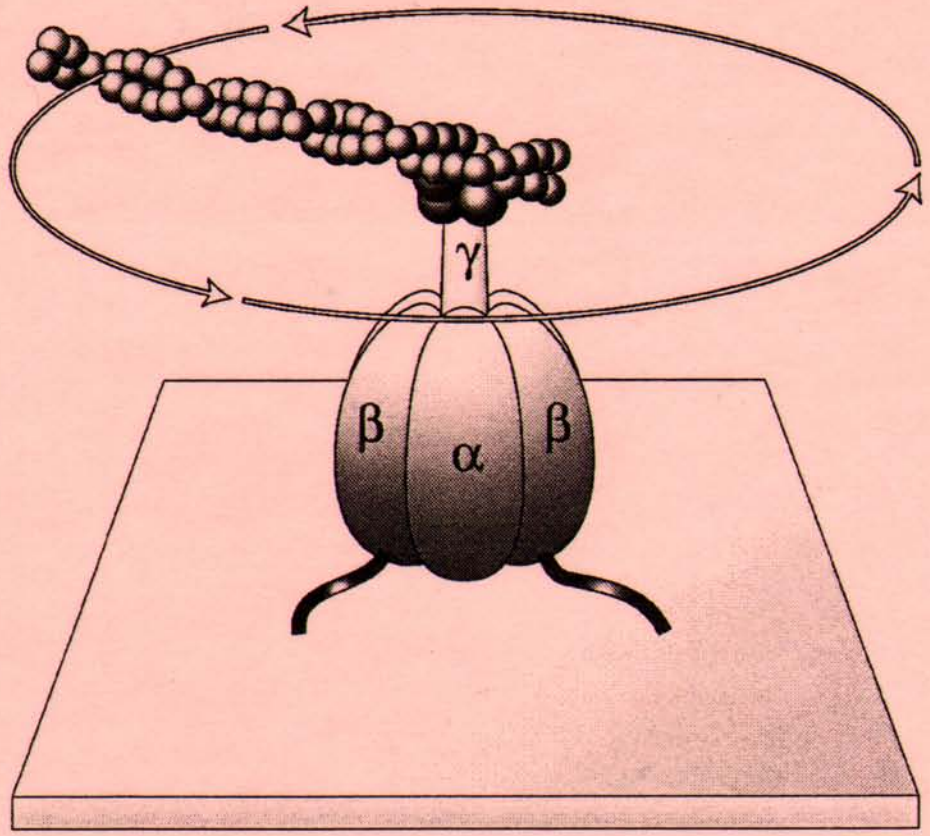
А. Н. Огурцов

БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ

Принципы и применение



Учебное пособие

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ,
МОЛОДЁЖИ И СПОРТА УКРАИНЫ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«Харьковский политехнический институт»

А. Н. Огурцов

БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ
Принципы и применение

Учебное пособие по курсам
«Молекулярная биофизика» и «Бионанотехнология»

для студентов направления подготовки «Биотехнология»,
в том числе для иностранных студентов

Утверждено
редакционно-издательским
советом университета,
протокол № 1 от 20.06.2012 г.

Харьков
НТУ «ХПИ»
2012

УДК 577
ББК 30.16
О 39

Рецензенты:

Ю.В. Малюкин, д-р физ.-мат. наук, проф., зав. отд. нанокристаллических материалов, зам. директора ИСМ НАН Украины

В.А. Карачевцев, д-р физ.-мат. наук, зав. отд. молекулярной биофизики ФТИНТ им. Б.И. Веркина НАН Украины

Посібник включає необхідні при вивченні молекулярної біофізики та біонанотехнології відомості про специфічні особливості будови та принципи функціонування, розробки та застосування нано- та біонаномашин відповідно до програми підготовки студентів напряму «Біотехнологія».

Призначено для студентів спеціальностей біотехнологічного профілю всіх форм навчання.

Огурцов А. Н.

О 39 Бионанотехнология. Принципы и применение : учеб. пособие / А. Н. Огурцов. – Х. : НТУ «ХПИ», 2012. – 480 с. – На рус. яз.

ISBN 978-617-05-0005-2

Пособие включает необходимые при изучении молекулярной биофизики и бионанотехнологии сведения о специфических особенностях строения и принципах функционирования, разработки и применения нано- и бионаномашин в соответствии с программой подготовки студентов направления «Биотехнология».

Предназначено для студентов специальностей биотехнологического профиля всех форм обучения.

Ил. 260. Табл. 1. Библиогр.: 92 назв.

УДК 577
ББК 30.16

ISBN 978-617-05-0005-2

© А.Н. Огурцов, 2012

Вступление

XX век был веком физики, электроники, атомной энергетики, космонавтики и телекоммуникацй. На рубеже тысячелетий в мире начал формироваться шестой технологический уклад, для которого характерно развитие робототехники, биотехнологий, основанных на достижениях молекулярной биологии и генной инженерии, нанотехнологии, систем искусственного интеллекта, глобальных информационных сетей, интегрированных технологических систем.

XXI век станет веком нанотехнологий, биотехнологий и информационных технологий. И именно бионанотехнология является результатом синергетического соединения этих трёх технологических направлений XXI века.

Бионанотехнология как одна из самых молодых технологических дисциплин в настоящее время переживает процесс своего становления. Стремительное развитие нанотехнологий требует изучения наномашин, во множестве присутствующих в любой биологической системе, поскольку именно в живой клетке находятся и очень эффективно функционируют природные молекулярные наномашины, на совершенствование конструкции которых природа потратила 3,5 млрд. лет эволюции. Молекулярные двигатели, сверхчувствительные рецепторы и наносенсоры, механизмы для репликации ДНК и синтеза белка, а также множество

других нанобиоустройств – всё это возникло уже в простейших клетках бактерий три миллиарда лет назад и с тех пор непрерывно совершенствовалось эволюционными механизмами естественного отбора. И сегодня, через миллиарды лет после возникновения жизни человечество начинает использовать в технике структурные и функциональные принципы, на которых построены биологические наномашины, и внедрять эти принципы в наноэлектронику, в наномедицину, в пищевые, сельскохозяйственные и экологические технологии.

Современный подход к изложению дисциплин "Молекулярная биофизика" и "Бионанотехнология" предусматривает обязательное изучение биотехнологических и молекулярно-биологических принципов, методов и способов манипуляции атомами и молекулами для решения нанотехнологических задач, а также механизмов создания структур и функциональных комплексов на атомно-молекулярном уровне с использованием биологических прототипов. Научную основу бионанотехнологии составляют физика и химия, биохимия и биофизическая химия, молекулярная биология, биоинформатика и молекулярная биотехнология.

Настоящее пособие подготовлено на основе исправленных и дополненных пособий [1–3] и адаптированных работ [4–92], послуживших также источником иллюстраций, таким образом, чтобы максимально облегчить усвоение принципов бионанотехнологии при изучении курсов "Молекулярная биофизика" и "Бионанотехнология" студентам направления подготовки 051401 "Биотехнология".

Раздел 1
Основания бионанотехнологии

Глава 1
Нанотехнология и бионанотехнология

1.1. Основные концепции

Нанотехнология (англ. *nanotechnology*) – это междисциплинарная область науки и техники, занимающаяся исследованием, анализом и синтезом, производством и применением продуктов с заданной (искусственно созданной) атомарной структурой путём *контролируемого манипулирования* отдельными атомами, молекулами и другими наномасштабными элементами или *наночастицами* размером 0,1–100 нм.

Размеры большинства *атомов* лежат в интервале от 0,1 до 0,2 нм.

Наночастица (англ. *nanoparticle*) – это изолированный твердофазный объект, имеющий отчетливо выраженную границу с окружающей средой, размеры которого во всех трех измерениях составляют от 1 нм до 100 нм.

Многие *биообъекты* можно классифицировать как наночастицы.

Бактерии, размер которых находится в интервале между 1 и 10 мкм, относятся к объектам мезоскопических масштабов.

Вирусы с размерами от 10 до 200 нм находятся в верхней части диапазона наночастиц.

Белки, характерные размеры которых лежат в диапазоне между 4 и 50 нм, находятся внизу нанометрового диапазона. Строительные блоки белков – 20 протеиногенных аминокислот, имеют размеры порядка 1 нм и также попадают в число бионанообъектов.

Нуклеиновые кислоты, и, прежде всего, ДНК как носитель генетической информации, являются полимерами, состоящими из мономеров-нуклеотидов. Молекула ДНК представляет собой двойную наноспираль диаметром 2 нм и шагом 3,4 нм, на который приходится 10 пар нуклеиновых оснований (*base pairs*, bp) (рисунок 1).

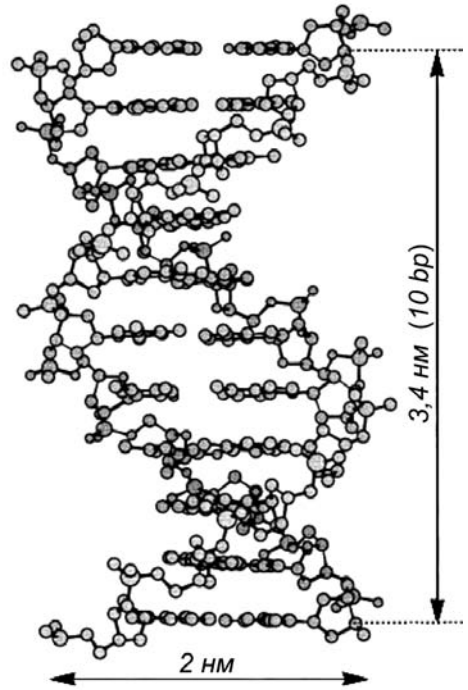


Рисунок 1 – Схема двойной спирали ДНК

Во многих источниках первое упоминание методов, которые впоследствии будут названы нанотехнологией, связывается с известным

выступлением Ричарда Фейнмана "There's Plenty of Room at the Bottom" (http://www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html) ("В атомном мире полно места"), сделанным им в 1959 году в Калифорнийском технологическом институте на ежегодной встрече Американского физического общества. Ричард Фейнман предположил, что возможно механически перемещать одиночные атомы, при помощи манипулятора соответствующего размера, по крайней мере, такой процесс не противоречил бы известным на сегодняшний день физическим законам.

Впервые термин "нанотехнология" употребил японский физик Норио Танигути (*Norio Taniguchi*) в 1974 году [70]. Он назвал этим термином производство изделий размером несколько нанометров. В 1986 году этот термин использовал американский инженер и популяризатор Эрик К. Дрекслер (*Eric Kim Drexler*) в своей книге: "Машины создания: Грядущая эра нанотехнологии" (*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*, http://e-drexler.com/d/06/00/EOC_Russian/eoc.html).

Два технологических подхода. Специфической особенностью нанотехнологий является способность (или умение) конструировать необходимые материалы или изменять форму материалов, манипулируя одиночными атомами, один за другим, по очереди.

Такой способ "сборки" объекта из атомов называют способом "*снизу вверх*" (*bottom-up approach*, или "от малого к большому"), когда объект собирается, ассемблируется из элементов, как дом из кирпичей.

Именно таким, иерархическим образом "собираются" биологические объекты из элементарных "кирпичиков" – аминокислот, нуклеотидов, моносахаридов – из мономеров синтезируются полимеры биомакромолекул; биомакромолекулы объединяются в макромолекулярные комплексы (такие, как рибосома); далее иерархическое ассемблирование идёт от субклеточных структур (цитоскелет, биомембраны, органеллы) к клеткам; Клетки объединяются в ткани и органы, из которых и формируется организм.

С другой стороны, абсолютное большинство технологий, используемых человеком для производства необходимого объекта, эксплуатируют *прямо противоположный подход* – берут "заготовку" и с помощью

различных инструментов и методов технологической обработки придают ей нужные свойства и форму – получают необходимую деталь, отсекая всё лишнее от заготовки.

Такой традиционный подход к "покорению" природы называют способом "*сверху вниз*" (*top-down approach*, или от большого к малому).

Вообще говоря, вся индустрия человечества использует природное сырьё и физически видоизменяет его для получения конечных продуктов. Даже в микроэлектронике, где устройства собираются из радиодеталей, материалы для производства полупроводниковых элементов, резисторов и конденсаторов всё равно получают путём последовательного обогащения исходной "руды".

Вплоть до средневековых алхимиков человечество и не пыталось манипулировать атомами в своих технологиях.

Химические технологии, которые были созданы в попытках алхимиков разгадать тайны бессмертия и превращения свинца в золото, действительно вооружили человечество способами "строительства" химических молекул атом за атомом, придавая им необходимую форму и заданные свойства.

Химические реакции идут на *атомном* уровне. Но большинство химических технологий эксплуатирует *статистические* термодинамические закономерности, которые реализуются только в больших объемах, когда правомерно использование термина *термодинамическая система*. Исходные вещества в "больших" количествах (больших – это означает, что речь идет о мóлях, а не о штуках атомов) смешиваются, реагируют, а затем необходимые продукты реакции выделяются из смеси, очищаются и используются.

Химия комбинирует атомы и функциональные группы и строит новые молекулы. Поэтому иногда возникает соблазн отнести химию к нанотехнологиям. Однако химия, как технология, оперирует в *макро* масштабах с *макро* объемами вещества, и химические технологии скорее *определяются статистической механикой*, нежели контролем за манипуляцией атомами в *нано* масштабах.

Наноассемблирование. XXI век характеризуется как время *нано*революции. Именно сейчас исследователи и технологи получили и необходимые знания, и нужные "инструменты" для *модификации* вещества "*поатомно*", атом за атомом, перемещая один единственный атом и конструируя молекулярные структуры по одному атому за операцию.

Поначалу предполагалось, что молекулярная нанотехнология может использовать привычные для человека методики: брать атом за атомом и "прижимать" эти атомы к нужным местам молекулы так, чтобы образовывались нужные химические связи. Такой *механосинтез*, требует, однако, сначала создать *ассемблеры*.

Ассемблер – это молекулярный механизм, созданный с помощью нанотехнологий, способный собирать из отдельных атомов заданные нанообъекты атом за атомом согласно некоторой программе. Если бы удалось создать такие ассемблеры, то (поскольку эти ассемблеры могли бы строить самих себя) предполагалось очень быстрое дальнейшее внедрение нанотехнологий во все сферы промышленности. Однако, ассемблеры, основанные на таком "механосинтезе", пока ещё не реализованы.

В то же время, *биологические клетки* располагают огромным множеством наномашин и использование как самих этих наномашин, так и отточенных тысячелетиями эволюции принципов их функционирования – это, возможно, наиболее реальный путь развития нанотехнологий в настоящее время.

Модифицируя биологические наномашины клетки или создавая на их основе новые наномашины, мы можем видоизменять функции этих машин, подстраиваясь под нужды конкретных технологий. И по мере того, как человек изучает все глубже устройство и принципы функционирования биологических систем клетки, растет и число применений биологических нанотехнологий.

Бионанотехнология (*bionanotechnology*) – это раздел нанотехнологии, в котором необходимые атомные перестройки осуществляются с использованием принципов, методов и способов, подсказанных биологией.

Бионанотехнология родственна *биотехнологии*, поскольку она дает возможность модифицировать на атомном уровне синтезируемые биотехнологические объекты.

Биотехнология. В широком смысле термин биотехнология применим к любому производству коммерческих продуктов, образуемых микроорганизмами в результате их жизнедеятельности. Более формально биотехнология определяется как *применение научных и инженерных принципов к переработке материалов живыми организмами с целью создания товаров и услуг*.

Исторически биотехнология возникла тогда, когда дрожжи были впервые использованы при производстве пива, а бактерии – для получения йогурта. Термин "биотехнология" был придуман в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупно-масштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки, биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты.

Однако это определение не получило широкого распространения и долгое время термин "биотехнология" относился главным образом к процессам промышленной ферментации. И только с 1961 года, когда научный журнал "*Journal of Microbiological and Biochemical Engineering and Technology*", специализировавшийся на публикации работ по прикладной микробиологии и промышленной ферментации, был переименован на "*Biotechnology and Bioengineering*", биотехнология оказалась чётко и необратимо связана с исследованиями в области промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов.

В конце XX века возникла новая отрасль биотехнологии – *молекулярная биотехнология* или *нанобиотехнология*.

Молекулярная биотехнология определяется как раздел науки и технологии, в которой используется перенос единиц наследственности (генов) из одного организма в другой, осуществляемый методами генной

инженерии (технология рекомбинантных ДНК). В большинстве случаев целью такого переноса является создание нового продукта или получение уже известного продукта в *промышленных* масштабах.

Известна точная дата начала молекулярно-биотехнологической революции. 15 октября 1980 г. на Нью-Йоркской фондовой бирже произошло знаменательное событие: уже через 20 минут после начала торгов стоимость одной акции биотехнологической компании *Genentech* поднялась с 35 до 89 долларов. Это был рекордный для того времени скачок цен на акции коммерческого предприятия. К моменту закрытия торгов в тот день цена одной акции *Genentech* составляла 71,25 доллара, а стоимость всех 528 тысяч акций была столь баснословно высока, что мелкие инвесторы, собиравшиеся приобрести небольшой пакет акций, не имели никаких шансов. В 1980 г., когда фирма *Genentech* впервые предложила обществу свои акции, это была небольшая компания в Калифорнии, в течение четырёх лет успешно работавшая над проблемой получения рекомбинантных ДНК. За два года до этого учёным компании удалось выделить фрагменты гена, кодирующие человеческий инсулин, и перенести их в генетические элементы (клонирующие векторы), способные реплицироваться в клетках обычной кишечной палочки (*Escherichia coli*). Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после соответствующей очистки мог использоваться как лекарственный препарат для больных диабетом. В 2008 году фирма *Genentech* уже имела объём продаж 9,2 млрд долл., объём НИОКР 1,8 млрд долл. и численность персонала 33,5 тыс. чел. (см. [14], п. 19).

Сегодня достижения компании *Genentech* тридцатилетней давности являются одной из рутинных лабораторных процедур, осуществляемых ежедневно в десятках тысяч лабораторий всех колледжей, университетов, исследовательских институтов и коммерческих фирм под общим названием *нанобиотехнология*.

Нанобиотехнология (*nanobiotechnology*), как и любая другая нанотехнология, оперирует теми биообъектами, которые относятся к наночастицам или наноструктурам, с целью такого видоизменения

организма, которое приводит к созданию нового продукта или получения уже известного продукта в промышленных масштабах. Молекулярная биотехнология, оперирующая единицами наследственности организмов – олигонуклеотидными фрагментами ДНК, в тех случаях, когда она манипулирует одиночными нанообъектами, является типичной нанобиотехнологией.

Кроме молекулярной биотехнологии к нанобиотехнологии относят совокупность передовых усовершенствованных биотехнологических методов и продуктов, которые включают разнообразные подходы и приёмы для создания более чувствительных и точных наносистем работающих в реальном времени, таких как "лаборатории на чипе" (*lab-on-chip*) и *наносенсоры* в промышленной биотехнологии, или, например, использование *наноупорядоченных матриц* для управляемого производства лекарств, инженерии и регенерации живых тканей в фармацевтической биотехнологии.

Бионанотехнология, спецификой которой является применение биомолекул и достижений биологии в нанотехнологии, отличается от *биотехнологии* тем, что в *бионанотехнологии* обязательным элементом является инженерное конструирование и сборка необходимых "конструкций" на наноуровне, а в *биотехнологии* не является необходимой информация об устройстве и функционировании используемых наномашин, а также отсутствует этап конструкторского дизайна биотехнологических "наноинструментов".

Биотехнолог просто использует уже готовые биосистемы либо селектирует нужное качество, не занимаясь целенаправленной перестройкой *нано*объектов на атомарно-молекулярном уровне.

Современная биотехнология возникла из исследования ферментативных процессов, самих природных ферментов, их структуры, функций, из попыток *улучшить параметры ферментов*, изменить их структуру. Всё это привело к появлению инженерной энзимологии, а *приёмы* модификации структуры ферментов вследствие изменения структуры генов были в дальнейшем *использованы* для модификации уже и целого организма в целом. При этом знание детальных, атомных,

подробностей строения как генов, так и кодируемых ими белков, вообще говоря, не было нужным. Просто комбинировались уже существовавшие функции и особенности для достижения технологической цели.

В настоящее время достигнут уже такой уровень совершенства аппаратуры и степени понимания происходящих процессов, что биотехнологи могут придумать бионаномашину, спроектировать её, а затем построить её (вырастить) атом за атомом согласно этому предварительному плану.

Следует отметить, что термины "нанобиотехнология" и "бионанотехнология" появились совсем недавно – первый в базе данных *MedLine* в 2000 году, а второй – в 2004 году. Первый термин встречается в четыре раза чаще второго, хотя, как станет ясно из дальнейшего изложения, во многих случаях было бы правильнее использовать именно термин "бионанотехнология".

1.2. Основные направления развития бионанотехнологии

На сегодняшний день методами бионанотехнологии построены *десятки искусственных бионаномашин*. Многие из них были созданы просто для проверки наших знаний и представлений о мире бионаномашин. Это, вообще говоря, игрушки, но, используя опыт, накопленный в ходе их создания и комбинируя этот опыт с теми "инженерными решениями", которые природа реализовала в живых клетках за миллиарды лет эволюции, можно предсказать, каких успехов можно ожидать от бионанотехнологии уже в ближайшем будущем.

Бионаномашины прекрасно приспособлены к работе в живой клетке, следовательно, их можно использовать для медицинских применений. Уже созданы сложные молекулы, которые ищут и находят больные или раковые клетки. Разрабатываются сенсоры для диагностирования болезней. Уже используется заместительная терапия искусственно синтезированными молекулами для лечения диабета и дефицита гормона роста. Например, первым продуктом одной из

крупнейших биотехнологических компаний *Amgen* был белок эритропоэтин (*erythropoietin*) (коммерческое название – EPOGEN®), который стимулирует образование эритроцитов. Управление США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) в 1989 году разрешило использовать этот препарат для лечения людей, и эритропоэтин стал одним из первых продуктов современной биотехнологии. Другие примеры нанобиотехнологических продуктов включают рекомбинантный человеческий инсулин, человеческий интерферон, человеческий и бычий гормоны роста, а также терапевтические антитела.

Производство терапевтических антител – сравнительно новая и весьма интересная область. Благодаря замечательным свойствам аффинности и специфичности, такие антитела останавливают патологические процессы в организме, действуя исключительно направленно и не затрагивая лишнего. Так, совсем недавно были разработаны гуманизированные рекомбинантные моноклональные антитела, связывающие и ингибирующие биологическое действие фактора роста эндотелия сосудов, (коммерческое название – AVASTIN™). Лечение этим препаратом значительно повышает шансы на выздоравливание у пациентов с вторичной карциномой толстой кишки, не излечимой методами обычной химиотерапии.

Особое место занимает человеческий интерферон – белок, играющий ключевую роль в ответе человеческого организма на вирусную инфекцию, и человеческий гормон роста – важный регуляторный белок, обеспечивающий нормальный рост детей и подростков.

Многие другие белки исследуются в настоящее время с целью их применения в качестве лекарств. Один из факторов, ограничивающих распространение лекарств, основанных на белках и пептидах, – это невозможность их перорального приёма. В отличие от большинства низкомолекулярных лекарств, которые можно принимать в виде таблеток и сиропов, белки и пептиды обычно разрушаются в пищеварительном тракте. Поэтому белковые и пептидные препараты, подобные описанным выше, вводят исключительно с инъекциями, что сложно делать

самостоятельно. Решить эту важную проблему возможно с использованием нанотехнологий. Так, для безболезненного подкожного введения биомолекулярных лекарств можно использовать матрицы из сотен и тысяч крошечных наношприцев. Другой пример – использование наноносителей. В частности, исследуются носители, которые транспортируют лекарство через начальные отделы пищеварительного тракта, но освобождают его только в кишечнике. Также изучаются наноносители, способные преодолевать гематоэнцефалический барьер и доставлять лекарственные пептиды для лечения опухолей мозга и различных нейродегенеративных заболеваний. Наноносители могут создаваться путем самосборки из материалов биологической (таких как пептидные наносферы, или липидные липосомы) или небиологической природы (таких как мицеллы амфифильных молекул).

Основная задача диагностической биотехнологии – обнаружение и количественное определение биологических материалов биохимическими методами, такими как иммунохимический анализ, ферментативные реакции, а также с помощью РНК- и ДНК-технологий. Применение наносборок и наноконструкций позволит значительно повысить чувствительность и специфичность подобных диагностических методов.

В список нанотехнологических продуктов для диагностики, основанных на иммунохимическом анализе, входят тест-полоски для определения беременности (они содержат антитела, выявляющие малейшие следы человеческого гормона, называемого хорионическим гонадотропином (*chorionic gonadotropin*, hCG)). Другими примерами служат наборы для выявления ВИЧ и гепатита.

Эффективность диагностики повышается за счёт высокой аффинности и специфичности, присущих молекулярному узнаванию. Разобравшись в устройстве и принципах работы биологических молекулярных "меток" и их "детекторов", обеспечивающих молекулярное узнавание, в дальнейшем можно эффективнее использовать принцип узнавания для решения различных задач диагностики. Повышение чувствительности таких методов позволит при диагностике использовать намного меньшее количество образца. Например, для определения

ключевых биологических показателей содержания глюкозы будет достаточно совсем маленькой капли крови – объем крови реально уменьшить с нескольких микролитров до нанолитров. Это уменьшит неприятные ощущения при заборе крови для определения уровня глюкозы. Фантазируя дальше, можно вообразить наноустройство, измеряющее содержание глюкозы в крови с помощью электрохимической реакции и чипа с наноэлектродами, соединенного с системой автоматического дозирования, выделяющее в кровь инсулин согласно заданной программе. Такое наноустройство могло бы заменить некоторые функции поджелудочной железы, которые она теряет при остром (тип I) или хроническом (тип II) диабете.

Человечество на протяжении всей своей истории использует *биоматериалы* – изделия из дерева, хлопка, шерсти – жилища, мебель, одежда, книги. Биоматериалы экологически более приемлемы – они одновременно и прочные, и могут быть достаточно легко утилизируемы посредством биодеградации. Биоматериалы прекрасно совместимы с живыми тканями, следовательно, они идеальны для медицинских применений.

Комбинация биологических машин с неорганическими конструкциями, например, светочувствительных белков или антител с кремниевыми микрочипами, позволяет создавать *гибридные устройства*, которые выполняют функцию интерфейса между миром бионаномашин и макромиром компьютеров и электроники, и проектировать сенсорные системы, позволяющие регистрировать, реагировать и управлять событиями на *нано*уровне. Использование биомолекул (таких как ДНК и белки) для создания металлических наноструктур – одна из задач бионанотехнологии. Подобные структуры могут быть использованы в компьютерах и других устройствах будущего, не связанных напрямую с биологией.

Нанотехнология определяется как технология конструирования, манипулирования деталями и создания новых структур в масштабах нанометров с атомной точностью. Наиболее адекватно суть нанотехнологии отражает название "молекулярная нанотехнология". Так, например,

нанотехнологи сейчас успешно манипулируют заданным атомом (например, атомом аргона), перемещая его в заданном направлении на заданное расстояние по поверхности кристалла (например, по кристаллу кремния). В будущих бионанотехнологиях инструменты из олигонуклеотидов ДНК, пептидных нанотрубок и белковых фибрилл могут использоваться для сборки в наноконструкции металлических нанопроводников и других наноэлементов для нужд наноэлектроники и наноэлектрохимии.

Биология обеспечивает технолога машинами, которые манипулируют единичными атомами, поэтому ожидается, что бионаномашины смогут подобным образом "строить" макрообъекты, которые совершенно не свойственны естественными (природным) системам.

Молекулярное узнавание в биологических системах имеет огромное значение для реализации принципов самосборки в нанотехнологии. Биомолекулы и надмолекулярные комплексы представляют собой естественные строительные блоки, готовые "опознающие модули" (*recognition modules*) и целые системы (например, рибосома или комплекс инициации транскрипции). И даже более высоко организованные структуры, такие как вирусы животных и растений и бактериофаги (вирусы бактерий) состоят из нанокомпонентов. Сборкой структур по принципу *bottom-up* может управлять биологическое узнавание, характерное, например, для специфичных антител. Благодаря высокой специфичности и спонтанности их образования, мультимолекулярные сборки из биомолекул могут служить "умными каркасами" (*smart scaffold*) для "автоматического" монтажа сложных органических и неорганических наномашин и наноинструментов.

Таким образом, практическое использование биологических систем и достижений биотехнологии идёт в двух главных направлениях (рисунок 2).

Бионанотехнология решает различные задачи, в том числе не связанные с биологией, с помощью сборок из биомолекул. В этом случае роль биологических компонентов заключается главным образом в их специфичности, разнообразии и способности к образованию сложнейших

структур из относительно простых строительных блоков. Биология может предоставить уникальные инструменты, которые пока невозможно получить другим способом. В качестве примера можно привести метод молекулярной литографии, когда белки размером несколько нанометров служат защитным слоем при создании золотых проводников на молекулах ДНК. Среди других направлений – создание новых материалов, обладающих уникальной жёсткостью, особенными химическими свойствами поверхности и другими физико-химическими параметрами, которые могут оказаться полезными для автомобильной и космической индустрии или для производства обычных потребительских товаров.

Рисунок 2 – Инструменты бионанотехнологии и нанобиотехнологии

Нанобиотехнология решает биологические задачи с помощью достижений нанотехнологии. Применяемые для этой цели наноструктуры могут быть построены вовсе без биомолекул, а, например, только из кремниевых ("*lab-on-a-chip*") или углеродных наноструктур (подложки из углеродных нанотрубок для тканевой инженерии). Использование нанотехнологии может произвести переворот в биотехнологии, открыв возможности для ранней диагностики заболеваний, мониторинга

медицинских процедур в реальном времени и выращивания тканей в пробирках.

Несмотря на различия между бионанотехнологией и нанобиотехнологией, во многих случаях происходит объединение этих технологий. Например, биомолекулярные структуры, образовавшиеся путем самосборки, могут служить в тканевой инженерии как трехмерные матрицы при выращивании сложных органов "в пробирке". Нанокаркас (*nano-scaffold*) из биомолекул может обладать уникальными свойствами – биосовместимостью и возможностью размещать на нём биологические сигнальные молекулы. И хотя биологические наносборки играют роль неорганических каркасов, но они, в то же время, обладают уникальными свойствами быть связующим звеном (т. е. активно участвовать) в биологических сигнальных каскадах, а если на них размещать ферменты и антитела, то они могут, в принципе, даже усиливать биологические сигналы.

1.3. Бионаномашины

Когда вы читаете этот текст, около десятки тысяч различных наномашин работают в вашем теле. Каждая из этих наномашин собрана безошибочно с атомной точностью.

Тело человека возможно наиболее сложный механизм во вселенной, причём абсолютное большинство процессов и действий происходит в нем на наноуровне. *Идеальная кооперация этих наномашин* обеспечивает все процессы жизнедеятельности – питание и дыхание, рост и залечивание повреждений, восприятие внешних сигналов и реакцию на них, энергетическую самодостаточность и размножение.

Примечательно, что многие из этих наномашин продолжают нормально работать, осуществляя свои наноатомные функции, *если их изъять из организма*, из его клеток. Каждая из них является *самодостаточным* молекулярным механизмом. Эти наномашины уже используются человеком. Такие пищеварительные ферменты как *пепсин* или *лизозим* (лизоцим) устойчивы настолько, что их добавляют к моющим

средствам для удаления пятен. *Амилазы* используются в промышленности для преобразования порошка крахмала в сладкий раствор глюкозы (кукурузный сироп).

Все *технологии в генной инженерии* и биотехнологии обеспечиваются имеющимся на рынке набором наномашин, которые манипулируют ДНК – разрезают, сшивают, удаляют и вставляют фрагменты и т. д. Как правило, природные бионаномашины удивительно прочные и надежные.

Природные бионаномашины во многом *отличаются* от машин привычного нам макромира.

1. Природные бионаномашины были созданы *в результате эволюции*, а не в результате работы конструкторов, инженеров и дизайнеров, а это наложило необычные ограничения на процесс эволюционной "разработки" и форму конечного "продукта" – бионаномашину.
2. Природные бионаномашины в теперешнем виде были созданы эволюцией для выполнения своих задач *в чрезвычайно специфической окружающей среде*, в условиях активного действия особых, необычных для нашего макромира сил со стороны этого окружения.

Необходимо помнить об этих особенностях и исследуя принципы устройства и функционирования природных бионаномашин, и пытаясь использовать природные бионаномашины в качестве прототипа, отправной точки при конструировании собственных искусственных бионаномашин в конкретной области применения бионанотехнологии.

Принципы и подходы "машиностроения" в естественных биологических системах существенно отличаются от всего, что характерно для машиностроительных технологий инженерного *макро*мира человека.

Природные биомолекулы имеют невероятно *сложную внешнюю поверхность*, совершенно не похожую на изящные обводы кухонных комбайнов или самолётов. Они работают *в активном*, если не сказать, агрессивном, *внешнем окружении*, которое постоянно раскачивает, тянет

и толкает части бионаномашин. (Парусный корабль в штормящем море или понтонная переправа в шторм – вот примеры такого взаимодействия с активной внешней средой). Компоненты бионаномашин связаны между собой *сложным набором* взаимодействий (связывающих и антисвязывающих). В своем наномире бионаномашины практически *не ощущают* силы *гравитации* и *инерции*, хотя именно эти силы являются доминирующими в мире макромашин.

Мир бионанотехнологии – это необычный, быстроменяющийся, движущийся мир в котором действуют *совсем другие правила и законы*, чем в привычном нам макромире.

Гравитация и инерция. Для макроскопических объектов, таких как велосипеды и мосты, масса является определяющим свойством, диктующим логику инженерных расчетов.

Для устройств с характерными размерами *в диапазоне от метра до сантиметра* такие физические свойства, как трение, сила упругости, сцепление, напряжение растяжения и сдвига – являются соизмеримыми по амплитуде с воздействиями гравитации и инерции.

Переходя в любую сторону, либо к более крупным, либо к более мелким объектам, такой баланс сил будет *нарушаться*.

При *увеличении* размера объектов, масса их растет пропорционально кубу размера, в то время как жёсткость и сила трения пропорциональны квадрату размера. Такой опережающий рост инерционных или массовых свойств объекта приводит, например, к ограничению размера зданий. Нет таких конструкционных материалов, которые выдержали бы собственный вес небоскреба высотой в километр.

Масштабируя объекты в обратном направлении – в сторону *уменьшения* размера мы получим обратную ситуацию. Объекты размером в микрометр (микропесчинки, отдельные клетки) взаимодействуют между собой совсем иначе, чем макрообъекты в привычном нам макромире. *Инерция* больше *не является заметным фактором*. Это зачастую противоречит нашим интуитивным представлениям.

Например, *движение бактерий* обеспечивается вращением жгутика. На первый взгляд, если вращение жгутика прекратится, то бактерия

должна ещё некоторое время двигаться по инерции, как движется корабль после остановки гребного винта. Однако, поскольку инерция убывает с уменьшением размера объекта гораздо быстрее сил вязкости в воде, бактерия останавливается, проплыв по инерции расстояние *меньше атомного радиуса*, то есть, практически сразу.

Гравитационными силами тоже можно пренебрегать, рассматривая *микро-* и *нано*объекты. Движение таких объектов определяется их взаимодействием с окружающими молекулами, которые толкают их со всех сторон. Так микропылинки в воздухе не опускаются на пол, а находятся во взвешенном состоянии. А в микроскоп можно наблюдать броуновское движение мелких частичек в водном растворе. Силы притяжения между мелкими объектами также превышают гравитационные силы. Именно поэтому мелкие насекомые ходят по стенам и потолку, а мелкие капли росы висят на кончиках листьев и не падают.

Атомная гранулярность (дискретность). Наноразмерные объекты построены из дискретной комбинации целого числа взаимодействующих между собой атомов. Поэтому представление о непрерывном изменении некоторого пространственного параметра неприменимы к наномиру.

Так, например, вращение ротора *нано*размерного двигателя уже нельзя представлять как непрерывный процесс, поскольку по периметру ротора расположено фиксированное число атомов или их комбинаций в виде молекулярных доменов. Вращение такого ротора (как, например, в случае АТФ-синтазы или мотора бактериального жгутика) – это последовательное перемещение между дискретными положениями – *повороты на дискретные углы*. Это не плавное вращение, а *скачки* ротора из одного положения в другое, в том случае, когда на ротор действует "порция" энергии достаточная для такого перескока. При этом, несмотря на такую атомную гранулярность, в нанотехнологии *все равно используют понятия ось вращения и точка опоры или подвеса* для теоретического описания процессов механического движения.

Из-за атомной гранулярности в бионанотехнологии неприменимы обычные континуальные представления, используемые в инженерии. Такие макроскопические коллективные свойства как *вязкость и трение*

не определены для дискретных наборов атомов. Вместо них следует использовать индивидуальные свойства каждого атома и взаимодействия между атомами по законам квантовой механики.

Квантовомеханические задачи для биомакромолекул невозможно решить точно, но, к счастью, большинство основных свойств бионаносистем можно *оценить качественно*, используя упрощающие предположения. Прежде всего, используется *представление о ковалентных связях,* с помощью которых атомы объединяются в стабильные молекулы определённой геометрии. Затем используют несколько типов взаимодействий атомов не связанных ковалентно – стерическое отталкивание несвязанных атомов, электростатические взаимодействия, водородные связи. Вообще говоря, биомолекулы могут быть представлены как сочлененные цепочки атомов, которые (атомы) взаимодействуют между собой всего несколькими вполне определёнными типами взаимодействий.

Тепловое движение и диффузия в наномире. Молекулярная *нано*технология (не био-) стремится создать "индустриальную среду" (*machine-phase environment*) или машинную фазу вещества (*machine-phase matter*, см. п. 13.6), в которой отдельные наномашины организованы в конвейеры образуя *микро-* и *макро-* объекты. Взаимодействие бионаномашин в природе организовано иначе – сначала отдельные бионаномашины синтезируются с высокой точностью, а затем они помещаются в нужное место клетки. Различные бионаномашины находят друг друга в результате случайных блужданий и диффузии. Искусственно, конечно, можно создать "индустриальную среду", но абсолютное большинство своих функций в клетке бионаномашины выполняют именно находя друг друга в процессе *диффузионного* движения в результате случайных блужданий. Бионаномашины функционируют в "хаотическом" окружении. Они постоянно "бомбардируются" молекулами воды. Они рассеиваются случайным образом, если они не зафиксированы в каком либо месте клетки.

Молекулярные комплексы. Бионаномашины работают, образуя *комплексы* с другими бионаномашинами, объединяясь и разъединяясь в

ходе работы. Если две молекулы имеют комплементарные поверхности (геометрическое соответствие) и комплементарные (взаимно дополняющие) химические группы (химическая комплементация) на этих интерфейсных, стыковочных поверхностях, то образующийся комплекс будет существовать долгое время.

Если взаимодействия *не столь сильные*, то комплекс будет образован на непродолжительное время, после которого компоненты комплекса снова отправятся в самостоятельное "блуждание". Изменяя "конструкцию" таких взаимодействующих (интерфейсных, стыковочных) поверхностей, бионаномашины могут образовывать и стабильные молекулярные каркасы, существующие годами, и нежные биосенсоры, чувствительные к наличию одиночных молекул в системе.

Клетки устроены сложно, они состоят из миллионов различных белков, поэтому возникает естественный вопрос, может ли диффузионное движение обеспечить взаимодействие между заданной парой молекул в таком термически хаотической системе, которой является клетка. Оказывается, что в масштабах клетки диффузионное движение *чрезвычайно эффективно*. Если ввести определённый белок в бактериальную клетку, то уже через *одну сотую секунды*, он может оказаться в любой точке клетки. Если разместить две разные молекулы в противоположных частях клетки, то уже через секунду они провзаимодействуют.

Справедливо следующее утверждение: *В клетке размером микрометр любые две молекулы встречают друг друга каждую секунду.*

Водная среда. Форма и функции биомолекул определяются двумя основными факторами:

1) химическими особенностями атомов, из которых состоит биомолекула;
2) особыми, *не обычными свойствами водной среды*, в которой функционирует биомолекула.

Энергетика этого взаимодействия существенно отличается от всего того, к чему мы привыкли в нашем макроскопическом мире.

Вода является необычной субстанцией со специфическими особенностями.

Молекулы воды достаточно сильно связаны друг с другом через водородные связи, которые разрываются только если возможно другое, более энергетически предпочтительное взаимодействие.

Те участки биомолекул, на которых повышена электронная плотность, или те, на которых много атомов кислорода или азота, более предпочтительно взаимодействуют с молекулами воды. Эти участки легче растворяются в водном растворе.

Те участки биомолекул, которые богаты атомами углерода, не способны участвовать в образовании водородных связей, альтернативных водородным связям между молекулами воды. Такие участки стремятся объединиться в отдельную фазу, минимизируя контакт с водой.

Это явление называется "гидрофобный эффект", а сам термин *гидрофобность* (водобоязнь) отражает тот экспериментальный факт, что атомы углерода "избегают" контакта с водой. Гидрофобные взаимодействия оказывают сильное воздействие на то, какую форму будет иметь биомолекула, и какие функции будет она выполнять.

Собственная *геометрия молекулярной цепочки* (вне водной среды) позволяет реализоваться огромному числу конформаций. Причём та конформация, которая является биологически функциональной, возникала бы (случайным образом) слишком редко, чтобы иметь значение для формирования и эволюционирования организмов.

Однако помещённая в водную среду, биомолекулярная цепь сворачивается так, чтобы гидрофобные участки сблизились и оказались внутри биомолекулы, а на поверхность биомолекулы "выталкиваются" те, гидрофильные, участки молекулярной цепи, которые активнее взаимодействуют с водой.

- **Белки**. У белков полипептидная цепочка чаще всего сворачивается в компактный клубок (глобулу).
- **ДНК**. У ДНК уотсон-криковские пары располагаются внутри спирали, а заряженные фосфаты обращены наружу, к воде.

- **Липиды**. В случае липидов индивидуальные молекулы "выталкиваются" из воды и образуют отдельную фазу – биомембрану, в которой гидрофобные хвосты липидов находятся между двумя слоями гидрофильных головок.

Единственность. Если биомолекула "спроектирована" правильно (а это именно так в случае природных биомолекул), то в результате фолдинга формируется только одна (единственная) структура, образуя *нано*размерную машину, конформация которой идеально приспособлена к выполнению функции этой наномашины.

Контрольные вопросы и задания

1. В чём сходны и чем различаются биотехнология и бионанотехнология?
2. В чём сходны и чем различаются нанотехнология и бионанотехнология?
3. Какие элементы молекулярной нанотехнологии включает в себя бионанотехнология?
4. Какие элементы молекулярной биотехнологии включает в себя бионанотехнология?
5. Перечислите основные направления развития бионанотехнологии.
6. В чём заключается отличие бионаномашин от макромеханизмов?
7. Как изменяется влияние гравитации и инерции в наномире?
8. Что такое атомная гранулярность и каково её значение для функционирования природных бионаномашин?
9. В чём состоит специфика влияния теплового движения и диффузии в наномире?

Глава 2
Специфика бионаномашин

2.1. Особенности строения биогенных макромолекул

Четыре основных типа молекулярных структур были отобраны миллиардами лет эволюции для формирования всех биоструктур всех биообъектов, существующих сегодня.

Современные клетки практически для всех задач используют

1) белки;
2) нуклеиновые кислоты;
3) полисахариды;
4) липиды.

Некоторые другие небольшие молекулы также специально синтезируются для определённых нужд, но постоянная, ежедневная жизнедеятельность клетки осуществляется именно этими четырьмя типами молекул.

Конечно, в бионанотехнологии никто не требует оставаться в границах только этих четырёх типов молекул. Однако прежде чем конструировать нечто новое, следует как можно полнее использовать все те наработки, которые сделаны эволюцией за миллиарды лет истории биосферы.

Более того, логично использовать тысячи уже существующих и эффективно работающих бионаномашин в качестве исходного *прототипа*, изменяя который, мы можем создать наномашины для решения нашей частной нанотехнологической задачи.

Белки. *Белки наиболее многоцелевые объекты из четырёх основных типов биомолекул.* Белки используются в создании наномашин, наноструктур и наносенсоров с различными функциями.

Важное качество белков – их *модульность*.

Они организованы как линейная цепь аминокислот, которая свернута в определённую структуру (рисунок 3).

Рисунок 3 – Схема аминокислотной цепи, которая сворачивается в компактную глобулярную структуру (находится в процессе белкового фолдинга)

Самая длинная из известных в настоящее время белковых цепей – аминокислотная последовательность белка *титина* – имеет более 26 000 аминокислот. С другой стороны существуют пептиды длиной порядка *десяти* аминокислот – *гормоны*, которые используются для клеточной сигнализации. *Средние* же *размеры* тех водорастворимых белков, чья концентрация в цитозоле клеток максимальна, составляет 200–500 аминокислот.

Аминокислоты состоят из центрального атома α-углерода с *тремя* боковыми группами: аминогруппа, карбоксильная кислотная группа, боковая группа (аминокислотный остаток).

Существует двадцать разных боковых групп и, соответственно, двадцать стандартных аминокислот. На рисунке 4 представлены схемы этих аминокислот.

Каждая аминокислота присоединяется *пептидной связью* между аминогруппой и карбоксилом последующей аминокислоты в цепи.

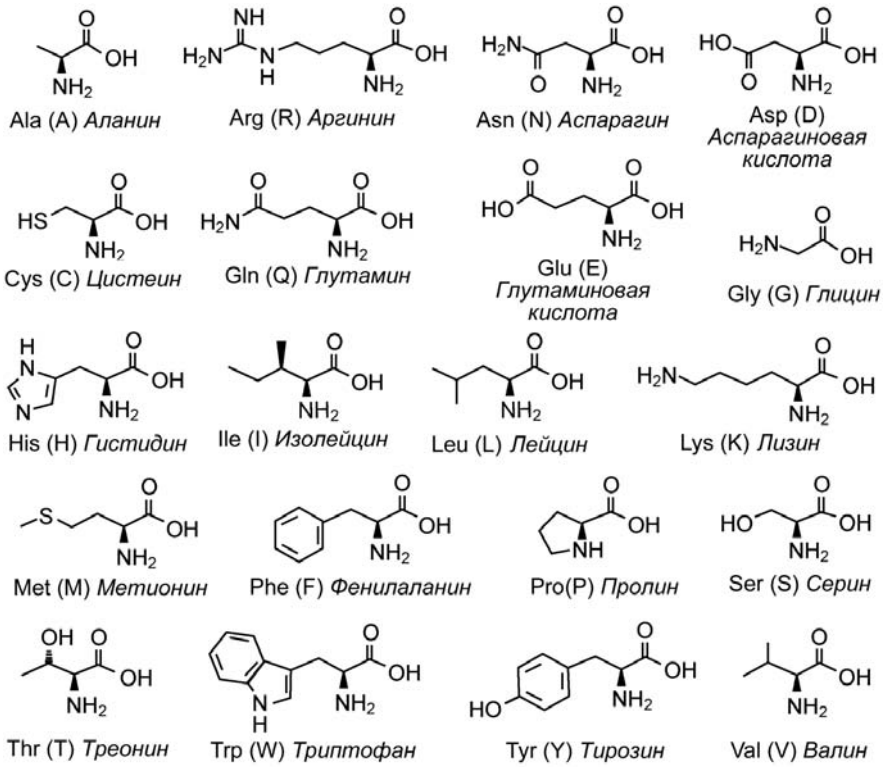


Рисунок 4 – Стандартные аминокислоты

Пептидная связь является *жёсткой*, причём *четыре атома*, её образующие (H–N–C=O), лежат *в одной плоскости*. В результате образования пептидной связи группа H–N становится потенциальным *донором* водородной связи, а группа O=C – её *акцептором*. Поэтому эти группы участвуют в образовании внутримолекулярных водородных связей, формирующих α- и β-структуры и в процессах межмолекулярной агрегации белков.

Периодичность чередования пептидных связей существенным образом *определяет геометрию* образуемых белковых структур. Именно свойства периодичности пептидных связей в аминокислотной цепи и то, каким образом располагаются наружу белковой цепочки атомы водорода

и кислорода, определяют только *ограниченное количество стабильных конформаций* белковой цепи.

В частности, две конформации, представленные на рисунке 5, являются стабильными. В них сочетается *минимальность* длины цепи с *максимальностью* числа водородных связей между атомами разных пептидных групп.

Первая конформация – это α-*спираль* (рисунок 5(б)). Цепь свернута в спираль таким образом, что каждый кислород пептидной группы образует водородную связь с атомом водорода пептидной группы, расположенной через три аминокислоты от данной.

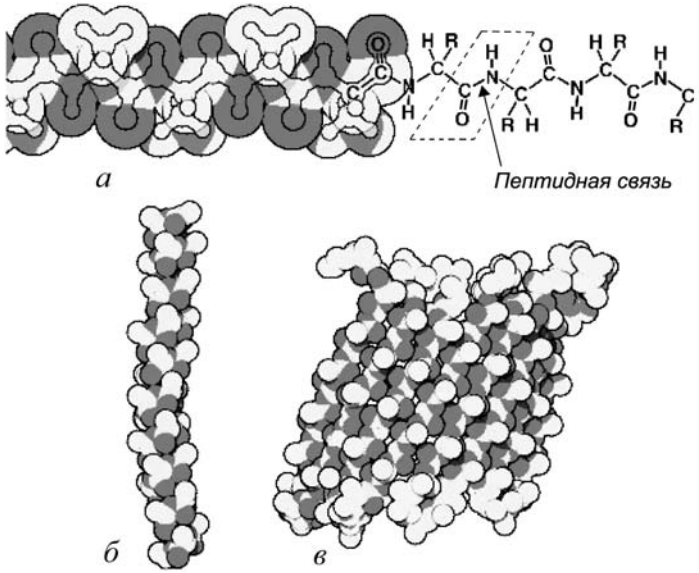


Рисунок 5 – Строение белковых структур: *а* – первичная структура белковой цепи; *б* – α-спираль; *в* – β-структура

Вторая конформация – это β-*структура*, образованная несколькими, расположенными параллельно, цепями (рисунок 5(в)). Каждая из цепей вытянута ровно, а стабильность всей β-структуре обеспечивают водородные связи между цепями.

Разнообразие химических свойств различных боковых цепей аминокислот обеспечивают те *преимущества белков как строительного материала*, которые объясняют использование белков для реализации разнообразных функций.

Двадцать стандартных (протеиногенных) аминокислот, которые используются в биосинтезе белка, отличаются как химически, так и структурно. Комбинируя эти аминокислоты можно добиться как *желаемой формы* белковой глобулы, так и того, чтобы данная глобула *была устойчивым образованием*. Кроме того, необходимые для реализации той или иной биохимической реакции боковые группы могут быть размещены в необходимых местах белковой цепи.

Аминокислоты *глицин и пролин* (рисунок 6) выполняют *специфические структурные функции* при "строительстве" белковой глобулы.

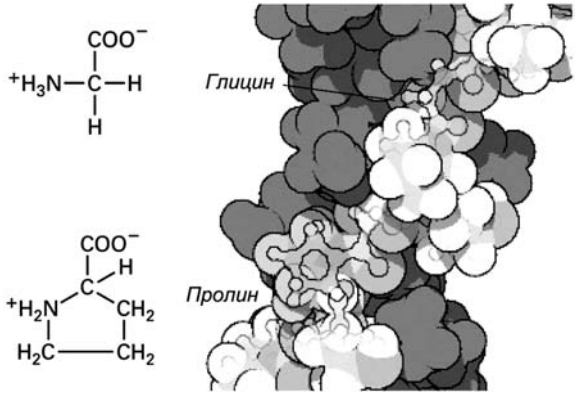


Рисунок 6 – Структурные особенности глицина и пролина

Глицин это самая маленькая аминокислота, не имеющая бокового радикала. Вследствие этого полипептидная цепь в том месте, где расположен глицин, более лабильна. Глицин используется в тех местах белковой цепи, которые для достижения наиболее плотной конформации должны быть максимально изогнуты, и там, где другие аминокислоты просто не поместились бы вследствие плотной упаковки окружающих

атомов, как это имеет место, например, в случае плотного тройного спирального жгута *коллагена*, изображенного на рисунке 6.

Пролин является единственной циклической аминокислотой (точнее, пролин – это иминокислота), у которой радикал присоединен к полипептидной цепи *двумя* ковалентными связями (CH_2–$^{\alpha}C$ и CH_2–N). Пролин формирует *жёсткий изгиб* (*кинк*) в белковой цепи. В коллагене такие кинки обеспечивают формирование тугой тройной белковой спирали.

Аминокислоты *аланин, валин, лейцин* и *изолейцин* являются *неполярными алифатическими* аминокислотами, боковые цепи которых насыщены углеводородными группами и различаются формой и размером (рисунок 7).

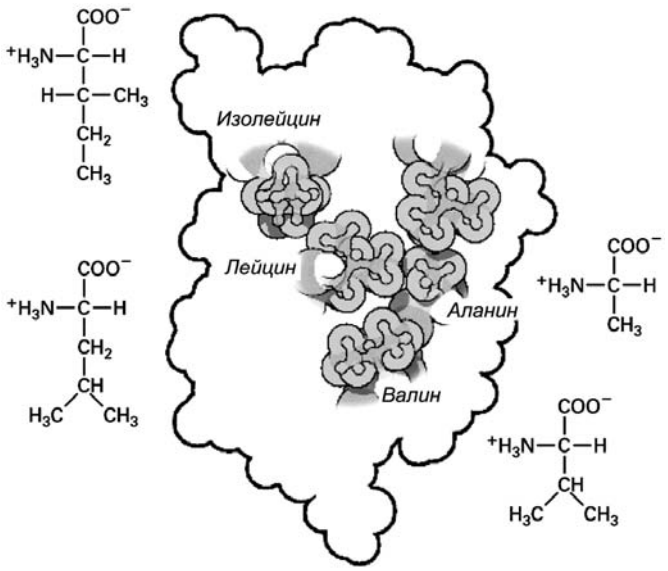


Рисунок 7 – Структурные особенности изолейцина, лейцина, аланина и валина

Эти аминокислоты обеспечивают *относительную жёсткость*, негибкость полипептидной цепи и являются *сильно гидрофобными*. Зачастую именно наличие этих гидрофобных аминокислот обеспечивает фолдинг белковой цепи. На рисунке 7 изображено положение этих

аминокислот внутри глобулы *инсулина*, образуя плотно упакованный кластер внутри белка.

Хотя можно представить себе большое количество других подобных гидрофобных аминокислот, отличающихся числом и расположением углеводородных групп, но *только эти четыре* аминокислоты кодируются генетически в естественных биосистемах.

Аминокислотные остатки *фенилаланина*, *тирозина* и *триптофана* содержат *ароматические* группы (рисунок 8).

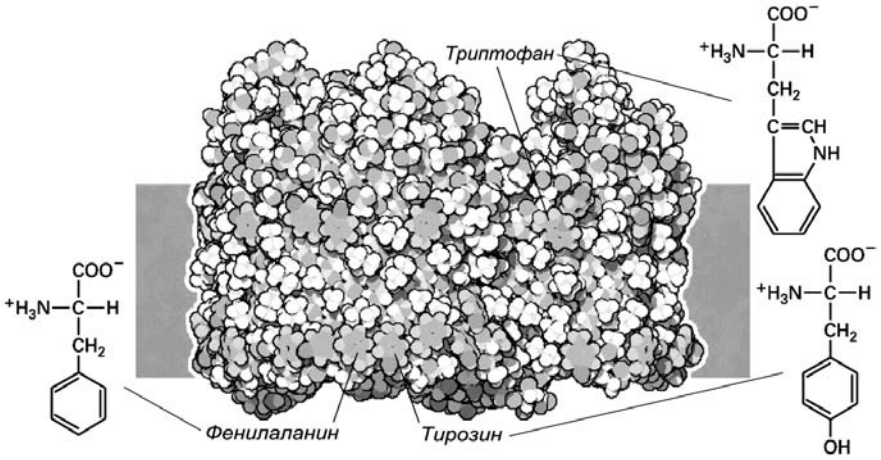


Рисунок 8 – Структурные особенности фенилаланина, тирозина и триптофана

Так же как и в случае алифатических аминокислот эти аминокислоты являются *гидрофобными* и также обеспечивают фолдинг белковых цепей. Ароматические кольца этих аминокислот вследствие *стэкинга* часто располагаются *стопкой* друг над другом или над основаниями ДНК (также имеющими циклическую структуру) и используются для обеспечения *специфичности* участков связывания данного белка с другими белковыми молекулами или нуклеиновыми кислотами.

Тирозин кроме ароматического кольца имеет ещё и *гидроксильную* группу. Этим обеспечиваются его особые свойства, которые исполь-

зуются для обеспечения взаимодействия с малыми органическими молекулами. Активные центры, в которых присутствует тирозин, одновременно могут и связываться с гидрофобными участками лигандов, и образовывать водородные связи с лигандами. На рисунке 8 представлена схема молекулы *бактериального порина*, погруженного в липидную мембрану. Мембрана изображена на рисунке схематически в виде серого прямоугольника. Ароматические аминокислоты расположены по периметру порина, образуя целые зоны на поверхности белка, которые взаимодействуют с гидрофобной внутренней областью биомембраны.

Аминокислотные остатки *серина*, *треонина*, *гистидина*, *аспарагина* и *глутамина* участвуют в образовании *водородных связей*. Эти аминокислоты, как правило, располагаются на поверхности белковой глобулы, где они взаимодействуют с окружающей водой (рисунок 9).

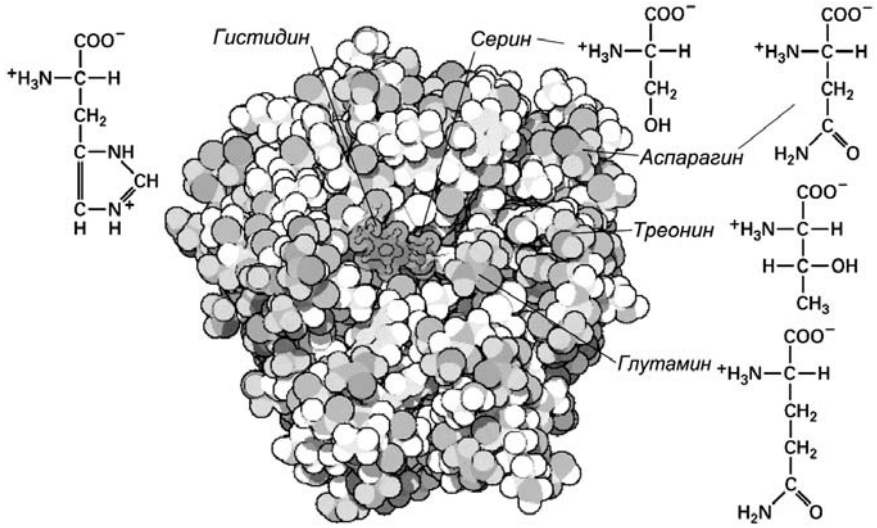
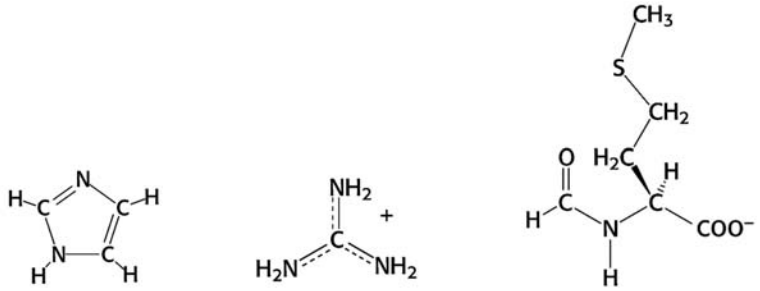


Рисунок 9 – Структурные особенности гистидина, серина, аспарагина, треонина и глутамина

Серин, треонин, аспарагин и глутамин часто используются для соединения белковых структур между собой и для формирования

специфических взаимодействий с другими молекулами. *Гистидин* выполняет *особые* функции. Он содержит *имидазольную* группу, которая может принимать заряженную или нейтральную формы в слегка отличающихся условиях (рисунок 10(а)).



а *б* *в*

Рисунок 10 – Структурные схемы: *а* – имидазол; *б* – гуанидин; *в* – формилметионин

В нейтральной форме в гистидине сочетаются одновременно и электрофильный протонированый *вторичный азот*, который может быть *донором* водородной связи, и сильно нуклеофильный *третичный азот*, который может быть *акцептором* водородной связи.

Гистидин не часто используется в белках. Главным образом он участвует в формировании специализированных *каталитических активных центров* ферментов. Например, на рисунке 9 показано, как гистидин использован в протеолитическом ферменте *трипсине* для активации аминокислоты *серин*. Обычно гидроксильная группа серина неактивна, но в активированной форме серин участвует в каталитических реакциях, в которых нужно либо добавить, либо отвести атом водорода.

Гистидин также эффективно взаимодействует *с ионами металлов* и используется для формирования специфических металл-связывающих центров.

Аспарагиновая и *глутаминовая кислоты* содержат карбоксильные кислотные группы. В нормальных физиологических условиях при нейтральном pH эти аминокислотные остатки *ионизованы и отрицательно*

заряжены. Они характерны для поверхности белков и часто используются в биохимическом катализе и *для прочного связывания металлических катионов* (рисунок 11).

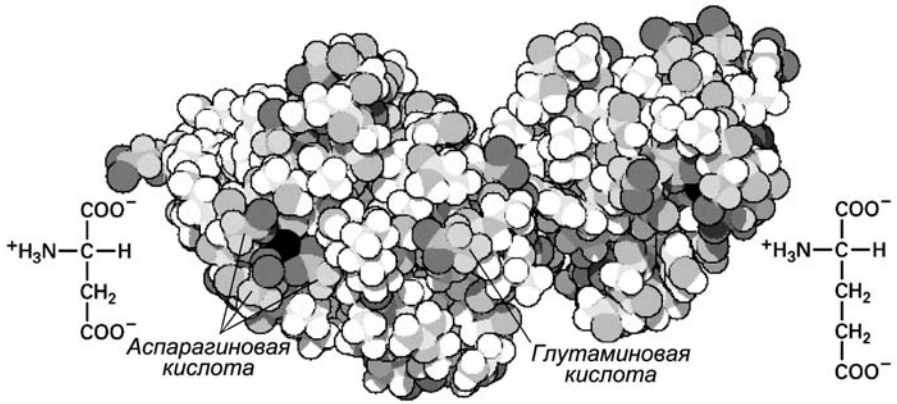


Рисунок 11 – Структурные особенности аспарагиновой и глутаминовой кислот

Кальций-связывающий регуляторный белок *кальмодулин* использует три кислотные (отрицательно заряженные) аминокислоты для связывания *ионов кальция* (рисунок 12).

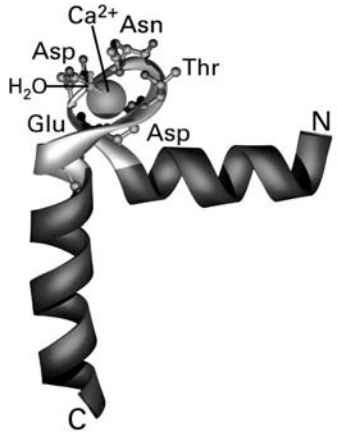


Рисунок 12 – Схема одного из четырёх кальций-связывающих мотивов спираль-петля-спираль кальмодулина

Множество других отрицательно заряженных аминокислот расположены на поверхности белков, где они активно *взаимодействуют с окружающей водой*.

Аминокислоты *лизин* и *аргинин* имеют *основные* группы на конце длинной углеводородной цепи (рисунок 13).

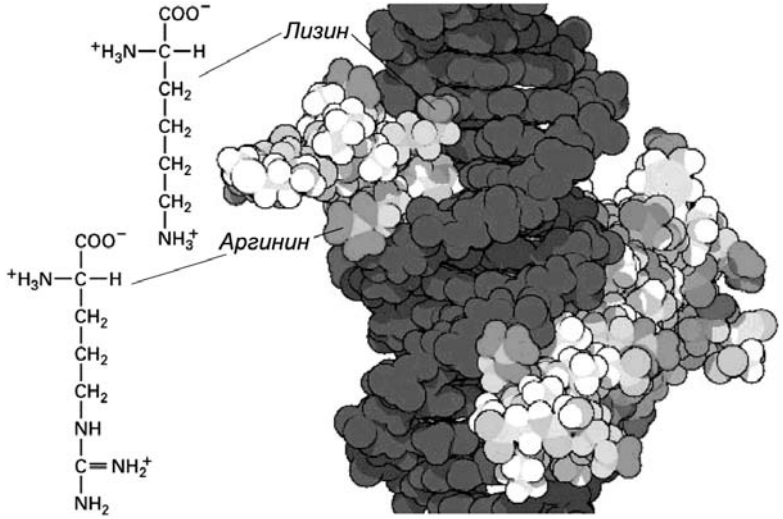


Рисунок 13 – Структурные особенности лизина и аргинина (темно-серым цветом изображена молекула ДНК)

Аминогруппа на конце лизина и *гуанидиновая группа* (рисунок 10(б)) на конце аргинина ионизованы при физиологических условиях и нормальном pH и несут *положительный* заряд. Лизин и аргинин располагаются *на поверхности* белковых глобул и используются для распознавания отрицательно заряженных молекул. В частности, аргинин используется *для связывания белков с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами* – на рисунке 13 показан репрессорный белок, связанный с двойной спиралью ДНК. Длинная гибкая углеводородная цепь аргинина также *участвует в гидрофобных взаимодействиях* с другими гидрофобными молекулами.

Аминокислоты *цистеин* и *метионин* содержат атомы *серы* (рисунок 14). *Цистеин* является наиболее реакционно-способной аминокислотой, он содержит *тиольную* (SH) группу. Два цистеина из разных участков белковой цепи способны образовать ковалентно связанный *дисульфидный мостик.* Цистеин также (как и серин) используется в формировании каталитических *активных центров* ферментов. Цистеин эффективно взаимодействует с ионами металлов и используется при формировании металлсвязывающих центров.

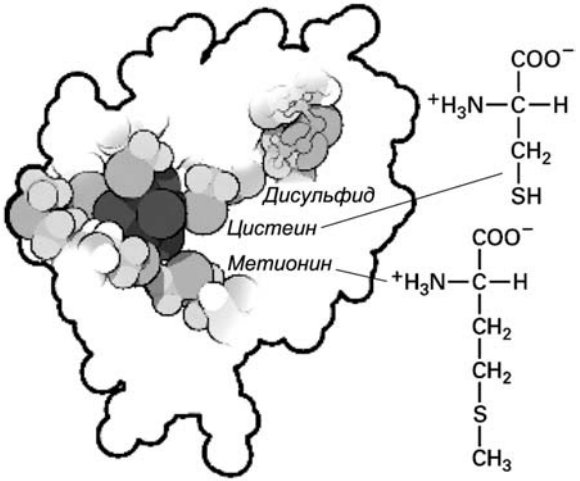


Рисунок 14 – Структурные особенности цистеина и метионина

Метионин имеет *гидрофобный атом серы*. Именно с метионина (а у прокариот с формилметионина (рисунок 10(в))) начинается синтез любой белковой цепи эукариот. Он часто используется подобно гидрофобным алифатическим аминокислотам для обеспечения фолдинга белка.

Атом серы является нуклеофильным и может взаимодействовать с некоторыми типами ионов металла. Эти свойства цистеина и метионина используются в малом электрон-несущем белке *ферредоксин* (рисунок 14). Дисульфидная связь показана в правом верхнем углу ферредоксина, *четыре цистеина удерживают кластер*, состоящий из атома железа и четырёх атомов серы (кластер показан темно-серым

цветом в центре ферредоксина). Два метионина окружают кластер, стабилизируя его внутри белка.

Кроме двадцати стандартных аминокислот, в белках для выполнения специфических функций используются ещё *множество химически модифицированных аминокислот*. Некоторые из них, такие как аминоцистеин, непосредственно встраиваются в белковую цепь во время её синтеза, используя альтернативную трансляцию генетического кода. Большинство же химических модификаций двадцати стандартных аминокислот происходят уже после того, как они встроены в белковую цепь. Например, *гидроксильная группа* может быть *добавлена к пролину*, что способствует образованию дополнительных водородных связей, а это в свою очередь существенно для формирования пространственной структуры, например, коллагена. В белках, обеспечивающих сворачивание крови, добавление *карбоксильной* кислотной группы *к глутаминовой кислоте* приводит к более сильному связыванию с ионами кальция.

Погрешности в биосинтезе белков ограничивают размер индивидуальных белковых цепей, которые могут быть безошибочно синтезированы за один раз. В бактериальных клетках ошибка чтения генетического кода происходит 1 раз на 2000 аминокислот, в результате чего в белковой цепи оказывается не та аминокислота, которая должна быть. Однако эти случайные ошибки биосинтеза, как правило, не являются радикальными, и ошибочная аминокислота оказывает *слабое* влияние на функции белковой глобулы (*консервативная* мутация).

В то же время ошибки трансляции, в результате которых происходит *преждевременная терминация* синтеза белковой цепи, являются более серьезными (*нонсенс*-мутация). Такие ошибки случаются 1 раз на 3000 аминокислот. Вследствие таких внутренних (статистических) ограничений биосинтеза белков средняя длина белковой цепи составляет 200–500 аминокислот, хотя и существуют "выдающиеся" исключения из этого правила – например, белок клеток мускулатуры *титин*, состоящий из 26 000 аминокислот.

Белки обнаруживаются везде в живых клетках. Большинство из них являются *водорастворимыми* и функционируют в растворе. Яичный

белок является хорошим примером макроскопических свойств концентрированного раствора растворимых белков: вязкий раствор, который денатурирует, становится непрозрачным при нагревании. Криовысушивание такого раствора образует обезвоженный порошок, который, для большинства содержащихся в нем белков, может быть вновь растворен в воде, при этом восстанавливается активность этих белков.

Из белков также построены *крупные части биоматериалов*. Эластичные материалы в сухожилиях главным образом состоят из белка *коллагена*, а жёсткий, но гибкий материал волос и ногтей в основном состоит из белка *кератина*. Для большей прочности эти белки между собой соединены *кросс-линками* – перекрестными ковалентными связями.

Био*нано*технология *использует* потенциал белков во всех мыслимых применениях. Существуют высокопродуктивные методы синтеза искусственных белков, о чем пойдет речь ниже. Главным лимитирующим фактором в настоящее время является недостаточное понимание тех механизмов и процессов, благодаря которым белок сворачивается в стабильную глобулярную форму.

Особенности строения нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты являются модулярными линейными цепями длиной *до сотен миллионов* нуклеотидов. Наиболее широко используются две формы нуклеиновых кислот: рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). ДНК отличается отсутствием одной гидроксильной группы в каждом нуклеотиде, что делает её немного более стабильной при физиологических условиях. Нити нуклеиновых кислот гораздо более *гибкие* по сравнению с белковыми цепями, поэтому для нуклеиновых кислот достижим гораздо более широкий диапазон конформаций (см. [5], п. 6.2).

Структура нуклеиновой кислоты определяется взаимодействиями оснований каждого нуклеотида. Поскольку нуклеиновые основания имеют ароматическую структуру, то они располагаются стопкой одно над другим в водном растворе. Такой процесс формирования стопок из плоских циклических органических молекул называется *стэкинг*. Кроме того, нуклеиновые основания способны спариваться друг с другом,

образуя *водородные связи*. Такая комбинация двух типов взаимодействий (1) *нормальных* взаимодействий, формирующих стопки оснований (стэкинг) и (2) перпендикулярных им *латеральных* взаимодействий между нуклеиновыми основаниями посредством водородных связей формируют известную структуру двойных спиралей ДНК и определённых участков РНК (рисунок 15).

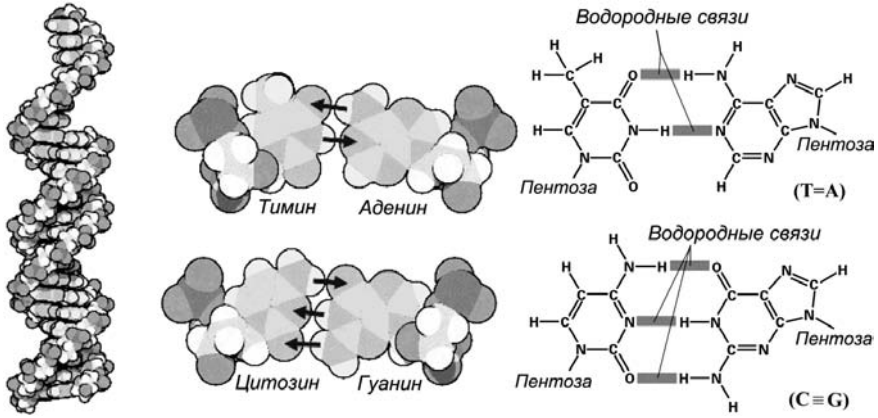


Рисунок 15 – Структура ДНК: *а* – двойная спираль ДНК; *б* – уотсон-криковские пары оснований; *в* – схема связей в парах азотистых оснований

Каждая из нитей двойной спирали состоит из пентоз и фосфатных групп, нуклеиновые основания ориентированы *внутрь* двойной спирали.

В ДНК обычно используются *четыре* нуклеиновых основания: аденин, гуанин, цитозин и тимин.

Аденин образует пару с *тимином*, формируя две водородные связи.

Гуанин спаривается с *цитозином*, формируя три водородные связи.

В РНК *тимин* заменён *урацилом*.

Нуклеиновые основания имеют *подобные* химические свойства и различаются главным образом в ориентации по периметру оснований акцепторов и доноров водородных связей. Кроме двух основных уотсон-криковских пар возможны и *другие типы* спаривания, кроме того, в

специальных случаях для расширения диапазона возможных типов спаривания нуклеотидов используются также и *модифицированные* азотистые основания (см. [8], п. 5.2).

Главная функция нуклеиновых кислот – хранение и обработка генетической информации. В то же время, *рибосома*, которая является наиболее сложной и важной молекулярной бионаномашиной в клетке, состоит преимущественно из РНК. Мы редко встречаемся с нуклеиновыми кислотами в повседневной жизни. Отсепарированные и высушенные рибонуклеиновые кислоты имеют фибриллярную форму и похожи на волокна хлопка.

Однако бионанотехнология *расширяет* область использования нуклеиновых кислот за пределы исключительно задач хранения генетической информации и манипулирования ею. Ниже будет показано, как благодаря однозначному распознаванию комплементарных нуклеотидов можно синтезировать такие нуклеиновые кислоты, которые будут *самопроизвольно ассемблироваться* в заданные макроструктуры. Кроме того, нуклеиновые кислоты начинают использовать и для таких прикладных задач как биокатализ и биосенсорика.

Особенности строения липидов. Примечательно, что *самые большие* пространственные структуры, которые формируются в клетке, образованы не из макромолекул, таких, как белки или нуклеиновые кислоты, а агрегацией липидов в обособленную жидкую фазу. Липиды, которые используются клеткой, устроены так, чтобы осуществлялась *самопроизвольная агрегация*, в результате которой в клетке формируется клеточная инфраструктура (см. [13], п. 2.2).

В молекуле липидов объединены *два* противоположных химических качества. Они одновременно содержат и полярную или даже заряженную гидрофильную группу атомов, которая стремится раствориться в воде, и одну или несколько гидрофобных углеводородных цепей, которые выталкиваются из воды. Такие молекулы называются *амфифильными*. Как будет подробно обсуждено ниже, такая *дуалистическая природа* липидных молекул приводит к их самоорганизации в мембранные структуры, в которых заряженные (или полярные) головки обращены в

сторону воды, а углеводородные хвосты упакованы внутри мембраны (рисунок 16).

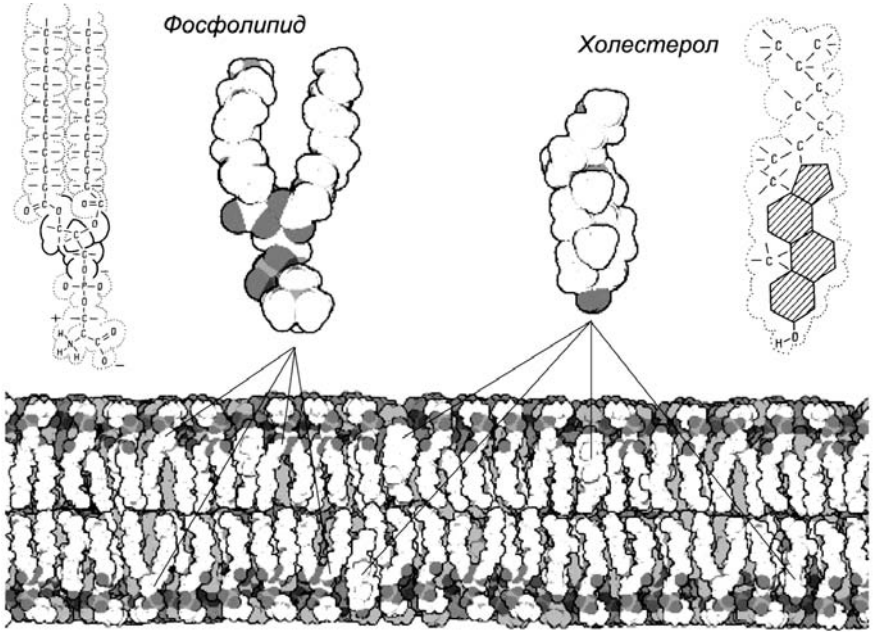


Рисунок 16 – Молекулы фосфолипида (фосфатидилсерин) и холестерола из которых происходит самосборка биомембраны. Темно-серым цветом обозначены полярные участки молекул

Природа использует только несколько типов молекул липидов для строительства биомембран, бионанотехнология может использовать эти естественные липиды в качестве стартовой точки, варьируя их структуру.

Наиболее распространенные липиды в природе это *фосфолипиды* и *гликолипиды*. В основе их конструкции лежит молекула глицерола, имеющая три гидроксильные группы, вместо которых могут быть присоединены три другие группы. Две из них, как правило, это жирные кислоты, присоединенные к глицеролу через карбоксильную группу. Углеводородные хвосты этих жирных кислот имеют 16–24 атома углерода. Если жирные кислоты имеют *ненасыщенные* углерод-

углеродные связи, то в таких местах образуются *жесткие кинки* и это влияет на физические свойства агрегатов (биомембран). Вместо третьей гидроксильной группы к глицеролу присоединяется фосфатная группа или другая полярная/заряженная группа.

Холестерол и другие стеролы устроены иначе. Они состоят из нескольких жёстко связанных гидрофобных углеводородных колец протяжённостью такой же, как и углеводородные хвосты фосфолипидов. Гидроксил на одном из концов обеспечивает гидрофильность, ориентируя холестерол в мембране. Холестерол добавляется к мембранам в разных пропорциях для того, чтобы модифицировать свойства биомембран. Поскольку молекула холестерола является жёсткой, то добавление холестерола *ингибирует* движение соседних липидов, увеличивая тем самым вязкость мембраны, и делая её менее проницаемой для малых молекул.

Липиды используются клетками для формирования мембранных структур клетки. Мембраны непроницаемы для ионов и больших молекул, начиная с сахаров и полипептидов. В то же время молекулы, содержащие много атомов углерода, достаточно легко проникают через мембраны. Именно поэтому алкоголь легко распространяется по организму, пересекая все барьеры.

Особенности строения полисахаридов. Полисахариды являются наиболее гетерогенными структурами из четырёх типов молекулярных образований, которые используются в природе (см. [6], п. 4.3).

Моносахариды – мономеры полисахаридов – имеют множество гидроксильных групп, объединяя которые и происходит полимеризация моносахаридов в полисахарид. При этом возможно образование бесчисленного множества структур.

В природе множество различных *линейных* и *разветвленных* структур полисахаридов синтезируется для различных нужд. Например, объединение молекул глюкозы посредством (β1→4) связи образует длинные линейные молекулы *целлюлозы*, из которых, например, образованы волокна хлопка. Однако же, если использовать несколько другой тип

связи, а именно (α1→4) связь, полисахаридные молекулы образуют спирали, которые образуют рыхлые гранулы *крахмала*.

Широко используется также *ветвление* полисахаридов. *Гликоген* является примером такого использования ветвления – он представляет собой *дендромер* состоящий из постоянно разветвляющихся полисахаридных цепей глюкозы. (рисунок 17).

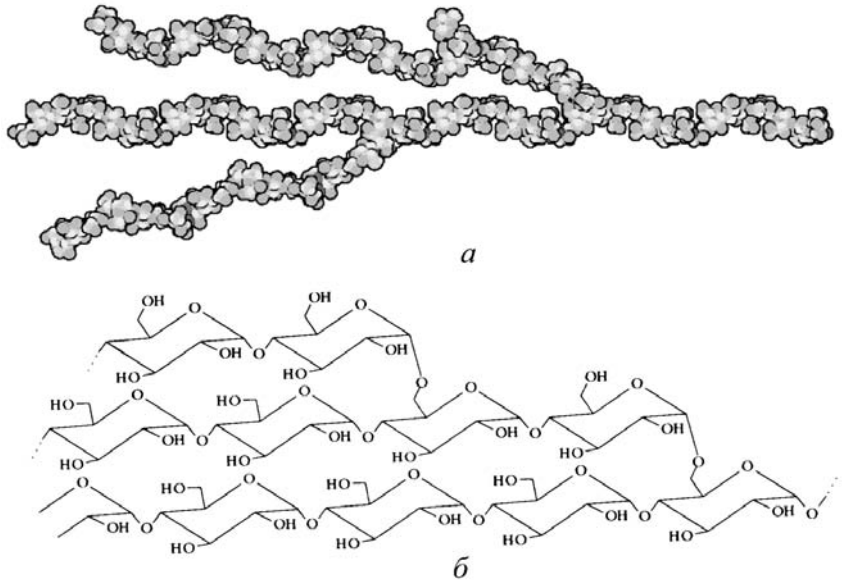


Рисунок 17 – Полисахариды: *а* – схема дендромерной молекулы полисахарида; *б* – схема связей в молекуле гликогена

Гликоген используется для хранения глюкозы, поэтому его древовидная (дендромерная) компактная форма обеспечивает, тем не менее, свободный доступ ко многим свободным концам ветвей для отсоединения, по мере необходимости, индивидуальных моносахаров.

Большое количество гидроксильных групп в полисахаридах образуют водородные связи с другими донорами или акцепторами, обеспечивая существование *двух важных типов структур* в живых организмах.

В одном случае отдельные полисахаридные цепи ассоциируются с большим количеством молекул воды, образуя *клейкий гель*. В таком виде углеводы покрывают большинство наших клеток, образуя их клейкую защитную оболочку. Гликопротеины *слизи* дают представление о внешнем виде и свойствах такого образования.

В другом случае углеводные цепи прочно ассоциируются друг с другом посредством сети водородных связей, образуя *прочные волокна* и *панцири* внутри которых практически нет воды. В таком виде полисахариды используются для формирования макроскопической инфраструктуры клеток и межклеточных образований и для запасания энергии.

Некоторые из наиболее впечатляющих биологических структур, созданных природой, включая прочные стволы *гигантских деревьев* и жесткие водонепроницаемые панцири *членистоногих*, обязаны своей силой и прочностью полисахаридам.

2.2. Эволюционная специфика строения природных бионаномашин

Если бы кто-нибудь поставил перед нами задачу сконструировать *живую клетку*, мы бы, вероятно, не пошли бы тем наиболее экономным и бережливым путем, который использовала природа.

Рассмотрим, к примеру, компьютер. Он состоит из микроскопически синтезированных кремниевых микросхем, пластикового корпуса, металлических проводов, соединяющих устройства, флуоресцентных веществ, нанесенных на стекло и бомбардируемых электронами, чтобы получить свечение. Все эти компоненты произведены используя *различные* технологические процессы, *различные* базовые принципы, часто в *разных* частях света.

Клетки более однородны – они используют всего *несколько* технологий синтеза и только *нескольких* базовых типов макромолекул для того, чтобы построить множество различных бионаномашин.

Это является одновременно и ценным качеством и ограничивающим фактором. Биологические молекулы имеют свои ограничения –

им необходимо водное окружение с соответствующей температурой, pH и концентрацией солей. Почему же природа ограничилась только таким ограниченным количеством базовых подходов? Причина этого – *эволюционный процесс* путём естественного отбора. Эволюция наложила жёсткие граничные условия на то, каким образом биологические молекулы изменялись в ходе эволюции, всячески *стимулируя модификацию* уже существующих структур и как можно реже "изобретая" действительно новые молекулярные решения.

Линия жизни. Эволюционный процесс происходит в процессе передачи генетической информации от поколения к поколению. На каждом этапе возможны небольшие изменения генотипа и потомство получается слегка отличным от родителей. При этом действительно необходимо, чтобы изменения были *малыми*.

Если изменение затронет один из жизненно важных процессов, то потомство не выживет. Клетки и организмы *должны поддерживать линию жизни*, которая тянется к ним от первых, первобытных клеток. Если какое либо поколение не сможет создать жизнеспособное потомство, всё то, что было накоплено предыдущими поколениями, все те биологические "открытия" и "изобретения" будут утеряны.

Поэтому *эволюция гораздо более ограничена* в "свободе", чем традиционные технологии человеческой цивилизации.

Если мы создали компьютер, который не функционирует должным образом, например, в ходе тестирования новых микросхем или клавиш клавиатуры, мы просто выбросим его и вернемся к проектированию нового образца. Мы просто потеряем определённое количество времени и денег и более ничего.

Если же произвести изменение какого-либо критически важного молекулярного компонента в клетке, то такое изменение должно быть всегда правильным, иначе клетка погибнет и эволюционный процесс прервется.

Конечно же, эволюция продолжается, несмотря на такие печальные последствия изменения критически важных систем. Свидетельством этому является то многообразие форм жизни, которое окружает нас.

Клетки имеют *несколько уровней защиты*, которые позволяют экспериментировать с новыми молекулярными машинами.

Структура данного белка может быть *продублирована* в геноме. Поэтому одна из копий может быть модифицирована без опасности потерять исходную информацию. Дупликация генов чрезвычайно распространена в геномах организмов. Например, 200 миллионов лет назад ген, кодирующий гемоглобин, белок, который переносит кислород в крови, был продублирован. Это позволило второй форме гемоглобина быть адаптированной для выполнения других функций, в то время как исходная форма продолжала выполнять свою функцию в крови. Новая форма постепенно выработала бóльшее сродство к кислороду, связывая его более сильно, чем исходный гемоглобин. Сейчас этот специализированный гемоглобин используется во время внутриутробной жизни плода в его крови, перехватывая кислород из крови матери.

Кроме того, эволюции помогает *закон больших чисел*. Клетки редко существуют в одиночку. Как правило, колония бактерий, косяк рыбы, стая птиц или стадо скота является биологически адекватной единицей. Внутри такой естественной популяции больше возможностей для экспериментирования. Влияние случайной летальной мутации нивелируется, если оставшаяся часть популяции выживет. А отдельные особи с редко встречающимися улучшениями могут впоследствии доминировать в следующих поколениях. Постепенно эти *изменения* приводят к *развитию* популяции, образуя новые варианты организмов и, в конце концов, к появлению совершенно новых особей.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) демонстрирует эволюционную силу популяции и тот прогресс, который становится возможным вследствие эволюционной оптимизации. Когда ВИЧ репродуцируется, он использует фермент для копирования своего малого генома. Работа этого фермента не надежна, он делает гораздо больше ошибок, чем подобные ДНК-полимеразы. Такой брак в работе, тем не менее, является большим преимуществом. В инфицированном организме каждый день ассемблируется около 10 миллиардов вирусов. Многие из них имеют мутации в геноме, причём многие из этих мутаций являются летальными. Но

популяция вирусов настолько большая, что значительная часть вирусов остается нормальной и продолжает существование популяции, причём некоторые из мутировавших вирусов оказываются даже более жизнеспособны, чем исходные вирусы. Если же, например, лечение каким-либо лекарственным препаратом против ВИЧ приводит к гибели нормальных вирусов, но мутировавшие вирусы выживают, то через неделю такой лекарственно-устойчивый штамм уже будет доминировать в популяции.

Это эффектный *пример эволюции в действии*, хотя и во много раз более ускоренной по сравнению с теми темпами эволюции, которые нам более привычны.

Естественным популяциям высших организмов необходимы сотни и тысячи лет чтобы зафиксировать эволюционные изменения. Это объясняется высокой надежностью работы их ДНК-полимераз и большим временем жизни каждой особи. А популяция ВИЧ может модифицироваться за считанные дни вследствие небрежной работы её реплицирующего фермента и огромного числа вирусов в популяции.

2.3. Эволюционный и инженерный подходы к созданию бионаномашин

Эволюционная изменчивость обеспечивается *мутациями* и *дупликацией генов*. Большое число вариантов тестируется в популяции, медленно улучшая и оптимизируя каждый компонент. Много удивительных бионаномашин, которые мы рассмотрим ниже, являются свидетельством этой изменчивости. Эволюционная оптимизация создала такие утонченные и нежные наномашины, целенаправленное проектирование которых в конструкторских бюро человеческой цивилизации трудно себе даже представить.

Структурированный ансамбль функциональных конформаций. У *белков* часто широкий *диапазон подвижностей* их частей является частью их функционирования: они используют захват цели и сложные перемещения частей для изменения и управления активностью. Более

того, эти перемещения *не являются переходом* между несколькими фиксированными состояниями, подобно двум состояниям настенного электрического выключателя. Вместо этого эти движения приспособлены к условиям постоянного и случайного теплового движения индуцированного водным окружением, поэтому эти движения должны рассматриваться как *структурированный ансамбль многих функциональных конформаций*.

Повторить, спроектировать аналогичную *нано*машину – это задача колоссальной сложности вряд ли посильная человечеству сегодня, поскольку конструирование машин и механизмов требует полного знания и описания всех возможных конформаций в каждом состоянии. А для эволюционного "конструирования" эта задача является легкой. Эволюция делает одновременно много небольших изменений и сохраняет в потомстве только те из них, которые работают.

Эволюция не проектирует ничего перед началом конструирования – вместо этого она создает много, очень много прототипов и сохраняет наилучшие. Фактически эволюция создаёт широкий спектр модификаций и "ждёт", какая из них выиграет естественный отбор.

Единообразие ключевых процессов. Эволюция, однако, *ограничена* необходимостью передачи полученных усовершенствований через потомство. После того, как *критически важная часть оборудования* доведена до совершенства и находится в постоянной эксплуатации, очень сложно удалить её, или заменить её, или пытаться модифицировать её, поскольку при этом существует очень большой риск разрушения всей системы (в нашем, биологическом, случае – смерть клетки).

Это в частности справедливо для таких *ключевых* молекулярных процессов, как

- считывание и использование генетической информации;
- производство необходимой в клетке энергии;
- размножение.

Каждый из этих процессов критически зависит от согласованной работы десятков и сотен молекулярных машин.

Это привело к выдающейся *унификации, единообразию и подобию*, в работе на молекулярном уровне таких ключевых процессов во всех биологических системах. Все они построены из подобных основных компонентов, открытых в своё время эволюцией и использующихся с тех пор во всех последующих организмах.

Конечно же, в нашей собственной инженерной бионанотехнологии мы свободны от таких эволюционных ограничений. Мы можем создавать и тестировать любую наномашину, которую только можем себе представить. Инженер *не ограничен* механизмом эволюции. Но мы в настоящее время *ограничены* теми *материалами*, которые создала для нас биомолекулярная эволюция. Чтобы использовать принципы, заложенные в структуру и функции созданных эволюцией биоматериалов, мы должны начинать с биомолекул и изменять их (тщательно и осторожно, аккуратно и медленно) в сторону необходимой нам бионанотехники.

Эволюционные ограничения свойств биомолекул. Биомолекулы идеально приспособлены к работе в биологических условиях, которые относительно *мягкие* по сравнению с теми условиями, в которых приходится работать машинам в нашем макромире. А это накладывает существенные ограничения на диапазон возможных функций бионаномашин и на те условия, в которых они могут работать.

Практически все биомолекулы созданы таким образом, чтобы работать в водной среде.

Большинство сконструированы для работы при температуре 37°C, нейтральной pH и фиксированной солености раствора.

В специальных случаях могут быть проведены определённые модификации для того, чтобы расширить диапазон стабильности, но основные ограничения для ковалентно связанных органических молекул, которые должны зачастую самоассемблироваться в более сложные комплексы, достаточно жёстко ограничивают диапазон приемлемых условий.

Время функционирования – это ещё одна особенность, которую необходимо учитывать. В большинстве случаев биологическая эволюция создала наномашины с относительно *малым временем жизни*. Большинство белков существуют только одни сутки.

Этот подход прямо противоположен подходу в макромашиностроении, где машины и агрегаты создаются для *длительного* функционирования, а биомашины предназначены для *одноразового* использования при выполнении какой-либо одной задачи.

Даже те биоструктуры, которые на первый взгляд кажутся неизменными, такие, например, как кости, и те перманентно дизассемблируются, восстанавливаются и перестраиваются. В макромашиностроении такого нет. И хотя при таком подходе происходит перерасход энергии и других ресурсов на постоянную перестройку биосистем, это *оправдано* с точки зрения адекватной *реакции* биосистемы на изменяющиеся внешние условия, что характерно для жизни вообще. Возможно именно такой, биологический, подход к созданию искусственных объектов, которые, по окончании использования, будут саморазлагаться, поможет решить экологические проблемы сегодняшней индустрии.

2.4. Примеры природных бионаномашин

Природа уже реализовала множество фантазий нанотехнологов. Тысячи бионаномашин были отобраны и усовершенствованы эволюцией с тем, чтобы выполнять наноманипуляции точно, последовательно и контролируемо. Причём эти бионаномашины используют *все инженерные приёмы*, которые используются в наших макромашинах:

- сборка конструкции из множества тщательно подогнанных частей;
- использование рычагов, шарниров, осей вращения, точек опоры и подшипников;
- цифровое хранение информации;
- химическая адгезия (молекулярное сцепление) и химические силы (разность химических потенциалов).

Фермент тимидилат синтаза осуществляет механосинтез углерод-углеродных связей (рисунок 18).

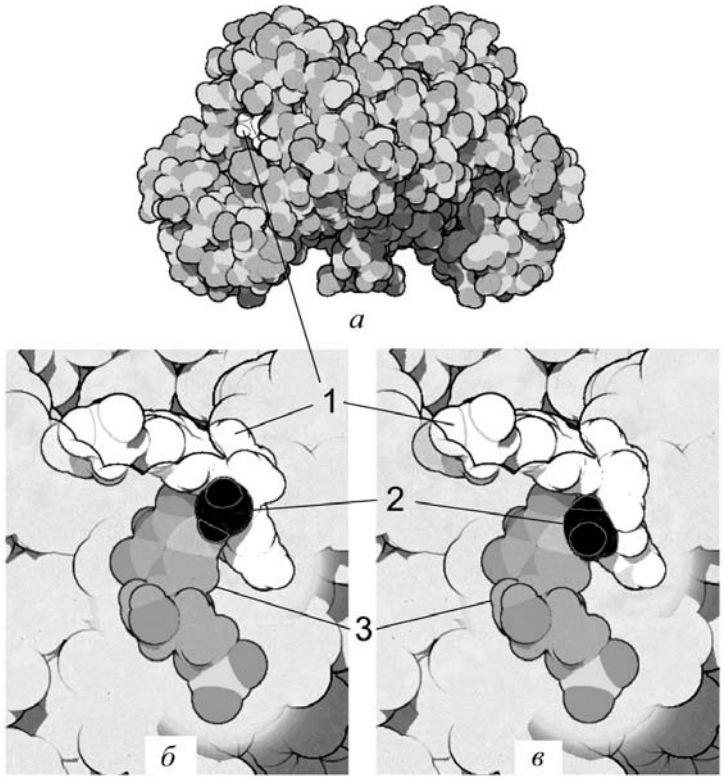


Рисунок 18 – Фермент тимидилат синтаза: *а* – схема молекулы, кофактор (белый) расположен в левом верхнем кармане фермента; *б* – исходное расположение молекул перед каталитическим актом, метильная группа связана с кофактором; *в* – расположение молекул после катализа, метильная группа присоединена к нуклеотиду; 1 – кофактор; 2 – метильная группа; 3 – тимидин

Инициирование создания такой связи может быть обеспечено специальными молекулярными решениями. При этом совершенно недостаточно сблизить атомы углерода на необходимое расстояние. Для успешного проведения углеродного механосинтеза при биологических

условиях атом углерода должен быть *активирован* и та область, куда должен быть присоединен этот атом, также должна быть приготовлена для образования связи.

Тимидилат синтаза осуществляет специфическую реакцию механосинтеза углерода, присоединяя новую *метильную группу* к нуклеиновому основанию. Метильная группа, показанная на рисунке чёрным цветом, активируется, присоединяясь к молекуле кофактора, показанной на рисунке белым цветом. Кофактор устроен таким образом, чтобы удерживать метильную группу, образуя метастабильный комплекс, но быть в более стабильном, низкоэнергетическом состоянии без нее. Когда кофактор отдает метильную группу, кофактор переходит в это, энергетически более выгодное положение, делая тем самым невозможным обратный перенос метильной группы. Тимидилат синтаза точно размещает в пространстве молекулу нуклеотида и активированный углерод и принудительно осуществляет перенос метильной группы. Простая близость нуклеотида и метильной группы не достаточна, вместо этого фермент должен организовать идеальное для протекания реакции молекулярное окружение. Нуклеотид при этом так окружен функциональными группам фермента, что симметрия его электронного облака изменяется в пользу реализации переноса углерода.

Следующий пример природной бионаномашины – **РНК полимераза** (рисунок 19). Молекула ДНК переносит генетическую информацию. Эта информация хранится в чрезвычайно плотноупакованном виде. Одна бактериальная клетка размером в микрометр хранит в себе около 70 килобайт информации в своем геноме. Обычный компакт-диск на одном микрометре хранит только один бит информации. Генетическая информация хранится в форме, которая химически стабильна и продублирована, что обеспечивает её восстановление в "аварийных" ситуациях. Структура ДНК является

(1) "архивом технологических регламентов" для сборки всех структур организма;
(2) активным участником и регулятором синтеза матричных РНК.

Генетическая информация хранится в ДНК в виде последовательности нуклеотидов спаренных водородными связями. РНК-полимераза копирует информацию с ДНК в про-мРНК (см. [7], п. 2.1).

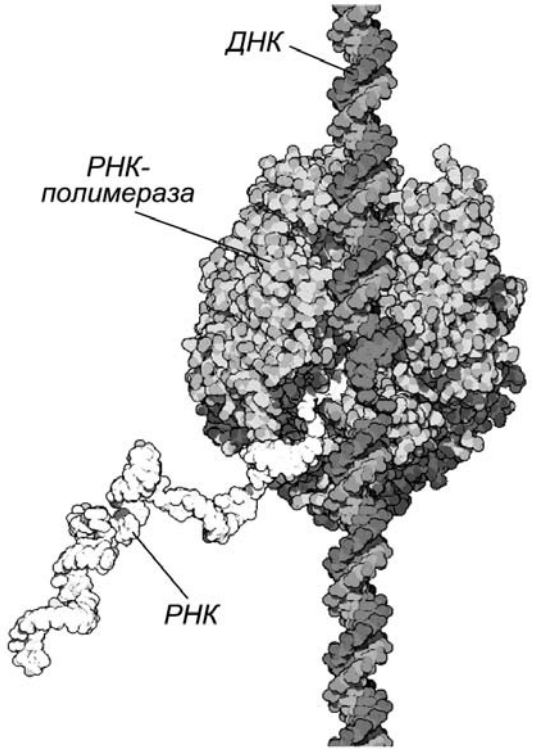


Рисунок 19 – Транскрипция ДНК ферментом РНК-полимераза в молекулу РНК

Поверхность двойной спирали ДНК также содержит информацию, управляющую самим ходом процессов инициации, элонгации и терминации транскрипции. Эта "экстрагенетическая" информация считывается белками, которые присоединяются и "обёртываются" вокруг спирали ДНК. Даже степень жёсткости и напряжённости конкретного участка ДНК используется для управления местоположением, перемещением и функционированием молекул, которые взаимодействуют с ДНК.

Рибосома – это самодостаточная фабрика, в которой происходит биосинтез белка. Эта фабрика осуществляет операции модульной сборки всех необходимых макромолекул, считывания генетической информации с линейного носителя (мРНК) и соответствующего упорядочения 20 стандартных (протеиногенных) аминокислот в белковую цепь (рисунок 20).

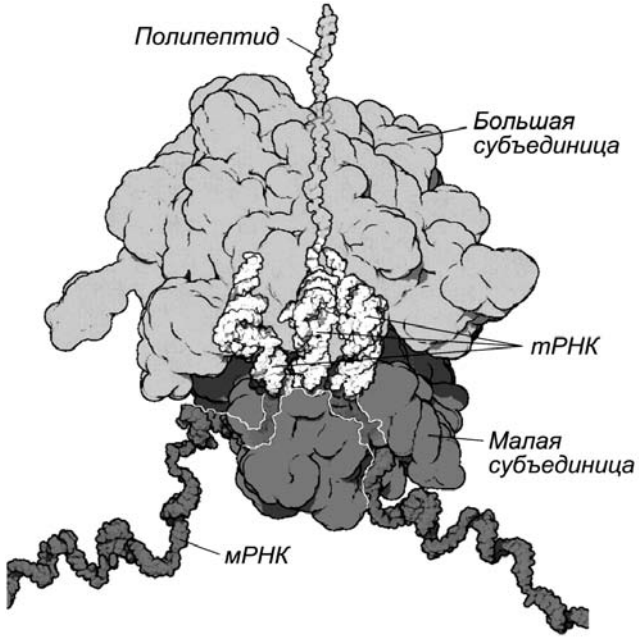


Рисунок 20 – Схема рибосомы

Белковая нить *любой* длины и с *любым* порядком аминокислот может быть синтезирована просто в результате предварительного формирования соответствующей мРНК (см. [7] п. 4).

Рибосомы универсальны. Любой белок может быть синтезирован на рибосоме, используя стандартный набор стартовых и стоповых инструкций и стандартный генетический код.

АТФ-синтаза (рисунок 21) является одновременно и вращательным мотором и генератором. АТФ-синтаза трансформирует энергию, превращая электрохимическую энергию в химическую и наоборот. В нижней части рисунка 21 изображен "*электрохимический мембранный мотор*", который приводится во вращение *электрохимическим* градиентом, и который закреплён в липидной мембране (см. [6], п.6.7). Мотор состоит из ро*то*ра, образованного циклически расположенным кольцом белков, и *статора*. Статор управляет потоком протонов через мембрану и использует энергию этого потока для вращения ротора.

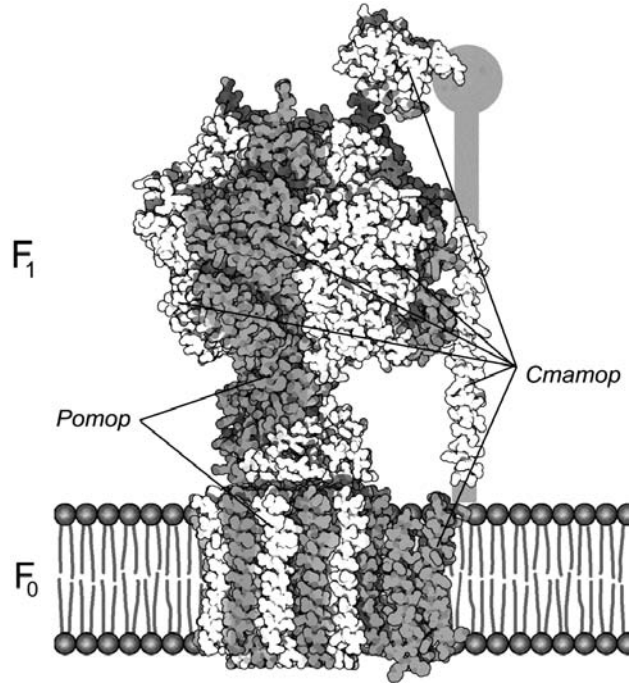


Рисунок 21 – Схема АТФ-синтазы: 1 – ротор; 2 – статор

В верхней части рисунка 21 изображен "*химический цитозольный мотор*", который приводится в движение химической энергией *гидролиза* АТФ. Этот мотор расположен в цитозоле и состоит из кольца из шести белков, окружающих эксцентричный ротор. Гидролиз АТФ изменяет конформацию белков, окружающих ротор, стимулируя, тем самым, вращение ротора.

Вся эта сложная конструкция используется для работы в *двух* направлениях.

1. *Электрохимический мотор в мембране* может вращать химический мотор, который в этом случае будет осуществлять реакцию синтеза АТФ из АДФ, то есть будет генератором АТФ.
2. *Химический цитозольный мото*р за счет энергии гидролиза АТФ будет вращать электрохимический мотор, который будет работать в качестве насоса, перекачивающего протоны через мембрану и увеличивающего градиент протонов по обе стороны мембраны.

Актин и миозин образуют "машину", производящую мышечное сокращение (рисунок 22).

Мышечные клетки заполнены чередующимися филаментами миозина (серые "снопы") и актина (темные "спирали").

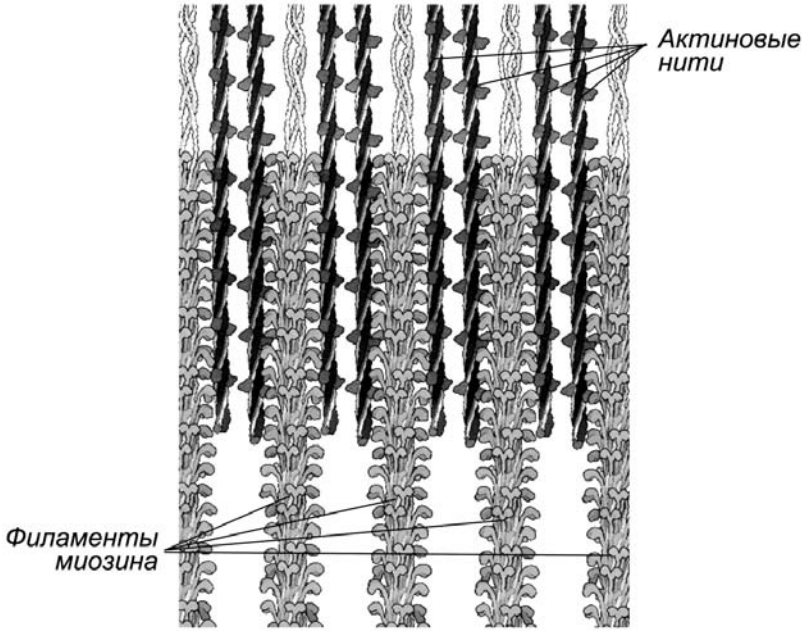


Рисунок 22 – Схема расположения актиновых нитей и миозина в саркомере

Химическая энергия АТФ превращается в механическую работу в молекулах миозина. Множество миозиновых головок "карабкаются" вдоль актиновых волокон. В сокращающейся мышце каждая молекула миозина может совершить за одну секунду пять "шагов" длиной 10 нм вдоль актинового филамента. Для того чтобы просто держать в руках баскетбольный мяч необходимо около двух триллионов (2×10^{12}) миозиновых "шажков". Однако бицепсы человека содержат в миллионы раз больше молекул миозина, поэтому только небольшая часть миозина в мускулах участвует в генерации силы в данный момент времени.

Белок описн (рисунок 23) является светочувствительным белком.

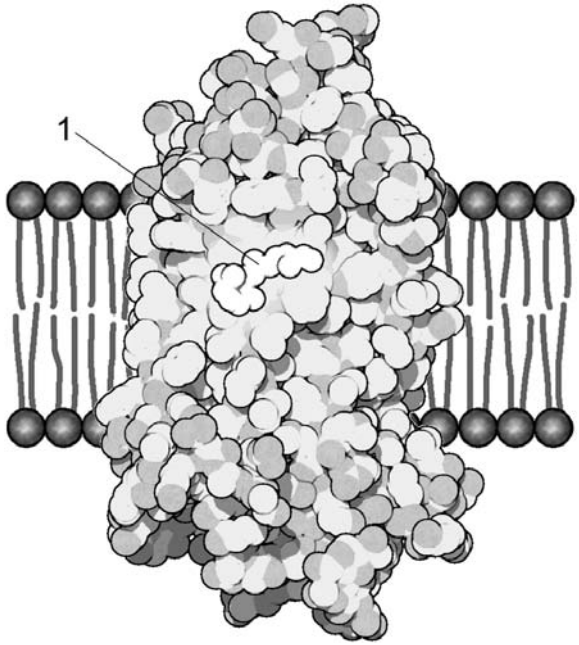


Рисунок 23 – Схема опсина: 1 – молекула ретиналя

Поскольку биомолекулы при ассоциации взаимодействуют своими поверхностями, они легко распознают изменения в конформациях поверхности соседей. Поэтому большинство биосенсоров преобразуют

внешний световой или химический сигнал в изменение формы поверхности. Опсин содержит в себе светочувствительную молекулу ретиналя, погружённую внутрь глобулы. Ретиналь, поглощая фотон, претерпевает цис-транс переход. Это изменение формы ретиналя усиливается окружающим белком. Итоговое изменение формы поверхности опсина легко детектируется белками клетки, каскад конформаций которых, в конце концов, превращается в нервный импульс, передаваемый в мозг.

Окаймленные везикулы, трискелионы (рисунок 24). Известно, что из 20 правильных (равносторонних) треугольников можно составить сферообразную поверхность *икосаэдр*. Если допустить небольшие отклонения от правильности и разрешить некоторую гибкость в местах соединения треугольных элементов, то из них можно составить округлую (яйцеобразную) поверхность произвольного размера.

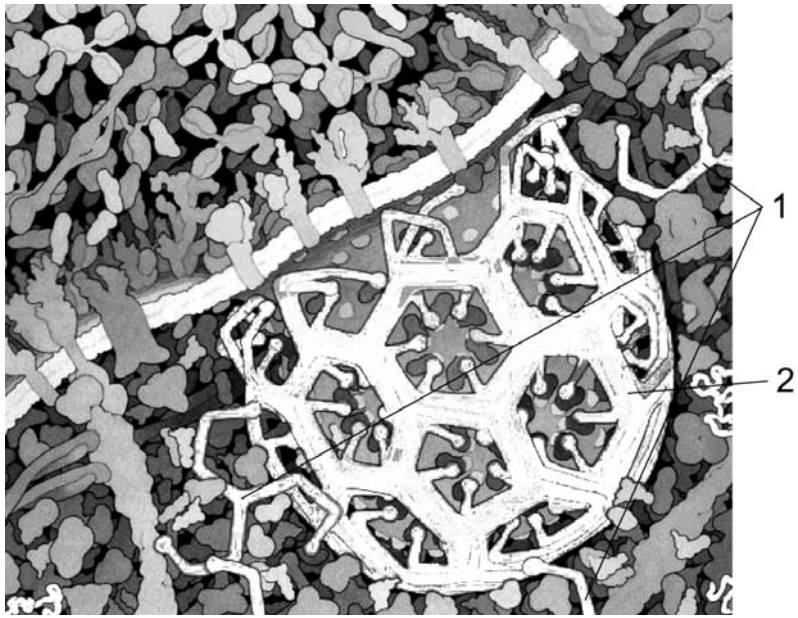


Рисунок 24 – Формирование окаймленного пузырька: 1 – трискелионы клатрина; 2 – клатриновая корзина

Белок *клатрин* использует это свойство, обратимо формируя жёсткие каркасы, обеспечивающие формирование мембранных транспортных структур вакуолярной системы клетки (см. [6], п. 3.4). Трёхлучевые звёзды *трискелионов* (молекулярных комплексов клатрина) формируют ячеистые корзины на поверхности биомембраны, что способствует формированию внутри таких корзин транспортных везикул и их отрыву от мембраны. Трискелионы формируют пяти и шестиугольные ячейки такой окаймляющей корзины. Гибкость лучей трискелионов позволяет формировать сферические и эллипсоидальные поверхности различной формы и размера.

Антитела (рисунок 25). Миллионы лет назад природа изобрела наномедицину, защищающую организмы от болезней и инфекций. Иммунная система состоит из сотен видов биомолекул, которые селективно находят и уничтожают чужеродные болезнетворные клетки.

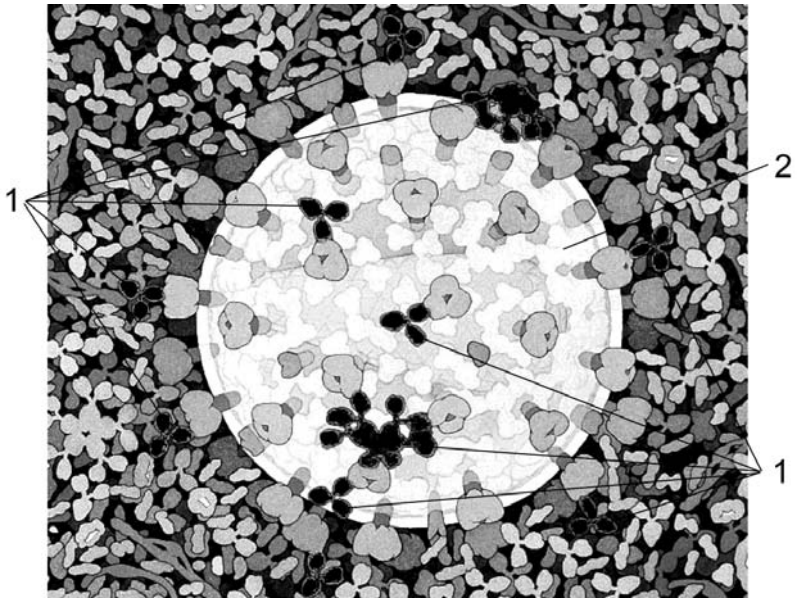


Рисунок 25 – Связывание антител белками липопротеидной оболочки вируса: 1 – антитела; 2 – вирион ВИЧ

На рисунке 25 схематически показано, как множество Y-образных *антител* (см. [6], п. 6.6), изображенных на рисунке черным цветом, атакуют *вирион ВИЧ*. В окружающей плазме крови находятся также и множество других Y-образных антител, которые предназначены для связывания с другими чужеродными молекулами.

Прочные и эластичные природные биоматериалы синтезируются всеми высшими организмами. На рисунке 26 показана схема строения **коллагена** – наиболее распространённого белка в теле млекопитающих, который формирует длинные жгуты, которые укрепляют сухожилия.

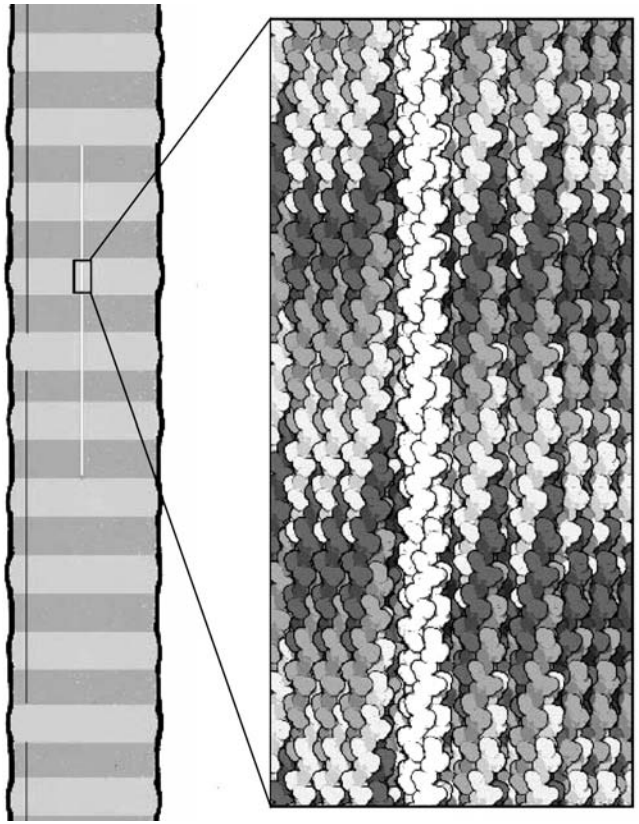


Рисунок 26 – Схема строения коллагенового волокна

Отдельная молекула коллагена представляет собой длинную нить, состоящую из трех скрученных белковых цепей.

Такие нити затем упаковываются в прочные волокна. Прочность таких волокон усиливается за счет множества водородных связей и перекрестных ковалентных связей между нитями коллагена.

Если же между волокнами коллагена внедрить небольшие кристаллики апатита, то материал становится ещё более жёстким, формируя костную ткань, которая может на много лет пережить организм.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие четыре типа молекулярных структур наиболее распространены в биосфере?
2. В чём состоит сходство, и в чём различие наностроения белковых α-спиралей и β-структур?
3. Как белки используются в бионанотехнологии?
4. В чём состоят наноособенности строения и технического применения нуклеиновых кислот?
5. В чём состоят наноособенности строения липидов?
6. В чём состоят наноособенности строения полисахаридов?
7. Почему эволюция гораздо более ограничена в "свободе", чем традиционные технологии человеческой цивилизации?
8. Каким образом нивелируется влияние случайных летальных мутаций в природе?
9. Какие существуют эволюционные ограничения свойств биомакромолекул?
10. Приведите примеры природных бионаномашин.

Глава 3
Аналитические методы в бионанотехнологии

3.1. Методы молекулярной биологии и биотехнологии

В настоящее время существует множество методов для работы на атомном уровне. *Химики* владеют мощными методиками для синтеза молекул, состоящих из нескольких десятков атомов. *Физики* перемещают атомы с помощью атомно-силовых микроскопов и захватывают их в оптических лазерных пинцетах. *Биологи* используют богатый набор бионаномашин для проведения необходимых исследований.

Бионанотехнология более *доступна*, чем любая другая передовая нанотехнология. Технологии кремниевых микрочипов для того, чтобы достичь наноразмеров должны выйти на предел разрешения оборудования, что настолько удорожает такие технологии, что они доступны только большим корпорациям и лабораториям с приоритетным финансированием. В то же время, оборудование для разработки бионаномашин доступно каждому, у кого есть компьютер, воображение, доступ к базам данных (см. [11], п. 16.2) и стандартный инструментарий, которым оборудована любая начинающая биотехнологическая фирма.

3.1.1. Технология рекомбинантных ДНК

Технология рекомбинантных ДНК является ключевой в био*нано*-технологии. Эта технология позволяет конструировать любой белок, просто изменяя структуру гена, кодирующего этот белок.

Два природных фермента – *рестрикционные ферменты* и *ДНК-лигаза* – являются основными "инструментами" технологии рекомбинантных ДНК. Они позволяют "редактировать" генетический "текст" записанный в ДНК. Рестрикционные ферменты, такие как фермент *Eco*RI, изображенный на рисунке 27(а), разрезают ДНК на определённых участках. Как правило (но не всегда), образующиеся фрагменты ДНК

имеют "липкие концы" (рисунок 27(б)). Фермент ДНК-лигаза (рисунок 27(в)) соединяет разъединенную молекулу ДНК.

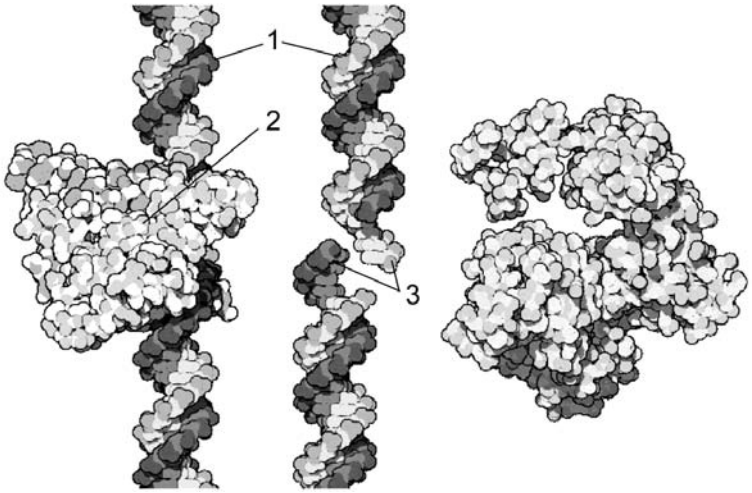


Рисунок 27 – Редактирование ДНК: *а* – разрезание ДНК рестрикционным ферментом; *б* – "липкие концы" молекулы ДНК; *в* – ДНК-лигаза; 1 – ДНК; 2 – рестрикционный фермент; 3 – "липкие" концы

Рестрикционный ферменты – чрезвычайно полезные белки. Они синтезируются бактериями для защиты от вирусных инфекций. Рестрикционные ферменты разрезают чужую ДНК в специфической области рестрикции, имеющей определённую последовательность нуклеотидов. В то же время собственные ДНК, имеющие такие же последовательности, модифицируются таким образом (метилируются), что рестрикционные ферменты не разрезают собственные ДНК бактерии. Вирусные же ДНК постоянно разрезаются рестрикционными ферментами.

Большинство рестрикционных ферментов разрезают ДНК так, что образуются комплементарные "липкие концы", которые затем могут самопроизвольно соединяться. Помещая затем фрагменты разных ДНК с одинаковыми "липкими концами" в общий раствор мы получим вполне определённый набор слившихся ДНК. Таким образом, рестрикционные

ферменты, которые были созданы природой для разрушения, *оказались удобным инструментом* для редактирования ДНК с атомной точностью.

В настоящее время технология рекомбинантных ДНК находится в расцвете. Непрерывно изобретаются новые методы для использования клеточной механики биосинтеза белков. Соответствующие методы, зачастую в форме коммерчески распространяемых наборов ферментов, доступны в настоящее время практически для всех мыслимых процессов.

Можно, например,

- обнаружить и экстрагировать специфический ген из организма;
- дуплицировать и определить структуру большого количества интересующих генов;
- искусственно мутировать, реорганизовать и соединить гены или создать совершенно новый ген, наращивая его нуклеотид за нуклеотидом;
- заменить этими генами исходные гены клетки, изменив, тем самым, генотип клетки.

3.1.2. Конструирование ДНК

Создание изменённых ДНК – это рутинная лабораторная процедура, которую ежедневно проводят в тысячах лабораторий во всем мире. Объединение биологических методик и методик химического синтеза позволяют *конструировать длинные ДНК-цепи*, состоящие из природных ДНК или же совершенно новые ДНК. Уже сформировалась соответствующая индустрия, которая обеспечивает лаборатории необходимыми компонентами для такой работы. Действительно, можно приобрести фрагменты ДНК, имеющих любую заданную структуру, и все ферменты, необходимые для манипулирования этими фрагментами.

Исследователи используют широкий набор природных биомолекул для манипулирования ДНК. Чётко определённые протоколы использования и коммерческие источники таких ферментов доступны для любой современной лаборатории. Самые важные *компоненты* перечислены ниже.

1. *Рестрикционные ферменты*, изолированные из бактерий. Более 100 типов таких ферментов предлагаются коммерческими структурами. Каждый из ферментов разрезает ДНК в специфической области рестрикции. Обычно рестрикционные ферменты состоят из двух идентичных субъединиц, поэтому они симметрично атакуют обе нити спирали ДНК и разрезают её на специфическом участке, содержащем палиндромную последовательность.

2. *ДНК-лигаза*, соединяющая разрезанные ДНК-фрагменты. После того, как "липкие концы" соединятся, ДНК-лигаза достраивает недостающие связи для восстановления сахарофосфатного остова непрерывной спирали ДНК.

3. *ДНК-полимераза* синтезирует новую ДНК, используя другую нить в качестве матрицы, образуя двойную спираль по одинарной нити. ДНК-полимераза используется для заполнения однонитевых "дыр" и для полного копирования фрагментов ДНК.

Химический синтез фрагментов ДНК дополняет эти три природные биомолекулярные инструменты манипулирования ДНК. Современные технологии химического синтеза позволяют автоматически формировать фрагменты ДНК длиной до 100 нуклеотидов. Сформированные таким образом комплементарные нити ДНК затем гибридизируются, образуя двойные спирали ДНК. Синтез коротких олигонуклеотидов является рутинной компьютеризованной процедурой. Коммерческие организации предлагают на рынке огромное количество синтезированных олигонуклеотидов.

Химический синтез одноцепочечных ДНК-зондов для определённой последовательности нуклеотидов может быть осуществлен серией реакций, показанных на рисунке 28 (см. [12] п. 4.1).

Первый 3'-нуклеотид (мономер 1) присоединяют к стеклянной подложке посредством его 3' гидроксила. 5' гидроксил первого мономера готов к присоединению второго мономера. *Второй* нуклеотид последовательности (мономер 2) модифицируется добавлением *к 5'-гидроксилу* 4',4'-диметокситритила (DMT) для того, чтобы блокировать этот

гидроксил, не дать ему вступать в неспецифические реакции. Кроме того, *к 3'-гидроксилу* второго мономера присоединяют высокореактивный фосфорамитидит MeO–P–$N(IP)_2$ (Me – метильная группа, $N(IP)_2$ – диизопропиламинная группа). Такая молекулярная конфигурация и называется *фосфорамидитом* (рисунок 29).

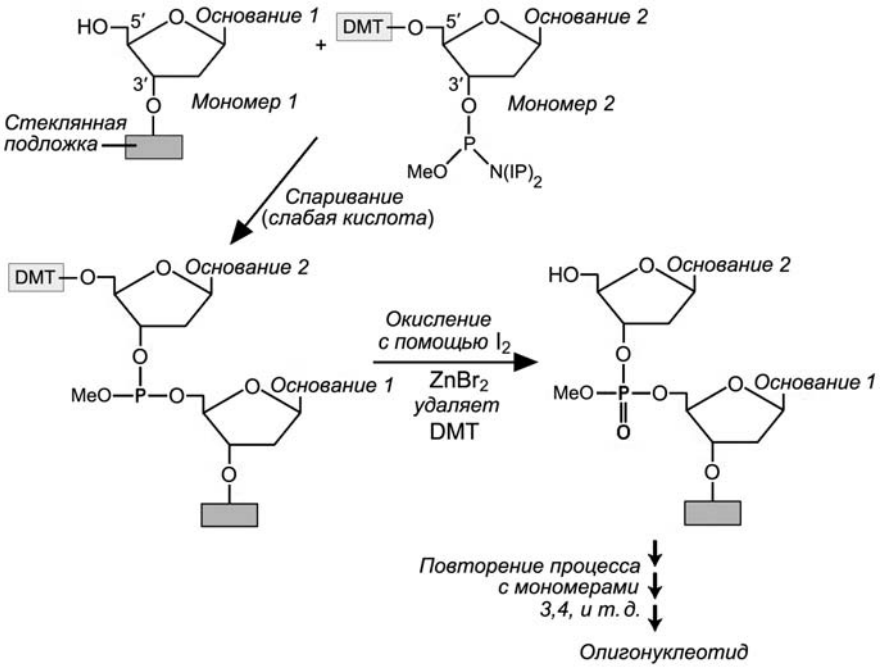


Рисунок 28 – Химический синтез олигонуклеотидов

Когда эти два мономера смешиваются в присутствии слабой кислоты, они связываются, благодаря образованию фосфодиэфирной связи с фосфором в трёхвалентном состоянии. Окисление такого димера с помощью иодной смеси увеличивает валентность фосфора до 5, с последующим освобождением 5'-конца, благодаря удалению DMT-группы бромидом цинка ($ZnBr_2$). Аналогично присоединяется *третий* мономер. Повторение процедуры позволяет синтезировать олигонуклеотид нужной

длины. Затем, применяя щелочную среду, удаляются все метильные группы с фосфатов и олигонуклеотид (мономер 1) отделяют от стеклянной подложки.

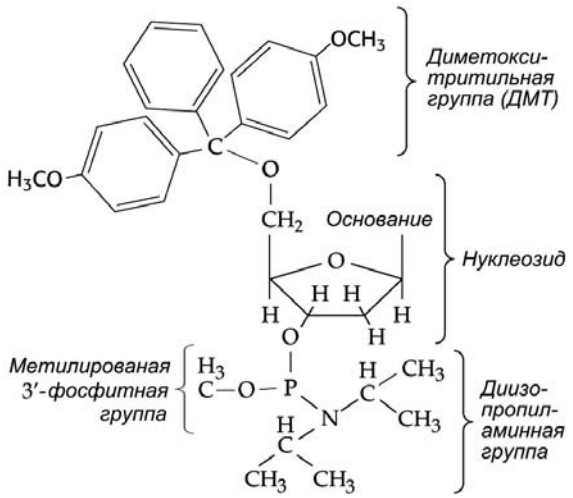


Рисунок 29 – Фосфорамидит

В настоящее время процесс синтеза олигонуклеотидов автоматизирован. Исследователь может программировать синтез специфических последовательностей длиной до 100 нуклеотидов. Альтернативный способ приготовления зондов состоит в использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Клонирование ДНК. После того, как получена необходимая новая молекула ДНК, её копирование в больших количествах производится с помощью *двух* основных методик: (1) клонированием ДНК и (2) полимеразной цепной реакцией. Термин "*клонирование*" обозначает процесс получения идентичной копии, минуя нормальные процессы полового размножения – копии мыши или овцы, колонии идентичных клеток или, в нашем случае, множество идентичных копий данного фрагмента ДНК. Для процесса клонирования ДНК используется бактериальная клетка, которая и осуществляет многократное копирование фрагмента ДНК.

В *одном* из методов данный фрагмент ДНК помещают в вирус, которым затем заражают бактериальную клетки, стимулируя тем самым процесс многократного копирования. В *другом* методе используются *бактериальные плазмиды* (см. [7] п. 9.2).

Бактерии, в дополнение к геномным ДНК, содержат в себе *плазмиды* – небольшие кольцевые ДНК. Для того чтобы клонировать фрагмент ДНК, мы встраиваем его в плазмиду, которую затем помещаем в бактерию. После этого плазмида копируется каждый раз при клеточном делении, образуя большое количество ДНК по мере роста бактериальной культуры.

На рисунке 30 представлена схема плазмидного вектора pBR322, содержащего 4361 пару оснований ДНК, который часто используют в биотехнологии с клеткой *Escherichia coli*.

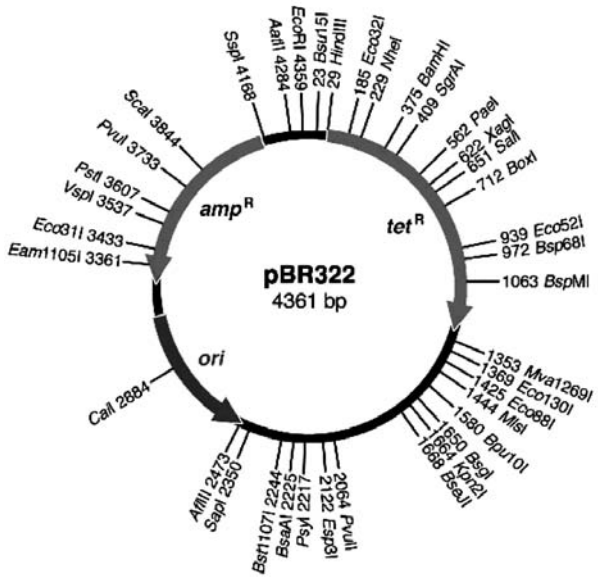


Рисунок 30 – Схема плазмидного вектора pBR322

Плазмида содержит *ориджин* репликации (*ori*) и два гена, которые кодируют белки, обеспечивающие *устойчивость к антибиотикам*, один к

ампициллину (amp^R), другой к тетрациклину (tet^R). По периметру плазмиды указаны местоположение сайтов рестрикции, на которые действуют различные рестрикционные ферменты, и обозначение соответствующего рестрикционного фермента.

Используя соответствующий рестрикционный фермент, плазмида может быть разрезана в определённом месте. Исследователи добавляют в плазмиду новые гены, разрезая плазмиду в одном из сайтов рестрикции. Гены, создающие устойчивость к антибиотикам, обеспечивают чёткий метод определения того, содержит ли бактерия такой плазмидный вектор. Например, если новый фрагмент ДНК будет вставлен в *Pst*I сайт рестрикции, то такая вставка разрушит ген резистивности к ампициллину. Поэтому те бактерии, которые содержат новую плазмиду, легко могут быть идентифицированы и отделены от тех бактерий, которые не содержат плазмиду, поскольку они будут резистентны к тетрациклину, но чувствительны к ампициллину.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это метод копирования небольших фрагментов ДНК. Он использует достоинства эффективной *термостабильной ДНК-полимеразы*, выделенной из бактерий, которые живут в горячих вулканических водных источниках и гейзерах. ПЦР работает циклически, удваивая число ДНК в каждом цикле (рисунок 31).

Процесс начинается с двойной спирали ДНК. Нагревание денатурирует двойную спираль на две однонитевые ДНК. В систему добавляются *короткие праймеры*, которые гибридизируются с концами нитей ДНК, и с которых начнется синтез комплементарных нитей.

ДНК-полимеразы достраивают комплементарные вторые нити ДНК, используя первые нити в качестве матрицы. В конце цикла из одного фрагмента ДНК получены два фрагмента, идентичных исходному.

Циклы повторяются, удваивая количество ДНК в каждом цикле. Именно использование термостабильных ДНК-полимераз, которые выдерживают тот нагрев, в каждом цикле, которым стимулируется денатурация (расплетание) двойных спиралей ДНК, обеспечивает эффективность ПЦР.

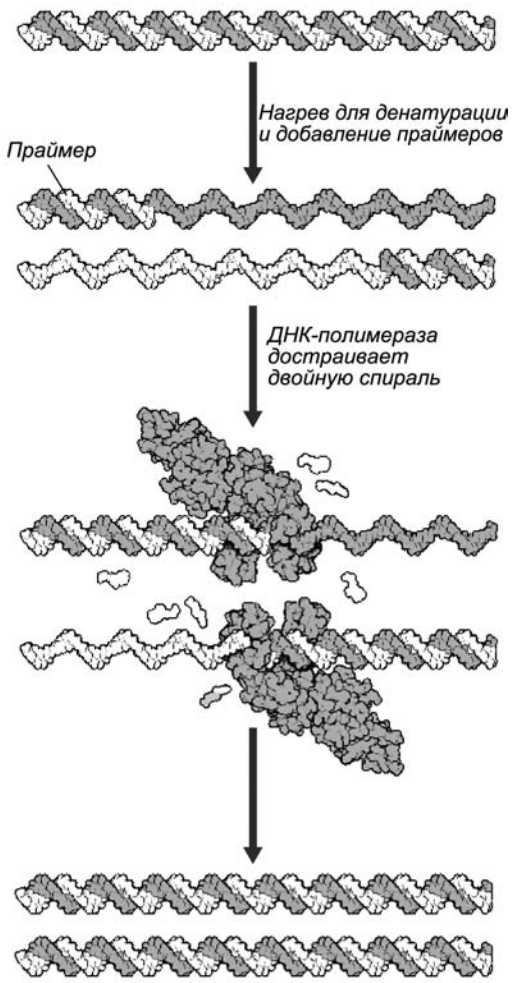


Рисунок 31 – Схема полимеразной цепной реакции

3.1.3. Методы синтеза белков

После того, когда мы сконструировали нужную ДНК, необходимо использовать её для синтеза планируемого белка. Обычно для синтеза белка используют **экспрессионные векторы** – плазмиды, которые

содержат необходимый ген, и активный промотор трансляции. Промотор, который обычно берут из вирусов, стимулирует модифицированную клетку синтезировать большое количество мРНК по плазмидному ДНК-вектору. Наиболее широко используют для этой цели *бактериальные* клетки. Такие трансформированные клетки синтезируют большое количество нужного белка – порядка 1–10% всего белкового содержимого клетки. Кроме того, преимуществом использования бактерий является их простое культивирование, и достаточно дешёвые методы ферментации, что позволяет выращивать большое количество бактериальной культуры, имея скромные ресурсы.

Однако использование бактерий имеет серьёзные *ограничения*.

(1) Клетки эукариот часто *модифицируют* синтезированные белки, а бактерии не способны осуществлять такие посттрансляционные *химические модификации*. В частности, многие животные и растительные белки имеют углеводные группы на поверхности (гликопротеины), а бактерии не могут осуществить такое *гликозилирование* белков. Это может иметь фатальные последствия при синтезе белков для медицинских нужд. Многие из таких белков для того, чтобы быть активными должны иметь необходимые углеводные группы, и иммунная система будет бороться с такими немодифицированными белками. Например, необходимость учитывать группу крови при переливании, связана именно с различием в строении углеводных цепей, присоединенных к белкам крови разных групп. В случаях, когда необходима соответствующая модификация белков, используют клетки дрожжей, насекомых или млекопитающих.

(2) Другая проблема, которая возникает при использовании бактерий, это то, что белки начинают *агрегироваться*, когда их концентрация превышает некоторый уровень, образуя *белковые включения в клетках*. Такие включения представляют собой плотные белковые агрегаты, различимые в оптический микроскоп и распространяющиеся через всю бактериальную клетку. Они формируются, когда новые белки случайным образом ассоциируются ещё до того как завершится их фолдинг. Белковые включения чрезвычайно прочные и для того, чтобы разъединить

их отдельные белковые нити необходимо использовать достаточно жёсткие внешние условия. Но в большинстве случаев выделенные таким образом индивидуальные полипептидные цепи смогут затем осуществить правильный фолдинг в подходящих условиях. Поэтому, если принципиально возможно выделить впоследствии индивидуальный белок из белкового включения, то само наличие таких включений существенным образом помогает *выделению белка* из клеток после клонирования. Поскольку плотность белковых включений намного выше плотности большинства остальных клеточных компонентов, они легко могут быть отделены от остальных клеточных компонентов простым центрифугированием клеточного экстракта.

Бесклеточный синтез. Белки могут быть синтезированы также и без помощи живых клеток. Достаточно собрать вместе те компоненты клетки, которые осуществляют биосинтез белков.

Первый этап производства белка – транскрипция ДНК в мРНК – производится с помощью РНК-полимераз. Однако на втором этапе – при синтезе белков на рибосомах – зачастую возникали трудности при использовании клеточного цитозоля *in vitro*. Такой клеточный экстракт может не иметь достаточно АТФ, или же, присутствующие в экстракте цитозоля протеазы и нуклеазы разрушают синтезированные белки или мРНК. Для преодоления этих ограничений были созданы специализированные проточные *бесклеточные* (*cell-free*) *реакторы*.

Также успешными были попытки осуществить синтез белков, изготовив искусственную смесь из предварительно выделенных и очищенных компонентов, необходимых для синтеза. Но из-за сложности такой системы, включающей более 100 биокомпонентов, эти попытки пока ограничились воспроизведением условий синтеза белков в самых простых дрожжах. Эти эксперименты были проведены в научных, а не в промышленных масштабах. Но те преимущества, которые имеют бесклеточные технологии синтеза белков, делают их разработку чрезвычайно перспективным делом. Именно с помощью таких технологий можно синтезировать такие белки как мембранные белки, белки-токсины или белки с нестандартными аминокислотами, которые трудно

синтезировать в живых клетках бактерий. Разработка бесклеточных трансляционных систем является в настоящее время областью активных исследований молекулярных биотехнологов.

3.1.4. Точечный мутагенез

Во многих случаях нам необходимы небольшие изменения в существующих природных белках, для того, чтобы приспособить их функции к данной задаче.

Направленный точечный мутагенез (или *сайт-специфический* мутагенез, *site-directed mutagenesis*) используется для того, чтобы модифицировать аминокислотную последовательность белка, сделав специфические изменения в структуре гена, кодирующего этот белок. В этом случае мы можем сделать изменения с атомной точностью в структуре белковой цепи, видоизменяя его функции и пространственную структуру. Существует множество методик (в том числе и коммерчески реализуемых на рынке) такого изменения существующих генов.

Сайт специфические (точечные) мутации вносятся в ген с помощью специальных олигонуклеотидов (рисунок 32).

Олигонуклеотид полностью комплементарен гену везде, кроме того сайта, в котором произведено *изменение* (обозначен *черным* цветом на рисунке). Это изменение может соответствовать (1) только замене одной аминокислоты на другую или (2) представлять собой небольшую вставку или, наоборот, (3) удаление короткого участка гена. При необходимых условиях этот олигонуклеотид гибридизируется с нитью ДНК, несмотря на несоответствие в данном сайте. Затем ДНК-полимераза достраивает остальную часть второй нити двойной спирали ДНК, используя олигонуклеотид в качестве праймера. После этого такая *отредактированная* нить ДНК отделяется и по ней, как по матрице, синтезируется уже мутантная ДНК, содержащая те изменения, которые были сделаны в олигонуклеотиде. Затем используются процедуры клонирования и экспрессии для синтеза модифицированного белка.

Точечный (направленный) мутагенез революционизировал молекулярную биологию. Это мощный *метод определения функций отдельно*

взятой аминокислоты или участка белковой цепи. Например, отдельные аминокислоты могут быть подвергнуты заменам по очереди, определяя при этом какие из них влияют на функционирование белка. Таким способом могут быть *локализованы* те аминокислоты, которые формируют активный центр фермента или центр связывания гормона.

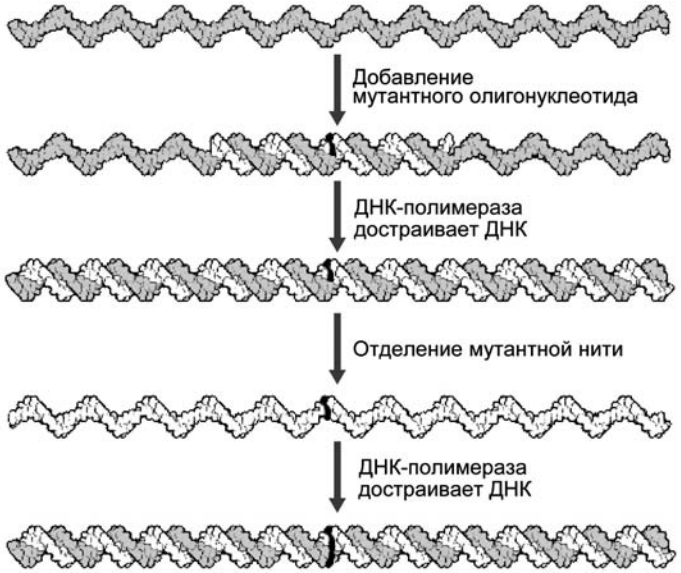
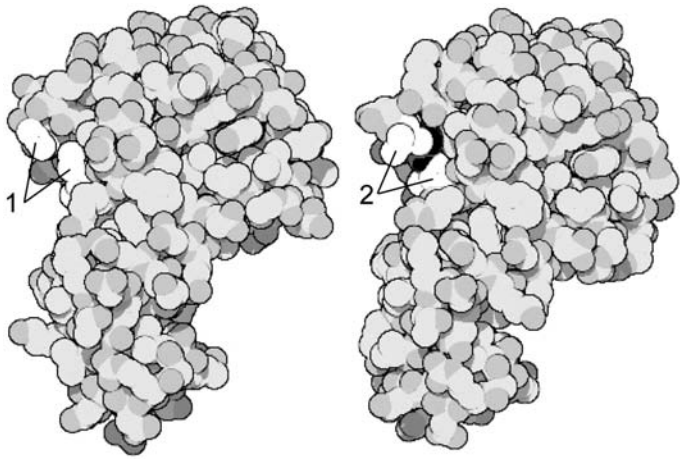


Рисунок 32 – Схема сайт-специфического мутагенеза

Направленный точечный мутагенез также широко используется для того, чтобы увеличить стабильность белков, конструируя дополнительные перекрестные связи в глобуле или улучшая укладку аминокислотных остатков внутри глобулы.

Например, одна из попыток увеличения стабильности белка лизоцима (*lysozyme*) изображена на рисунке 33.

В природном лизоциме аминокислоты концов цепи находятся рядом (рисунок 33(а)). Замена этих аминокислот на *цистеины* позволяет образовать *дисульфидный мостик* между ними (показан чёрным цветом на рисунке 33(б)), который делает структуру лизоцима более устойчивой.



а *б*

Рисунок 33 – Модификация лизоцима: *а* – исходная молекула лизоцима с аминокислотами (1) на концах белковой цепи; *б* – измененная молекула лизоцима с цистеинами (2) на концах

Однако в направлении модификации природных белков точечным мутагенезом достигнуты лишь скромные успехи. Оказалось, что предугадать, какие модификации белковой цепи не угрожают разрушить стабильность структуры и функциональность природных белков, – является очень сложной задачей.

3.1.5. Технология слияния белков

Технология рекомбинантных ДНК используется также для *соединения* целых генов, формируя *объединённый* белок, который сочетает функции обоих компонентов. При этом, разрабатывая место "стыковки" доменов, надо следить, чтобы соединяемые белки не заблокировали друг друга в процессе фолдинга. К счастью, большинство природных белков достаточно прочны и сохраняют свою функциональность даже при объединении в большие структуры.

Применяя технологию слияния белков, можно использовать для своих нужд *клеточные механизмы транспорта белков*. В клетках белки,

которые должны быть перенесены к разным клеточным компартментам, отмечаются специальными *сигнальными пептидами* на концах белковых цепей (см. [13] п. 8.1). Эти пептиды распознаются транспортными системами клетки и, после доставки в нужный компартмент, удаляются.

Используя технику рекомбинантных ДНК можно *добавить* сигнальный пептид к данному белку, направляя его тем самым в специфическую область клетки. Например, можно добавить сигнальный пептид, адресующий белок в *секреторные* везикулы. Такой белок будет выводиться из клетки во внеклеточную среду, где его уже достаточно легко собрать и очистить.

Перспективным также является *конструирование химерных белков* (рисунок 34). Комбинируя два белка, можно получить новый, гибридный белок, обладающий функциями обеих компонентов.

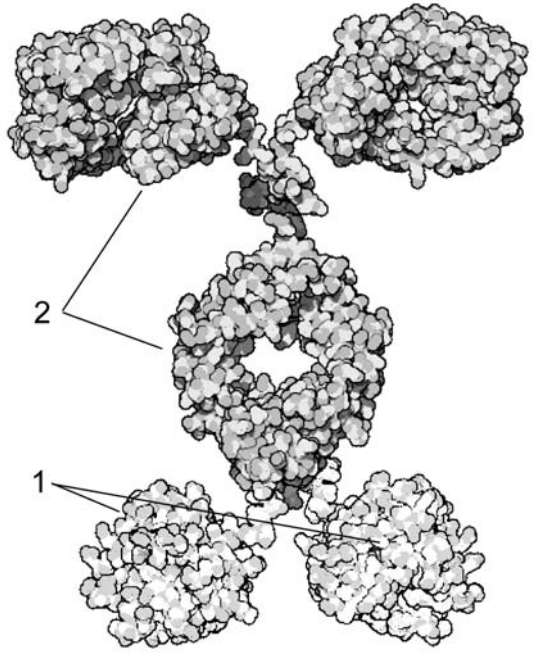


Рисунок 34 – Схема антиракового иммунотоксина: 1 – токсичный белок; 2 – антитело

Например, *антираковые иммунотоксины* были созданы, путём соединения антител, которые связываются с раковыми клетками, с белками-токсинами, которые убивают эти клетки (рисунок 34). Иммунотоксин находит раковую клетку и убивает её, снижая побочные эффекты традиционной антираковой хемотерапии.

Для визуализации клеточных процессов *зеленый флуоресцентный протеин* (*green fluorescent protein*, GFP) из медуз объединяют с исследуемыми белками для того, чтобы обнаружить местонахождение этих белков в организмах (иммунофлуоресценция). Те части организма, в которых синтезируются эти исследуемые белки, будут светиться зеленым светом.

3.1.6. Моноклональные антитела

Множество применений био*нано*технологии таких, как биосенсорика и обнаружение вызванных болезнью нарушений в наномедицине, требуют эффективных методов распознавания индивидуальных молекул.

Иммунная система животных была создана эволюцией именно для выполнения этой задачи, поэтому имеет смысл использовать наработанные природой решения для наших целей.

Главным "инструментом" иммунной системы является антитело (рисунок 35). Молекула антитела имеет два связывающих домена (две "руки" антитела), имеющих специальные специфические *центры связывания* с антигенами. Эти связывающие домены соединены гибкими линкерами с центральным доменом антитела.

Форма центра связывания (*области связывания антигена*) точно соответствует *только данной* молекуле антигена. На рисунке 35 показаны два примера связывания антител. Справа рука антитела имеет большую плоскую область связывания, с которой связана молекула лизоцима. Слева рука антитела имеет центр связывание в виде глубокого кармана, в котором связана молекула фуллерена.

Иммунная система человека способна синтезировать около 10^{15} различных видов антител, каждый с индивидуальной специфичностью. Комбинируя эту природную библиотеку молекул с современными

методами синтеза антител, сегодня стало возможным получать антитела, обладающие высокой специфичностью к любой молекуле.

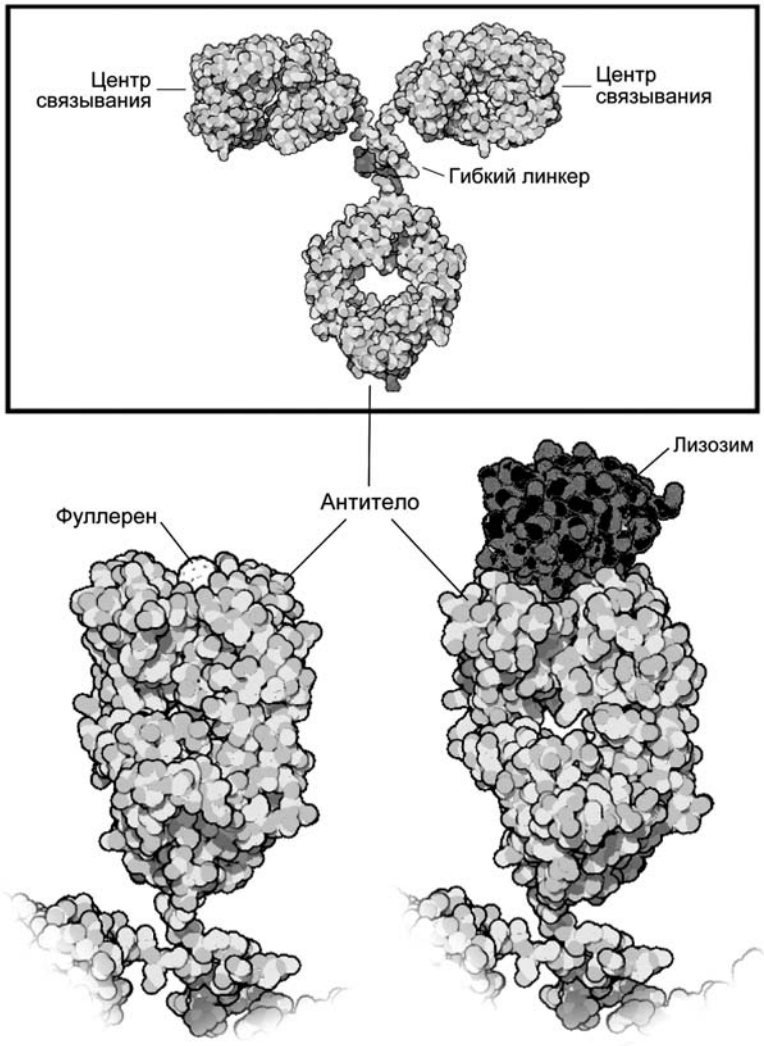


Рисунок 35 – Схема антитела (вверху) и примеры связывания с различными молекулами (внизу)

Антитела синтезируются *В-клетками* (В-лимфоциты, вид белых кровяных телец) и составляют около 20% белка в плазме крови человека. Каждая В-клетка синтезирует только единственный тип антител. На своей поверхности В-клетка имеет прочно связанные с её мембраной *"сигнальные"* антитела того типа, который она способна синтезировать.

Связывание этих присоединенных антител данной В-клетки с соответствующим антигеном *стимулирует* В-клетку к началу размножения и активного синтеза антител, которые выводятся в плазму крови и обладают той же специфичностью, что и "сигнальные" антитела на поверхности В-клетки. В процессе размножения В-клеток может происходить модификация центров связывания у антител. Те дочерние клетки, у антител которых центры связывания более эффективны, *чаще и прочнее* связываются с антигенами и, тем самым, имеют преимущество в дальнейшем росте и размножении. Те же дочерние клетки, центры связывания которых связываются с антигенами слабее, хуже размножаются. Так осуществляется *отбор* и "*юстировка*" иммунной системы под ксенобиотики.

Если животное инфицируется данной чужеродной молекулой (*антигеном*), его клетки синтезируют множество различных антител, связывающихся с различными участками (*антигенными детерминантами* или *эпитопами*) этого антигена. В большинстве случаев использование такой однородной смеси разных антител не целесообразно, необходимо выделить лишь одно характеристическое антитело. Для этого надо выделить ту единственную В-клетку, которая синтезирует это антитело, и, затем, культивировать её. Однако число актов деления В-клеток ограничено, поэтому не удается синтезировать необходимое количество антител.

В конце 70-х годов XX столетия эта проблема была решена. В-клетки были соединены с "бессмертными" раковыми клетками. Такие комбинированные клетки можно культивировать, синтезируя нужное количество антител. Такие антитела называются *моноклональными антителами*, поскольку они произведены клонированием идентичных комбинированных клеток. Сегодня моноклональные антитела могут быть синтезированы для практически любого мыслимого антигена.

3.2. Структурный анализ

3.2.1. Рентгеновская кристаллография

Как сказал Ричард Фейнман, ключ к пониманию биологии, это способность понять, что делают клетки. Только после того, как были определены атомные структуры первых белков, исследователи смогли разобраться в механике биомолекулярного функционирования. Умение конструировать биомолекулы для выполнения новых функций положило начало новой эре рационального дизайна биомакромолекул.

В конце 50-х годов XX века Джон Кендрю с коллегами расшифровал структуру миоглобина, выяснив на атомном уровне, каким именно образом белковая цепь может связывать кислород. С тех пор информация о структуре белков накапливается в Базе Данных Белков (*Protein Data Base*), которая доступна по Интернет-адресу http://www.pdb.org. Определение структуры биомолекул, хотя и имеет большую историю, все ещё является дорогостоящей процедурой в смысле необходимых инструментальных и человеческих ресурсов.

Ниже будут рассмотрены основные методы определения структуры биомолекул, причём нас будут интересовать не подробности каждого метода, а то, как можно использовать полученные результаты. Для использования этих результатов в качестве стартовой точки в бионанотехнологии, важно представлять себе, насколько точно эти структурные результаты представляют действительную структуру молекул.

Рентгеновская (X-лучевая) кристаллография дает наиболее детальную информацию об атомной структуре молекул.

Кристаллические тела, у которых межатомные расстояния соизмеримы с длиной волны рентгеновского излучения, т. е. составляют ~0,1 нм, являются для этих лучей трёхмерной дифракционной решеткой. Поэтому при прохождении излучения через кристаллический объект рентгеновские лучи образуют интерференционную картину, которая может быть зафиксирована детектором. Характер этой картины определяется размерами элементарных ячеек кристалла, их упорядоченностью и распределением электронной плотности в ячейках.

В основе дифракционных методов лежит явление интерференции волн отражённых от структур расположенных периодически в пространстве. Представим кристалл в виде параллельных кристаллографических плоскостей, отстоящих друг от друга на расстоянии d (рисунок 36).

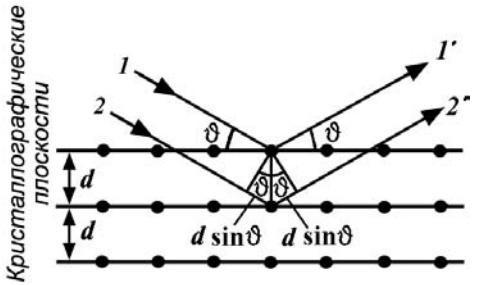


Рисунок 36 – Дифракция на кристаллической решетке

Пучок параллельных монохроматических лучей (1 и 2) падает под *углом скольжения* ϑ (угол между направлением падающих лучей и кристаллографической плоскостью) и возбуждает атомы кристаллической решетки, которые становятся источниками когерентных вторичных волн (1′ и 2′), интерферирующих между собой.

Максимумы интенсивности будут наблюдаться в тех направлениях, в которых все отражённые атомными плоскостями волны будут находиться в одинаковой фазе (формула Вульфа–Брэггов)

$$2d\sin\vartheta = m\lambda, \qquad (m = 1,2,3,\ldots).$$

Эта формула используется в *рентгеноструктурном анализе* – если известна длина волны λ рентгеновского излучения, то, наблюдая дифракцию на кристаллической структуре неизвестного строения и измеряя ϑ и m, можно найти d, т.е. определить структуру вещества. Она также используется в *рентгеновской спектроскопии* – если известно расстояние d, то, измеряя ϑ и m, можно найти длину волны λ падающего рентгеновского излучения.

Для получения информации о структуре бионанообъектов методом рентгеноструктурного анализа сначала из раствора, содержащего исследуемую молекулу, выращивается кристалл. Важными параметрами при этом являются концентрация биообъекта, тип и концентрация соли, pH, тип и концентрация поверхностно-активного вещества и прочие добавки, а также температура и скорость кристаллизации. Иногда кристаллы белка удаётся получить лишь после опробования более тысячи различных условий кристаллизации. Затем полученный кристалл облучают рентгеновским пучком.

Установка для исследования биологических образцов методом рентгеноструктурного анализа представлена на рисунке 37.

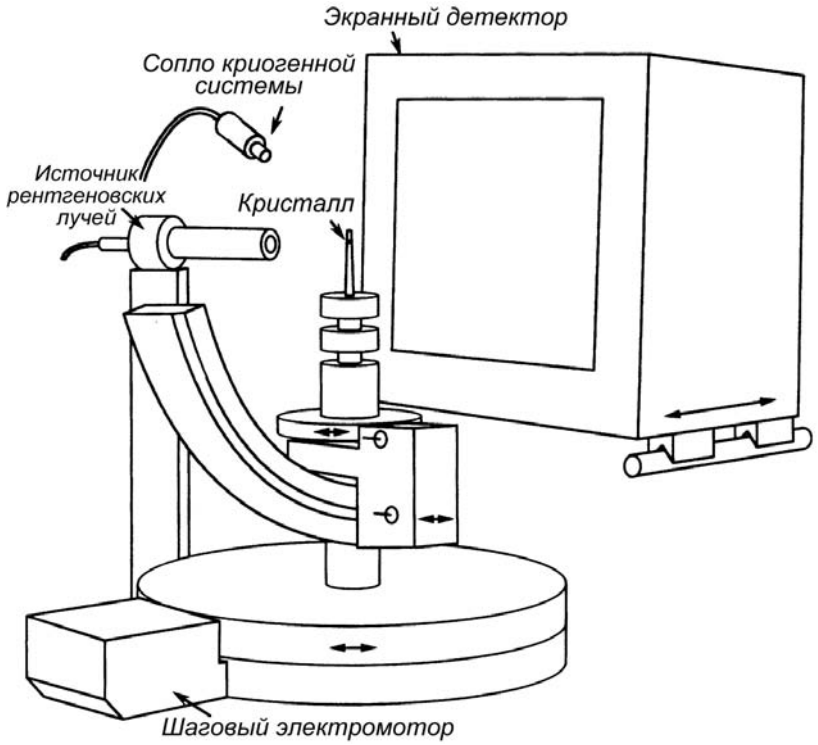


Рисунок 37 – Схема рентгеновского дифрактометра

В данной установке кристалл охлаждается струёй азота через сопло криогенной системы. Охлаждение кристалла снижает деградацию кристалла из-за воздействия рентгеновских лучей, но оно же и слегка изменяет межмолекулярные расстояния. Для получения полной информации о кристаллической структуре рентгенограмма записывается при вращении образца относительно трёх взаимно перпендикулярных осей. Обработка полученных данных с помощью преобразования Фурье позволяет определить к какой из 230 существующих пространственных групп принадлежит данный кристалл, определить параметры элементарной ячейки кристалла и положения атомов в такой ячейке.

Математически преобразование Фурье и обратное ему преобразование Фурье осуществляются между двумя областями (пространствами): $\vec{r}$ и $\vec{k}$. Если, например, $\vec{r}$ – пространство или время, а $\vec{k}$ – импульс или частота, то прямое и обратное преобразования Фурье, соответственно, можно записать, как:

$$F(\vec{k}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} f(\vec{r}) \exp(-2\pi \mathrm{i} \vec{k}\vec{r}) \mathrm{d}\vec{r},$$

$$f(\vec{r}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} F(\vec{k}) \exp(-2\pi \mathrm{i} \vec{k}\vec{r}) \mathrm{d}\vec{k}.$$

В качестве иллюстрации на рисунке 38 приведено одномерное преобразование Фурье.

Фурье преобразование сигнала f (рисунок 38(а)) представляет собой спектр F (рисунок 38(в)). Рисунок 38(б) представляет собой разложение на гармонические компоненты сигнала, показанного на рисунке 38(а). Это разложение было получено как Фурье преобразование спектра (в). С правильными начальными фазами четыре частотных компонента (б) при сложении дают сумму (а). Однако если сложить эти же четыре частотных компонента с начальными фазами равными нулю, то получится неправильная сумма (рисунок 38(г)). Если же использовать правильные начальные фазы то обратное преобразование Фурье спектра (в) даёт в точности сигнал (а).

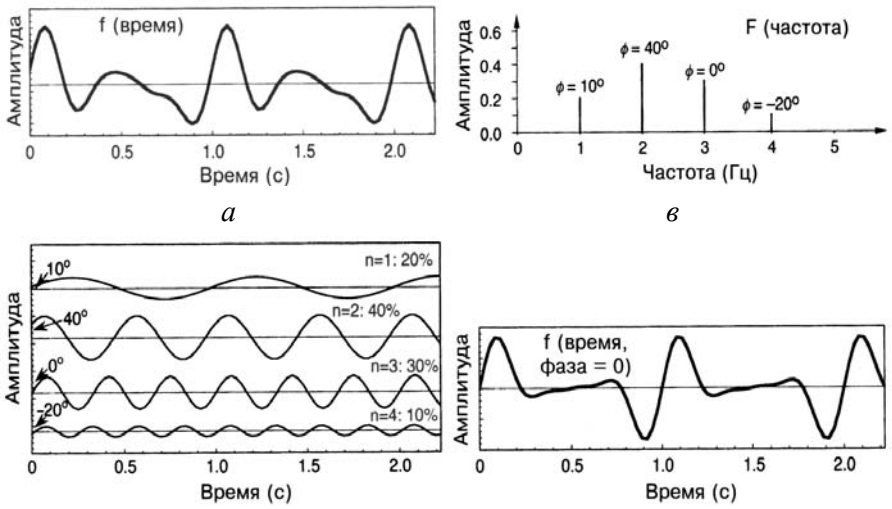


Рисунок 38 – Пример одномерного преобразования Фурье

Сравнение спектров (а) и (г) демонстрирует, что для восстановления исходного сигнала при преобразовании Фурье нужно знать и амплитуды, и фазы компонентов. В кристаллографии получаемая дифракционная картина кристалла (рисунок 39) или любого другого физического объекта является Фурье-преобразованием его структуры, а электронная плотность исследуемого объекта может быть восстановлена по дифрактограмме с помощью обратного преобразования Фурье.

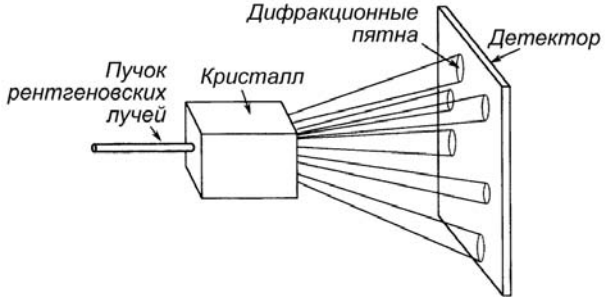


Рисунок 39 – Схема дифракции рентгеновских лучей на кристалле

К сожалению, при регистрации дифракционной картины вся информация о фазах теряется. Для получения фазовой информации в кристаллографии бионанообъектов используется методика замещения тяжёлыми атомами.

Кристалл, состоящий из идентичных белковых молекул, можно представить как *свёртку* кристаллической решетки и единичной ячейки, содержащей молекулу белка: Кристалл = Решетка ⊗ Единичная ячейка (рисунок 40). Единичная ячейка – это наименьшая кристаллическая единица, из которой можно получить весь кристалл путём простого параллельного переноса.

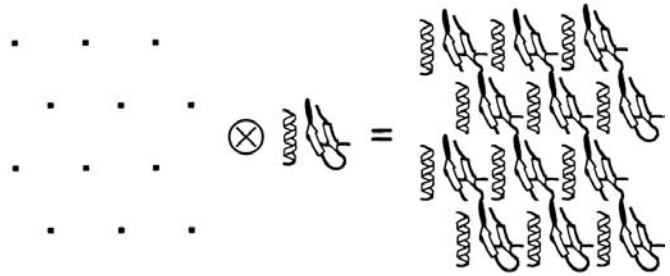


Рисунок 40 – Свёртка кристаллической решетки и единичной ячейки

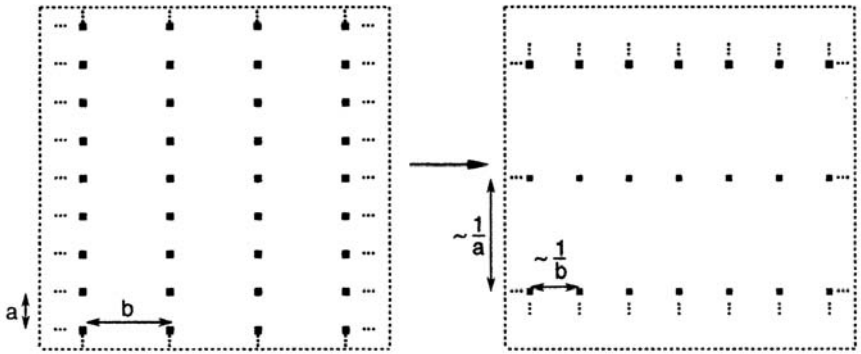
По определению *свёрткой* (*convolution*) двух функций $f(x)$ и $g(x)$, принадлежащих множеству $L(-\infty,+\infty)$ называется функция $h(x)$:

$$h(x) = f(x) \otimes g(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(x-y)g(y)\,\mathrm{d}y = \int_{-\infty}^{+\infty} f(y)g(x-y)\,\mathrm{d}y\,.$$

Функция $f(x) \otimes g(x)$ определена почти всюду и также принадлежит $L(-\infty,+\infty)$. По теореме свёртки преобразование Фурье, FT (*Fourier transform*) одновременно для двух функций свертки $f_1(\vec{r})$ и $f_2(\vec{r})$ есть произведение их Фурье-преобразований

$$FT\left[f_1(\vec{r}) \otimes f_2(\vec{r})\right] = FT\left[f_1(\vec{r})\right] \times FT\left[f_2(\vec{r})\right].$$

Таким образом, дифракционная картина белкового кристалла есть Фурье-преобразование единичной ячейки, умноженное на Фурье преобразование кристаллической решетки. Последнее называется обратной решеткой (рисунок 41).

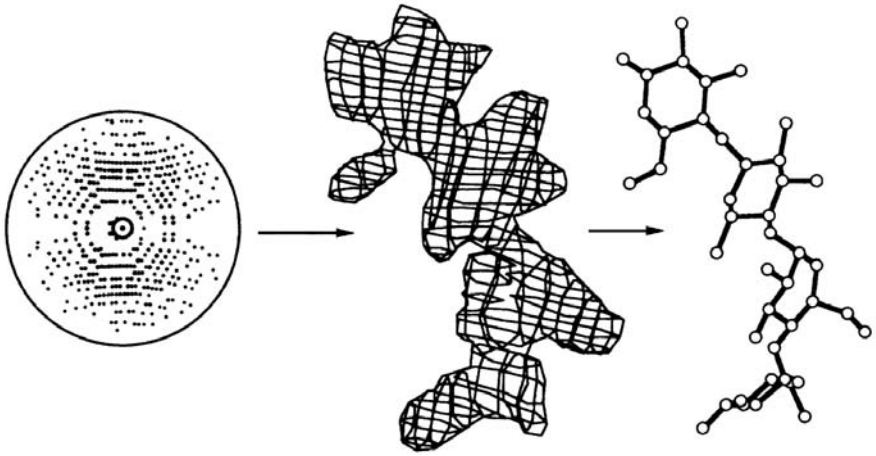


а *б*

Рисунок 41 – Фурье-преобразование кристаллической решетки в реальном пространстве в обратную решетку: *а* – решетка в реальном пространстве; *б* – обратная решетка

Сравнивая дифрактограммы исследуемого кристалла с дифрактограммами, полученными от аналогичных кристаллов, которые содержат один или несколько атомов тяжёлых элементов в фиксированных положениях (рисунок 42(а)), можно определить фазы рассеянных волн, соответствующим разным пятнам на дифрактограмме, рассчитать пространственное распределение (карту) электронной плотности (рисунок 42(б)), и построить атомную модель объекта (рисунок 42(в)).

Дифракционная картина, которая представляет собой сложное, но специфическое для каждого образца распределение пятен, регистрируется детектором и после компьютерной обработки превращается в диаграмму распределения электронной плотности (рисунок 43(б) или рисунок 43(в)), которая отражает пространственное положение и форму компонентов молекулы.



а *б* *в*

Рисунок 42 – Схема кристаллографического анализа белков: *а* – дифрактограмма; *б* – карта электронной плотности; *в* – атомная модель

На рисунке 43(в) представлена часть такой диаграммы кристалла молекулы ДНК. Области внутри контуров имеют повышенную электронную плотность. На диаграмме видно C≡G пару и ион кальция, окруженный молекулами воды.

Оборудование, которое необходимо для выращивания кристаллов, источник рентгеновских лучей и суперкомпьютеры для обработки полученных рентгенограмм, как правило, сосредоточены в специализированных международных центрах, имеющих достаточный бюджет для проведения таких исследований.

В результате кристаллографического анализа исследователи получают *трехмерную "карту"* распределения электронной плотности в молекуле. Разрешение такой карты – расстояние между точками, на котором изменение электронной плотности может быть замечено, – определяется качеством выращенного кристалла. *Самые лучшие кристаллы* из биомолекул обеспечивают данные с очень высоким разрешением, и особенности молекулярной структуры, отстоящие друг от друга на 0,1 нм (1 Ангстрем, 1 Å), могут быть легко распознаны на таких картах.

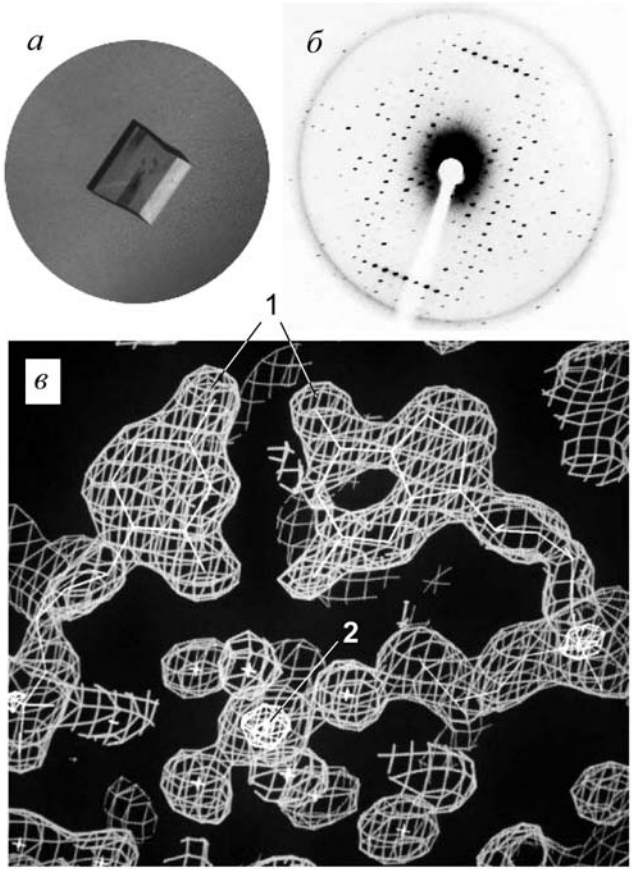


Рисунок 43 – Рентгеновская кристаллография: *а* – кристалл из биомолекул; *б* – дифрактограмма; *в* – распределение плотности, восстановленное компьютером. 1 – цитозин-гуаниновая пара оснований в ДНК; 2 – ион кальция

Обычно белки исследуются с худшим разрешением в диапазоне 1,5–3,0 Å. При разрешении 1,5 Å легко различимы отдельные атомы, однако при разрешении 3,0 Å, уже надо предварительно знать структуру ковалентных связей, чтобы расшифровать такую карту. Трёхмерная схема распределения электронной плотности затем интерпретируется в терминах атомной структуры.

Данные, полученные с *высоким* разрешением, достаточно легко интерпретируются и могут быть уверенно использованы.

Если же разрешение было 3,0 Å и ниже, то следует *осторожно* делать выводы об атомной структуре молекулы. Подвижные звенья молекулярной цепи и участки на поверхности могут быть не разрешены на карте электронной плотности, поэтому атомная интерпретация может не быть однозначной и достоверной.

Так называемые *B-факторы* (температурные факторы) представляют собой количественный параметр – *степень разупорядоченности* в данной точке молекулы, – отражающий точность определения позиции того или иного атома.

Моделируемые атомы обычно представляются как гауссово распределение вокруг центра атома. B-фактор пропорционален ширине такого распределения. Атомы с чётко определёнными позициями имеют B-факторы около 10. Если же величина B-фактора 30 и более, то это означает сильное разупорядочение и трактовка атомной структуры должна проводиться особо аккуратно.

Главным недостатком метода рентгеноструктурного анализа является необходимость выращивания кристалла. Однако молекулы в кристалле могут не соответствовать точно свободным молекулам в растворе, точнее молекулы в кристалле соответствуют какой-либо *одной*, замороженной, *конформации* свободной молекулы.

Для большинства растворимых белков, к счастью, эти различия несущественны. Однако, функциональные особенности, связанные с подвижностью компонентов биомолекулы, должны исследоваться на большом числе кристаллов, выращенных в различных условиях.

Например, на рисунке 44 наложены друг на друга две структуры белка лизоцима (обозначенные черным и серым цветом), полученные с использованием разных кристаллов. На рисунке отмечены стрелками:

1) перемещение внешней петли;
2) смещение радикалов аминокислот.

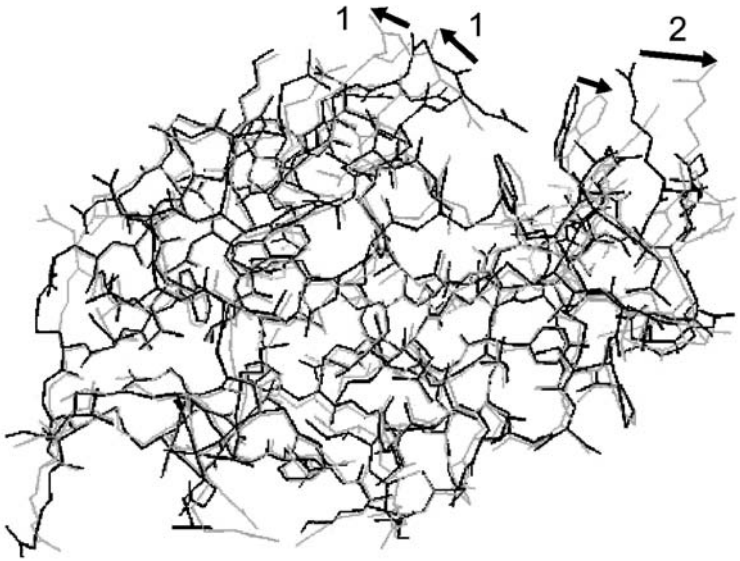


Рисунок 44 – Структура молекулы лизоцима. Стрелками показаны перемещения элементов глобулы: 1 – смещение петли; 2 – движение радикалов аминокислот

3.2.2. Электронный парамагнитный резонанс

Входящие в состав атомов электроны обладают спином, или, иначе говоря, собственным магнитным моментом. Как правило, на атомных орбитах находятся только спаренные электроны с антипараллельными спинами, и общий магнитный момент таких электронных пар равен нулю. Однако если в образце имеются неспаренные электроны, то во внешнем магнитном поле они будут ориентироваться параллельно или антипараллельно ему в зависимости от собственного спина. Переориентация спина неспаренного электрона сопровождается поглощением микроволнового излучения в области длин волн ~ 1 см. Это явление получило название электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Измеряя величину поглощения электромагнитного излучения с определённой длиной волны, можно определить концентрацию неспаренных электронов в исследуемом образце.

Наличие *спина* у электрона $\left(S=\frac{1}{2},\quad m_S=\pm\frac{1}{2}\right)$ приводит к тому, что во внешнем магнитном поле B, вследствие двух возможных ориентаций спина электрона по отношению к этому полю, энергия электрона может принимать одно из двух значений

$$E_{m_S}=2\mu_B m_S B,$$

где $\mu_B=\frac{e\hbar}{2m_e}$ – магнетон Бора; m_e – масса электрона. Поэтому, при усилении приложенного магнитного поля энергия электронов со спином $m_S=+\frac{1}{2}$ *повышается* $E_{+\frac{1}{2}}=\mu_B B$, а со спином $m_S=-\frac{1}{2}$ – *понижается* $E_{-\frac{1}{2}}=\mu_B B$, причём разность энергий этих двух спиновых состояний будет

$$\Delta E=E_{+\frac{1}{2}}-E_{-\frac{1}{2}}=2\mu_B B.$$

Если облучать образец полем с частотой ν, то при достижении магнитным полем такой величины, что

$$h\nu=2\mu_B B$$

резко возрастает поглощение – наблюдается *электронный парамагнитный резонанс* системы двух уровней с окружающим излучением (рисунок 45).

Парамагнитным резонанс называется потому, что он возможен только для системы с неспаренными спинами ($m_S\neq 0$), т. е. для парамагнитных веществ. В действительности, вследствие взаимодействия спина электрона с локальным магнитным полем, создаваемым ядрами и электронами молекулы, коэффициент в формуле отличается от 2, его называют g*-фактор*, условие резонанса записывают

$$h\nu=g\mu_B B.$$

Например, g-факторы равны: 2,00226 для атома водорода, 1,999 для NO_2, 2,01 для CO_2. Измерение g-фактора используют для идентификации частиц, находящихся в резонаторе. Для атомов и молекул со спином $m_S > \frac{1}{2}$ во внешнем магнитном поле возникает не два, а $2m_S + 1$ уровней, отличающихся значением спинового магнитного числа, и соответственно в спектре ЭПР не одна, а несколько близлежащих полос – так называемая *тонкая структура* спектра ЭПР, связанная с мультиплетностью уровня.

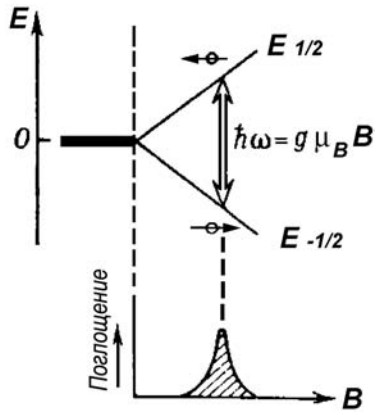


Рисунок 45 – Схема энергетического сдвига уровней в магнитном поле и формирования линии в спектре ЭПР

Если к тому же ядерный спин I отличен от нуля, то у ядра существует *собственное магнитное поле*, в котором каждая линия тонкой структуры спектра ЭПР расщепляется на $2I + 1$ компонент – *сверхтонкая структура спектра* (рисунок 46). Так, для одного протона со спином $I = \frac{1}{2}$, $m_I = \pm\frac{1}{2}$, общее *локальное магнитное поле*, в котором находится электрон

$$B_{лок} = B + am_I,$$

где a – некоторая константа, называемая *константой сверхтонкого взаимодействия*. Поэтому условия резонанса будут иметь вид

$$h\nu = 2\mu_B\left(B + \frac{1}{2}a\right) \quad \text{и} \quad h\nu = 2\mu_B\left(B - \frac{1}{2}a\right),$$

и вместо одной линии в спектре будут наблюдаться две линии, находящиеся друг от друга на расстоянии a по магнитному полю.

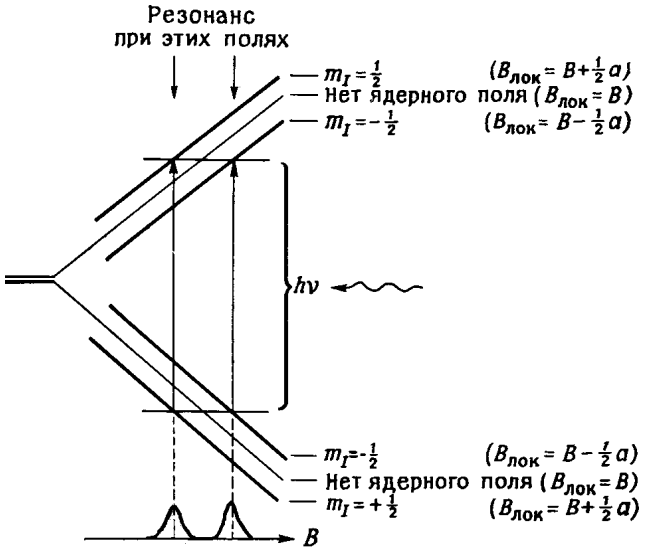


Рисунок 46 – Схема формирования сверхтонкой структуры спектра электронного парамагнитного резонанса

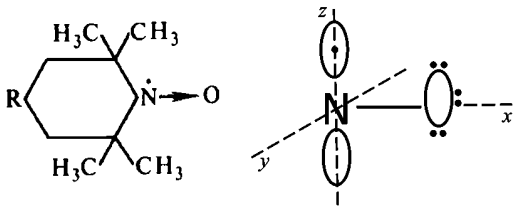
Из спектра ЭПР и особенностей его тонкой и сверхтонкой структуры можно получить важные сведения об электронной конфигурации атомов и ионов, о свойствах атомных ядер.

Метод ЭПР – один из наиболее чувствительных методов обнаружения и идентификации *свободных радикалов*, установления их электронной конфигурации и геометрии. Метод ЭПР применяется для исследования комплексных соединений, в частности, соединений переходных и редкоземельных металлов. При этом величина g-фактора и его зависимость от направления определяются силой и симметрией поля, создаваемого лигандами. Сверхтонкое расщепление в спектре позволяет

определить заселенность s- и p-орбиталей атома с магнитным ядром в радикале, а отсюда – электронное распределение и в известных случаях – валентные углы в молекулах, т. е. построить *карту молекулярных орбиталей*, которые занимает неспаренный электрон.

ЭПР-спектроскопия широко применяется для исследования объектов, в которых практически нет собственных неспаренных электронов. *Спектром ЭПР* называется зависимость мощности поглощения P электромагнитной волны от величины магнитной индукции B. Спектры ЭПР тем шире, чем сильнее взаимодействие между атомами и молекулами образца. И наоборот, чем слабее взаимодействие между частицами (больше подвижность молекул), тем спектры ЭПР уже. Следовательно, по ширине спектров ЭПР можно судить о подвижности молекул вещества. Например, с помощью метода ЭПР было проведено исследование изменения трансмембранной микровязкости фосфолипидной биомембраны толщиной 4 нм. Поскольку молекулы фосфолипидов диамагнитны, для исследований молекул липидов в составе биомембран методом электронного парамагнитного резонанса используются *спиновые зонды* и *спиновые метки* – молекулы или молекулярные группы с неспаренными электронами, которые содержат неспаренные электроны. В молекулах меток содержится атом азота с неспаренным электроном на 2$p\pi$-орбитали.

Формула одного из таких соединений, часто используемого при исследовании мембран, представлена на рисунке 47.

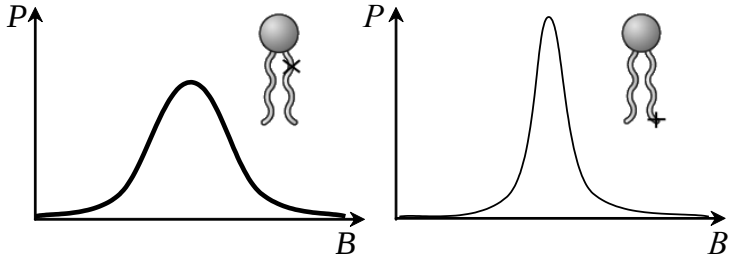


а *б*

Рисунок 47 – Спиновые зонды: *а* – формула спинового зонда 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксин (ТЕМПО); *б* – схема электронного строения парамагнитного фрагмента нитроксильного радикала

Методом ЭПР было показано, что микровязкость биомембраны у концов липидных хвостов меньше, чем около полярных головок. Спиновые метки присоединялись к разным местам фосфолипидной молекулы (рисунок 48).

Как показано на рисунке 48(б), положению спиновой метки на конце жирнокислотного хвоста липидов соответствует более узкий спектр ЭПР, а, следовательно, подвижность конца липидного хвоста фосфолипидной молекулы больше, чем в случае, показанном на рисунке 48(а), когда спиновая метка была прикреплена вблизи полярной головки липидной молекулы. Поэтому в середине мембраны упорядоченность во взаимном расположении хвостов фосфолипидных молекул меньше, чем на краях мембраны, и вязкость, соответственно, меньше. Именно высокая подвижность липидных молекул обусловливает латеральную (боковую) диффузию липидов вдоль мембраны.



а *б*

Рисунок 48 – Два способа прикрепления спиновой метки к фосфолипидной молекуле и различие спектров ЭПР для этих двух случаев (схематичное изображение)

Изучая спектры ЭПР, можно судить о переносе меток через мембрану, получать информацию о характере вращения молекул и изучать фазовые переходы с участием нанообъектов под действием различных факторов.

Однако при интерпретации результатов, полученных методом ЭПР-спектроскопии, следует учитывать возможные изменения свойств нанообъекта, которые могут произойти при введении в него метки.

3.2.3. Ядерный магнитный резонанс

В основе метода ядерного магнитного резонанса (ЯМР) лежит поглощение электромагнитных волн в радиочастотном диапазоне ядрами, обладающими механическим моментом или спином, а, следовательно, магнитным моментом. К их числу относятся ядра, которые имеют чётное массовое число и нечетный атомный номер, а также ядра с нечётным массовым числом и чётным или нечётным атомным номером.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса широко используется для определения молекулярной структуры в химии. *Спектры ЯМР характеризуют локальное окружение атомного ядра в молекуле.*

Ядра атомов, содержащие нечетное число нуклонов, имеют нескомпенсированный магнитный момент, который ориентируется во внешнем сильном магнитном поле – выравнивается вдоль поля.

Под действием электромагнитного излучения с определённой частотой в таких системах могут происходить различные переориентации ядерных спинов, которые сопровождаются поглощением или излучением энергии. Релаксация возбуждённого состояния в исходное состояние сопровождается излучением характеристического спектра радиочастотного электромагнитного излучения (спектр ЯМР), структура которого отражает информацию о *локальном окружении* данного атома.

Основные принципы ЯМР такие же, как для ЭПР, а главное отличие состоит в том, что в эксперименте контролируется обращение магнитных моментов ядер. Ядра с чётным числом протонов и нейтронов имеют спин $I = 0$ и, следовательно, не магнитны. Каждое ядро со спином $I \neq 0$ обладает магнитным моментом и *энергия ядра в магнитном поле* равна

$$E_{m_I} = -g_N \mu_N m_I B,$$

где g_N – ядерный g-фактор, $\mu_N = \dfrac{e\hbar}{2m_p}$ – ядерный магнетон, m_p – масса протона, знак "минус" отражает различие в заряде электрона и протона.

Для *протонов* $I = \dfrac{1}{2}$, $m_N = \pm\dfrac{1}{2}$, $g_N = 2{,}7927$. Масса протона почти в 2000 раз больше массы электрона, соответственно ядерный магнетон в 2000 раз меньше магнетона Бора, поэтому ядерные моменты почти в 2000 раз слабее, чем электронный момент, и ЯМР наблюдается в радиочастотном диапазоне спектра.

При наложении слабого радиочастотного поля, перпендикулярного внешнему статическому магнитному, происходит *резонансное поглощение* (рисунок 49), приводящее к переориентации спинов при частоте, определяемой *условием резонанса*

$$h\nu = \frac{1}{2} g_N \mu_N B - \left(-\frac{1}{2} g_N \mu_N B \right) = g_N \mu_N B.$$

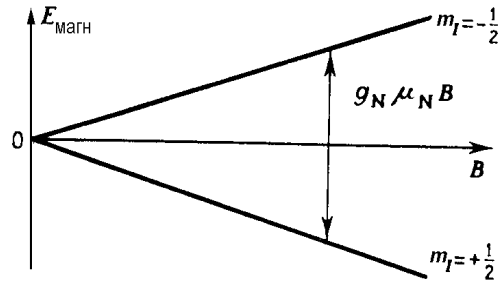


Рисунок 49 – Схема энергетического ЯМР-сдвига уровней в магнитном поле

Как и в случае ЭПР, резонирующий магнитный момент взаимодействует с *локальным* магнитным полем, которое отличается от приложенного внешнего поля, вследствие влияния магнитных полей, образуемых электронами. В ЯМР локальное поле принято записывать в форме

$$B_{лок} = (1 - \sigma) B,$$

где σ – *постоянная экранирования* ядра электронами. Дополнительное поле σB называется *химическим сдвигом* группы протонов. Протоны химически отличающихся групп имеют различное электронное

окружение, а, следовательно, и различные постоянные экранирования. Поэтому *условие резонанса*

$$h\nu = g_N \mu_N (1-\sigma) B$$

выполняется при различных значениях внешнего поля B для протонов в разном химическом окружении.

Величина химического сдвига зависит от электроотрицательности атома, с которым связан протон, а интенсивности резонансных полос протонов для групп CH, CH_2, CH_3 относятся как $1:2:3$, что позволяет использовать метод ЯМР при изучении строения и состава органических соединений. Спектры ЯМР на ядрах P^{31} и F^{19} используются при исследованиях структуры биомолекул, кофакторов и простетических групп.

Спектры ЯМР дают информацию о структуре биополимеров, взаимодействиях между молекулами и молекулярном движении. Метод ЯМР позволяет установить расположение отдельных атомов в небольших молекулах с молекулярной массой до 500, а иногда и до 1000 Да. Для биомакромолекул спектры ЯМР становятся настолько сложными, что требуются специальные изощрённые методики расшифровки таких спектров, чтобы исследовать множество подобных атомов в молекуле.

Современные двумерные методы ЯМР позволяют расшифровать структуру *малых белков*. В этом случае используется несколько радиочастотных импульсов для возбуждения нескольких атомных ядер. Возбуждение одного атомного ядра влияет на способность соседних атомов излучать и поглощать электромагнитное излучение. Такие малые возмущения используются для того, чтобы определить те атомы, которые находятся в соседстве друг с другом в молекуле. Развитие таких методов расширило диапазон исследования методом ЯМР, и теперь он включает белки, имеющие 100–250 аминокислот.

В экспериментах ЯМР определяются расстояния между ядрами соседних атомов и локальные конформации атомов в функциональных группах. Для определения структуры всей биомолекулы информация об этих локальных конформациях должна быть объединена в *общую атомную модель молекулы*. Разработка атомной модели ведётся с учётом

граничных условий, которые налагаются на систему квантовой механикой и тех условий, которые были получены другими методами. Зачастую результаты такого моделирования представляют в виде набора нескольких моделей, каждая из которых учитывает специфические ограничения (рисунок 50). При этом *главная* белковая полипептидная цепь демонстрирует *максимальное подобие* во всех моделях.

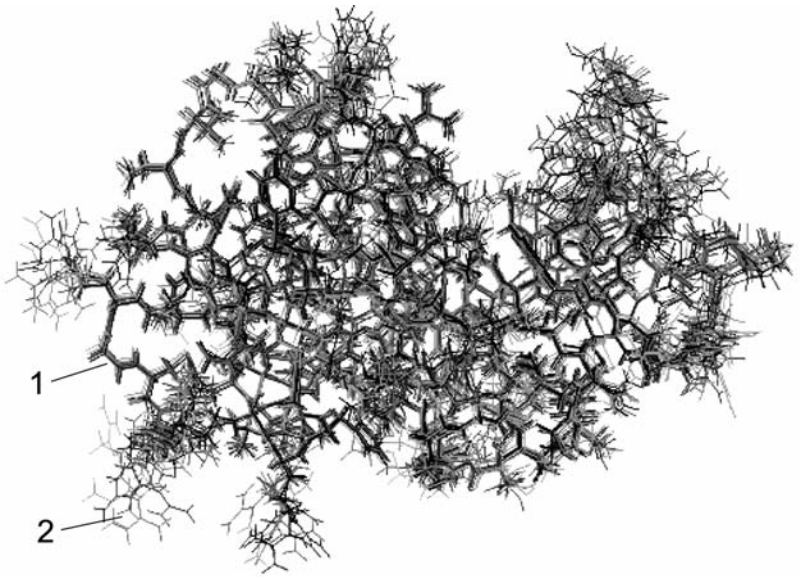


Рисунок 50 – Наложение десяти моделей структуры лизоцима, полученных методом ЯМР, учитывающих различные граничные условия. Отмечены: 1 – полипептидная цепь; 2 – боковые радикалы аминокислот

Положение аминокислотных остатков *на поверхности* белка, имеющих большую свободу в целом диапазоне конформаций, *менее детерминировано*. Интерпретация такой картины должна *сочетать*:

1) учёт того, что разные модели демонстрируют разные конформации молекулы в растворе;
2) возможность того, что моделирование даёт набор структур, только одна из которых соответствует действительности.

3.3. Микроскопия

3.3.1. Электронная микроскопия

Электронная микроскопия давно и успешно используется во всех отраслях исследований в нанодиапазоне. Она представляет собой наиболее простую для восприятия методику визуализации макромолекулярных объектов, поскольку она аналогична оптической микроскопии.

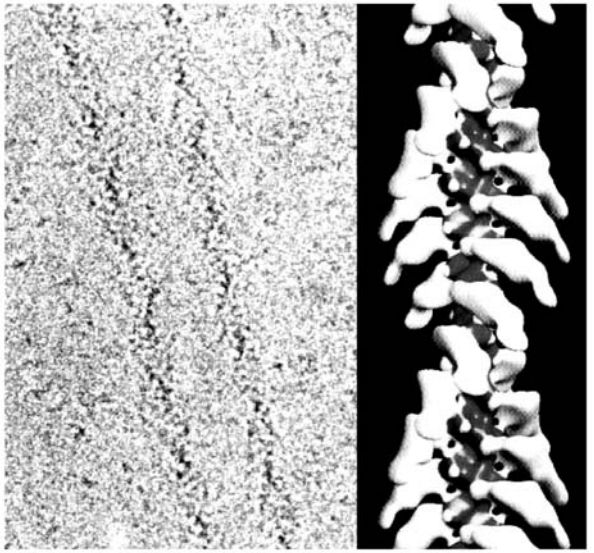
Высокое разрешение в электронном микроскопе достигается благодаря использованию в качестве источника "освещения" потока электронов. Электронам свойственны волновые процессы, определяемые соотношением Де Бройля $\lambda = \frac{h}{mv}$, где m – масса электрона; v – скорость электрона; h – постоянная Планка. Исходя из этой формулы при тех скоростях электронов, которые обычно применяются в электронных микроскопах, длина волны оказывается примерно на пять порядков меньше длины волны света.

Теоретически, электронная микроскопия должна бы "видеть" и субатомную структуру, однако *практические ограничения* – неидеальность магнитной оптики и те искажения, которые возникают при (1) приготовлении образцов, (2) обеспечении контрастности снимков и (3) вследствие радиационных повреждений – ограничивают разрешение визуализации биомолекул методом электронной микроскопии размерами *порядка* 2 *нм*. Такое разрешение достаточно, чтобы определить общую морфологию биомолекул и биомолекулярных комплексов, но недостаточно, чтобы зафиксировать индивидуальные атомы.

Электронная микроскопия дает информацию, которую невозможно получить из других экспериментов и, как правило, используется для исследования тех макромолекулярных структур, которые либо (1) слишком велики для исследования другими методами определения структуры молекул, либо (2) по-разному изменяют структуру в разных условиях.

Например, на рисунке 51(а) представлена электронная *микрофотография актиновых волокон*. Компьютерная обработка электронных

микрофотографий позволяет *воссоздать трехмерную модель* актиновой нити (рисунок 51(б)).



а *б*

Рисунок 51 – Актиновые нити: *а* – электронная микрофотография; *б* – компьютерная модель

Наилучшие результаты получаются, когда *дополнительно* учитывается структурная информация, полученная методами рентгеновской кристаллографии и ЯМР.

Для определения структуры природных бионаномашин используются данные как *просвечивающей электронной микроскопии* (*transmission electron microscopy*, TEM), так и *сканирующей электронной микроскопии* (*scanning electron microscopy*, SEM).

Просвечивающая электронная микроскопия. Принцип просвечивающей электронной микроскопии аналогичен обычной оптической микроскопии – пучок электронов облучает тонкий образец, и микроскоп определяет *относительную проницаемость* различных участков образца.

На рисунке 52 представлена схема трансмиссионного электронного микроскопа.

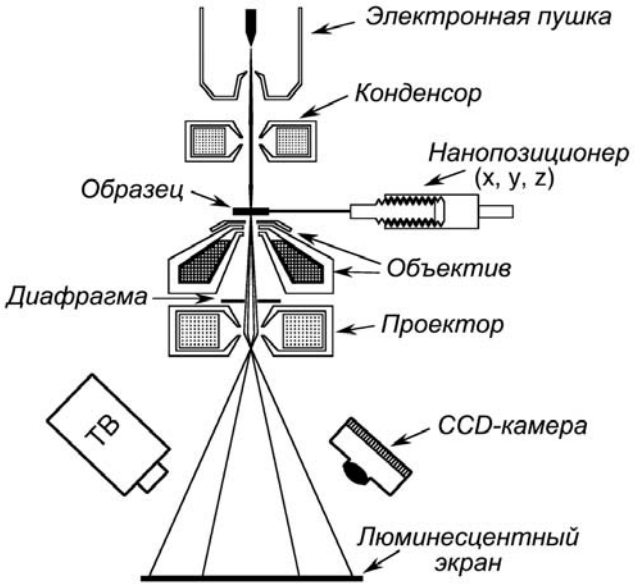


Рисунок 52 – Схема просвечивающего электронного микроскопа

Электроны, вылетающие из электронной пушки, проходят через конденсорные линзы, которые фокусируют электроны на объекте. Пучок электронов проходит через образец. Линзы объектива и линзы проектора увеличивают прошедший луч и проецируют его на люминесцентный экран. Попадание высокоэнергетичных электронов возбуждает молекулы люминофора в экране, в результате чего создаётся видимое увеличенное изображение образца. Изображение регистрируется различными детекторами, такими, например, как камера прибора с зарядовой связью (*charge coupled device*, CCD).

Практически все электроны, идущие сквозь объект, имеют одинаковую скорость, зависящую от общего ускоряющего напряжения и, следовательно, одинаковую длину волны. Поэтому различные участки объекта отличаются исключительно по степени рассеивания электронов.

В формировании конечного увеличенного изображения участвуют электроны, прошедшие сквозь объект. Электроны, отклонившиеся при встрече с молекулами объекта на достаточно большой угол или потерявшие скорость, в формировании изображения не участвуют. Соответствующие участки изображения на экране детектора остаются темными. Таким образом, различия в электронной плотности отдельных участков объекта, или разница в контрасте этих участков, зависят от *плотности* вещества и *толщины* объекта.

Наиболее сильное влияние оказывают вещества, имеющие большую атомную массу, а разность контрастов при этом будет зависеть от различия атомных масс соседствующих в объекте веществ. Последнее обстоятельство объясняет факт малого контраста у биологических объектов, так как большая часть атомов в клетке обладает низкой атомной массой и рассеивает электроны в одинаковой степени. Контраст биологических объектов можно повысить, используя тяжёлые металлы или их соли. Одним из широко распространенных методов *контрастирования* биообъектов является оттенение металлами. В специальных вакуумных установках производится термическое испарение металла – платины, палладия, осмия, урана – и напыление тонких металлических слоёв на исследуемые объекты. Контуры объекта при этом покрываются слоем металлических частиц. Метод дает очень контрастные изображения, но самые тонкие детали получаются размытыми. Кроме того, к сожалению, такое контрастирование солями тяжёлых металлов может привести к появлению *артефактов* в ходе обработки и сушки образцов.

Криоэлектронная микроскопия. Криоэлектронная микроскопия снижает риск получения таких артефактов, но снижается и контрастность изображений. Поскольку образцы вмораживают в лед, то контраст между биомолекулой и окружающим льдом получается очень низкий. Зачастую структуру объекта восстанавливают на основании суммирования и усреднения данных большого числа экспериментов. В некоторых случаях удаётся обработать дифференциальную информацию, полученную при сравнении изображений образца, которые поворачивают на небольшие

углы. Такая *электронная томография* позволяет создать трёхмерную модель объекта.

Сканирующая электронная микроскопия. Сканирующая электронная микроскопия воссоздаёт трёхмерные изображения, регистрируя электроны, которые рассеиваются или испускаются поверхностью образца. Пример такого изображения приведён на рисунке 53.

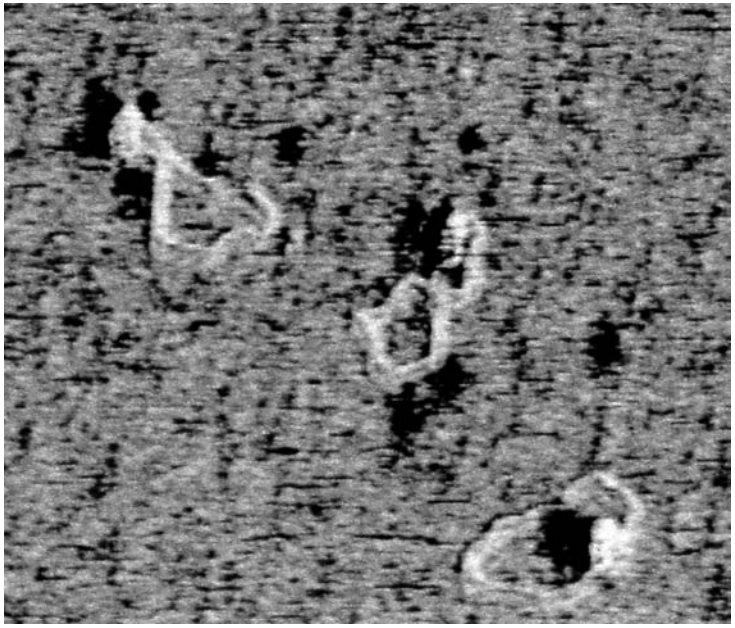


Рисунок 53 – Электронная микрофотография полисом

Исследуемый объект фиксируют на подложке, высушивают и покрывают тонким слоем металла. И уже эту металлическую поверхность сканируют узким пучком электронов, восстанавливая изображение. Получающиеся таким образом изображения очень наглядные, они дают хорошее представление о трёхмерной структуре образца. Однако, поскольку необходимо напыление металлического слоя, разрешение такой методики гораздо ниже просвечивающего электронного

микроскопа – порядка 10 нм. Этого вполне достаточно для изображения больших молекулярных ассоциатов, таких, как полисомы (рисунок 53).

3.3.2. Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовая микроскопия, АСМ (*atomic force microscopy*, AFM), появилась только в восьмидесятых годах XX века. Она имитирует скорее осязание, чем зрение. Острый шип зонда, закрепленный на конце тонкого монокристаллического рычага (*кантилевера*), сканирует поверхность образца, подобно тому, как игла звукоснимателя проигрывателя воспроизводит структуру дорожки грампластинки (рисунок 54).

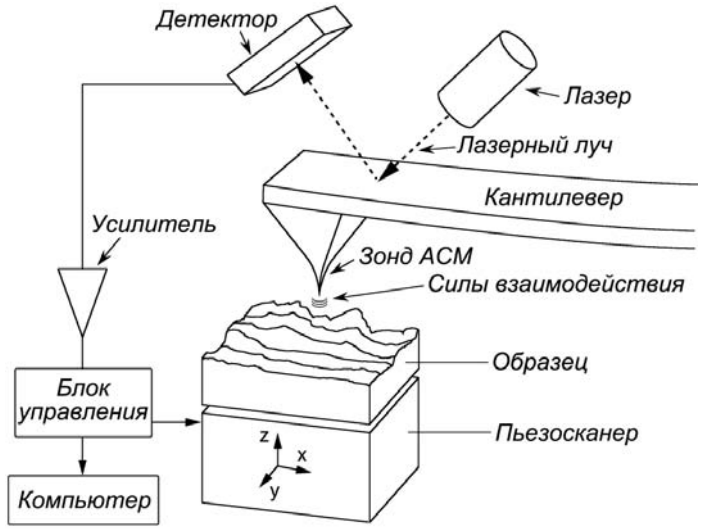


Рисунок 54 – Схема атомно-силового микроскопа (АСМ)

Фактически зонд измеряет слабые силы взаимодействия, возникающие между остриём и поверхностью образца. Лазерный луч отражается от зеркальца на конце *кантилевера* и попадает на фотодетектор, который фиксирует вертикальное отклонение кантилевера в каждой точке и восстанавливает, тем самым, топографическую карту

поверхности. Из всех перечисленных методов этот обеспечивает *наиболее непосредственную* связь между нашим макромиром и миром биомолекул.

Когда миниатюрное острие зонда приближается близко к поверхности образца на расстояние нескольких ангстрем, оно испытывает влияние ван-дер-ваальсовых сил притяжения (рисунок 55).

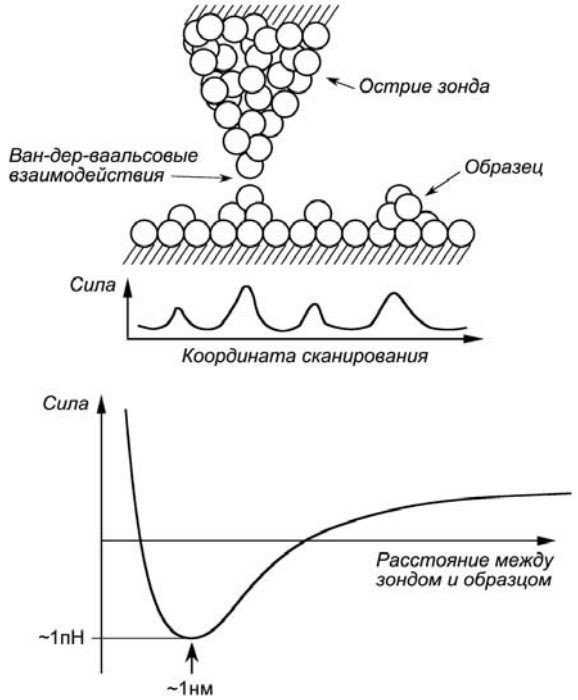


Рисунок 55 – Взаимодействие зонда кантилевера с образцом

На более коротких расстояниях начинают доминировать силы паулевского отталкивания. Когда зонд АСМ заряжен, основную роль играют кулоновские силы, и с помощью атомно-силового микроскопа можно проводить эффективное картирование электростатических потенциалов на поверхности биообъектов.

Очевидно, для эффективности регистрации рельефа поверхности с атомным разрешением, зонд должен иметь прочный и максимально остро

заточенный наконечник. Обычно диаметр окончаний коммерческих наконечников составляет 10–20 нм. Если же в качестве зонда использовать углеродную нанотрубку (п. 3.5.4), то диаметр острия можно уменьшить до 1 нм. Силы взаимодействия образца с остриём зонда обычно составляют всего лишь несколько пико- или наноньютонов. Поэтому кантилевер должен иметь очень малую массу, а несущие части корпуса микроскопа должны быть жёсткими и оборудованы специальными устройствами гашения (демпфирования) вибраций.

Для того чтобы отсканировать поверхность, образец перемещают под шипом *растроподобным образом*, а сам образец поднимают или опускают в вертикальном направлении (в соответствии с формой поверхности), чтобы сила взаимодействия шипа с поверхностью была постоянной. Оба движения – латеральное сканирование (в горизонтальной плоскости) и вертикальное перемещение – осуществляются пьезосканерами, а сила, с которой поверхность воздействует на шип кантилевера, детектируется по отклонению лазерного луча, отражённого от кантилевера.

Применяются *два режима сканирования*.

1. Образец можно сканировать, обеспечивая *постоянный контакт* шипа с поверхностью образца – *контактный режим* (рисунок 56(а)). Это позволяет осуществлять очень детальное сканирование, но при этом деформации сдвига, которые создает сам шип, могут исказить (исцарапать) исследуемую поверхность. Такие нарушения особенно сильны в случае биологических молекул, которые, как правило, слабо связаны с поверхностью – возникает опасность, что в ходе сканирования шип сорвет биообъект и утащит его за собой.
2. Для того чтобы избежать таких искажений используют другой вид сканирования, *динамический режим* (рисунок 56(б)) или "режим постукивания" (*tapping mode*). Кантилевер осциллирует так, что конец шипа только касается поверхности в ходе сканирования. Поскольку такие контакты очень короткие, то проблемы связанные со сдвиговыми силами, минимизируются.

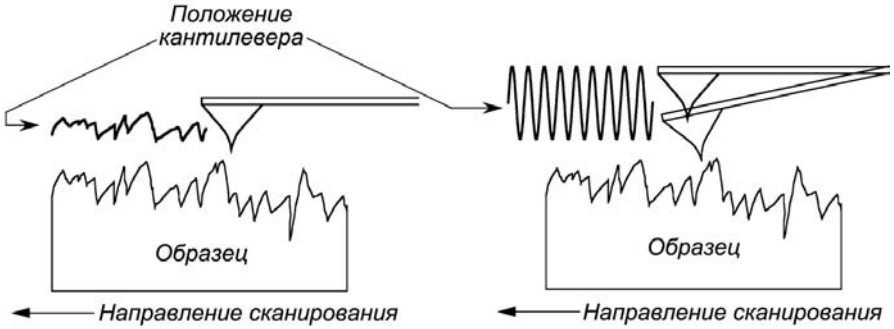


Рисунок 56 – Два режима сканирования: *а* – контактный; *б* – динамический

Разрешение метода атомно-силовой микроскопии зависит от остроты шипа и составляет обычно 5–10 нм. Атомно-силовая микроскопия стала действительно мощным методом исследования биообъектов, когда в нём стали использовать *образцы, погружённые в водную среду*. Дело в том, что даже высушенные биообъекты на подложке всё равно имеют тонкий слой воды, толщиной в несколько молекул, на поверхности. Капиллярные силы, которые возникают при погружении шипа кантилевера в этот слой воды, соизмеримы с силами взаимодействия самого шипа с исследуемыми биообъектами, что "маскирует" исследуемые эффекты и резко снижает чувствительность метода. Динамический режим "постукивания" несколько улучшает ситуацию, но при этом требуется создавать *большую амплитуду осцилляций*, чтобы шип каждый раз отрывался от слоя воды, преодолевая капиллярные силы.

Решением всех этих проблем стало просто погружение и образца, и кантилевера в водный раствор. Капиллярные силы исчезают, и взаимодействие шипа с образцом отображает только форму молекулы.

Атомно-силовая микроскопия прекрасно проявила себя при визуализации молекулярных биообъектов. Многочисленные системы, начиная от отдельных цепей ДНК до целых хромосом, были исследованы на атомном уровне. Преимуществом этого метода, по сравнению с вышеизложенными методами, является то, что *объекты исследуются в*

условиях, подобных условиям в живой клетке, и они имеют конформации, соответствующие их природному функционированию.

Атомно-силовые микроскопы оказались также очень удобными для манипулирования отдельными биомолекулами: механическим касанием молекулу белка можно адсорбировать на острие зонда, приподнять и перенести на другое место (рисунок 57).

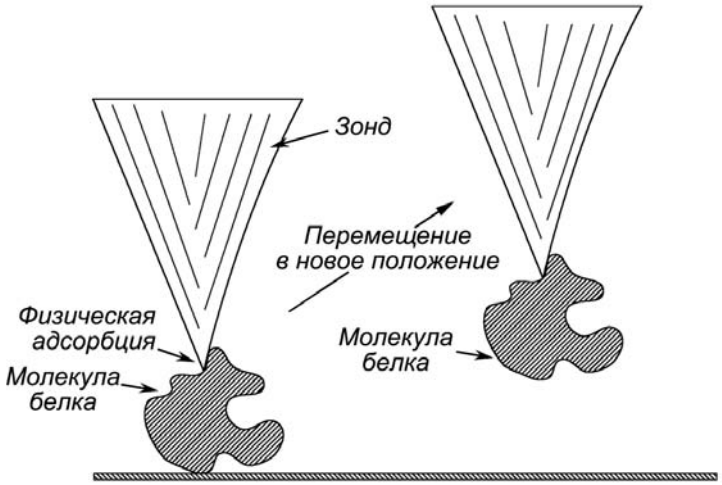


Рисунок 57 – Манипуляции с молекулой белка с помощью атомно-силового микроскопа

Метод АСМ также был особенно полезен в приложениях, где не требовалось создавать изображение поверхности. В этом случае микроскоп использовался для *измерения сил* притяжения между молекулами или сил, возникающих при растягивании (разворачивании) глобул биомолекул (см. п. 3.5.2). При "насильственном" расплетании глобулы атомно-силовой микроскоп обеспечивает чувствительный, в диапазоне пиконьютонов, метод измерения сил вдоль "координаты расплетания" (или траектории разворачивания) или разъединения (*trajectory of stretching or separation*) биомакромолекул, а это дает информацию, необходимую для понимания процессов: (1) белкового фолдинга, (2) конформационной динамики ДНК и (3) специфичности ферментов.

Сканирующая атомно-силовая микроскопия была использована во множестве впечатляющих демонстраций, для проведения *модификации образцов* на атомном уровне, как, например, в случае, проиллюстрированном на рисунке 58.

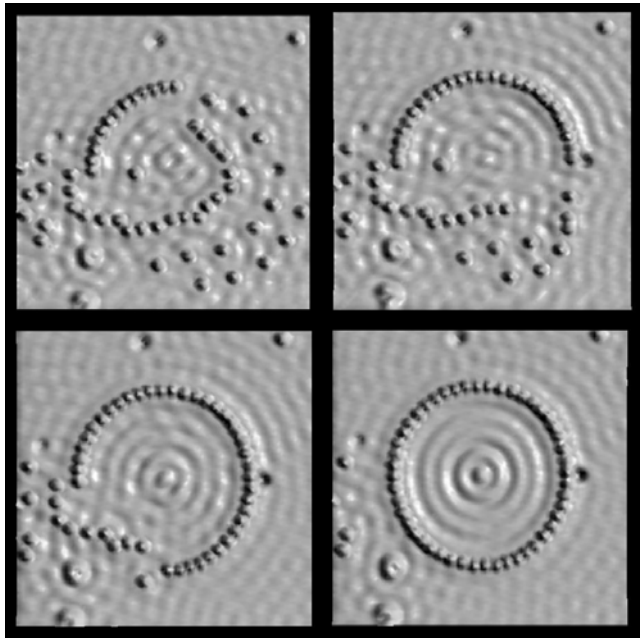


Рисунок 58 – Поэтапное создание кольцевого "коралла" из атомов железа используя атомно-силовой микроскоп (http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/corral.html)

В данном случае с помощью атомно-силового микроскопа фирмой IBM были реорганизованы индивидуальные атомы железа на медной подложке так, что был образован кольцевой "коралл", что позволило исследовать необычные квантовые свойства такого объекта.

На рисунке 59 представлена надпись "IBM", выложенная из 35 атомов ксенона на никелевой подложке.

Перспективным является также функционализация шипа атомно-силового микроскопа, тем самым создавая ассортимент "нано-манипуляторов" атомными объектами.

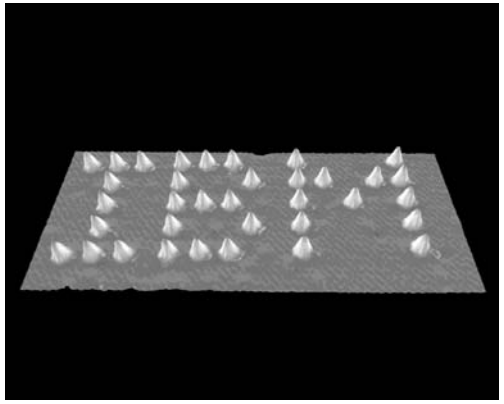


Рисунок 59 – Слово "IBM", выложенное из 35 атомов ксенона на никелевой подложке (http://www.almaden.ibm.com/vis/stm/atomo.html)

3.3.3. Туннельная микроскопия

Принципиальная схема сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) представлена на рисунке 60.

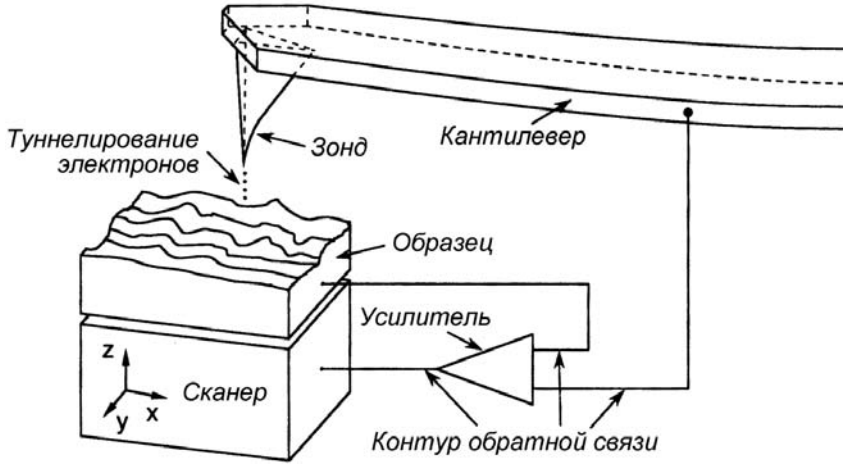


Рисунок 60 – Схема сканирующего туннельного микроскопа

Принцип работы сканирующего туннельного микроскопа основан на *квантовом туннелировании* электрона через потенциальный барьер, который образован разрывом электрической цепи – небольшой щелью (туннельным зазором) между зондирующим микроострием и поверхностью образца. Поэтому для работы сканирующего туннельного микроскопа, в отличие от атомно-силового микроскопа, требуются *электропроводящие* образцы и зонды. Между зондом и исследуемым образцом прикладывают разность потенциалов 1–1000 мВ и остриё зонда приближают к образцу до появления туннельного тока. Расстояние между остриём зонда и поверхностью образца составляет доли нанометра (рисунок 61). Туннельный ток зависит от химической природы образца и зонда, поэтому сканирующий туннельный микроскоп можно использовать для определения электронных свойств образца.

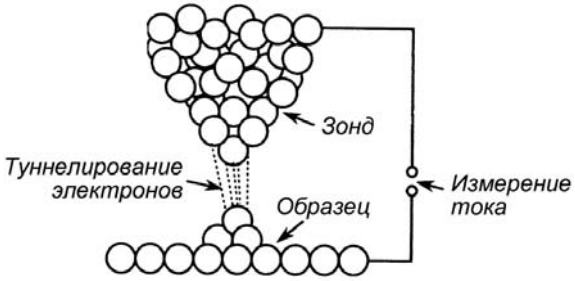


Рисунок 61 – Взаимодействие зонда с поверхностью образца

Контур обратной связи позволяет проводить сканирование в двух режимах: постоянной высоты или постоянного тока (рисунок 62).

В первом случае сканирование производят, удерживая остриё зонда на постоянной высоте (рисунок 62(а)).

В режиме постоянной высоты зонда регистрируют величину туннельного тока.

В режиме постоянного тока цепь обратной связи поддерживает постоянное расстояние между зондом и поверхностью так, чтобы туннельный ток был неизменен (рисунок 62(б)). При таком режиме сканирования зонд повторяет рельеф исследуемой поверхности и его

тангенциальное смещения регистрируют, например, с помощью лазерного луча, как в атомно-силовом микроскопе (рисунок 54).

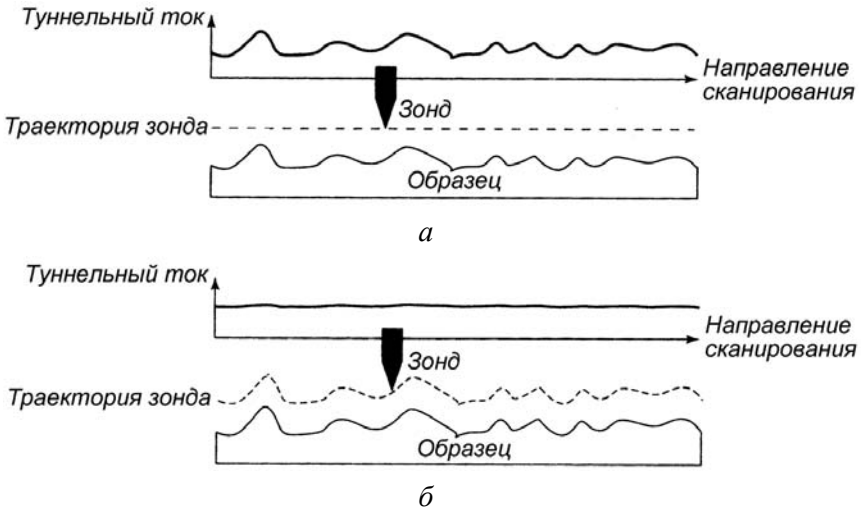


Рисунок 62 – Режимы сканирования СТМ: *а* – постоянной высоты зонда; *б* – постоянного тока

В сканирующем туннельном микроскопе часто используется пьезоэлектрический трёхточечный сканер. Его первоначальная конструкция, созданная Гердом Биннигом и Генрихом Ройрером, показана на рисунке 63. Напряжения, прикладываемые к трём пьезоактуаторам, вызывают перемещения зонда на нанорасстояния вдоль направлений *x*, *y* или *z*.

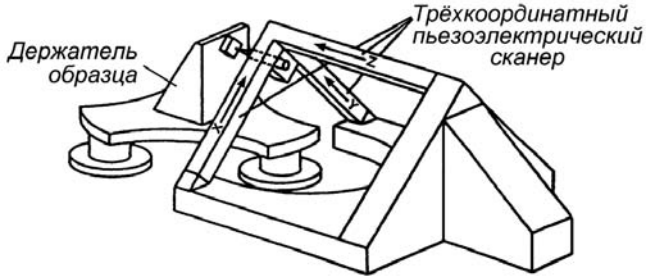


Рисунок 63 – Сканирующий механизм туннельного микроскопа

При изучении биомакромолекул существенным препятствием на пути достижения высокого разрешения являются *два фактора* (рисунок 64):

1) в результате *возбуждения* электрическим током (имеющим характерные значения в диапазоне 1–1000 пА) может измениться распределение зарядов в биологическом материале, что может привести к *изменению конформации* макромолекул;
2) ток в крупных биологических структурах может проходить по различным путям, такое *перераспределение проводимости* внутри образца искажает разрешение СТМ.

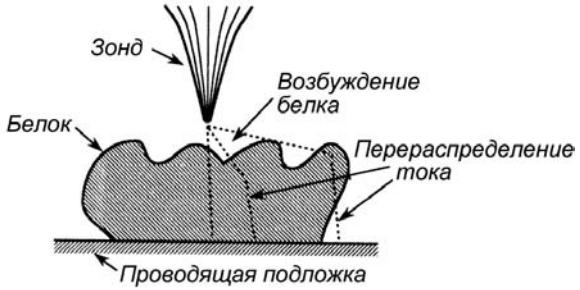


Рисунок 64 – Факторы, снижающие разрешение СТМ биологических объектов

Для получения изображений высокого разрешения необходимо снижать величину тока и увеличивать прочность связывания образца с подложкой.

3.4. Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия является важной аналитической методикой для идентификации нанообъектов путём измерения отношения их массы к заряду $\frac{m}{z}$ в ионизированном состоянии. Она особенно полезна для обнаружения и анализа структуры биомакромолекул в следовых количествах менее 1 пг (10^{-12} г). Обобщенная схема масс-спектрометра

включает в себя источник исследуемых ионов, в котором исследуемые объекты переводятся в газовую фазу и ионизируются, анализатор полученных ионов, который сортирует ионизированные объекты по значениям $\frac{m}{z}$, детектор, регистрирующий ионы данного типа и систему регистрации, обрабатывающую сигналы детектора и визуализирующую масс-спектры (рисунок 65).

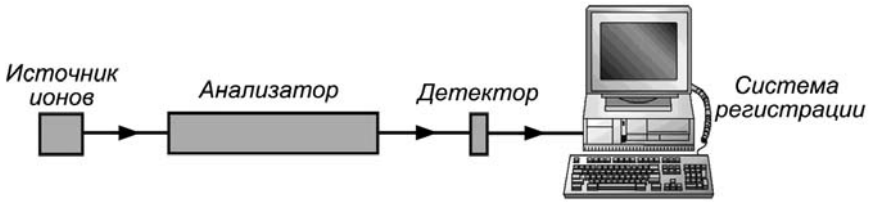


Рисунок 65 – Схема масс-спектрометрического анализа

Способность масс-спектрометра разделять ионы описывается с помощью разрешения R (или разрешающей способности) масс-спектрометра, которое определяется как

$$R = \frac{m}{\Delta m},$$

где m – масса иона; Δm – разность масс между двумя различимыми пиками. Область значений R лежит в интервале 100–500000.

3.4.1. Ионизация образцов

Разделяют следующие основные виды ионизации образца:

- электронным ударом (EI, *electron ionisation*),
- пучком фотонов (PI, *photon ionisation*),
- в результате ионно-молекулярных химических реакций (CI, *chemical ionisation*),
- ионизация внешним полем (FI, *field ionisation*),

– бомбардировкой быстрыми атомами (FAB, *fast atom bombardment*),
– плазменная десорбция (PDMS, *plasma desorption mass spectrometry*),
– ионизация твердого образца ионным пучком и масс-спектрометрия вторичных ионов из образца (SIMS, *secondary ion mass spectrometry*),
– ионизация из жидкости вторичных ионов (LSIMS, *liquid secondary ion mass spectrometry*),
– электроспрей-ионизация (ESI, *electrospray ionisation*),
– лазерно-десорбционная ионизация с участием матрицы (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionisation*).

Общая схема ионизации конденсированного образца приведена на рисунке 66.

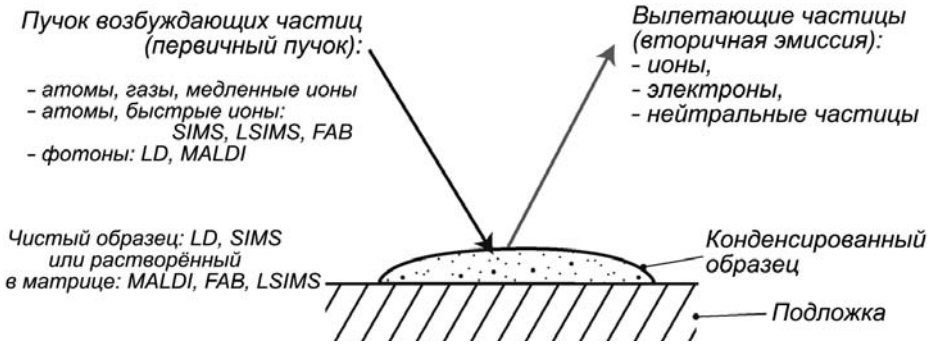


Рисунок 66 – Схема ионизации твердого образца

Особый интерес представляют последние два способа ионизации ESI и MALDI. Оба эти метода были впервые опробованы в 1988 году и с тех пор именно эти методы используются преимущественно для анализа бионанообъектов. За разработку методов масс-спектрометрического анализа биологических макромолекул один из авторов метода ESI Джон Беннетт Фенн (*John Bennett Fenn*) в 2002 году получил Нобелевскую премию по химии.

3.4.2. ESI и MALDI

ESI. В методике *электроспрей-ионизации* (электрораспылительный метод ионизации, ESI) жидкий раствор, содержащий исследуемые бионанообъекты вводят в капилляр, к которому приложен высокий электростатический потенциал (рисунок 67).

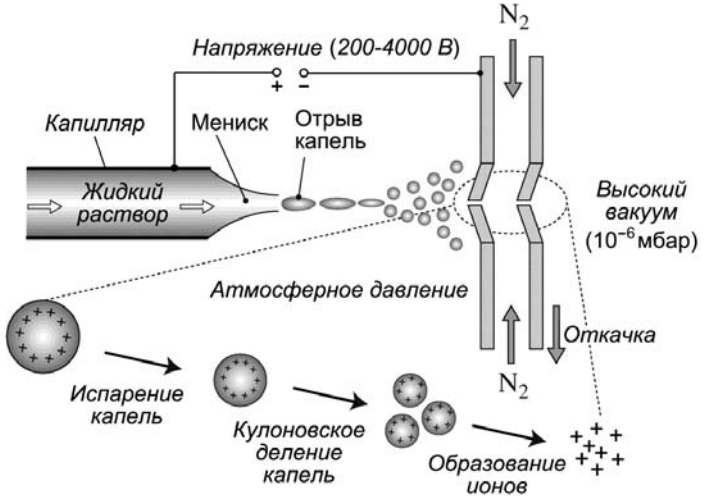


Рисунок 67 – Схема электроспрей-ионизации ESI

Электроспрей-ионизация происходит в три этапа:

1) образование капель;
2) испарение растворителя из капель;
3) образование газа ионов.

Сильное электростатическое поле вытягивает раствор из капилляра. Когда в образовавшемся мениске поверхностное натяжение становится меньше электростатических сил, от мениска отрывается капля. Вследствие испарения молекул растворителя в капле увеличивается плотность положительных зарядов. Кулоновское отталкивание этих зарядов, превышающее поверхностное натяжение, стимулирует деление

капель на более мелкие капельки. Продувание тёплым азотом щелей между электростатическими диафрагмами интенсифицирует испарение растворителя. Поскольку в рабочем объёме анализатора масс-спектрометра поддерживается высокий вакуум, то направленную газовую струю ионов формирует как электрический потенциал, так и градиент давления. Для примера на рисунке 68 приведен масс-спектр рибосомы *Thermus thermophilus*, полученные методом электроспрей-ионизации.

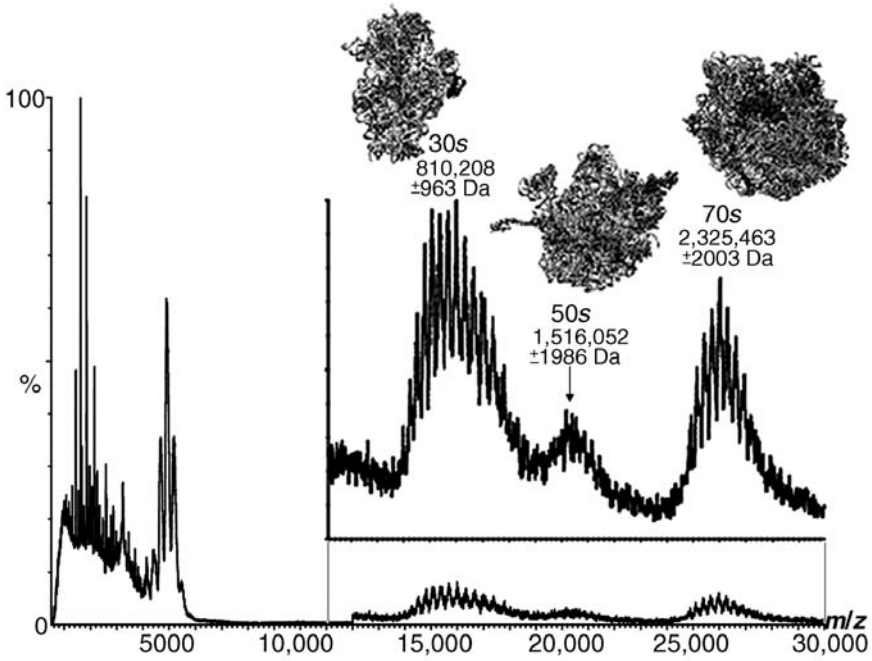


Рисунок 68 – ESI масс-спектр рибосомы *Thermus thermophilus.* Кроме собственно рибосомы 70S, в спектре присутствуют также серии пиков, относящихся к большой 50S и малой 30S субъединицам рибосомы

MALDI. В методике *лазерно-десорбционной ионизации с участием конденсированной матрицы* (MALDI) поглощение атомами матрицы импульсного лазерного излучения приводит к возбуждению и ионизации матрицы (рисунок 69(а)).

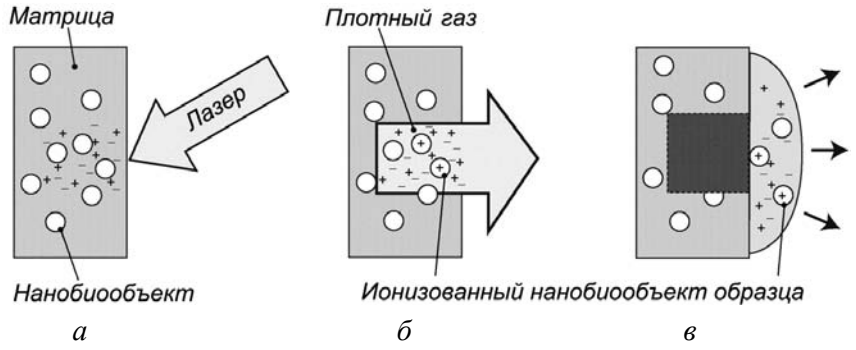


Рисунок 69 – Схема лазерно-десорбционной ионизации с участием конденсированной матрицы MALDI

Релаксация матрицы приводит к объёмному испарению образца в месте попадания лазерного луча и к возбуждению и ионизации бионанообъектов, расположенных в матрице (рисунок 69(б)).

Сверхзвуковое расширение образовавшегося плотного газа нейтральных и ионизованных молекул сохраняет ионизацию объектов (рисунок 69(в)), а приложенное внешнее электрическое поле вытягивает облако ионизованных частиц к анализатору.

3.4.3. Анализаторы масс

В соответствии с конструкцией анализатора масс существует *пять* основных типов масс-спектрометров:

1) секторные масс-спектрометры (SMS, *sector mass spectrometer*),
2) квадрупольные масс-спектрометры (QMS, *quadrupole mass spectrometer),*
3) масс-спектрометры с ионной ловушкой (ITMS, *ion-trap mass spectrometer*),
4) время-пролётные масс-спектрометры (TOFMS, *time-of-flight mass spectrometer*),
5) масс-спектрометры с преобразованием Фурье (FTMS, *Fourier-transform mass spectrometer*).

На рисунке 70 изображены схемы **секторных масс-спектрометров** с одноканальным (а) и многоканальным (б) детекторами.

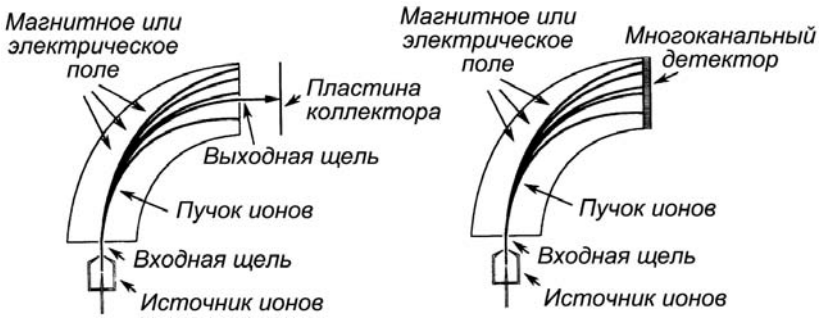


Рисунок 70 – Схема секторных масс-спектрометров: *а* – с одноканальным детектором, *б* – с многоканальным детектором

Ионы, покидающие ионизатор, ускоряются и проходят через сектор, в котором магнитное или электрическое поле прикладывается перпендикулярно к направлению их движения. Поле изгибает траекторию ионов и заставляет ионы с различным отношением m/z разлетаться веером.

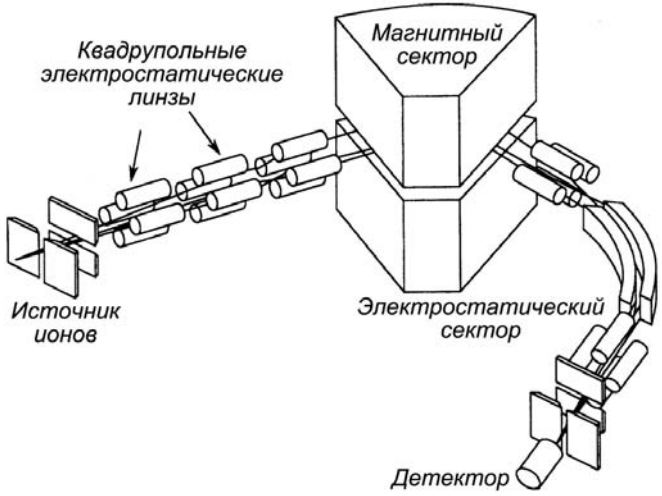


Рисунок 71 – Схема двухфокусного масс-спектрометра

В сканирующем анализаторе масс (рисунок 70(а)) изменяют силу электрического или магнитного поля, при этом каждый момент времени регистрируется только одно значение m/z. В несканирующем анализаторе (рисунок 70(б)) все массы регистрируются одновременно с помощью многоканального детектора в том диапазоне, который захватывает детектор. Для увеличения разрешения масс-спектрометров зачастую комбинируют электростатический анализатор (ESA, electrostatic analyser) и магнитный анализатор. Схема одного из таких двухфокусных масс-спектрометров представлена на рисунке 71.

Квадрупольный анализатор масс представляет собой две пары металлических стержней: одна пара находится под отрицательным электрическим потенциалом ($–U$), а другая – под положительным ($+U$) (рисунок 72).

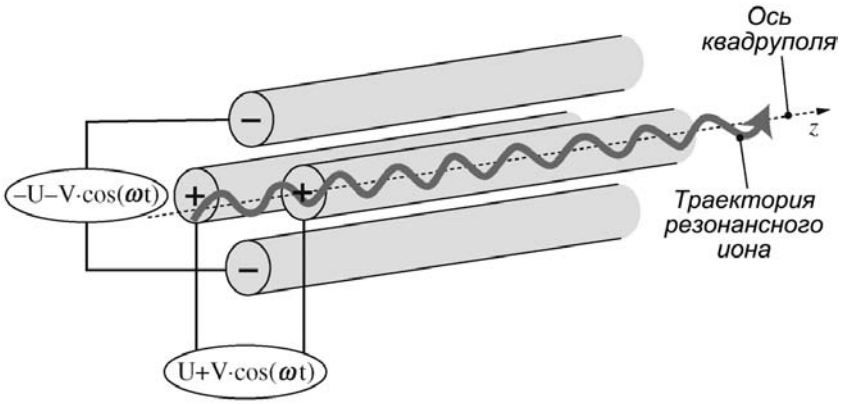
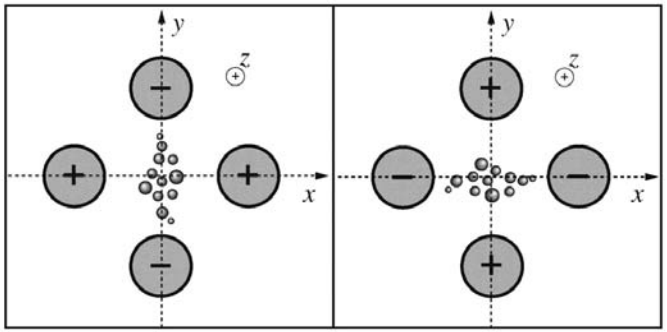


Рисунок 72 – Схема квадрупольного анализатора масс

Оба потенциала периодически изменяются во времени по закону $\pm U \pm V\cos(\omega t)$. Такое переменное тангенциальное электрическое поле позволяет проходить через анализатор только ионам с величиной m/z, которая определяется значениями величин U, V и ω.

Периодические осцилляции внешнего поля индуцируют осцилляции траектории ионов (рисунок 73).



а *б*

Рисунок 73 – Осцилляции ионного пучка в квадрупольном анализаторе: *а* – к концу первой половины периода осцилляции; *б* – к концу второй половины периода

Амплитуда таких осцилляций зависит от величины m/z. Для значений m/z меньше оптимальной (резонансной) величины (определяемой набором U, V и ω) амплитуда осцилляций слишком большая, и ионы соударяются с электродами. Ионы с m/z больше резонансной величины, наоборот, не успевают возвращаться на первоначальную траекторию и под действием постоянной составляющей электрического поля U уходят с оси z квадруполя, а, следовательно, не попадают на детектор.

Если поддерживать постоянными величины U/V и ω, а изменять U, то таким образом будет сканироваться условие резонанса для разных m/z. Квадрупольные анализаторы наиболее эффективны для диапазона масс $2000 < m/z < 8000$.

Ионная ловушка (рисунок 74) представляет собой вариант циркулярного (или, точнее, тороидального) квадруполя, в котором внутренний электрод сжат в точку, наружный электрод растянут в гиперболоид вращения (тороидальный электрод), а верхний и нижний электроды закрывают торцы такого гиперболоида (концевые электроды) и имеют сферическую топологию.

В отличие от рассмотренного выше линейного квадруполя в такой объёмной квадрупольной ловушке суперпозиция постоянного и переменного потенциалов, приложенная к тороидальному электроду, приводит к тому, что ионы двигаются внутри такой ловушки по замкнутым траекториям, которые называются фигурами Лиссажу.

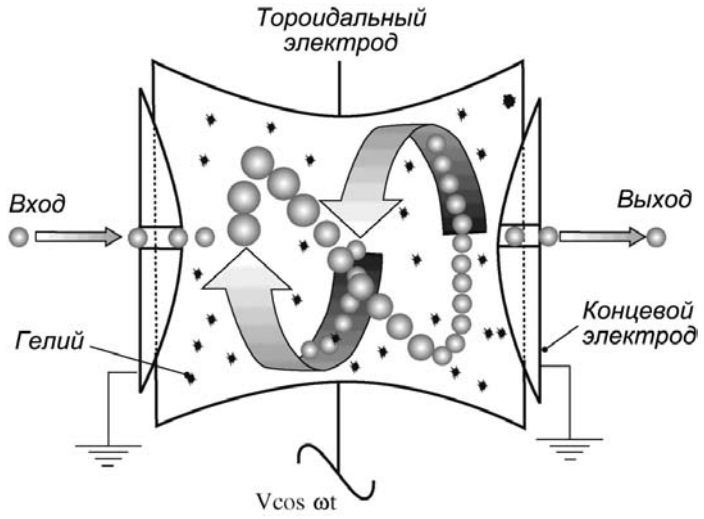


Рисунок 74 – Схема ионной ловушки

Если же к такой ловушке приложить внешнее переменное поле в направлении оси (z), ловушки, то только те ионы, для которых их величина m/z будет соответствовать условию резонанса с таким внешним переменным полем, смогут выйти из ловушки. Изменением частоты внешнего z-поля и производится сканирование масс-спектра.

Во **время-пролётных масс-спектрометрах** ионизация образца происходит коротким импульсом (лазерным импульсом или импульсом высокого напряжения), и ионы под действием ускоряющего напряжения в разгонной части спектрометра начинают движение одновременно (рисунок 75).

После прохождения разгонного участка с ускоряющей (*accelerating*) разностью потенциалов U ион с зарядом z, массой m и скоростью v

приобретает кинетическую энергию $E = zU = \frac{mv^2}{2}$. В дрейфовой части ионы с разным значением m/z летят с разными скоростями и проходят дрейфовый участок длиной L за время $t = L\sqrt{\frac{m}{2zU}}$. Таким образом, регистрируя время прилёта ионов, детектор осуществляет развёртку спектра масс ионов.

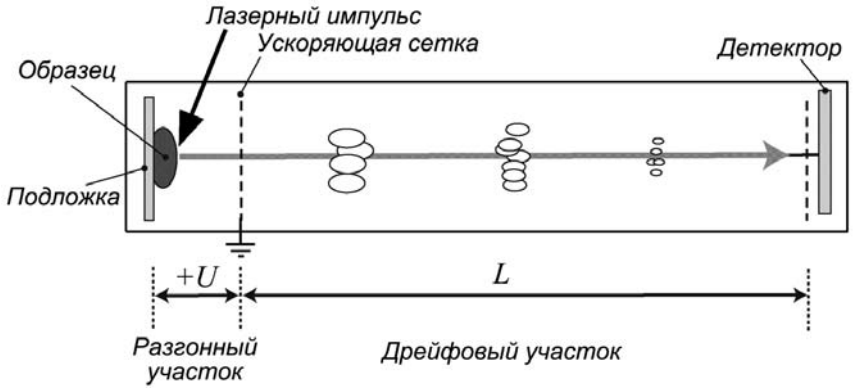


Рисунок 75 – Схема линейного время-пролётного масс-спектрометра

К сожалению, в реальных условиях не все ионы стартуют в одно и то же время, и не все ионы с одинаковым значением m/z имеют одну и ту же скорость. Такой разброс в скоростях приводит к искажениям спектра, которые называются *хроматической аберрацией*. Хроматическая аберрация является одной из главных причин ограничивающих разрешение линейных время-пролётных масс-спектрометров.

Простейший способ снизить влияние хроматической аберрации состоит в использовании *отражательной* (рефлекторной) схемы время-пролётного масс-спектрометра (*рефлектрона*) (рисунок 76). В в этом случае ион с данным m/z который вошёл в дрейфовый участок со скоростью, например, v, на прохождение этого участка затратит больше времени и окажется позади иона с таким же значением m/z, который

одновременно с первым ионом вошёл в дрейфовый участок, но с большей скоростью $v + \Delta v$. Однако после электростатического отражения "отставшему" медленному иону необходимо пройти меньший путь до детектора, чем опередившему его быстрому иону. В результате при правильной настройке оба иона прилетят на детектор одновременно, произойдёт *автофокусировка* масс-спектрометра, хроматическая аберрация значительно снижается, а разрешение прибора, наоборот, значительно возрастает.

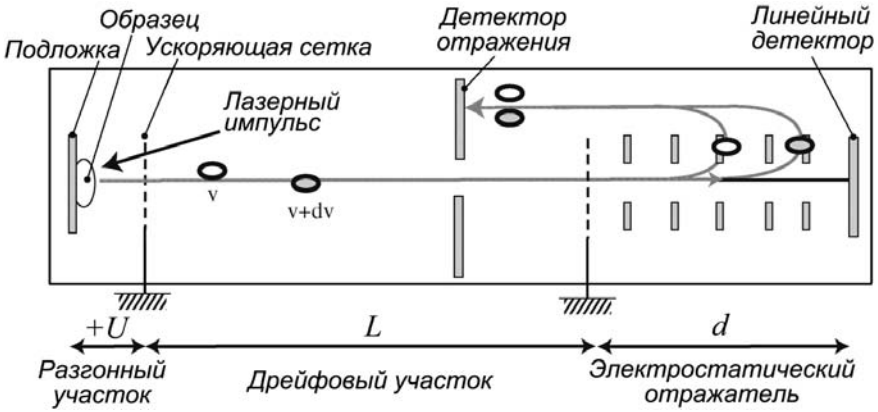


Рисунок 76 – Схема отражательного время-пролётного масс-спектрометра

Для примера на рисунке 77 приведены масс-спектры смеси пептидов зарегистрированные с использованием линейного время-пролётного масс-спектрометра (рисунок 77, верхний ряд спектров), и с использованием рефлектрона (рисунок 77, нижний ряд спектров. Видно, что использование отражательной (рефлекторной) схемы значительно увеличило разрешение получаемых масс-спектров.

Масс-спектрометр с Фурье преобразованием ионного циклотронного резонанса, FT-ICR MS (*Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer*), или просто **масс-спектрометр с преобразованием Фурье**, FTMS, (*Fourier-transform mass spectrometer*) был разработан в 1974 году (рисунок 78).

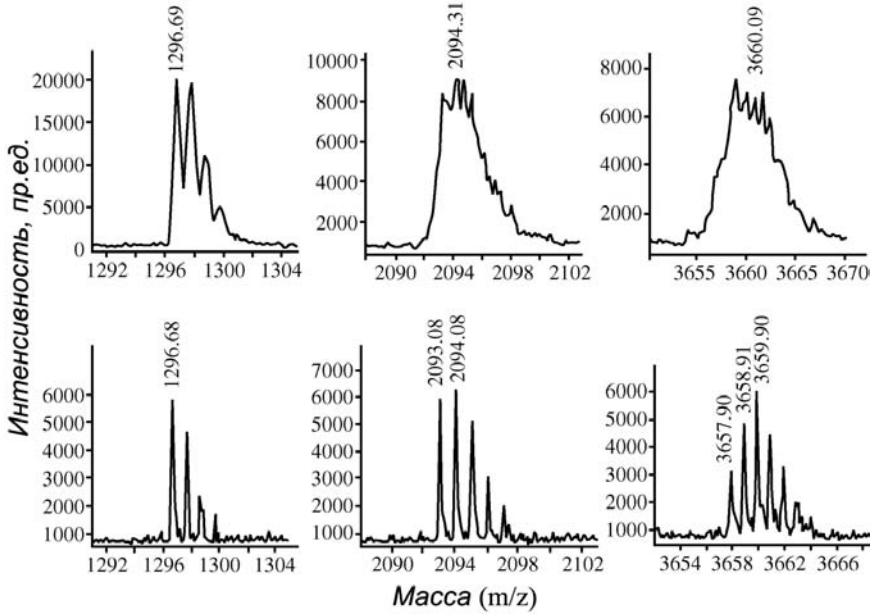


Рисунок 77 – Масс-спектры смеси пептидов записанные линейным времяпролётным масс-спектрометром (верхний ряд) и рефлектроном (нижний ряд)

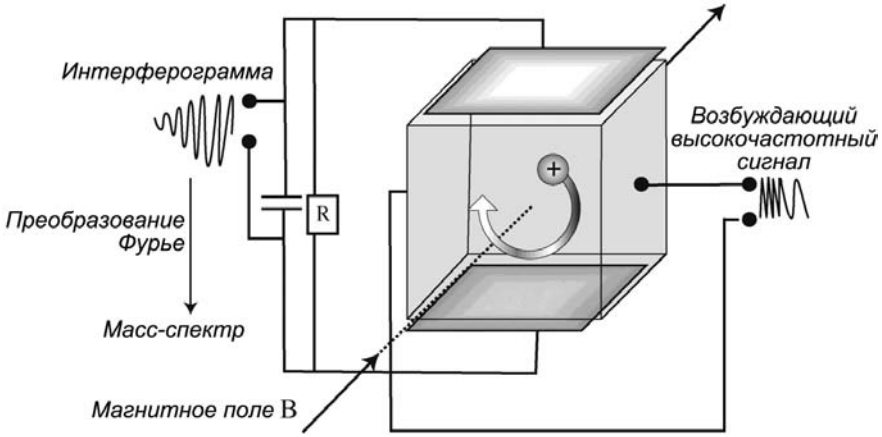


Рисунок 78 – Схема ячейки FT-ICR анализатора

Масс-анализ ионов происходит в три этапа. Сначала ионы инжектируются в анализаторную ячейку, находящуюся в сильном магнитном поле B. В результате ионы раскручиваются и вращаются на низких орбитах.

Затем к ячейке прикладывается высокочастотный возбуждающий сигнал, в результате чего ионы резонансно ускоряются, и радиус их орбиты увеличивается.

И, наконец, высокочастотный сигнал, порождаемый раскрученными ионами, измеряется и подвергается преобразованию Фурье.

3.4.4. Детектирование сигнала

За исключением масс-спектрометров с Фурье преобразованием, ионные сигналы регистрируются с помощью *вторичного электронного умножителя* (ВЭУ) (рисунок 79) или, после преобразования в фотоны, *детекторами фотонов*.

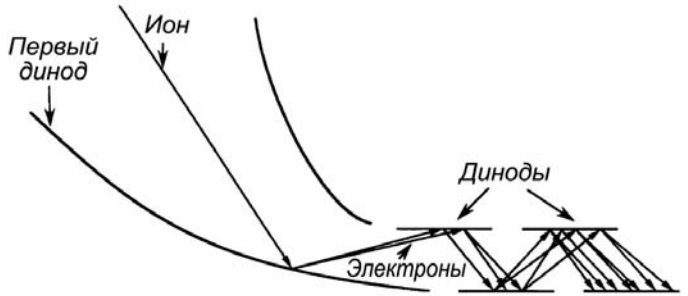


Рисунок 79 – Схема ВЭУ

Во вторичном электронном умножителе первый динод преобразует поток ионов в поток электронов. Последующие диноды умножают поток электронов в 10^3–10^8 раз. Коэффициент усиления конкретного ВЭУ зависит от напряжения между динодами, от их числа и от их расположения в пространстве. С последнего динода сигнал передается на счетчик.

В *масс-спектрометрах с преобразованием Фурье* ионы, разогнанные (раскрученные) в циклотроне, непосредственно регистрируются путём измерения и Фурье-преобразования сигналов напряжения, которое

эти ионы индуцируют в принимающих электродах (верхняя и нижняя пластины на рисунке 78).

В последнее время в масс-спектрометрах всё чаще используются *позиционно-чувствительные детекторы*, такие как многоканальная пластина (MCP, *multichannel plate*) и многоканальная матрица (*multichannel array detector*).

Многоканальная пластина представляет собой многоканальный вариант ВЭУ (рисунок 80), который может регистрировать двумерное распределение ионов в фокальной плоскости анализатора. Многоканальная пластина (рисунок 80(б)) состоит из большого числа индивидуальных микроканалов (рисунок 80(а)), изготовленных из металлизированных стеклянных капилляров диаметром ~10 мкм каждый.

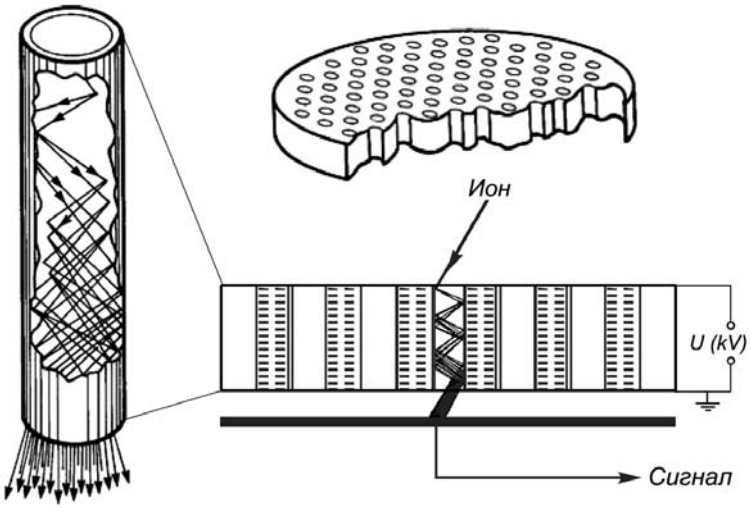


Рисунок 80 – Схема MCP-детектора: *а* – размножение электронов в микроканале; *б* – схема многоканальной пластины

Ион, попадая в такой канал, выбивает из его стенок электроны, которые, ускоряясь в электрическом поле, порождают лавину вторичных электронов.

В *многоканальном матричном детекторе* (рисунок 81) с помощью оптоволоконной системы (жгут световодов) объединены многоканальная пластина и детекторная матрица из фотодиодов.

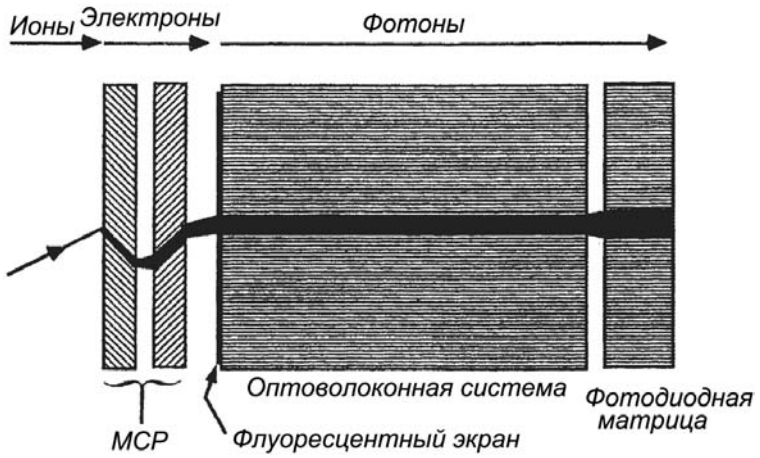


Рисунок 81 – Схема многоканального матричного детектора

Ион, попавший на многоканальную пластину, рождает лавину электронов, которая, выходя из пластины, попадает на флуоресцентный экран и превращается во вспышку света. Образованные таким образом фотоны распространяются по световодам до фотодиодов, образующих матрицу, подобную той, которая есть в любом цифровом фотоаппарате.

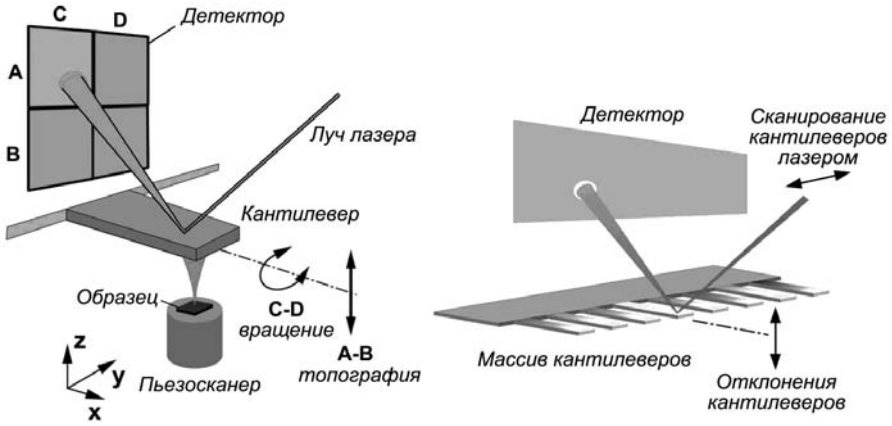
Фотодиодная матрица регистрирует не только интенсивность пучка ионов, но и его распределение в плоскости многоканальной пластины, и с помощью компьютерных систем информация с матрицы легко визуализируется на экране дисплея.

Многоканальная пластина в данном случае состоит из двух пластин с "шевронным" расположением каналов для того, чтобы только вторичные электроны достигали флуоресцентного экрана.

3.5. Биофизические нанотехнологии

3.5.1. Матрицы кантилеверов

Та сверхчувствительность кантилеверов, которые применяются в атомно-силовой микроскопии (см. п. 3.3.2), позволила использовать их в качестве нанобиодетекторов. Принцип действия такого детектора представлен на рисунке 82 [48].



а *б*

Рисунок 82 – Схема массива кантилеверов: *а* – движения кантилевера в атомно-силовом микроскопе; *б* – лазерное считывание кантилеверов

В атомно-силовом микроскопе сканирование образца зондом кантилевера вызывает два вида движений (рисунок 82(а)): (1) вертикальные смещения зонда регистрирует топографию поверхности образца (лазерный луч смещается вдоль оси A-B детектора), (2) тангенциальное смещение зонда при сканировании вызывает торсионный изгиб кантилевера (лазерный луч смещается по детектору вдоль направления C-D).

Используя такую экстрачувствительность кантилеверов, были созданы линейные массивы кантилеверов, в которых считывание информации о состоянии каждого из элементов массива осуществляется

сканированием лазерного луча (рисунок 82(б)). На рисунке 83 представлен один из таких приборов [48].

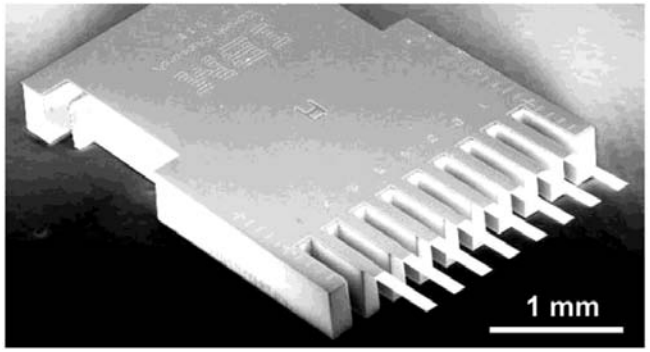
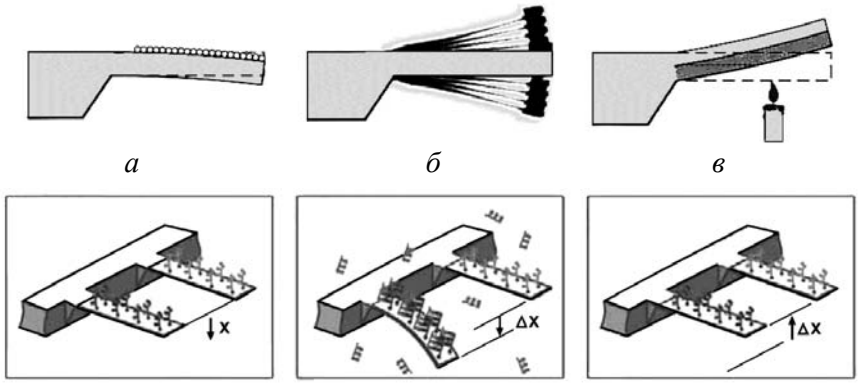


Рисунок 83 – Схема сенсорного массива кантилеверов Micro-/Nanomechanics Department of IBM's Zurich Research Laboratory

Кантилеверные сенсоры могут работать в статическом, динамическом и тепловом режимах (рисунок 84(а,б,в)).



а *б* *в*

г *д* *е*

Рисунок 84 – Режимы работы сенсора: *а* – статический; *б* динамический; *в* – тепловой. ДНК-гибридизационный сенсор: *г* – функционализация кантилеверов разными ДНК-зондами; *д* – смещение кантилевера в результате гибридизации с ДНК; *е* – восстановление исходного состояния сенсора после промывки

В статическом режиме (рисунок 84(а)) изменение формы кантилевера происходит в результате осаждения молекул аналита, например, на верхней поверхности кантилевера.

В динамическом режиме (рисунок 84(б)) переменным внешним полем возбуждают осцилляции кантилевера, частота которых определяется механическими свойствами кантилевера. При адсорбции на кантилевер молекул аналита изменяется его масса, а, следовательно, собственная частота и амплитуда колебаний, что и фиксируется системой детектирования.

В тепловом режиме (рисунок 84(в)) биметаллическая пластина кантилевера изгибается при изменении температуры. Такой термодатчик способен зарегистрировать изменения температуры до 10^{-5} К.

На рисунках 84(г,д,е) представлен ДНК-гибридизационный кантилеверный сенсор. На рисунке показаны только два кантилевера из всего массива, функционализированные различными ДНК-зондами. При гибридизации с ДНК-аналитом один кантилевер изогнулся относительно других кантилеверов. Такая относительная деформация Δx регистрируется при сканировании массива лазерным лучом. Сенсор способен регистрировать наличие в растворе целевой ДНК с концентрацией 100 пикомоль.

3.5.2. Измерение внутримолекулярных сил в белках

С помощью кантилевера атомно-силового микроскопа можно непосредственно измерять внутримолекулярные силы, связывающие белковые молекулы.

Так, например, на рисунке 85(а) представлен эксперимент по "разворачиванию" белка *титина* (основной компонент скелетных мышц), а на рисунке 85(б,в) – эксперимент по "разворачиванию" мембранного белка *бактериородопсина* с помощью функционализированного кантилевера атомно-силового микроскопа.

В обоих случаях зарегистрированная зависимость силы, прикладываемой к кантилеверу, от растяжения имеют пилообразный вид (рисунок 85(г)), что свидетельствует о поочерёдном "разматывании" доменов титина (рисунок 85(а)), или о попарном "выдёргивании"

трансмембранных α-спиралей *бактериородопсина* из биомембраны [45] (рисунок 85(в)).

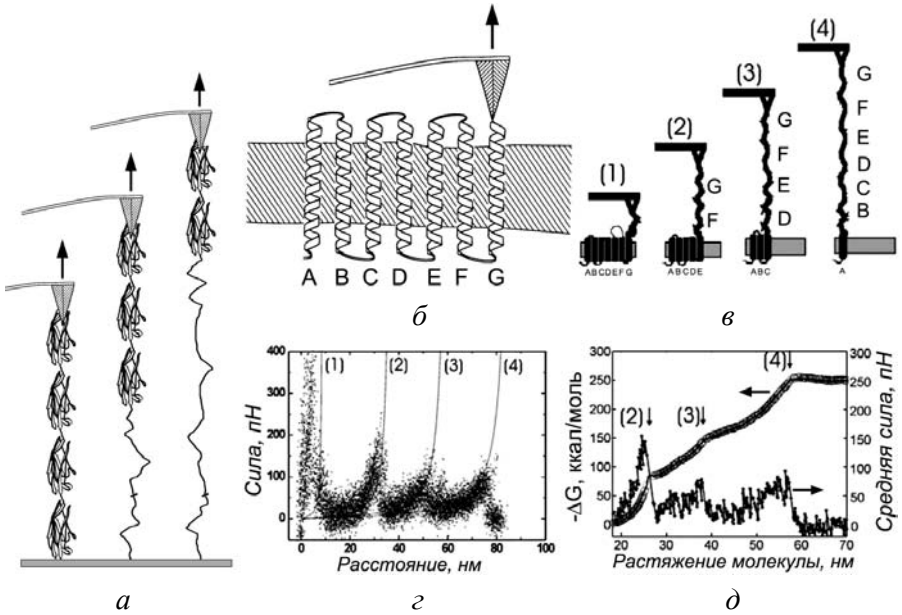


Рисунок 85 – Развёртывание белков: *а* – титина, *б-д* – бактериородопсина (BR) с помощью атомно-силового микроскопа

Этим методом было определено, что сила сворачивания индивидуального домена *титина* составляет 100–300 пН, причём одиночные молекулы титина демонстрируют эффект накопления механической усталости при повторении циклов натяжения-ослабления, а сила, удерживающая α-спирали *бактериородопсина* в мембране, составляет 100–200 пН (рисунок 85(г,д)).

Зависимость силы, регистрируемой атомно-силовым микроскопом, от расстояния между мембраной и зондом кантилевера показана на рисунке 85(г). Рассчитанные по этим данным величины внутримолекулярных сил и свободной энергии при растяжении молекулы бактериородопсина представлены на рисунке 85(д).

Аналогично атомно-силовая спектроскопия одиночной молекулы *шёлка паутины* выявила, что развёртывание молекулы происходит так же скачкообразно, как и в случае титина, что свидетельствует о модульном строении отдельной молекулы шёлка. Минимальный размер модуля при разворачивании имеет размер около 14 нм, т. е. модули состоят из 38 аминокислотных остатков.

Таким же образом была измерена сила адгезии при присоединении *рековерина* (кальций-миристоил-переключающего белка) к фосфолипидному бислою в присутствии ионов Ca^{2+}, которая оказалась равной 48±5 пН. Одиночные молекулы *голо*-формы *кальмодулина* (нагруженные кальцием) требуют значительно бóльших сил при разворачивании с помощью кантилевера, чем одиночные молекулы его *орто*-формы.

3.5.3. Детектирование молекулярного узнавания

Атомно-силовая микроскопия позволила начать работу по прямому измерению сил межмолекулярного взаимодействия бионанообъектов. Так, например, появилась возможность прямо измерить силу взаимодействия мембранного рецептора иммобилизованной клетки с соответствующим лигандом, присоединённым к зонду кантилевера с помощью биотин-стрептавидинового сопряжения [72] (рисунок 86).

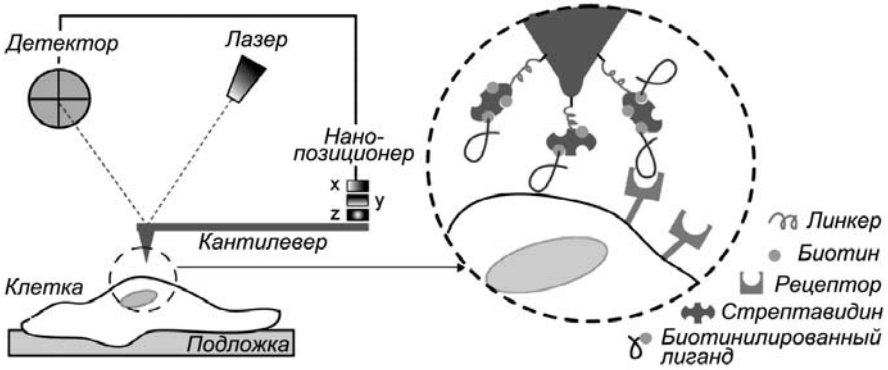
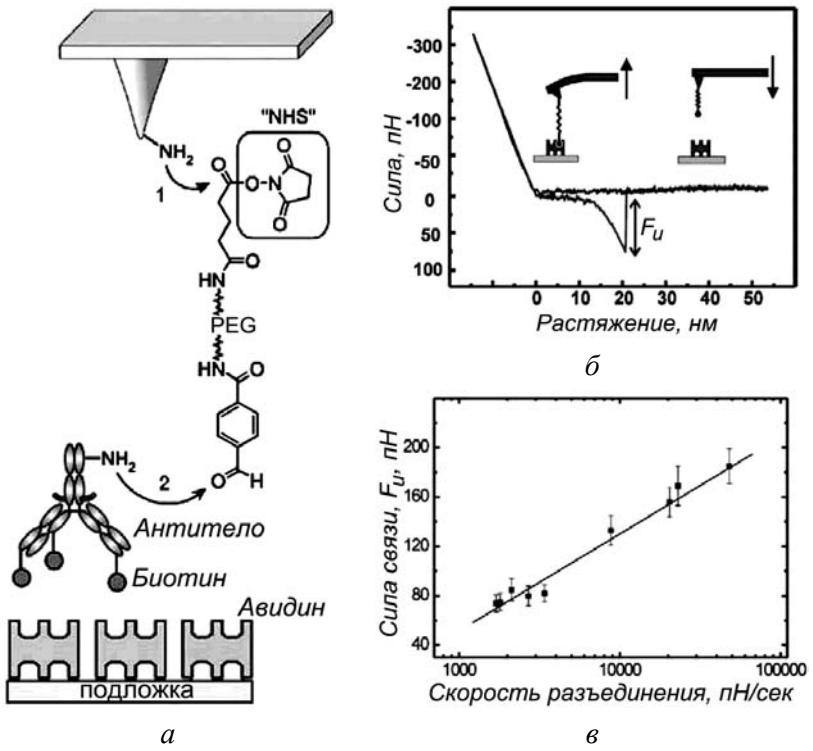


Рисунок 86 – Измерение силы межмолекулярного взаимодействия мембранного рецептора клетки с соответствующим лигандом

Один из примеров функционализации зонда кантилевера показан на рисунке 87(а) [55].



а *б* *в*

Рисунок 87 – Измерение межмолекулярных сил: *а* – функционализация зонда АСМ, *б* – определение силы связи, *в* – результаты измерений динамической силовой спектроскопии

Для того чтобы присоединить молекулу антитела к зонду АСМ, сначала к аминогруппе на конце зонда присоединяют N-гидрокси сукцинимид (NHS) линкера альдегид-PEG-NHS (этап 1 на рисунке 87(а)).

Затем один из лизинов антитела образует шиффово основание (*Schiff base*, –N=C<) с альдегидом линкера (этап 2 на рисунке 87(а)). Силу межмолекулярного взаимодействия (силу связи, F_u, *unbinding force*)

измеряют по максимальному изгибу кантилевера при его подъёме от поверхности (рисунок 87(б)).

Изменяя скорость движения кантилевера, можно получить детальную информацию о кинетике разрыва связи. На рисунке 87(в) представлены данные для специфического связывания пары антитело-антиген, полученные этим динамическим методом. Такая динамическая силовая спектроскопия позволяет получить значения константы диссоциации комплекса k_{off} и ширину активационного барьера диссоциации x_B. Для частного случая, представленного на рисунке 87(в), эти значения равны $k_{off} = 6\ с^{-1}$, $x_B = 0{,}12$ нм.

Этим же методом атомно-силовой микроскопии измеряют силу межклеточной адгезии [72] (рисунок 88).

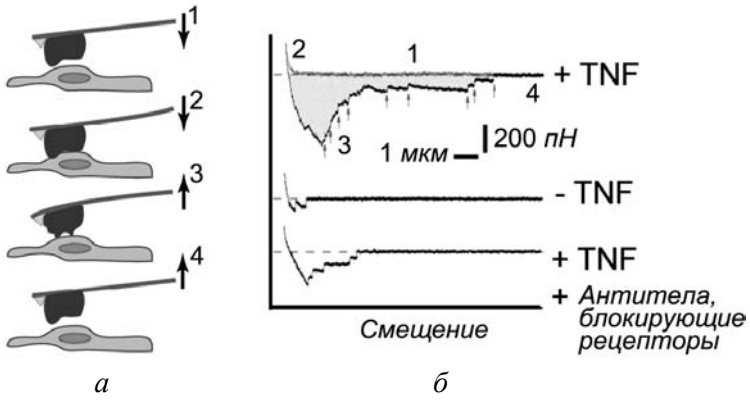


Рисунок 88 – Измерение силы межклеточной адгезии

На рисунке 88(а) представлена схема исследования межклеточной адгезии присоединённой к кантилеверу раковой клетки промиелоцитной лейкемии человека (HL-60, *human promyelocytic leukemia cell*), контактирующей с монослоем эндотелиальных клеток аллантоисной вены (*umbilical vein*) человека, и влияние на адгезию лекарственных препаратов: фактора-α некроза опухоли (*tumor necrosis factor-α*, TNF) и антител, блокирующих мембранные рецепторы межклеточных соединений

(*cell-cell junction receptors*). Именно с межклеточного контакта раковых клеток и клеток эндотелия начинается развитие метастаз.

Площадь под кривой на рисунке 88(б) (отмеченная серым) соответствует работе деадгезии, которую необходимо затратить для того, чтобы оторвать одну клетку от другой. Величина работы деадгезии увеличивается при стимуляция клеток эндотелия фактором-α и уменьшается при блокировании рецепторов адгезии антителами.

3.5.4. Использование фуллеренов и нанотрубок

Фуллерен (а точнее, *бакминстерфуллерен*) C_{60} (рисунок 89) был предсказан в 1966 году (статья *D.E.H. Jones* в научно-популярном журнале "New Scientist"), рассчитан квантово-химическим методом в 1973 году (статья Бочвара Д.А. и Гальперн Е.Г.) и, наконец, получен в микроколичествах в 1985 году (статья *H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley*). С тех пор изготовлены десятки, если не сотни килограммов этого удивительного вещества, а *R.F. Curl, R.E. Smalley* и *H.W. Kroto* в 1996 году получили Нобелевскую премию по химии "За открытие фуллеренов".

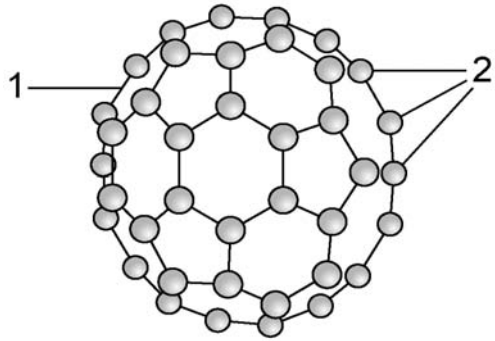


Рисунок 89 – Схема молекулы фуллерена: 1 – ковалентные связи; 2 – атомы углерода

Длинное и труднопроизносимое название бакминстерфуллерен происходит от имени и фамилии далёкого от химии американского архи-

тектора Бакминстера Фуллера. Он предложил строить куполообразную кровлю без подпорок в виде конструкций из шестиугольных и пятиугольных фрагментов, соединённых в определённом порядке.

Молекула C_{60} в точности повторяет одну из таких конструкций. Изобретатели молекулы C_{60} вспомнили своего соотечественника и назвали детище его именем. Молекула C_{60} представляет собой усечённый икосаэдр.

Оболочка футбольного мяча тоже имеет форму усечённого икосаэдра, поэтому C_{60} иногда называют *бакиболом* или *футболеном*. В первом названии ещё прослеживается связь с архитектором, а во втором суффикс "ен" подчёркивает наличие двойных связей, которых в "футбольной" молекуле 30. Но чаще всего для обозначения молекулы C_{60} всё-таки используется название *фуллерен*.

Фуллерен стал самым упоминаемым в научных статьях веществом. С момента открытия ему посвящены десятки тысяч статей, взяты сотни патентов, написаны монографии, выходит журнал "Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures", посвящённый фуллерену и родственным структурам. Уже начато полупромышленное производство фуллерена. Из экзотического вещества он превратился в продукт, который можно заказать и купить в любых количествах.

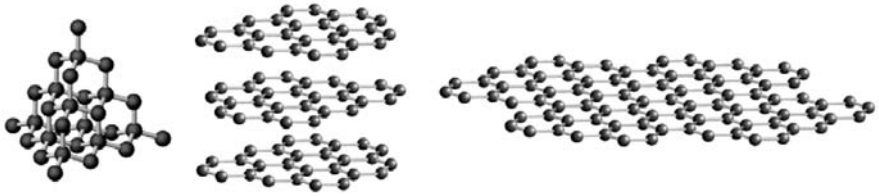
Фуллерены мало реакционноспособны, они могут вступать только в реакции присоединения. В первую очередь в них участвуют связи между 5- и 6-членными кольцами.

В молекуле фуллерена C_{60} диаметр атомного остова составляет 0,7 нм; во внутреннюю полость диаметром 0,44 нм могут поместиться некоторые атомы, например азота, металлов (La, Gd, Be, Ca и др.), инертных газов (He, Ne, Ar, Kr, Xe). Образуются так называемые *эндоэдральные фуллерены*. Их обозначают подобно адресу электронной почты: $N@C_{60}$.

Атомы, включённые в полость, оказываются надёжно спрятанными, как вещество в запаянной ампуле, и выходят оттуда только при разрушении оболочки фуллерена, что делает эндоэдральные фуллерены перспективным инструментом нанотерапии. При этом с самой углеродной оболочкой инкорпорированные в фуллерен атомы не реагируют.

Из фуллеренов можно собрать кристалл. В кристаллической решётке между сферическими молекулами фуллеренов также имеются пустоты. Они могут заполняться атомами щелочных металлов. Эти "соединения включения" называют *фуллеридами*. Некоторые из них, например фуллерид рубидия, Rb_3C_{60}, имеют сравнительно высокую температуру перехода в сверхпроводящее состояние (29К), что превышает температуру перехода некоторых промышленных сверхпроводников.

Основные и хорошо изученные кристаллические модификации углерода – алмаз и графит (рисунок 90 (а) и (б)). Если отделить одну плоскость от графита, то получим двухмерный лист атомов углерода. Такую аллотропную модификацию углерода называют *графен* (рисунок 90(в)).



а *б* *в*

Рисунок 90 – Аллотропные модификации углерода: *а* – алмаз; *б* – графит; *в* – графен

Лист графена можно свернуть в одностенную углеродную нанотрубку (*single wall carbon nanotube*, SWCNT) (рисунок 91).

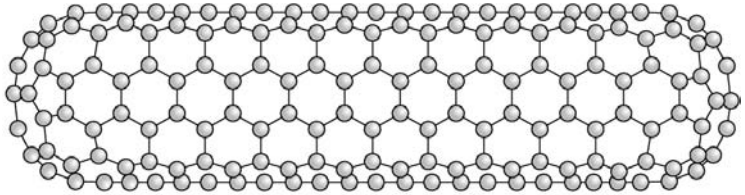


Рисунок 91 – Одностенная углеродная нанотрубка

Сворачивание нескольких листов графена приводит к образованию многостенной углеродной нанотрубки (*multiwall carbon nanotube*, MWCNT) (рисунок 92).

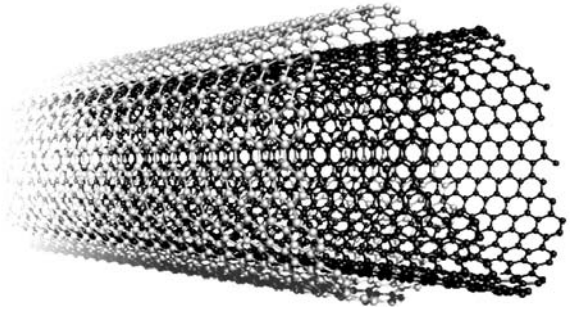


Рисунок 92 – М6ногостенная углеродная нанотрубка

Сворачивание графенового листа можно производить различным образом, чтобы получить нанотрубки различной хиральности (рисунок 93).

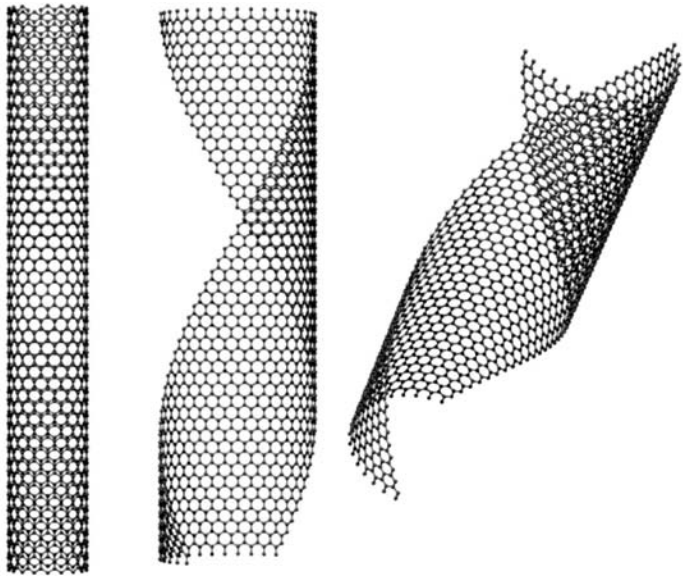


Рисунок 93 – Сворачивание графенового листа в углеродную нанотрубку

На рисунке 94 показаны направления сворачивания, при котором получаются нанотрубки различной хиральности.

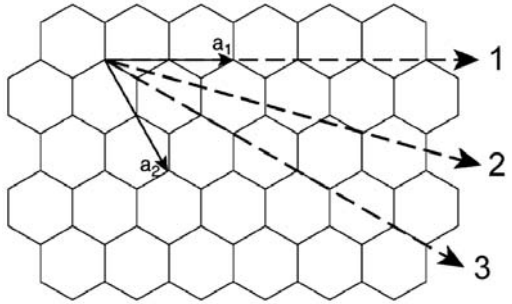
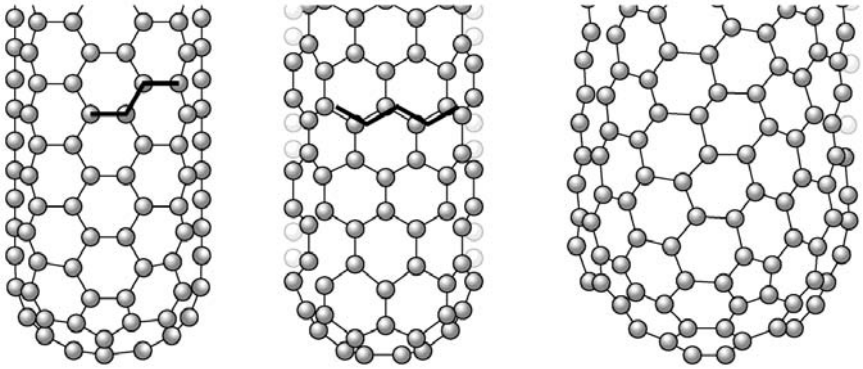


Рисунок 94 – Варианты сворачивания графенового листа в углеродную нанотрубку: 1 – "зигзаг"; 2 – хиральная трубка; 3 – "кресло"

Топология расположения атомов в нанотрубках при таких способах сворачивания показана на рисунке 95. В зависимости от того, каким именно образом производилось это "сворачивание", получились углеродные трубки (CNT, *carbon nanotube*) различной хиральности (рисунок 95).

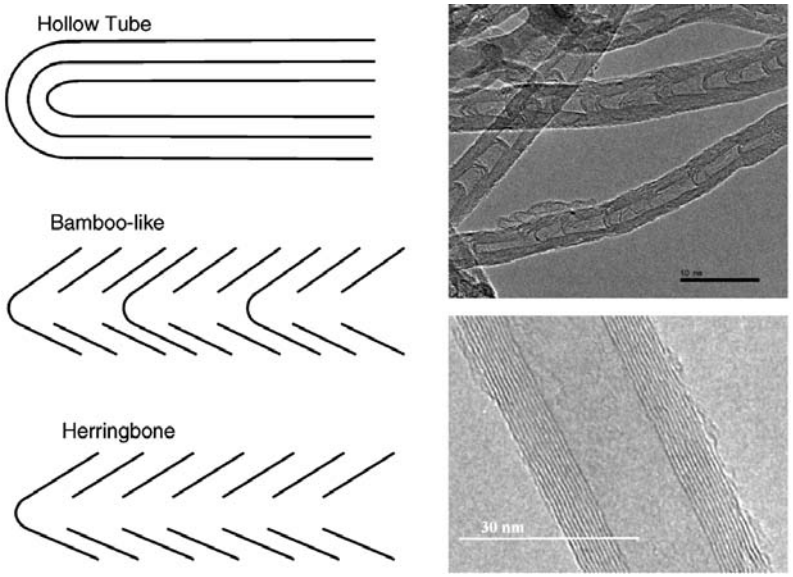


а *б* *в*

Рисунок 95 – Нанотрубки различной хиральности: *а* – нанотрубка типа "кресло"; *б* – нанотрубка типа "зигзаг"; *в* – хиральная нанотрубка

Примечательно, что хиральность углеродной нанотрубки совершенно определённо связана с её электрическими и оптическими свойствами. Так, например, нанотрубка типа "кресло" (*armchair nanotube*) демонстрирует металлические свойства, а нанотрубка типа "зигзаг" (*zigzag nanotube*) является полупроводником.

В случае многостенных нанотрубок в зависимости от технологических особенностей получения возможно образование различных морфологических разновидностей этих трубок (рисунок 96).



а *б*

Рисунок 96 – Многостенные углеродные нанотрубки: *а* – схемы строения нанотрубок; *б* – электронные микрофотографии бамбукообразных (вверху) и полых (внизу) нанотрубок

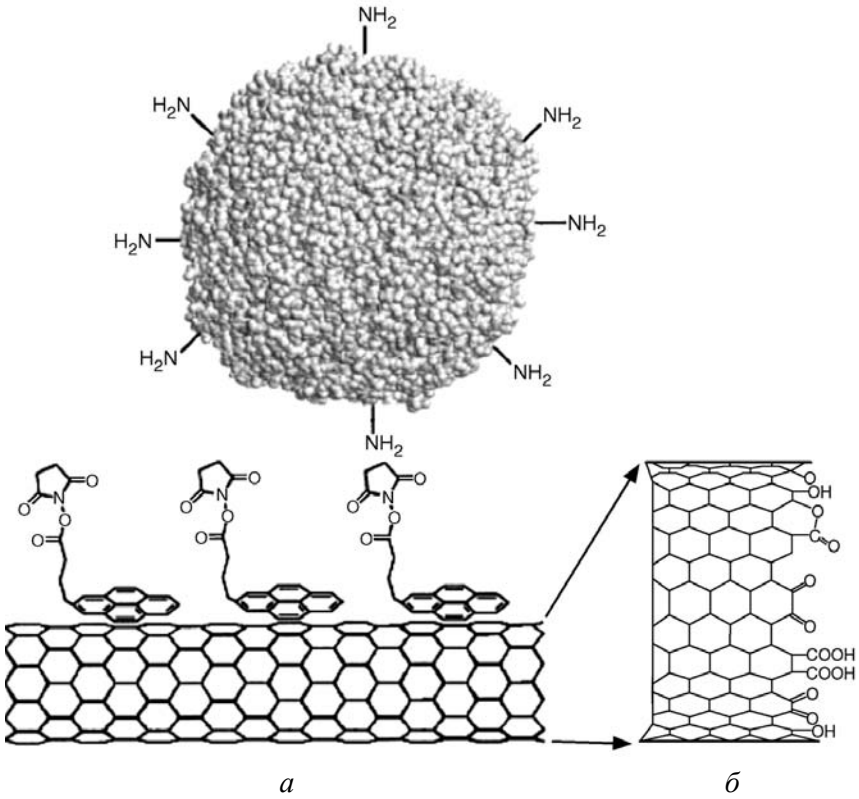
Основными разновидностями являются:

1) полые (*hollow*) многостенные нанотрубки (h-MWCNT),
2) многостенные нанотрубки с укладкой "ёлочкой", или "рыбий хвост" (*herringbone*, hb-MWCNT),

3) бамбукообразные (*bamboo-like*) многостенные нанотрубки (b-MWCNT).

Диаметр одностенной нанотрубки составляет порядка 1 нм, поэтому бионаноустройства, которые созданы с использованием нанотрубок, действительно являются самыми наглядными примерами внедрения бионанотехнологии.

Углеродные нанотрубки можно функционализировать *двумя* способами [33] (рисунок 97).



а *б*

Рисунок 97 – Способы функционализации нанотрубки: *а* – использование нековалентно ассоциированных линкеров для функционализации нанотрубки белком; *б* – использование системы реакционных групп на краю нанотрубки

Либо к боковой гидрофобной поверхности трубки с помощью нековалентно ассоциированных линкеров присоединяют необходимые биологические агенты используя стэкинг углеродных циклов. Либо биоагенты ковалентно присоединяют к торцу трубки (рисунок 97 (а) и (б)).

Второй способ был использован при конструировании нанобиосенсора глюкозы [55] (рисунок 98).

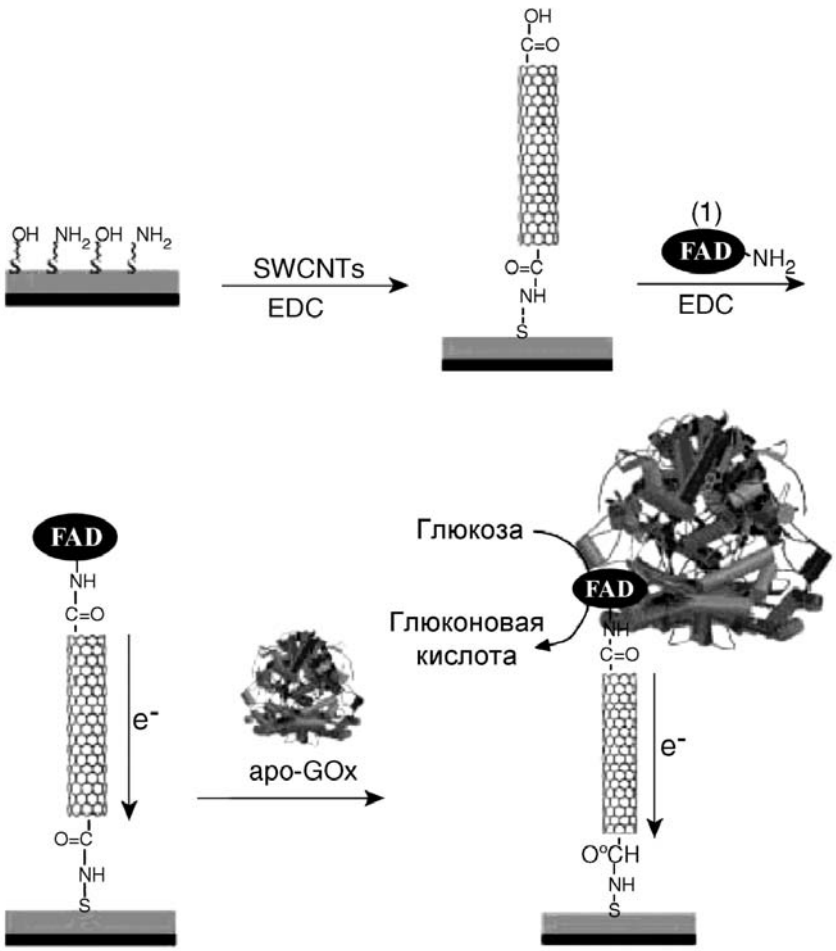


Рисунок 98 – Биосенсор для глюкозы на основе углеродной нанотрубки

Сначала поверхность золотого микроэлектрода была функционализирована тиоэтанолом и цистеамином, что предохраняло микроэлектрод от неспецифической агрегации с нанотрубками, и обеспечивало присоединение нанотрубок перпендикулярно к поверхности микроэлектрода. Затем к свободному концу нанотрубки ковалентно присоединялся кофактор ФАД, а к нему – фермент глюкозо-оксидаза (apo-GOx). В качестве активатора образования ковалентных связей с нанотрубкой использовался 1-этил-3-[3-диметиламинопропил] карбодиимид гидрохлорид (EDC).

Металлическая углеродная нанотрубка в таком биосенсоре выполняет роль нанопроводника, по которому переносится электрон между ФАД и микроэлектродом.

Способность нековалентно присоединять гидрофобные радикалы к боковой поверхности углеродной нанотрубки (CNT) используют для связывания с нанотрубкой молекул ДНК [42]. Азотистые основания достаточно прочно присоединяются к боковой поверхностью нанотрубки за счет стэкинга (рисунок 99).

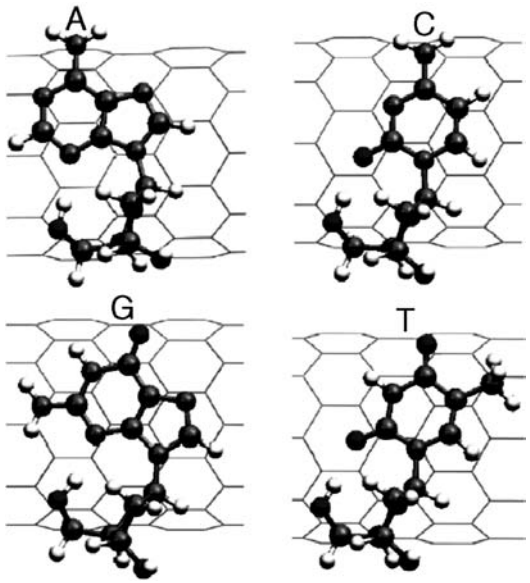


Рисунок 99 – Стэкинг нуклеозидов с поверхностью нанотрубки

Поэтому за счет стэкинга нуклеиновых оснований с поверхностью нанотрубки ДНК связываются с нанотрубками, обвивая их (рисунок 100).

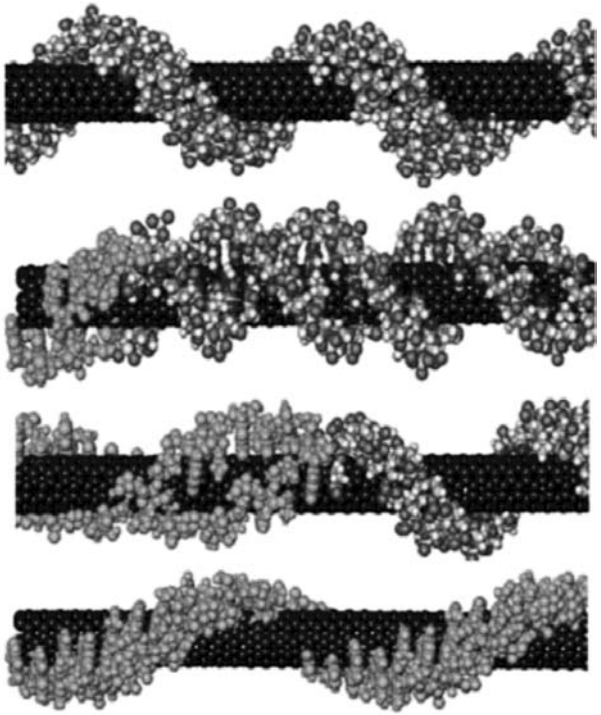


Рисунок 100 – Гибридизация ДНК и углеродных нанотрубок

Такие гибридные ДНК-CNT зондовые конструкции используют для создания ДНК бионаносенсоров, в которых гибридизация с ДНК молекул аналита из раствора или газовой смеси приводит либо к изменению электропроводности данного нанозонда, либо к изменению его спектральных характеристик. Пример такого CNT-ДНК-бионаносенсора представлен на рисунке 101 [68]. Наногибрид "ДНК-одностенная углеродная нанотрубка" (SwCN) закреплён между электрическими контактами S и D, которые вместе с кремниевой пластинкой (Si (Gate)) образуют полевой транзистор (FET, *field-effect transistor*, см. п. 15.4). В качестве ДНК-фрагмента использовался один из олигонуклеотидов Seq.1 или Seq.2 (рисунок 101(а)).

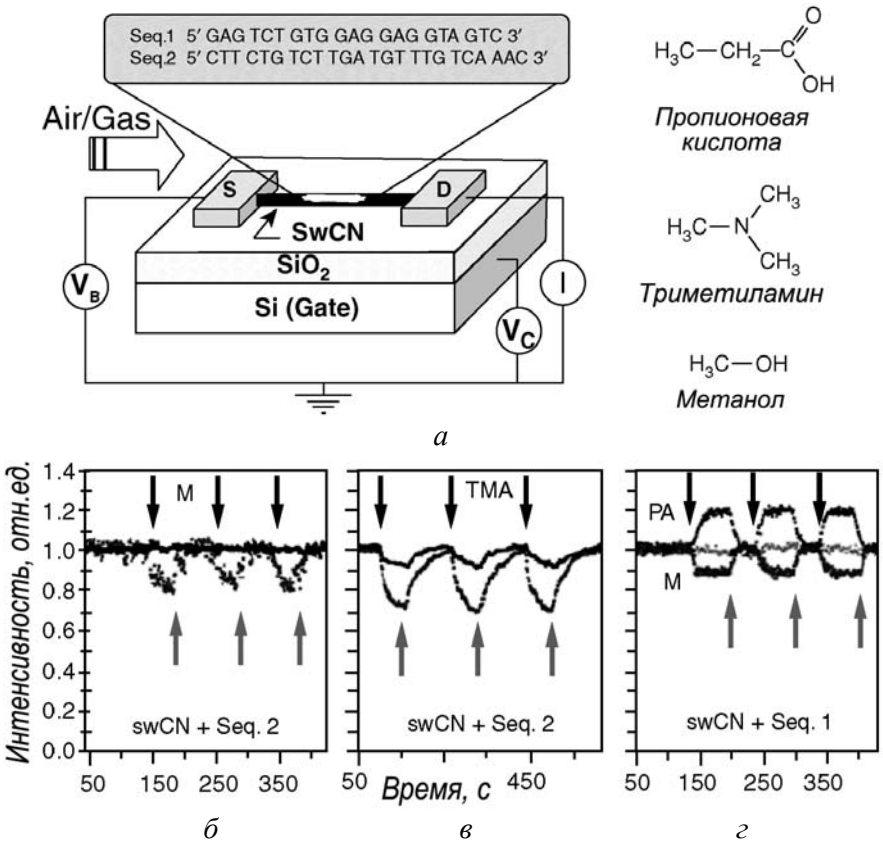


Рисунок 101 – ДНК-CNT-нанобиосенсор: *а* – схема сенсора и олигонуклеотидов. Детектирование молекул: *б* – метанола; *в* – триметиламина; *г* – метанола и пропионовой кислоты

Наносенсор детектировал наличие в газовом потоке молекул метанола (M, *methanol*), триметиламина (TMA, *trimethylamine*) и пропионовой кислоты (PA, *propionic acid*) (рисунок 101(б,в,г)). Верхние стрелки на рисунках 101(б,в,г) показывают моменты времени впуска газовой смеси в систему, а нижние стрелки – продувание системы чистым воздухом. Замена олигонуклеотида Seq.1 (рисунок 101(а,б)) на Seq.2 (рисунок 101(в)) снизило чувствительность сенсора к метанолу, но позволило тем

же сенсором регистрировать также наличие молекул пропионовой кислоты (PA). Слабое нековалентное связывание детектируемых молекул с олигонуклеотидами позволяет возвращать сенсор в исходное состояние простым продуванием чистым воздухом.

Используя различные олигонуклеотиды можно "настраивать" чувствительность CNT-ДНК-нанобиосенсора к различным молекулярным примесям. Все эти качества делают устройства такого рода перспективными кандидатами на роль "электронного носа" или "электронного языка" как для медицинской диагностики, так и для систем раннего обнаружения промышленного, военного и экологического назначения.

3.6. Моделирование бионаноструктур

При конструировании новых бионаномашин компьютерное моделирование используется наравне с биологическим экспериментом, причем, зачастую, *итерационно*. Сначала молекулы *проектируются* на компьютере, затем лучшие из вариантов *синтезируются и тестируются*. Выводы, сделанные в результате моделирования и экспериментов учитываются в *следующем цикле* компьютерных разработок и т. д.

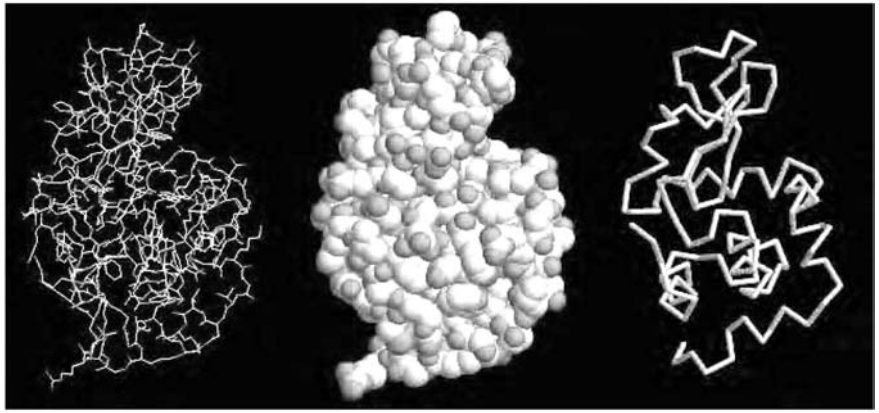
Такой подход, в частности, использовался при так называемом целенаправленном конструировании (или рациональном дизайне) молекул лекарств (*rational drug design*) наиболее впечатляющим из которых являются разрабатываемые лекарственные препараты против СПИДа. Компьютерное моделирование часто является единственно возможным методом изучения систем, недоступных экспериментатору, обеспечивая предсказания и направляя дальнейшие исследования и разработки.

3.6.1. Моделирование макромолекул

Компьютерная графика *революционизировала* исследование бионаномолекул и сейчас она является незаменимым инструментом во всех молекулярных науках. Компьютерная графика позволяет визуализировать необычные формы, свойства и взаимодействия молекул в привычном для нас виде. Молекулярная графика является первым шагом

в начале нового проекта, позволяющим исследователю представить себе и понять те молекулы, которые будут синтезированы или модифицированы.

Поскольку молекулы являются объектами, размеры которых меньше длины волны света видимого диапазона, то невозможно увидеть отдельную молекулу в микроскоп. Поэтому были разработаны различные способы представления структуры молекул (рисунок 102).



а *б* *в*

Рисунок 102 – Визуализация молекулярной структуры лизоцима: *а* – схема ковалентных связей; *б* – ван-дер-ваальсовая модель молекулы; *в* – "резиновая лента"

Можно изобразить пространственное расположение всех ковалентных связей в молекуле (рисунок 102(а)). Такое представление *наиболее полное*, но его сложно анализировать. Иногда удобно заполнить области, занимаемые каждым атомом, сферами соответствующего радиуса – *ван-дер-ваальсовая модель* (рисунок 102(б)). Такой способ визуализации даёт хорошее представление о *форме и размере* молекулы, но не видна внутренняя структура глобулы. Такое представление удобно для исследования межмолекулярного взаимодействия, но усложняет исследование процессов, связанных с особенностями вторичной структуры белка.

Для визуализации топологии белковой цепи используют схематическое изображение в виде "резиновой ленты", которая демонстрирует

только последовательность пептидных связей в белке (рисунок 102(в)). Такое представление удобно для *исследования фолдинга биомолекул*.

Наилучшие из программ визуализации представляют нам в зримом виде основные наносвойства молекул в виде трехмерных моделей.

Сегодня аппаратных средств компьютеров уже достаточно для интерактивного представления даже самых больших биомолекул. Программы визуализации доступны с сайта Базы данных белков (*Protein Data Base*, PDB) по адресу http://sw-tools.pdb.org/index.html.

3.6.2. Предсказание структуры и функций макромолекул

Молекулярное моделирование позволяет исследователю строить любую желаемую молекулу на основе известной молекулярной геометрии составляющих атомов (см. [14] п. 15).

Затем к этой трехмерной структуре прикладывается поле сил, определяющих взаимодействие между каждыми двумя атомами молекулы. Такая система может быть использована для решения следующих задач.

1. *Оптимизация.* Черновой вариант молекулярной структуры может быть оптимизирован с тем, чтобы полученная структура лучше соответствовала наложенному силовому полю.
2. *Анализ нормальных мод.* Набор внутримолекулярных взаимодействий и атомных положений может быть проанализирован для специфических гармонических колебательных мод, представляющих основные движения изгиба и кручения целой молекулы.
3. *Молекулярная динамика.* Можно рассмотреть каким образом изменяется во времени движение компонентов молекулы по мере того как рассеивается энергия тепловых флуктуаций, изначально сообщённая молекуле.
4. *Возмущения свободной энергии.* Детально моделируется переход молекулярной системы из данного начального положения в различные конечные состояния с детализацией процессов образования и развития промежуточных состояний. Иногда

полезно моделировать физически *бессмысленный* путь реакции, который, тем не менее, термодинамически идентичен реальному переходу и компьютерное моделирование которого является разрешимой задачей, в то время как компьютерное моделирование реального перехода неразрешимо в принципе.

Типичные методы позволяют моделировать биомолекулы, состоящие из нескольких тысяч атомов, а типичные расчеты молекулярной динамики охватывают интервалы времени в несколько наносекунд.

Этого достаточно, чтобы рассмотреть такие "*быстрые*" процессы как процесс катализа или локальных структурных изменений, но недостаточно для рассмотрения более продолжительных во времени процессов таких, как белковый фолдинг или ассоциация биомолекул.

3.6.3. Предсказание белкового фолдинга

Прежде чем бионанотехнология действительно станет распространенной технологией необходимо решить одну очень важную задачу. Мы должны быть способны *предсказать глобулярную структуру белка, исходя из его аминокислотной последовательности*. Без такого умения мы будем просто имитировать эволюцию, случайным образом модифицируя существующие белки до тех пор, пока они не изменятся в желаемую нам сторону. Белковый фолдинг является серьёзной проблемой по *двум причинам*.

1. Прежде всего, это *масштаб (абсолютная величина) проблемы*. Средний белок имеет несколько сотен аминокислот. Каждая соединена с соседями двумя гибкими связями, которые имеют целый набор устойчивых конформаций. Кроме того, каждая из аминокислот имеет гибкий боковой радикал, который может быть тоже может принимать много стабильных конформаций. Все вместе эти многочисленные торсионные степени свободы определяют невообразимо большое пространство конформаций, оперировать которым не в состоянии даже самые современные суперкомпьютеры.

2. Вторая проблема лежит в *методе*, который используется для оценки стабильности каждой пробной конформации в ходе компьютерного итерационного эксперимента.

Свёрнутый белок имеет тысячи внутренних контактов, каждый из которых вносит *ничтожный* вклад в стабилизацию общей структуры.

Множество *молекул воды* высвобождается в ходе фолдинга белка, когда белковые цепи прячут свои гидрофобные участки внутрь глобулы. Это высвобождение молекул воды является значительной силой, заставляющей белки приобретать глобулярную структуру.

С другой стороны, *энтропия* "*сопротивляется*" образованию внутрибелковых связей и отрыву молекул воды от белковой нити. С точки зрения снижения энтропии жёсткая белковая глобула, имеющая единственную конформацию, энергетически менее выгодна, чем гибкая расплетённая белковая нить, имеющая огромное множество конформаций.

Энергия, которая выделяется при образовании внутрибелковых контактов и высвобождении молекул связанной воды расходуется на сворачивание цепи в компактную форму.

В целом для системы *эти два противоположных вклада практически уравновешивают друг друга.*

Именно эту очень малую разницу, которая и представляет собой энергию стабилизации, мы и должны предсказать, когда пытаемся решить проблему белкового фолдинга, выбирая ту единственную третичную структуру, которая имеет наибольшую энергию стабилизации.

Однако величина этой энергии вычисляется как *разность между двумя большими величинами*, каждая из которых получена в результате суммирования огромного количества индивидуальных вкладов атомов молекулы белка. Даже малая погрешность определения величины вклада взаимодействий каждого из атомов белка в результате дает *суммарную* (кумулятивную) *ошибку*, которая больше, чем величина энергии стабилизации.

Оба фактора – и (1) огромное пространство конформаций, и (2) кумулятивные ошибки в целевых функциях, – в сумме *сводят на нет предсказания белкового фолдинга*.

Наиболее успешные приближения используют *упрощённые* модели, часто аппроксимирующие белковую цепь некоторым подобием кристаллической решётки, чтобы уменьшить число координат в пространстве конформаций. Однако, эти приближения все ещё далеки от предсказания трёхмерных структур при конструировании биомолекул.

Гомологическое моделирование. В настоящее время *самые хорошие предсказания* структуры белков получают *гомологическим моделированием*. При этом белки моделируются на основе известной структуры *подобных* белков. Проанализировав структуру всех белков Базы данных белков, оказалось, что белки, имеющие 30% *идентичных участков* первичной структуры, *имеют гомологичные структуры*. В этих структурах фолдинг и топология белковой цепи подобны, но локальные детали конкретных петель могут различаться. Гомологическое моделирование использует преимущества этого наблюдения. Структура нового белка может быть смоделирована на основе структуры известного белка, имеющего подобную аминокислотную последовательность (если, конечно, такая информация существует).

Компьютерное моделирование, в таком случае, используется для предсказания *структуры свободных петель и для определения координат специфических аминокислот*, которыми отличается новый белок от уже изученного.

Для белков, имеющих 60% и более гомологичности в первичной структуре, такие модели могут быть *очень точными*. В диапазоне гомологичности 30–60% первичной структуры такие модели могут быть полезны для предсказания *общих свойств* белковой структуры, таких как идентификация аминокислотных остатков, расположенных на поверхности, или могут быть использованы в предсказании общей формы глобулы.

Предсказание локальной структуры белка на основе его аминокислотной последовательности. Современные алгоритмы для предсказания локальной структуры белков на основе их последовательности также достаточно совершенны. Эти методы откалиброваны с исполь-

зованием известной структуры многих белков. При сканировании структуры нового белка эти алгоритмы классифицируют каждый участок как α-спираль, β-структуру или другую структуру, или классифицируют участки как поверхностные или внутриглобулярные.

Эти методики дают корректные предсказания, если первичная структура белка известна не менее чем на 70%. В таком случае возможно корректное предсказание фолдинга белка. Подобные методики, в частности, являются успешными при идентификации *трансмембранных участков мембранных белков*. Поскольку такие участки имеют необычные свойства (они взаимодействуют с мембраной, а не с водным окружением), то в таком случае алгоритмы, предсказывающие белковую структуру, достигают 95% точности.

Однако отметим, что *оба* подхода, и (1) гомологическое моделирование и (2) предсказание вторичной структуры могут иметь лишь ограниченное применение в бионанотехнологии. Оба метода основаны на факте, что рассматриваемые аминокислотные последовательности являются развитием белковой структуры вследствие эволюции. Исследователь *изначально полагает*, что первичная белковая структура укладывается в стабильную, функциональную, свернутую глобулу. В то же время существует множество примеров, когда замена *единственной* аминокислоты полностью изменяет (разрушает) известную структуру и вышеперечисленные методы предсказания не в силах идентифицировать такого типа "катастрофу" вследствие единственной замены.

Однако успешное гомологическое моделирование может быть рассмотрено в качестве хорошей *стартовой точки* в бионанотехнологии. Используя его можно начинать разрабатывать модифицированные белки, начиная с существующих стабильных функциональных белков, и, модифицируя их пошагово, стремиться получить искомую новую функциональность.

3.6.4. Моделирование докинга молекул

Специфическое взаимодействие между молекулами (молекулярное узнавание) является основой большинства биомолекулярных процессов.

Ферменты распознают форму (геометрическую и химическую) субстратов и создают такое окружение, которое благоприятствует протеканию необходимой химической реакции. *Антитела* имеют центры связывания, которые идеально соответствуют эпитопам антигенов. *Белки* взаимодействуют друг с другом и управляют функционированием друг друга через специфические места связывания. Для бионанотехнологии важно уметь предсказывать такие взаимодействия.

В настоящее время разработаны точные, самосогласованные методы для предсказания связывания молекул – лигандов или ингибиторов – с биомолекулами. На рисунке 103 показан пример компьютерной симуляции такого "*докинга*".

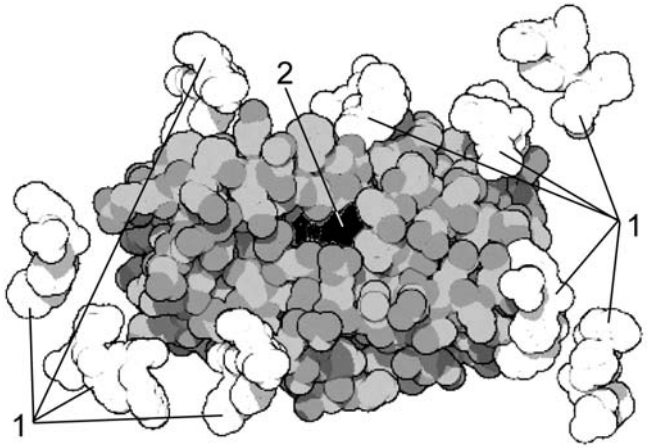


Рисунок 103 – Моделирование молекулярного докинга молекул лекарственного препарата саквинавир (*saquinavir*) к ВИЧ-протеазе: 1 – различные конформации молекул саквинавира; 2 – наиболее "удачная" конформация саквинавира, связанная в активном центре протеазы

Компьютерные программы проводят *поиск наилучших* центров связывания молекул лекарств с бионаномашинами. Если моделирование предсказывает *достаточно сильное* взаимодействие между молекулами, то тогда данное лекарственное средство синтезируют и проводят клинические испытания.

Наиболее совершенные компьютерные программы соединяют в себе *два* алгоритма.

Сначала они используют быстрый алгоритм для поиска множества способов, с помощью которых молекулы могут быть подогнаны друг к другу геометрически.

Затем к геометрическому подобию подключают *систему межатомных взаимодействий*, оптимизация которых (поиск конфигурации с минимальной энергией) позволяет точно предсказать энергию взаимодействия. *Компьютер перебирает множество возможных способов* связывания молекул, используя энергетический критерий для определения наилучшего из них.

Безусловно, для того, чтобы такие расчетные задачи на современных компьютерах возможно было *решить в разумное время*, используются различные *упрощения*. Как правило, предполагается, что белковая молекула является абсолютно (или в значительной степени) жёсткой – тем самым снижается количество возможных конформаций, которые следует рассчитать. Но это упрощение может создавать значительные трудности, например, когда белок "смыкается" вокруг малой молекулы при её связывании. Современные методики, использующие стандартные методы, являются успешными в половине случаев. В остальных случаях необходимо внимательно учитывать любые движения аминокислотных петель внутри белка, которые могут оказать существенное влияние на результат.

Что же касается моделирования *взаимодействия между большими биомолекулами*, особенно между белками, то эта задача все ещё слишком сложна для более-менее точного решения. В настоящее время не существует "готового к употреблению" метода для её решения, однако многие лаборатории уже тестируют такие методы.

Проблема объединения макромолекул, вследствие большого размера обеих молекул, намного более сложная, чем предсказание взаимодействия белка с малыми молекулами. Сейчас работа ведется в *двух* направлениях.

1. В первом реальные биомолекулы упрощаются, и вместо них используется модель их поверхностей с соответствующими химическими группами на них. Возможные комплексы молекул получают сначала простым перебором всех возможностей топологического докинга, а затем исследуют наиболее подходящие конфигурации более детально.
2. Второй подход, в котором "в лоб" моделируется атомная структура и атом-атомные взаимодействия, *основан на успехах геномики и протеомики*, в которых структура и функции белков определены с использованием сравнения структур генов [10].

Этот подход только недавно стал применяться и уже показал своё преимущество и эффективность в предсказании конформаций для эффективного межмолекулярного связывания и предсказания энергии связывания таких молекулярных комплексов.

3.6.5. Моделирование новых функций молекул

Значительное количество успешных решений в бионанотехнологии было достигнуто благодаря видоизменению природных биомолекул с целью придания им новых функций.

Конечно же, чем лучше мы знаем структуру макромолекулы, тем больше уверенности в успехе наших модификаций этой макромолекулы. Простое молекулярное моделирование является основным инструментом позволяющим проектировать изменения в структуре молекул, глядя на экран монитора. Это позволяет исследователю конструировать новые структуры, оптимизировать их, следя за тем, насколько хорошо эти изменения вписываются в общую структуру макромолекулы. Такой подход в сочетании с молекулярной динамикой обеспечил большинство успехов молекулярной нанотехнологии сегодня. Большое число наноразмерных моделей было создано с использованием жёсткого атомного скелета, используя необходимую геометрию межатомных связей. На практике молекулярное моделирование интенсивно используется для разработки технологий точечных мутаций (*site-directed*

mutations) с целью повышения стабильности и изменения функциональности белков. Однако поскольку в компьютере можно спроектировать *все что угодно* и число таких вариантов бесконечно, то, для того, чтобы такое моделирование давало практический результат, исследователь должен иметь определённый опыт и обладать креативными качествами.

Многие лаборатории разработали *специализированные методы, помогающие в молекулярном дизайне*. Например, многие методы были созданы для того, чтобы минимизировать ручную рутинную работу. Эти способы позволяют проводить автоматизированную подгонку вместо интуитивного поиска вручную методом проб и ошибок (*hit-or-miss approach*, метод "тыка"), при моделировании они эффективнее учитывают изменение свободной энергии (возможность самопроизвольного протекания процесса). Многие из таких методик были созданы в области компьютеризованной разработки лекарств. Их целью является дизайн молекулы лекарства, которая идеально вписывается в активный центр бионаномашины, блокируя нормальное функционирование макромолекулы.

Некоторые программы начинают с попыток *докинга тысяч малых молекулярных фрагментов*, каждый из которых состоит из 5–10 атомов. Затем, чтобы спроектировать молекулу лекарства, те фрагменты, которые наилучшим образом вписались в активный центр, соединяются с теми фрагментами, которые хорошо подходят к соседним с активным центром участкам белка.

Другой подход к решению той же проблемы состоит в том, что дизайн *начинают с* "*базисной*" *молекулы*, которая связывается в глубине активного центра. Конструирование же молекулы лекарства осуществляется *добавлением* атомов по одному к этой базисной молекуле до тех пор, пока активный центр не будет полностью заполнен. Такими методами могут быть сконструированы превосходные кандидаты на новые лекарства (лиды), но есть и опасность, когда торопливый и нетерпеливый разработчик может спроектировать настолько экзотическую молекулу, которую ни один химик не в силах будет синтезировать.

Контрольные вопросы и задания

1. Как используют технологию рекомбинантных ДНК в бионанотехнологии?
2. Как методом точечного мутагенеза была увеличена термостабильность лизоцима?
3. Приведите примеры успешного конструирования химерных белков.
4. Как антитела используют в бионаномедицине?
5. Укажите достоинства и недостатки метода рентгеноструктурного анализа.
6. Какую информацию даёт исследователю метод электронного парамагнитного магнитного резонанса?
7. Какую информацию даёт исследователю метод ядерного магнитного резонанса?
8. Каковы достоинства и недостатки электронной микроскопии?
9. Назовите виды электронной микроскопии. В чём заключаются преимущества каждого из видов?
10. Опишите принцип действия атомно-силового микроскопа.
11. Опишите принцип действия сканирующего туннельного микроскопа.
12. В чём сходство и различие атомно-силового и сканирующего туннельного микроскопов?
13. Какие компоненты входят в обобщенную схему масс-спектрометра?
14. По какому параметру производится разделение сигнала в масс-спектрах?
15. Какие основные виды ионизации образца используются в масс-спектроскопии?
16. Какие пять типов анализаторов используются в масс-спектроскопии?
17. В чём преимущество отражательного время-пролётного масс-спектрометра по сравнению с линейным время-пролётным масс-спектрометром?
18. Как устроен детектор ионов на основе вторичного электронного умножителя?

19. Как устроен многоканальный матричный детектор ионов на основе фотодиодной матрицы?
20. Каким методом считывается информация с кантилевера атомно-силового микроскопа?
21. Какие существуют три режима работы кантилеверных нанобиосенсоров?
22. Каким образом были измерены силы внутримолекулярных нековалентных взаимодействий в молекуле титина?
23. Каким образом были измерены силы липид-белковых взаимодействий молекулы бактериородопсина?
24. Как с помощью атомно-силового микроскопа можно измерить силу межмолекулярного взаимодействия мембранного рецептора клетки с соответствующим лигандом?
25. Каким образом измеряют силу межклеточной адгезии и влияние на неё различных метаболитов?
26. Какие фуллерены называются эндоэдральными?
27. Какие существуют аллотропные модификации углерода?
28. Чем отличаются углеродные нанотрубки типа "зигзаг" и типа "кресло"?
29. Какие существуют морфологические разновидности многостенных углеродных нанотрубок?
30. Как функционализируют углеродные нанотрубки?
31. Какую роль выполняет углеродная нанотрубка в нанобиосенсоре глюкозы?
32. За счёт чего гибридизуются ДНК и углеродные нанотрубки?
33. Для чего используют гибридные ДНК-CNT зонды?
34. Какова роль компьютерного моделирования в бионанотехнологии?
35. Назовите две причины, не позволяющие до настоящего времени осуществить компьютерное моделирование белкового фолдинга.
36. В чём заключается гомологическое моделирование структуры белков?
37. Для каких целей используют компьютерное моделирование молекулярного докинга?

Раздел 2
Структурные принципы бионанотехнологии

Глава 4
Структура и стабильность биомолекул

4.1. Роль среды в формировании биомолекул

Любая нанотехнология предназначена для создания *стабильных* наноструктур. Только после того, когда мы сможем расположить атомы так, как мы этого хотим, мы можем начинать фантазировать о том, и планировать то, какую работу будут выполнять эти наши атомные конструкции. Чтобы достичь этой основной цели мы обязаны понимать, какие *силы* объединяют атомы в наноконструкции. Эти силы *отличаются* от привычных нам сил в макромире. Прежде всего, мы не можем изменять форму атомов по нашему желанию. Когда мы строим макромашины, мы плавим пластик, стекло или металл, придавая им желаемую форму. Но в наномасштабе существующие "строительные" материалы накладывают более жёсткие ограничения на возможное изменение их формы. Существует вполне *определённый набор квантово-химических правил*, в соответствии с которым атомы связываются друг с другом.

Необходимо также прогнозировать прочность и стабильность проектируемых нанообъектов – мы обязаны так создавать их, чтобы они выдерживали *воздействия* той среды, в которой они будут работать.

Прочность нанообъектов ограничивается ещё и тем, что существует только *определённый набор связей*, в образовании которых может участвовать данный атом. Для успешной разработки искусственных структур, которые будут сравнимы с природными бионаномашинами, необходимо сначала проанализировать те "инженерные" решения, структуры, приемы и пути, которые реализованы в природных бионаномашинах. Определив те *принципы*, согласно которым природные бионаномашины достигают *стабильности* и *функциональности*, станет возможным использовать эту информацию, чтобы создать тот базисный набор функциональных структур (тот "конструктор"), используя который мы сможем конструировать собственные наномашины.

Каждый раз, используя биологию в качестве прототипа для нанотехнологии, мы должны помнить об одном существенном ограничении. *Природные бионаномашины были созданы для работы внутри клетки.* Они были оптимизированы именно для такой среды и не могут оптимально функционировать (или даже, вообще не будут функционировать), если их поместить в другие среды.

Самым важным ограничением является *наличие водной среды*. Природные бионаномашины сконструированы, чтобы быть стабильными в водном окружении. Особые свойства воды используются для стабилизации биомолекулярной структуры. За исключением редких случаев, эти бионаномашины не могут быть воспроизведены или их функции не могут быть проанализированы в других растворителях или в вакууме, поскольку они обретают функциональную структуру и проявляют свои функции только, когда их помещают в воду.

Биологическая среда характеризуется *узким диапазоном приемлемых температур*. Типичные бионаномашины оптимально функционируют при температуре около 37°C, хотя в особых случаях биомолекулы могут быть созданы и для работы при высоких температурах вплоть до 90°C. Бионаномашины созданы так, чтобы быть *стабильными* при этих температурах, *но не слишком* стабильными – они должны быть достаточно гибкими для осуществления своих функций.

При физиологических температурах происходит интенсивное тепловое движение биомолекул и окружающих их молекул воды. Силы, связывающие атомы в биомолекулах, являются *достаточно прочными*, чтобы образовывать стабильные структуры, выдерживающие постоянные толчки, сопровождающие тепловое движение, и град ударов со стороны молекул воды. Однако эти силы являются *достаточно слабыми*, чтобы обеспечить возможность сборки и разборки бионаномашин *без* применения *экстремальных* энергоресурсов.

Клетки не используют такие экстремальные технологии обработки материалов, как электросварку и плавку в домнах или мартенах для образования новых структур, напротив, они осуществляют все операции по синтезу новых компонентов и поддержанию необходимого концентрационного уровня цитозольных компонентов, используя *минимальный* расход энергии.

Природные бионаномашины сконструированы так, чтобы быть стабильными на протяжении биологически *необходимого промежутка времени*. Большинство бионаномашин функционируют *всего несколько секунд*, и крайне редко создаются бионаномашины для работы в течении более чем одного года. Природные бионаномашины собираются быстро, используются для специальных задач, а затем разбираются, обеспечивая тем самым клетку исходными материалами для строительства новых машин. Правилом является *планируемая* при сборке *пригодность* для утилизации.

Для строительства машин с такими свойствами идеальными являются *органические молекулы на основе углерода*. Органические молекулы обеспечивают большой *набор взаимодействий* в водном окружении. Они *стабильны* при физиологических температурах, но не слишком стабильны, позволяя быстрый синтез или разборку в течении секунд. Комбинируя *углерод* с несколькими другими атомами – *кислородом, водородом, азотом, серой, фосфором* – может быть синтезировано бесконечное разнообразие молекул с различными химическими свойствами.

4.2. Принцип иерархичности в создании бионаномашин

Идеальной технологией, о которой мечтают молекулярные нанотехнологи, являлась бы технология, позволяющая собирать планируемую структуру атом за атомом, начиная с первого атома и до завершения сборки. Однако и химики, и природа используют другой, *иерархический* подход к сборке больших структур, комбинируя их, уровень за уровнем, из последовательно все более сложных субструктур.

Принято выделять *четыре иерархических метода* (стратегии), которые позволяют ассемблировать сложные наноструктуры из элементарных компонентов (рисунок 104).

1. Последовательный ковалентный синтез. Первый метод называется *последовательный ковалентный синтез* (*sequential covalent synthesis*). Последовательный ковалентный синтез использовался для создания множества малых органических молекул, которые имитируют функции биологических аналогов.

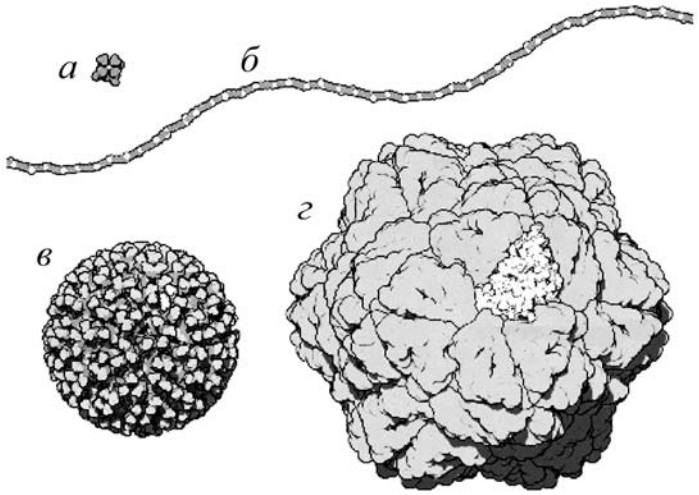


Рисунок 104 – Четыре иерархические стратегии.

На рисунке 104(а) представлена молекула, которая имитирует гем в гемоглобине и обладает аналогичными гему свойствами связывать кислород. В случае последовательного ковалентного синтеза *функциональные группы* или отдельные *атомы* непосредственно *связываются друг с другом в ковалентные молекулы* необходимой формы. Из всех четырёх иерархических стратегий, первый метод более всего *напоминает* привычные нам *макроскопические индустриальные технологии*. Сначала проектируется необходимая конструкция, а затем, компоненты (в нашем случае группы атомов) складываются в единую конструкцию. Именно так работают химики, осуществляя синтез продуктов. Химический синтез таких молекул как витамин B_{12} и таксол, каждая из которых состоит из нескольких сотен атомов, это пример максимально возможных молекулярных структур, которые в состоянии произвести синтетическая химия.

Преимущества ковалентного синтеза определяются тем разнообразием химических структур, которые могут быть синтезированы. Атомы могут быть скомбинированы практически в любых комбинациях, включая сильно деформированные и напряженные конструкции, в пределах, конечно, ограничений на геометрию и силу связей, которые обусловлены квантовой природой химических связей.

2. Ковалентная полимеризация. Вторая стратегия называется *ковалентная полимеризация* (*covalent polymerization*). Структуры строятся из модульных блоков, которые соединяются в линейные или разветвлённые цепи (рисунок 104(б)). Примеры использования принципа ковалентной полимеризации – пластики, эластичные материалы, полиэтилен, нейлон. Синтез методом ковалентной полимеризации может быть осуществлен как в объёме, так и из смеси малых цепочек. Или же полимеризация может контролироваться по одному шагу за раз, каждый раз синтезируя идентичные цепи полимеров.

Химический синтез ДНК твердотельными методиками и синтез ДНК в клетках – это пример ковалентной полимеризации – в обоих случаях производятся одинаковые цепи идентичные на атомном уровне.

Большие биологические макромолекулы собираются именно методом ковалентной полимеризации.

Однако есть и *ограничения*, свойственные именно этой стратегии. Во-первых, после того, как выбран определённый тип связи отдельных мономеров в полимер, свойства всей цепи будут ограничены именно *этим типом связи*. Например, белки обычно образуются соединением в цепь пептидных групп, но не ангидридов или эфиров. Во-вторых, синтез ограничен использованием только тех мономеров, которые *стабильны* в условиях протекания реакции полимеризации, поэтому, некоторые полезные химические группы могут быть слишком неустойчивы, чтобы их использовать. Для решения этой проблемы при проведении химического синтеза используются скрупулезные химические схемы для *защиты* чувствительных химических групп во время синтеза. В биологических системах эту функцию выполняют ферменты, которые обеспечивают гораздо более "мягкие" условия для полимеризации, позволяя использовать мономеры с более широким спектром химических свойств.

3. Самосборка. Третья стратегия называется *самоорганизующийся синтез* (*self-organizing synthesis*) или *самосборка*. В этом случае также используется *принцип модульной сборки*, но модули соединяются в структуру *нековалентно*. Типичными примерами таких самособранных структур являются молекулярные кристаллы (например, твердый кислород или метан, кристаллы сахара или белка) и жидкие кристаллы (в дисплеях мобильных телефонов и мониторов). В клетках примерами самособранных структур являются *мицеллы* и *биомембраны* собранные из липидов. На рисунке 104(в) показан пример липосомы для доставки лекарств, образованной при самосборке липидных молекул. Множество современных применений из разряда нанотехнологий, такие, например, как *наносферы* или *нанокомпозиты*, используют именно самосборку в качестве метода формирования нанообъекта.

Следует подчеркнуть *отличие* самосборки от двух вышеперечисленных иерархических стратегий: последовательного ковалентного синтеза и ковалентной полимеризации. *При ковалентном синтезе* или полимеризации инженер присоединяет атомы друг к другу, формируя желаемую структуру, которая *необязательно* является энергетически наиболее выгодной. *При самосборке*, напротив, молекулы формируют структуру,

достигая *термодинамического энергетического минимума*, спонтанно находя при этом самую энергетически выгодную комбинацию взаимодействий между модулями, но, не формируя ковалентных связей между ними. Проектируя самособирающуюся структуру, инженер должен *предугадать* такой минимум, а не просто помещать атомы в желаемые места структуры.

4. Самоассемблирование. Четвертая иерархическая стратегия это *самоассемблирование* (*self-assembly*). Самоассемблирование определяется как *спонтанное ассемблирование молекул в структурированные, стабильные, нековалентно-связанные агрегаты*.

Два наиболее распространённых процесса самоассемблирования это *белковый фолдинг* и *самоассемблирование мультиглобулярных структур*. Оба процесса включают быстрый перебор (вследствие случайных термических флуктуаций) различных возможных конформаций до тех пор, пока не будет достигнут термодинамический минимум. Высокоспецифичные взаимодействия определяют геометрию финальной структуры.

Из всех технологических приемов и решений, которые человек может позаимствовать у природы, *самым ценным*, возможно, является использование *спонтанного самоассемблирования* для создания наномашин. Такой способ сборки конструкций абсолютно не свойственен нашим макроскопическим технологиям. Мы всегда используем целенаправленную непосредственную сборку объекта, основываясь на конструкторской документации, которая четко определяет его трёхмерную пространственную форму изделия. В то время как клетки помещают все необходимые компоненты вместе и ждут, пока они не самоассемблируются в финальный продукт.

4.3. Структурные особенности ковалентных связей в биомолекулах

Углерод это основа бионанотехнологии. Органические молекулы на основе углерода являются идеальным материалом, обеспечивающим

широкий диапазон свойств для конструирования бионаномашин. Различные устойчивые виды межатомной связи, обеспечиваемые углеродом, позволяют конструировать *практически любые конструкции* любой формы, какую только можно себе представить. К углеродной основе легко *добавляются* атомы кислорода и азота, обеспечивая дополнительные молекулярные свойства и функциональность.

Структуру и свойства органических молекул можно понять, используя *простую эмпирическую модель*, которую химики и биологи используют уже много десятилетий. Это, конечно, не то полное описание, которое обеспечивает квантовая механика, но этого достаточно для понимания тех исходных взаимодействий, которые и формируют форму, и стабилизируют биомакромолекулы (см. [5], п. 5.1).

Такое упрощённое описание включает *три основных модели*. Во-первых, *ковалентное* связывание соединяет атомы, формируя стабильные структуры с определённой геометрией. Во-вторых, несколько типов *нековалентных* сил контролируют взаимодействия внутри молекул и между молекулами. И, в-третьих, особые *свойства воды* кардинально модифицируют форму и стабильность молекул.

На рисунке 105 в качестве примера приведена схема молекулы *инсулина*. Трёхмерная структура этой молекулы стабилизирована широким набором различных взаимодействий. *Ковалентные* связи, изображённые на схеме цилиндрами (2), связывают атомы молекулы. В водном окружении белковая цепь сворачивается так, чтобы спрятать *гидрофобные* участки (1) внутрь глобулы, а *гидрофильные* заряженные аминокислоты (4) оказались на поверхности молекулы, где они взаимодействуют с молекулами воды. Прочность глобулы увеличивают *водородные* связи между различными участками молекулы. Пунктиром (3) показаны водородные связи, формирующие α-спираль.

Характерная энергия различных взаимодействий приведена в таблице 1.

Самыми сильными взаимодействиями в биомолекулах являются ковалентные связи, которые образуются между атомами благодаря квантово-механическому обобществлению электронов. При физиологических температурах ковалентные связи стабильны. Для того чтобы их сформировать или разорвать требуется *значительная* энергия.

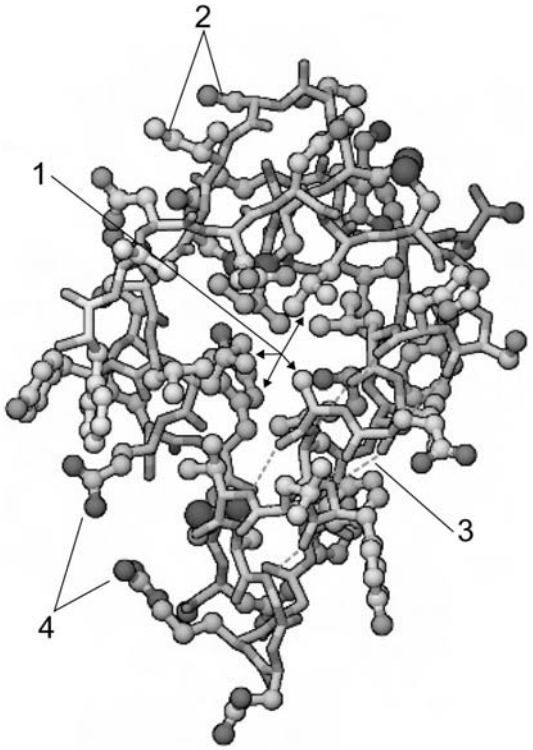


Рисунок 105 – Физические взаимодействия в молекуле инсулина: 1 – гидрофобные аминокислоты (гидрофобный эффект); 2 – ковалентные связи; 3 – водородные связи; 4 – заряженные аминокислоты (электростатические взаимодействия)

Прочность большинства органических материалов определяется именно ковалентными связями. Например, шёлк формируется многими длинными нитями (цепочками) ковалентно связанных атомов, сплетёнными в жгуты. Прочность шёлка определяется этими ковалентными связями. Эластичность шёлка является следствием того, что отдельные одномерно связанные нити легко скользят друг относительно друга, поскольку они не связаны ковалентно между собой. Если же сформировать *трёхмерную*

систему ковалентных связей, такую, как в углеродной решетке алмаза, то образуется самый прочный из минералов, который выдерживает максимальные нагрузки, приложенные в любом направлении.

Таблица 1 – Энергия взаимодействий в макромолекулах

	кал/моль
Ковалентная связь	> 50
Ван-дер-ваальсовые силы	< 1
Водородная связь	1–7
Электростатические взаимодействия	1–6
Гидрофобные взаимодействия	2–3
Средняя тепловая энергия при 37°C	0,6

Ковалентные связи *жёсткие* и *направленные*. Геометрия ковалентных связей определяется квантово-механическим распределением электронной плотности в атомах. Для описания структурных свойств большинства органических молекул пользуются наглядными моделями ковалентных связей в основе которых, конечно же, лежит строгое квантово-механическое описание межатомных взаимодействий. Эти модели сродни тем шаро-стержневым конструкторам, из которых собирают объёмные модели молекул. Однако для более глубокого понимания природы ковалентных связей и при попытках встраивания в органические молекулы более экзотических атомов необходимо более детально изучать квантовую механику и квантовую химию.

В первом приближении, органические молекулы могут быть собраны из атомов, используя соответствующее число и геометрию связей, показанную на рисунке 106.

Атомы *углерода* (C) образуют *четыре* связи с окружающими атомами, формируя тетраэдрические структуры. В некоторых соединениях углерод способен образовывать две (или даже три) связи с одним атомом, образуя двойную связь. *Кислород* (O) образует две связи под углом порядка 100° или двойную связь с одним атомом. *Азот* (N) образует три связи. *Сера* (S) образует две связи. *Фосфор* (P) в биомолекулах участвует

в составе фосфатной группы, в которой он окружен четырьмя атомами кислорода.

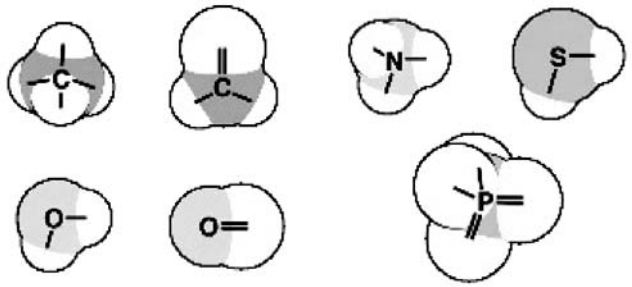


Рисунок 106 – Схемы ковалентных связей в органических молекулах атомов серы, азота, фосфора, углерода и кислорода

Используя эти простые модели можно "собрать" огромное количество разнообразных молекул. Более того, эти правила конструирования молекул настолько универсальны, что для исследования свойств органических молекул вполне пригодны даже пластиковые шаро-стержневые модели. Однако, конструируя новую молекулу, необходимо всё же сначала ознакомиться с теми молекулами, которые уже созданы природой, чтобы не тратить силы на выдумывание нестабильных образований.

Стабильные органические молекулы, как правило, имеют *углеродный скелет*, а присоединённые атомы азота и кислорода, как правило, пространственно разнесены и не соединены друг с другом ковалентно. Кроме того, обычно менее стабильными являются молекулы, в которых сильно *искажена* нормальная геометрия атомных орбиталей, например, такой является треугольная молекула из трёх атомов углерода. Геометрия взаимодействий посредством ковалентных связей чётко определена и относительно жёстка. Длина связей варьируется *только на доли ангстрема*, а вариации углов между двумя связями редко превышают несколько градусов. В то же время, для многих типов связей разрешено *вращение* вокруг связей. Вообще говоря, хотя такое движение, как и всё в квантовом мире, является последовательными перескоками

системы из одного состояния в другое, но, поскольку барьеры при таких перескоках малы, то в молекулярной нанотехнологии *одиночные связи принято рассматривать как оси вращения*. Однако двойные и тройные связи, при образовании которых обобществляются дополнительные электроны, являются жёсткими.

В действительности всё не так просто. Вышеперечисленные простые правила должны быть скорректированы с учетом явлений *гибридизации* и *резонансов*, которые объясняют некоторые необычные аномалии. Классическим примером является *бензол* (рисунок 107). По нашим правилам его шестиугольное "кольцо" следовало бы изображать как попеременное чередование одиночной и двойной связей между углеродами. Очевидно, что возможны *два* представления. Однако исследования показывают, что все связи в бензольном кольце тождественны и в действительности картина связей есть "среднее арифметическое" двух экстремальных случаев, показанных на рисунке 107, т. е. образуется так называемый "резонанс", охватывающий все шесть атомов углерода.

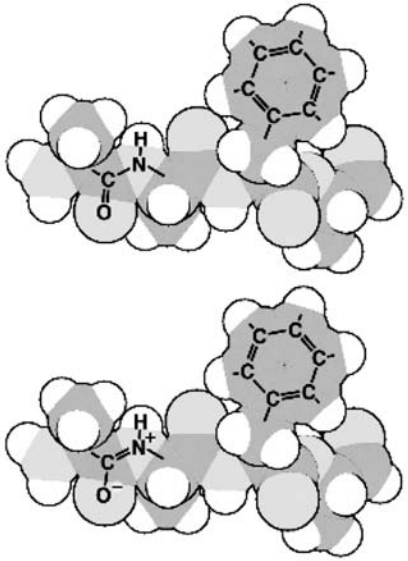


Рисунок 107 – Образование жёстких плоских молекулярных структур вследствие формирования резонансов

Резонансы существенно снижают гибкость молекулярных связей. Примером этого является *пептидная связь* (рисунок 108). Вследствие *гибридизации* вся пептидная группа является *жёстким* образованием, лежащим в одной плоскости, хотя могло бы показаться, что в ней возможно вращение вдоль N–C связи.

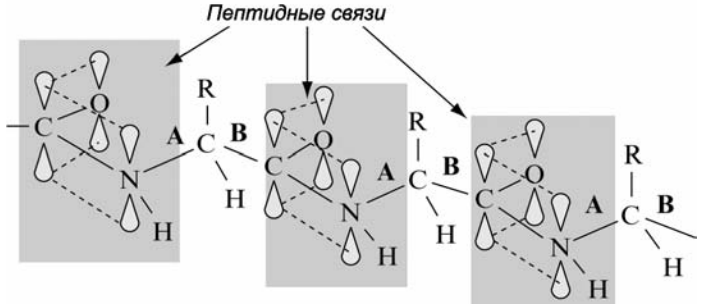


Рисунок 108 – Резонансы в пептидной связи

Наглядно этот процесс можно представить как "перенос" электрона с азота на кислород, при котором вместо одинарной HN–CO связи формируется двойная (рисунок 107). В действительности электронная структура опять-таки соответствует промежуточному между этими крайностями состоянию, она имеет характер *резонанса, охватывающего все четыре атома пептидной группы* и обеспечивающего её жёсткость, как если бы все связи имели свойства двойных. В результате пептидная цепь может относительно свободно вращаться только относительно A и B связей α-углеродов (рисунок 108).

4.4. Структурные особенности нековалентных взаимодействий

Нековалентные взаимодействия являются определяющими в формировании функциональной структуры биомолекул и клеточных компонентов. Силы нековалентных межмолекулярных взаимодействий являются

короткодействующими – они проявляются на расстояниях менее 10^{-9} м (см. [5], п. 5.2). Нековалентные взаимодействия подразделяют на:

1) электростатические (или ионные) взаимодействия;
2) ван-дер-ваальсовые силы;
3) водородную связь;
4) гидрофобные силы.

Рассмотрим взаимодействие двух молекул, одна из которых расположена в начале координат (рисунок 109).

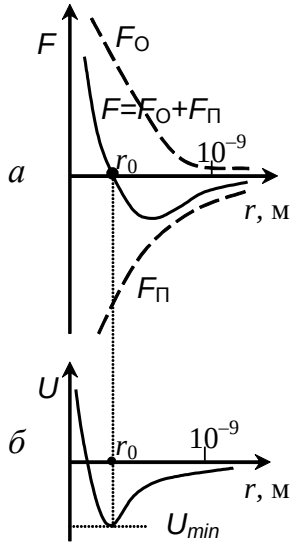


Рисунок 109 – Межмолекулярное взаимодействие: *а* – сила межмолекулярного взаимодействия; *б* – потенциальная энергия

Сила взаимодействия молекул – это равнодействующая сил притяжения $F_П$ (они преобладают на больших расстояниях) и сил отталкивания $F_О$ (они доминируют на малых расстояниях). На расстоянии $r = r_0$ эти силы уравновешивают друг друга и $F = 0$. Таким образом, расстояние r_0 – это равновесное расстояние между молекулами, на котором бы они

находились в отсутствие теплового движения. Потенциальная энергия взаимодействия молекул U минимальна в состоянии устойчивого равновесия при $r = r_0$ (рисунок 109(б)).

Ван-дер-ваальсовые взаимодействия. *Ван-дер-ваальсовые взаимодействия* имеют электромагнитную природу и определяются взаимодействием электрических диполей молекул (рисунок 110).

В зависимости от того, обладают ли взаимодействующие молекулы электрическим дипольным моментом изначально, или последний возникает вследствие поляризации оболочек, существуют различные типы ван-дер-ваальсовых сил:

1) диполь-дипольное взаимодействие полярных молекул;
2) индукционное взаимодействие диполя полярной молекулы с индуцированным диполем другой молекулы;
3) дисперсионное взаимодействие индуцированных диполей двух молекул.

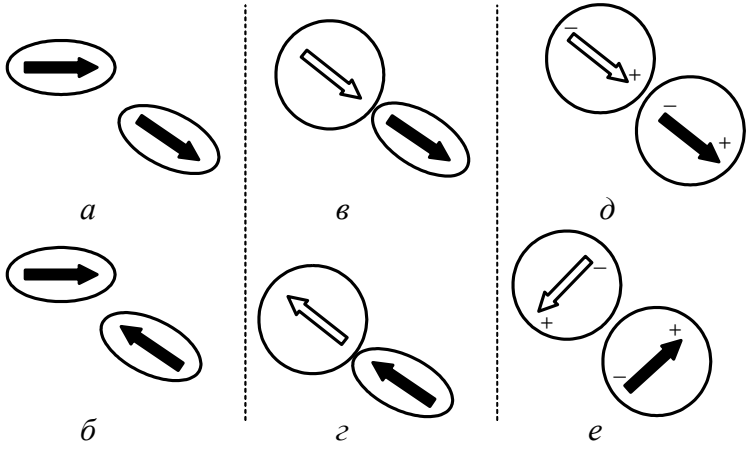


Рисунок 110 – Схема разных типов ван-дер-ваальсовых взаимодействий: *а,б* – диполь-дипольное взаимодействие; *в,г* – индукционное взаимодействие; *д,е* – дисперсионное взаимодействие

Диполь-дипольное взаимодействие дипольного момента полярной молекулы с электрическим полем, создаваемым другой полярной молекулой, может иметь характер притяжения (рисунок 110(а)) или отталкивания (рисунок 110(б)) в зависимости от взаимной ориентации диполей. Таким образом, диполь-дипольное взаимодействие приводит к *ориентационной упорядоченности* молекул. С другой стороны, *тепловое движение молекул разупорядочивает* ориентацию молекул.

Усредняя энергию взаимодействия двух диполей по всем возможным взаимным ориентациям с учетом теплового движения, можно получить выражение для средней энергии взаимодействия двух молекул с постоянными дипольными моментами μ_1 и μ_2, находящихся на расстоянии R друг от друга

$$U_{dd}(R) = -\frac{2}{3k_BT}\frac{\mu_1^2\mu_2^2}{(4\pi\varepsilon_0)^2}\frac{1}{R^6}.$$

Индукционное взаимодействие возникает тогда, когда молекула, обладающая постоянным дипольным моментом (рисунок 13(в,г), тёмная стрелка), наводит в другой молекуле, неполярной или полярной, так называемый *индуцированный дипольный момент* (рисунок 110(в,г), светлая стрелка). Взаимодействие постоянного диполя одной молекулы и наведенного им диполя второй понижает потенциальную энергию системы на величину, называемую энергией индукционного взаимодействия

$$U_{ind}(R) = -\frac{\alpha\mu^2}{8\pi^2\varepsilon_0}\frac{1}{R^6},$$

где α – поляризуемость молекулы, в которой индуцируется диполь.

Индукционное взаимодействие *не зависит от температуры*, так как ориентация наведенного диполя не может быть произвольной, она однозначно определяется направлением постоянного диполя. Индукционное взаимодействие существенно только для молекул со значительными поляризуемостями.

Дисперсионное взаимодействие индуцированных диполей характерно для атомов и молекул, у которых нет не только дипольного, но и квадрупольного, октупольного и других электрических моментов. *Осцилляция электронного облака* молекулы позволяет рассматривать её как частицу, имеющую *мгновенный дипольный момент*, который постоянно меняет свою величину и направление.

Предположим, что в данный момент времени (рисунок 110(д)) электронная конфигурация молекулы соответствует мгновенному диполю, μ_1 представленному тёмной стрелкой. Этот диполь поляризует другую молекулу и индуцирует в ней мгновенный диполь μ_2, изображённый светлой стрелкой. Взаимодействие диполей обеспечивает притяжение молекул.

Хотя направление диполя в первой молекуле будет продолжать изменяться, индуцированный диполь во второй молекуле будет *подстраиваться* под эти изменения (рисунок 110(е)), и *вследствие такой корреляции* эффект притяжения не усреднится до нуля.

Энергия дисперсионного взаимодействия пропорциональна поляризуемостям α_1 и α_2 обеих молекул и, так же, как энергии диполь-дипольного и индукционного взаимодействий, обратно пропорциональна *шестой степени* расстояния между молекулами

$$U_{disp}(R) = -\frac{1}{16\pi^2}\frac{3I_1I_2}{2(I_1+I_2)}\frac{\alpha_1\alpha_2}{R^6},$$

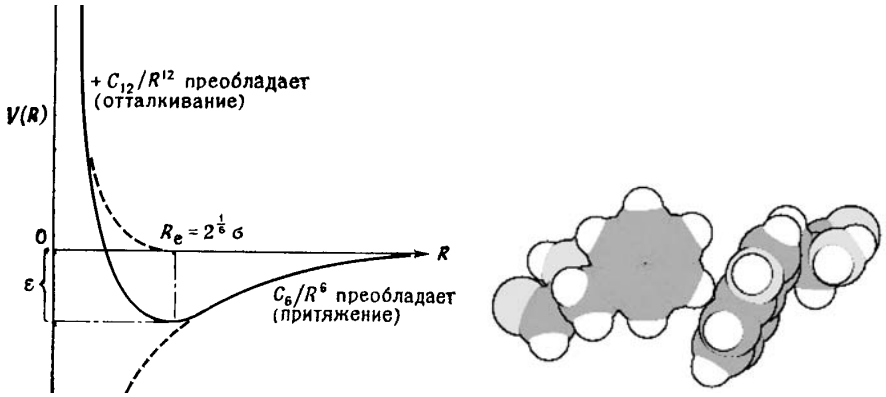
где I_1, I_2 – потенциалы ионизации двух молекул.

Потенциал Ленарда-Джонса. Суммарное действие ван-дер-ваальсовых сил притяжения и паулевских сил отталкивания хорошо описывается *потенциалом Ленарда-Джонса* (который часто называют потенциалом "(12,6)" – "двенадцать-шесть") (рисунок 111(а)).

Зависимость потенциальной энергии $V(R)$ от расстояния R в потенциале Ленарда-Джонса имеет вид

$$V(R) = \frac{C_{12}}{R^{12}} - \frac{C_6}{R^6},$$

где C_{12} и C_6 – константы. При малых R паулевское *отталкивание* (член $+\frac{C_{12}}{R^{12}}$) преобладает над *притяжением* (член $-\frac{C_6}{R^6}$).



а *б*

Рисунок 111 – Ван-дер-ваальсовое взаимодействие: *а* – потенциал Ленарда-Джонса; *б* – ван-дер-ваальсовое представление молекулярного комплекса

Часто (12,6)-потенциал записывают в форме

$$V(R) = 4\varepsilon\left\{\left(\frac{\sigma}{R}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{R}\right)^{6}\right\}.$$

В этой форме *параметр* ε является *глубиной минимума* на кривой, который соответствует равновесному расстоянию между молекулами $R_e = \sqrt[6]{2}\cdot\sigma$ (рисунок 111(а)).

Вместе ван-дер-ваальсовые силы притяжения и паулевские силы отталкивания удерживают атомы на некотором расстоянии друг от друга. На рисунке 111(б) показан комплекс из двух близкорасположенных аминокислот, удерживаемых вместе ван-дер-ваальсовыми силами притяжения, но предохраняемым от перекрытия молекул паулевскими силами отталкивания. Обычно эти пары сил визуализируют используя

ван-дер-ваальсовое представление молекул (так называемую модель "*spacefilling*"). В ван-дер-ваальсовых моделях каждый атом изображается в виде сферы соответствующего радиуса так, чтобы изобразить пространственное расположение атомов, при котором достигается *оптимальный баланс* между ван-дер-ваальсовым притяжением и паулевским отталкиванием.

Вместе ван-дер-ваальсовые и паулевские силы определяют область пространства, занимаемого молекулой.

Ван-дер-ваальсовые и паулевские взаимодействия существенно увеличивают стабильность биомолекул. Энергия каждого из взаимодействий мала, но суммарно эти малые энергии складываются в значительную величину для всей биомолекулы. Ван-дер-ваальсовые силы явно проявляются в виде трения и адгезии (слипания) при соприкосновении двух поверхностей. Например, насекомые и ящерицы гекконы используют дисперсионные силы между поверхностями их лапок и вертикальными поверхностями стен, чтобы перемещаться по ним.

Водородные связи. Водородные связи играют *главную роль* в обеспечении стабильности биомолекул и в обеспечении взаимодействия биомолекул между собой. Атом водорода, входящий в состав одной молекулы M_1A-H, образует вторую, обычно более слабую связь с атомом B другой молекулы BM_2, в результате чего обе молекулы объединяются в комплекс $M_1A-H\cdots BM_2$ (рисунок 112) через так называемый *водородный мостик* $-A-H\cdots B-$, в записи которого водородная связь изображается пунктиром. Обычно $R_{HB} > r_{A-H}$.

а *б*

Рисунок 112 – Схема образования водородной связи: *а* – водородный мостик $-A-H\cdots B-$; *б* – пример образования водородной связи между аминокислотами

Наибольшей стабильностью водородная связь обладает при *линейном* расположении атомов $-A-H\cdots B-$.

Атомы A (F, O, N, Cl) и B в водородном мостике обладают высокой электроотрицательностью. Атом B обычно имеет *неподелённую электронную пару*. В процессе образования водородной связи электронный заряд с атома H "перетекает" на электроотрицательный атом A, тем самым высвобождая s-орбиталь водорода ("оголяя" протон) который эффективно притягивает электронное облако неподелённой электронной пары атома B. Таким образом, механизм образования водородной связи двух электроотрицательных атомов через протон весьма *близок* к донорно-акцепторному.

Современные квантово-механические расчёты, выполненные с учетом всех атомов комплекса, показали, что при образовании водородной связи изменяется распределение электронной плотности не только у атомов, непосредственно образующих H-мостик, но и *на всех остальных атомах*, причем полярность молекул возрастает, что усиливает их взаимодействие. Молекулы таких жидкостей, как HF, вода и спирты, могут при образовании водородных связей выступать как *акцепторы и доноры* электронного заряда *одновременно*. В результате этого происходит *ассоциация молекул* – образование димеров, тримеров, тетрамеров и т. д., пока тепловое движение не разрушит образовавшиеся цепочки молекул.

Наряду с *межмолекулярной* H-связью осуществляется и *внутримолекулярная* водородная связь. Образование её возможно при одновременном наличии в молекуле донорной группы $A-H$ и акцепторной группы, содержащей атом B. Водородные связи функционально напоминают застежку-"липучку"; они как многоразовый крепёж могут соединяться и разъединятся в зависимости от необходимости.

Водородные связи слабее ковалентных и не так жёстко ориентированы, но их энергия *несколько больше*, чем характерная термическая энергия при физиологических температурах, поэтому они являются стабильными для биологических объектов. Поскольку они слабее ковалентных связей, их легче разорвать.

Поверхностное натяжение воды, приводящее к формированию дождевых капель, является физическим проявлением сильных водородных связей между молекулами воды, в то же время в том, что вода является жидкостью при комнатных температурах, проявляется та лёгкость, с которой образуются и рвутся водородные связи. Система водородных связей определяет уникальные свойства *воды* – самого распространённого соединения в живых организмах (рисунок 113).

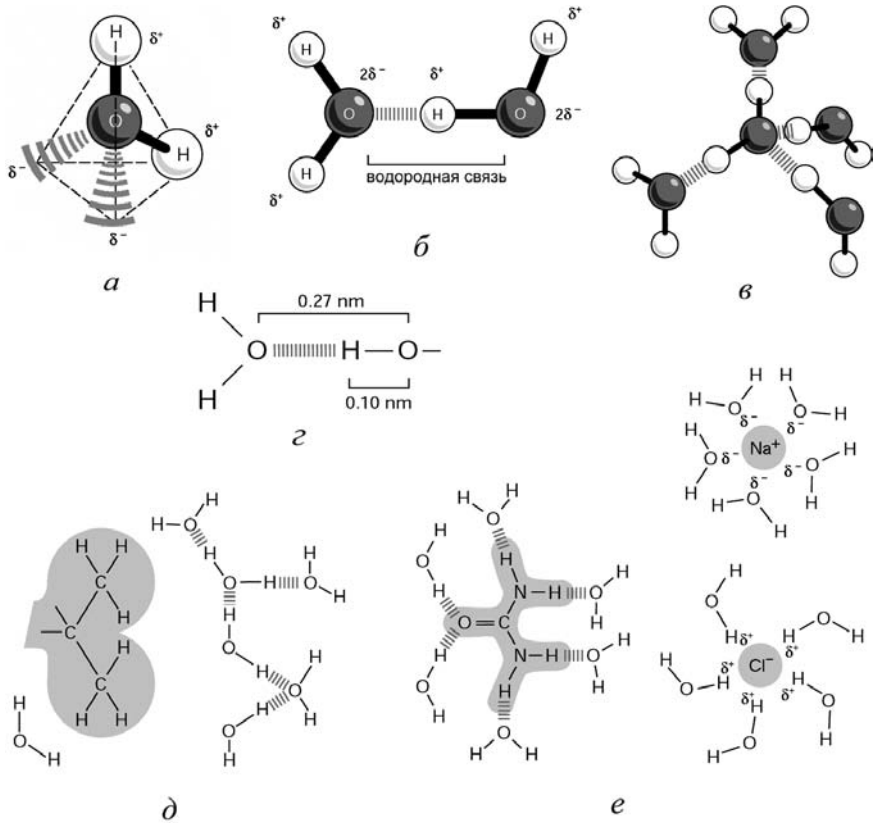


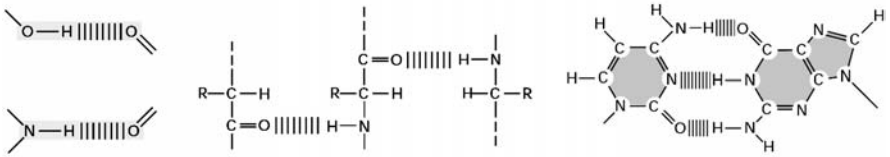
Рисунок 113 – Молекулярные свойства воды: *а* – пространственное расположение химических связей; *б* – схема водородной связи; *в* – структура связей в жидкой воде; *г* – длина связей; *д* – нерастворимость в воде гидрофобных (в частности, углеводородов) молекул; *е* – гидратация ионов и гидрофильных молекул

Вода заполняет клетки и межклеточные пространства и представляет собой ту среду, в которой осуществляются диффузия веществ, химические реакции и взаимодействия макромолекул (белков и нуклеиновых кислот) друг с другом. Кроме того, вода сама непосредственно участвует во многих химических реакциях клетки.

Два свойства воды: способность образовывать *водородные связи* и *обратимая ионизация* – оказываются весьма существенными для протекания внутриклеточных процессов.

Атомы кислорода и водорода обладают *разным сродством* к *электрону* (электроотрицательностью), и, хотя молекула воды в целом электрически нейтральна, на кислороде локализуется частичный отрицательный ($2\delta^-$), а на атомах водорода – частично положительный (δ^+) заряды. Два электроотрицательных атома связываются через атом водорода, образуя водородную связь.

Белки и нуклеиновые кислоты содержат большое число *внутримолекулярных* водородных связей, которые играют важную роль в организации структуры и функционировании этих макромолекул (рисунок 114).



а *б* *в*

Рисунок 114 – Внутримолекулярные водородные связи в белках и нуклеиновых кислотах: *а* – сила связи наибольшая при линейном расположении атомов; *б* – водородные связи между полипептидными цепями белков; *в* – азотистые основания цитозин и гуанин в ДНК спариваются, образуя водородные мостики

Водородные связи намного слабее ковалентных. Энергия водородных связей в жидкой воде (т. е. энергия, необходимая для разрушения одной связи) составляет примерно 18,8 кДж/моль, тогда как энергия ковалентных связей Н–О в молекулах воды примерно в 25 раз больше.

Молекулы в жидкой воде находятся в непрерывном тепловом движении, поэтому образующиеся водородные связи постоянно и быстро разрываются и вновь восстанавливаются. Среднее время жизни водородной связи при комнатной температуре не превышает $1{,}5\times10^{-9}$ с. Каждая молекула воды может образовывать водородные связи *с четырьмя* соседними молекулами, однако при комнатной температуре каждая молекула воды образует водородные связи в среднем с 3,4 других молекул.

Любые молекулы, между которыми возможны водородные связи, могут образовывать такие же связи с молекулами воды. Из-за такой конкуренции с молекулами воды водородные связи, образуемые между двумя молекулами в водном растворе, относительно слабы (рисунок 115).

Аномально высокие (по сравнению с большинством других жидкостей) *удельная теплоемкость* и *теплота испарения* воды является следствием высокого межмолекулярного сцепления в воде, обусловленного образованием водородных связей. Эти особенности воды важны для поддержания постоянства внутренней температуры живыми организмами. При изменении температуры внешней среды в клетке происходит поглощение или выделение тепла благодаря разрыву или новообразованию водородных связей между молекулами воды.

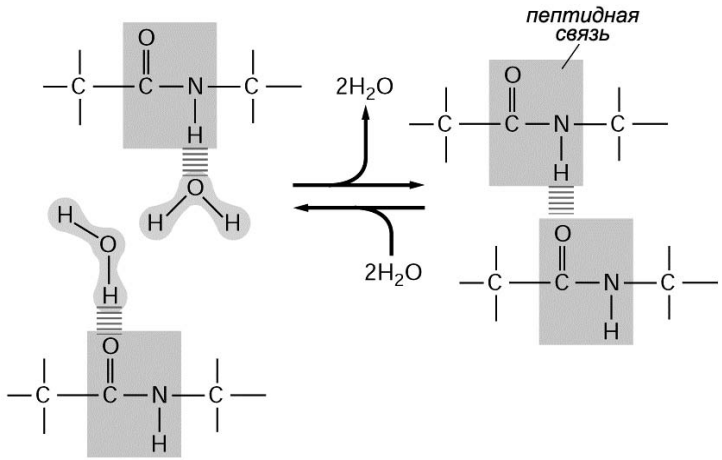
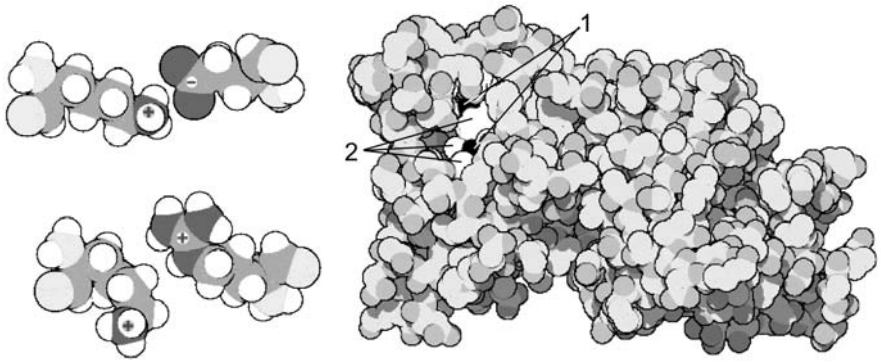


Рисунок 115 – Эволюция водородных связей в водном растворе

Таким образом, колебания температуры внутри клетки, несмотря на её резкие изменения во внешней среде, ослабляются – *вода выступает в роли термостата*. Благодаря высокой теплоте испарения воды организмы могут эффективно защищаться от перегрева, поскольку на испарение 1 г воды с поверхности листа или в виде пота с поверхности кожи расходуется 2,26 кДж тепловой энергии.

Полярный характер молекулы воды делает её значительно лучшим *растворителем*, чем большинство других общеизвестных жидкостей. В воде растворяются очень многие вещества, причем растворимость некоторых веществ определяется способностью воды образовывать водородные связи с *гидроксильными и карбоксильными* группами других молекул.

Электростатические силы обеспечивают взаимодействие между полностью или частично заряженными функциональными группами (рисунок 116).



а *б*

Рисунок 116 – Электростатическое взаимодействие в биомолекулах: *а* – вверху – лизин и глутаминовая кислота притягиваются, внизу – лизин и аргинин отталкиваются; *б* – схема фермента супероксид-дисмутаза, обеспечивающего детоксикацию: 1 – ионы меди и цинка в активном центре фермента связывают и химически модифицируют супероксиды (перекиси), 2 – гистидины, которые удерживают ионы металлов в ферменте

Электростатическое взаимодействие между атомами, имеющими *нескомпенсированный* электрический заряд, играет важную роль в стабилизации биомолекул. Электростатические взаимодействия являются дальнодействующими. Электростатические силы используются как на *малых* расстояниях для связывания атомных групп, так и на *больших* расстояниях, для притяжения или отталкивания необходимых молекул. Они *не являются направленными* и действуют симметрично во всех направлениях от заряженного центра.

Выделим некоторые виды электростатических взаимодействий, общих для всех биообъектов.

1. *Солевые мостики*, образующиеся между органическими группами, несущими формальный заряд (в этом они подобны ионным связям в кристаллах неорганических солей). Солевые мостики характерны для поверхностей белков, где они служат *для стабилизации* структуры. Когда требуется дополнительные силы, в белки встраиваются заряженные сульфатные или фосфатные группы.
2. Белки часто включают в себя *ионы металлов* – от легкого магния до тяжёлых железа и кобальта – для стабилизации структуры или для выполнения специфических химических функций (рисунок 116(б)).

Часто ионы должны быть помещены в специфические химические "контейнеры", которые обеспечивают необходимую ориентацию иона и использование нужного электронного состояния иона.

Интенсивность электростатических взаимодействий снижается за счет диэлектрического эффекта, который зависит от того, какие атомы расположены между заряженными атомами и вокруг них. Вода является сильным диэлектриком, сильно уменьшая электростатическое взаимодействие ионов. Молекулы воды являются диполями – атом кислорода несёт избыточный отрицательный заряд, а два атома водорода – избыточный положительный. Когда ионы помещаются в водный раствор, окружающие молекулы воды разворачиваются. Это снижает воздействие данного иона

на другие ионы, снижая силу электростатических взаимодействий в 81 раз. Атомы в белках более фиксированы и не могут совершать такую динамическую реорганизацию. Поэтому белки являются слабыми диэлектриками.

4.5. Роль гидрофобного эффекта в формировании структуры биомолекул

Описанные выше силы легко понять, представив себе молекулу как *комбинацию* атомов – следует просто просуммировать такие парные межатомные вклады ковалентных связей, водородных связей, ван-дер-ваальсовых и электростатических сил, чтобы предсказать поведение биомолекулы (см. [5], п. 5.3).

При помещении в воду, однако, картина оказывается гораздо более сложной. Возникающий в воде *гидрофобный эффект* определяет свойства биомолекул и взаимодействие между ними. Молекулы воды интенсивно взаимодействуют между собой, образуя водородные связи. Жидкая вода образуется перемещающимися молекулами воды, которые постоянно формируют и переформировывают водородные связи с соседними молекулами. Стабильность водного раствора определяется *комбинацией энтальпий* ван-дер-ваальсовых и водородных связей и *энтропии*, которая стремится увеличить число беспорядочно ориентированных молекул.

Водородные связи между молекулами воды *энтальпически выгодны*, поскольку при этом образуется много стабилизирующих взаимодействий. Они также *энтропически выгодны*, поскольку каждая молекула воды имеет неограниченное количество возможностей для взаимодействия со всеми остальными молекулами воды, причем все эти взаимодействия имеют одинаковую энергию. Любое воздействие, которое будет нарушать этот процесс должно обеспечить *эквивалентное* количество энтальпии во взаимодействиях с таким же количеством энтропического разнообразия, в противном случае оно будет энергетически невыгодным.

Однако биомакромолекулы собраны, главным образом, из *углерода*, который очень слабо взаимодействует с окружающей водой. Когда

углеводородные молекулы помещаются в воду, молекулы воды, окружающие углеводороды, теряют свою способность свободно формировать и перестраивать водородные связи с соседними молекулами воды.

С одной стороны, они, взаимодействуя с углеводородами и образуя с ними слабые ван-дер-ваальсовые связи, *проигрывают энергетически*, поскольку они теряют возможность образовывать водородные связи с теми молекулами воды, на чьём месте расположилась молекула углеводорода.

С другой стороны, молекулы воды, примыкающие к углеводороду, стремятся максимально использовать оставшиеся возможные взаимодействия с соседними молекулами воды, а это ограничивает их способность к свободному перемещению по водному раствору. Они формируют *клатратную* конструкцию вокруг каждого углеводородного включения, что *снижает энтропию*, а значит, энергетически невыгодно (рисунок 117).

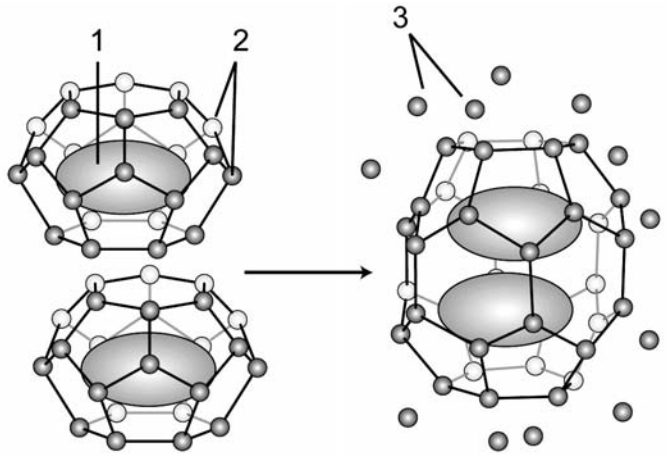


Рисунок 117 – Гидрофобное взаимодействие: *а* – неагрегированное, энергетически невыгодное состояние, водное окружение более упорядочено, энтропия ниже; *б* – агрегированное, энергетически выгодное состояние, водное окружение менее упорядочено, энтропия выше; 1 – неполярное вещество; 2 – упорядоченные молекулы воды; 3 – молекулы воды, освобожденные в объём раствора

Если теперь *собрать* эти углеводородные включения и сгруппировать их в одном месте, то ситуация улучшится. Общая площадь поверхности углеводородной фазы, которая доступна молекулам воды будет уменьшаться по мере ассоциирования углеводородных молекул. При этом множество молекул воды будут "освобождены" из клатратных корзинок в раствор. Углеводороды в свою очередь будут увеличивать число дисперсионных связей между собой. Всё это снижает общую энергию системы и проявляется как *гидрофобный эффект*, собирающий углеводороды в единую фазу с возможно большим числом освобожденных в раствор молекул воды. На молекулярном уровне гидрофобный эффект является *движущей силой* большинства процессов самосборки в биомолекулярной механике.

Иногда более *удобно представлять* себе гидрофобный эффект как определённые гидрофобные взаимодействия, которые стабилизируют ассоциат углеводородных молекул. *Нужно только всегда помнить*, что такие стабилизирующие взаимодействия являются следствием освобождения в раствор молекул воды, а не какого-либо внутреннего взаимодействия между углеводородными молекулами.

Гидрофобный эффект широко *используется* в бионаномеханике. Гидрофобные компоненты используются практически во всех типах бионаномашин.

Стабильные *белковые глобулы* образуются вследствие *фолдинга*, при котором гидрофобные аминокислоты перемещаются внутрь глобулы. *ДНК и РНК* цепи образуют компактные *двойные спирали* так, чтобы спрятать гидрофобные плоскости их азотных оснований. *Липиды* самособираются в *бислойные мембраны* так, чтобы их углеводородные хвосты были спрятаны внутрь мембраны. Гидрофобный эффект *управляет* ассемблированием этих структур и бионаномашин и стабилизирует их финальную структуру.

На рисунке 118 на примере *фолдинга лизоцима* показаны особенности гидрофобного эффекта. Богатые углеродом гидрофобные участки развернутого полипептида лизоцима изображены белым цветом. Молекулы воды, показанные кружочками, находятся в энергетически невыгодных положениях рядом с этими гидрофобными участками.

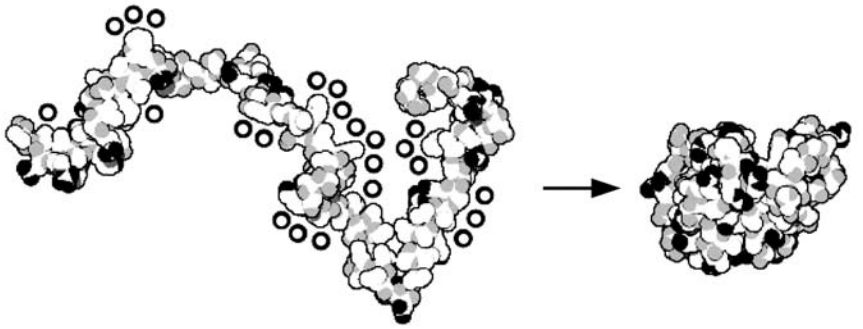


Рисунок 118 – Высвобождение молекул воды (**o**) при фолдинге белка лизоцим

В результате фолдинга эти молекулы воды освобождаются в раствор, гидрофобные участки спрятаны внутрь глобулы, а на поверхности находятся атомы азота и кислорода (показанные черным цветом), несущие избыточный заряд и, поэтому, взаимодействующие с водой.

4.6. КОМБИНАТОРНЫЙ ХАРАКТЕР МОЛЕКУЛЯРНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

Колоссальное разнообразие живых организмов, наблюдающееся в природе, определяется не атомным, а молекулярным разнообразием, которое носит в основном *комбинаторный характер*. Действительно, тысячи разнообразных больших и сложных молекул, входящих в состав живых организмов, построены лишь из 30 *основных простых органических молекул*, играющих роль строительных блоков: *двадцать* L-аминокислот, *пять* азотистых оснований (урацил, тимин, цитозин, аденин и гуанин), *два* сахара (D-глюкоза и D-рибоза), *один* азотсодержащий спирт (холин), *одна* 16-атомная насыщенная жирная кислота (пальмитиновая) и *один* 3-атомный спирт (глицерол) (см. [6], п. 5.7).

Четыре основных типа молекулярных структур были отобраны миллиардами лет эволюции для формирования всех биоструктур всех биообъектов, существующих сегодня.

Современные клетки практически для всех задач используют (1) белки, (2) нуклеиновые кислоты, (3) полисахариды, (4) липиды (рисунок 119).

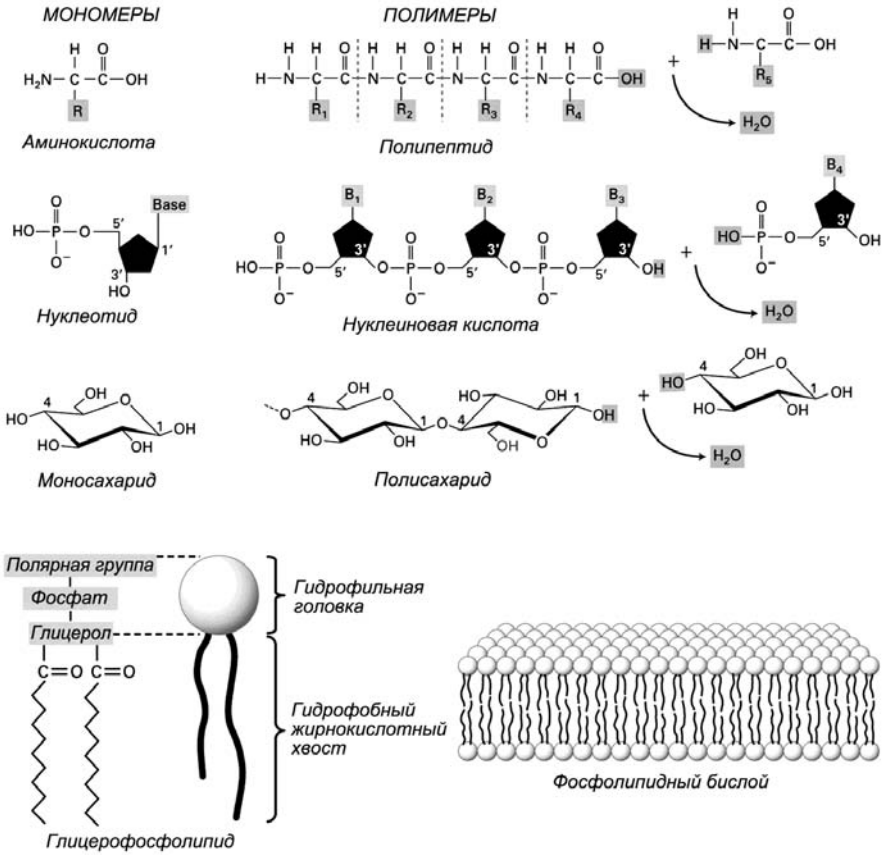


Рисунок 119 – Образование биополимеров и биомембран

Некоторые другие небольшие молекулы также специально синтезируются для определённых нужд, но постоянная, ежедневная жизнедеятельность клетки осуществляется именно этими четырьмя типами молекул. При этом в случае *нерегулярных полимеров* (белки и нуклеиновые кислоты) их разнообразие определяется разнообразием

чередования нескольких типов мономеров, а в случае *регулярных полимеров* (полисахариды) – разнообразием химических связей между однотипными мономерами.

Огромное разнообразие биологических молекул предопределяет ещё более значительное разнообразие *взаимодействий между ними*. Такое разнообразие имеет тенденцию к неограниченному росту из-за образования всё новых объектов в результате взаимодействия уже существующих, и, следовательно, *комбинаторный принцип* строения основных биологических веществ представляется совершенно необходимым для эволюции живых организмов, поскольку, вероятно, только таким образом может эффективно возникать новый материал для естественного отбора.

Контрольные вопросы и задания

1. Каким образом водная среда определяет специфические особенности природных бионаномашин?
2. В чём состоит отличие иерархических стратегий от метода поатомной сборки молекулярных структур?
3. Каковы достоинства и недостатки метода самосборки по сравнению с тремя другими иерархическими стратегиями сборки биоструктур?
4. Перечислите три основные модели, с помощью которых упрощенно эмпирически описывают органические молекулы.
5. Сравните энергии различных взаимодействий, которые определяют структуру и функции биомакромолекул.
6. В чём взаимное отличие трёх типов дисперсионных взаимодействий?
7. Почему наличие водородных связей является существенным фактором структурной стабильности биомолекул?
8. Какие факторы формируют энтальпийный и энтропийный вклады в снижение свободной энергии жидкой воды?
9. Почему внедрение углеводородного включения в водную среду является термодинамически невыгодным?
10. Какое явление называют гидрофобным эффектом?
11. Как гидрофобный эффект используется в бионаномеханике?

Глава 5
Фолдинг белков

5.1. Принцип формирования стабильных структур в результате белкового фолдинга

Природа использует эффективный "*информационный*" метод для конструирования белков. Природные белки "сконструированы" эволюцией так, чтобы они образовывали стабильные глобулярные структуры. Аминокислотная последовательность каждого белка "разработана" таким образом, чтобы *обеспечить определённый набор аминокислот*, прежде всего *гидрофобных*, которые формируют достаточно стабильное ядро белковой глобулы, используя гидрофобный эффект. Кроме того, *в состав белка должно входить также много заряженных аминокислот* и аминокислот, способных образовывать друг с другом водородные связи. Эти аминокислоты связывают белковую цепь в стабильный клубок. Однако более примечательным свойством белков является то, что они "сконструированы" природой так, *чтобы происходил спонтанный фолдинг* из произвольной исходной конформации в единственную функциональную глобулярную структуру.

"Инструкции" и к тому, как стабилизировать структуру, и к тому, как реализовать процесс ассемблирования, "записаны" в последовательности аминокислот – первичной структуре белковой молекулы. В этом-то и состоит *удивительность белкового дизайна*. Минимальное количество информации используется для формирования чрезвычайно сложной белковой механики.

Главная задача, которую предстоит решить бионанотехнологии, – это *научиться предсказывать финальную структуру белковой глобулы на основании только лишь знания его аминокислотной последовательности*.

Если эта проблема будет решена, то это немедленно скажется на успехах бионанотехнологии, поскольку станет возможным "проектировать" новые белки "на заказ", с наперёд заданными конформациями и

функциями. В настоящее время активно исследуется механизм белкового фолдинга и уже получены впечатляющие результаты на этом пути.

Не все белковые последовательности сворачиваются в стабильные структуры. По современным оценкам только небольшая часть возможных комбинаций аминокислот способны формировать стабильные структуры. Исследователи считают, что есть всего лишь порядка 1000 способов свернуть белковую нить в стабильную структуру. Известно очень много примеров, когда *подобные*, гомологичные аминокислотные последовательности сворачиваются в *подобные* трёхмерные структуры, отличающиеся лишь в деталях.

Так, например, аминокислотная последовательность в *гемоглобинах*, синтезируемых различными животными, варьируется очень сильно. Из 140-150 аминокислот аминокислотной цепи гемоглобина только *две аминокислоты* повторяются во всех вариативных формах: *гистидин*, который напрямую скоординирован с активным ионом железа в геме, и *фенилаланин*, который необходим для правильной ориентации гема-кофактора. Все другие аминокислоты могут изменяться, что позволяет модифицировать функции гемоглобинов (например, сродство к кислороду может отличаться в 100 000 раз), или просто вследствие дрейфа генов. Несмотря на такой огромный диапазон вариабельности гемоглобинов, *все они принимают подобную трёхмерную функциональную структуру в ходе фолдинга*.

Предсказание структуры достаточно надежно для гомологичных аминокислотных последовательностей. Для последовательностей с 30-40% *идентичных аминокислот* существует высокая вероятность того, что их трёхмерная структура *будет подобна* до такой степени, что возможно будет применить современные методики белкового моделирования. Это благоприятное для бионанотехнологии обстоятельство позволяет предсказывать множество новых белковых структур.

Однако белковые инженеры сталкиваются с *другого рода проблемой*. Вышеупомянутая статистика справедлива *только для природных биомолекул*, чья структура была оптимизирована эволюцией для эффективного фолдинга. *Точечные изменения структуры могут быть фатальны* для функциональности и фолдинга белка, хотя этот

белок все еще будет демонстрировать высокую степень гомологичности к белкам демонстрирующим успешный фолдинг.

Поэтому, при модификации существующего белка для достижения новой функциональности, изменения следует вносить небольшими порциями, каждый раз проверяя, сохраняет ли измененный белок способность к функциональному фолдингу.

Только малая часть возможных аминокислотных последовательностей спонтанно формирует устойчивые глобулярные структуры, при этом фолдинг многих подобных аминокислотных последовательностей образует одну и ту же финальную конформацию.

5.2. Принцип иерархичности при белковом фолдинге

Природные белки имеют *несколько уровней структурной организации*, которые оказываются важными как для правильного фолдинга, так и для обеспечения функциональности и стабильности белков (рисунок 120).

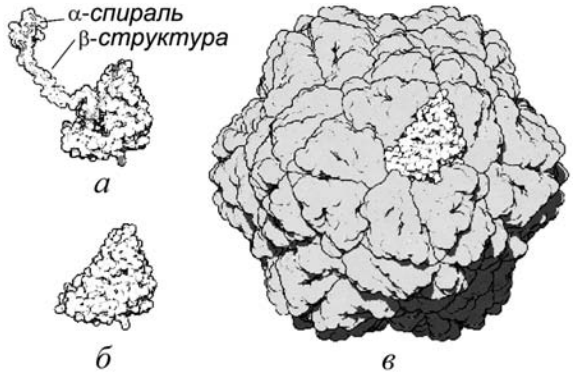


Рисунок 120 – Иерархия белковых структур: *а* – вторичные структуры, *б* – третичная структура глобулярного белка, *в* – четвертичная структура белкового олигомерного вирусного капсида, ассемблированного из 60 идентичных субъединиц

Отдельные участки белковой цепи формируют несколько достаточно устойчивых вторичных образований, таких, как α-спирали и

β-структуры, и множество устойчивых образований в виде петель и узлов. α-Спирали и β-структуры обычно *собраны в группы*, которые затем ассоциируются в бóльшие структурные домены. Отдельные α-спирали редко напрямую взаимодействуют с отдельными β-структурами по причине различного упорядочения водородных связей в этих структурах. β-*Структуры* ассоциируются *друг с другом* располагаясь параллельно, с тем, чтобы оптимизировать водородные связи между ними, образуя при этом двухнитевые ленты. Аналогично формируются и многонитевые β-листы и β-цилиндры (рисунок 121).

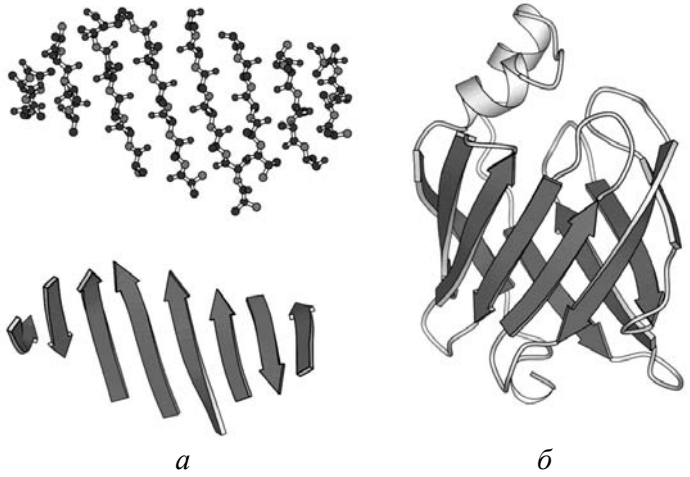
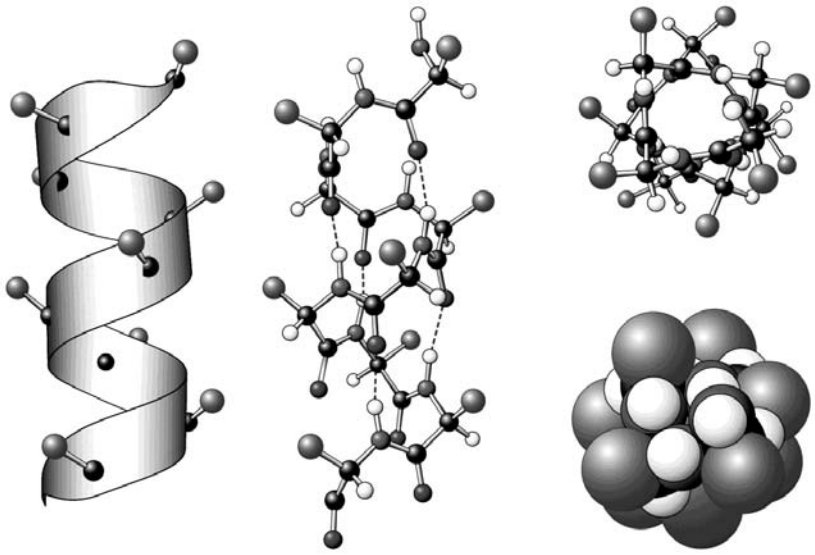


Рисунок 121 – β-Структуры: *а* – разные способы наглядного представления (визуализации), *б* – третичная структура собранная из β-структур

Эти структуры максимизируют число водородных связей между пептидными группами белковой цепи, *увеличивая стабильность* белка, а также *гарантируя*, что эти пептиды *не будут погружены внутрь глобулы в одиночку*, а только в составе таких устойчивых образований с вполне определёнными партнерами по водородным связям. Такие стабильные локальные вторичные структуры затем сворачиваются в устойчивые третичные глобулярные структуры. В α-*спиралях* все возможные водородные

связи между пептидными группами образуются уже в пределах самой спирали вдоль оси спирали При этом радикалы аминокислот располагаются снаружи α-спирали, образованной в пределах пептидного остова (рисунок 122).



а *б* *в*

Рисунок 122 – Белковая α-спираль: *а* – изображение в виде "резиновой ленты", *б* – схема связей, вид сбоку, *в* – проекция вдоль оси спирали

Спиральное упорядочение аминокислотных остатков формирует *впадины и гребни* вдоль цилиндра α-спирали. α-Спирали стремятся расположится рядом друг с другом так, чтобы гребни одной из них попадали во впадины другой. Кроме того α-спирали часто располагаются *напротив* плоскостей β-листов.

Вследствие таких особенностей образования и взаимодействия вторичных структур, и вследствие термодинамического стремления образовать глобулу из линейной полипептидной цепочки, многие белки, как оказалось, образуют *подобные комбинации* вторичных структур при фолдинге. Несколько таких структур представлены на рисунке 123.

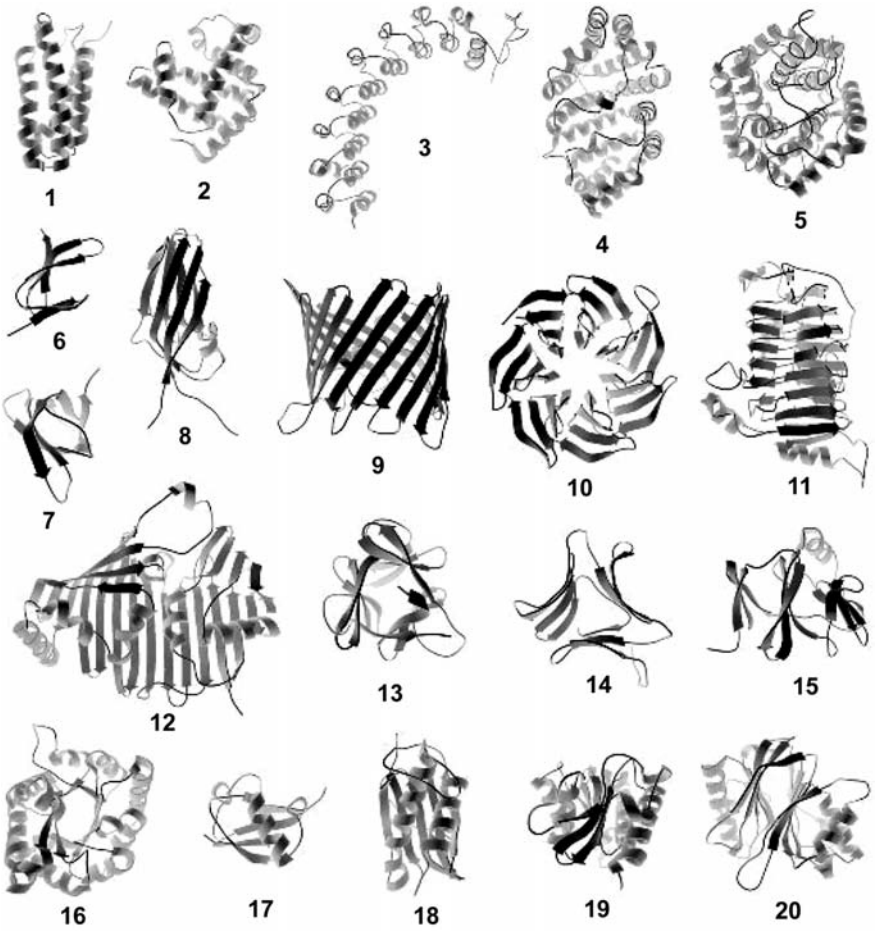


Рисунок 123 – Комбинации α-спиралей, β-структур и соединяющих белковых нитей определяют топологию белков: (1–5) – характерные комбинации α-спиралей; (6–15) – характерные комбинации β-структур; (16–20) – α/β комбинированные комбинации вторичных структур

На рисунке 123 изображены: (1) – α-пучок (α-*bundle*); (2) – неупорядоченные α-спирали (α-*nonbundle*); (3) – α-грива (α-*horseshoe*); (4) – α-соленоид (α-*solenoid*); (5) – α/α-бочонок (α/α-*barrel*); (6) – β-лента (β-*ribbon*); (7) – β-рулон (β-*roll*); (8) – β-сэндвич (β-*sandwich*); (9) – β-бочонок

(β-*barrel*); (10) – β-пропеллер (β-*propeller*); (11) – β-соленоид (β-*solenoid*); (12) – β-ракушка (β-*clam*); (13) – β-трилистник (β-*trefoil*); (14) – β-призма (β-*prism*); (15) – β-трёхслойник (β *3-layer*); (16) – α/β-бочонок (α/β-*barrel*); (17) – α/β-рулон (α/β-*roll*); (18) – α/β-двухслойник (α/β *2-layer*); (19) – α/β/α-трёхслойник (α/β/α *3-layer*); (20) – α/β/β/α-четырёхслойник (α/β/β/α *4-layer*).

Примечательно, что топология таких комбинаций достаточно проста. Некоторые из этих структур получены в результате фолдинга белковой цепи *наполовину* и, затем, еще один такой "полу-фолдинг", и так несколько раз. Другие организованы наподобие спиральных *пружин*. Крайне *редко* образуются сложные топологические структуры такие, как, например, *узлы*, при формировании которых цепь проходит в петлю.

Большинство возможных белковых структур фолдинга уже *исследовано и систематизировано*. Обнаружение радикально новых структур происходит крайне редко и можно утверждать, что *фолдинг большинства белковых цепей происходит в уже систематизированные финальные глобулярные структуры*.

Наконец, многие глобулярные структуры могут ассоциироваться в *четвертичные комплексы*. Иногда *различные* белки формируют такой комплекс, иногда *идентичные* белки, имеющие необходимую симметрию, ассемблируются в большие структуры.

Таким образом, белки имеют иерархическую структуру, в которой локальные структуры, такие, как α-спирали и β-структуры ассоциируются так, чтобы образовать стабильный глобулярный белок, который затем может ассемблироваться с другими белками, образуя четвертичные структуры.

5.3. Принципы позитивного и негативного дизайна

Принцип позитивного дизайна. Первое требование для фолдинга белков можно назвать *позитивным дизайном*. Белок должен быть сконструирован так, чтобы он был энергетически стабилен.

Белковые цепи конструируются для фолдинга в воде. Движущей силой фолдинга является гидрофобное "удаление" из воды внутрь глобулы гидрофобных аминокислот. Наиболее устойчивые белковые структуры имеют *гидрофобное ядро* – плотноупакованный набор гидрофобных аминокислот в центре белковой глобулы.

Боковые цепи в этом ядре, взаимодействуя посредством дисперсионных взаимодействий, укладываются в общую структуру подобно трёхмерным фрагментам мозаики, полностью заполняя доступное пространство так, что не остается даже минимальных пустот достаточных для внедрения молекулы воды.

Дисперсионные взаимодействия обеспечивают *большую часть энергетической стабилизации* свёрнутой глобулярной белковой структуры. (Например, использование лейцина или фенилаланина вместо аланина даст энергетический выигрыш в 2-5 ккал/моль.) Однако, эти взаимодействия *недостаточно векторны*, чтобы обеспечить уникальную конформацию сворачивания белковой цепи.

Несвёрнутая белковая цепь чрезвычайно гибка (относительно α-углеродов в пептидной цепи), поэтому, при сворачивании в компактную структуру происходит *снижение энтропии*. Такой процесс энергетически невыгоден и такое энтропийное повышение энергии составляет 1-2 ккал/моль из расчета на одну аминокислоту в цепи.

Для образования устойчивой глобулярной структуры такое невыгодное *снижение энтропии* должно *компенсироваться* возникновением *энергетически выгодных взаимодействий* в образуемой глобулярной структуре.

Когда сотни таких "выгодных" взаимодействий сложить с "невыгодным" понижением энтропии при фолдинге сотен аминокислот, *энергетический выигрыш* для большинства белков составляет 4-10 ккал/моль. Такая энергия стабилизации хоть и не является значительной, все же является *достаточной* для того, чтобы свёрнутая белковая структура была значительно более стабильна, чем несвёрнутая.

Принцип негативного дизайна. Другое важное требование к фолдингу белков часто называют *негативным дизайном*. *Цель* негативного

дизайна состоит в том, чтобы в результате фолдинга образовывалась *единственная* стабильная конформация. Белковая цепь сконструирована таким образом, что все *нежелательные* конформации являются энергетически *невыгодными* и поэтому формируется только необходимая конформация. Если же в результате ошибки фолдинга образован неверно свёрнутый белок, то локальное повышение энергии вследствие неверной конформации является "сигналом" для юбиквитирования такого белка и его последующего протеолиза в протеосомах.

Негативный дизайн является *критически важным* процессом, обеспечивающим предсказание и дестабилизацию возможно большего числа низкоэнергетичных структур, образованных вследствие альтернативного фолдинга.

В природных белках использовано множество *приемов негативного дизайна*.

(1) *Полярные и заряженные* аминокислоты существенны для негативного дизайна. Они располагаются на петлях и прочих сегментах, *удерживая их* на поверхности белка в ходе фолдинга.

(2) *Водородные связи и солевые мостики* внутри белков также используются при негативном дизайне. В правильно свёрнутом белке партнеры по таким связям будут образовывать стабилизирующие пары, а в неправильно свёрнутых – нет. Аналогично *парные заряды*, расположенные на поверхности глобулы будут стабилизировать её структуру при правильном фолдинге, и, наоборот, будут разрыхлять её вследствие электростатического отталкивания при мисфолдинге.

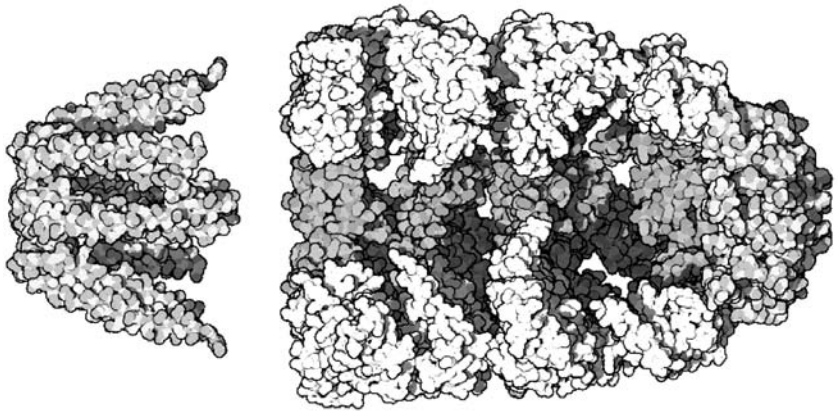
(3) Такое использование полярных и заряженных аминокислот комбинируется с *использованием структурных особенностей* формы аминокислот. Например, *глицин и пролин* часто используются чтобы прервать дальнейшее формирование α-спирали, поэтому их много в белковых петлях между вторичными структурами.

(4) Наконец, различные *гидрофобные аминокислоты* используются для формирования отдельных участков, которые геометрически комплементарны друг другу при правильном фолдинге и которые не будут подходить друг для друга при мисфолдинге.

Таким образом, конструирование спонтанно сворачивающихся глобулярных белков включает в себя позитивный дизайн, при котором программируется образование стабильной конформации пептидной цепи, и негативный дизайн, который обеспечивает невыгодность неверного фолдинга цепи в нефункциональную конформацию.

5.4. Механизмы регуляции фолдинга

Многим биомолекулам необходима *помощь в фолдинге* и дозревании (см. [6], п. 6.5). Клетка содержит набор биомолекул, которые обеспечивают условия для фолдинга и которые имеют общее название шапероны, а также большой набор биомолекул, которые "достраивают" белки в "созревшую" форму (рисунок 124).



а *б*

Рисунок 124 – Белки, которые обеспечивают фолдинг: *а* – перфолдин, *б* – бактериальный шаперонин GroEL

Этот факт следует учитывать при конструировании белков. Различные организмы имеют различные системы для обеспечения фолдинга и дозревания белков, поэтому конечный продукт белкового синтеза может быть различным в различных организмах.

Наличие в составе белковых молекул цепочек гидрофобных аминокислот, которые необходимы для фолдинга, в то же время создает *неблагоприятную* возможность для агрегации таких гидрофобных участков разных молекул в общую нефункциональную глобулярную структуру – аморфный слипшийся ком (*clump*).

Белки-*шапероны* устраняют такую потенциальную проблему, разделяя индивидуальные белковые нити, а *шаперонины* обеспечивают среду, в которой белок может сворачиваться без риска агрегации с другими белками (см. [8], п. 4.6).

Шаперонины являются полостями с гидрофобной внутренней поверхностью. Вновь синтезированный белок, "притягиваемый" гидрофобностью внутренней поверхности полости шаперонина, входит внутрь этой полости, после чего вход закрывается.

Это индуцирует изменение конформации шаперонина, сопровождающееся поворотом доменов из которых построены стены полости. Такое изменение конформации приводит к тому, что многие из гидрофобных аминокислот "втягиваются" в стены шаперонина, и увеличивается объём полости.

Белок, утратив стабилизирующие "опоры" в стенах шаперонина, теперь вынужден сворачиваться самостоятельно.

Следует подчеркнуть, что шаперонины *не являются* некими шаблонами или чертежами, по которым происходит ассемблирование белков. Напротив, они обеспечивают "правильную" среду для фолдинга или же они "помогают" белкам преодолевать наиболее общие препятствия на пути фолдинга. Поэтому, они не нуждаются в детальной информации об устройстве конкретного белка и, также, *не являются источником* (или носителем) специфической *информации* о ходе фолдинга того или иного белка.

Обычно *два процесса ограничивают скорость*, с которой белки достигают свою функциональную трёхмерную форму:

1) образование неправильных дисульфидных связей;
2) неправильная конформация пролина.

Для борьбы с этими процессами клетка имеет *два фермента*. Неправильное образование дисульфидных мостиков между цистеинами устраняется ферментом *протеин-дисульфид-изомеразой*. Выбор правильной из двух возможных молекулярных конформаций пролина осуществляется ферментом *пролил-пептид-изомераза*, который катализирует переключение между двумя конформациями пролина.

Принцип избыточного синтеза. Другой прием, который используется для обеспечения фолдинга – *синтез про-формы белка*, значительно превышающей по размерам сам белок. Примером такой стратегии является синтез и фолдинг инсулина (см. [8], п. 12.1).

Инсулин – это очень маленький белок, собранный из двух отдельных цепей A и B, соединённых дисульфидными мостиками (рисунок 125).

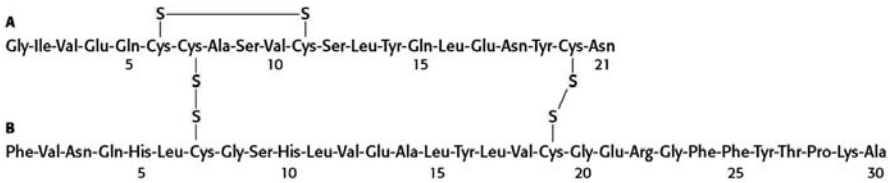


Рисунок 125 – Схема пептидных цепей инсулина

Инсулин исходно транслируется в виде полипептида *проинсулина* (рисунок 126), состоящего из 84 аминокислот. Именно в таком виде происходит фолдинг белка, затем образуются три внутримолекулярные дисульфидные связи и только после этого из проинсулина вырезается участок C (из 33 аминокислот) и остаётся 51-аминокислотная функциональная молекула гормона, состоящая из двух полипептидных цепей: цепь A из 21 аминокислоты и цепь B из 30 аминокислот.

Функциональная молекула инсулина, содержащая две полипептидные цепи, показана на рисунке 127. Белковая нить, соответствующая участку A показана белым цветом, а участку B – серым. Черным показаны атомы серы, образующие дисульфидный мостик между цепями A и B.

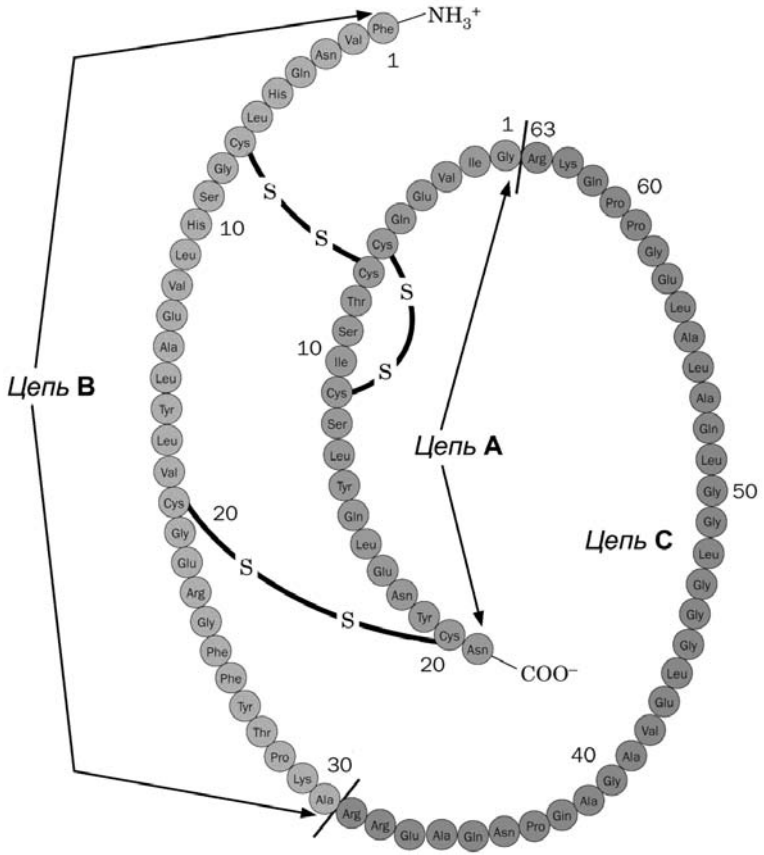


Рисунок 126 – Первичная структура проинсулина

Стабильность инсулина в значительной степени обеспечивается внутренними дисульфидными мостиками. Очень сложно (*а может быть и невозможно*) спроектировать белок, имеющий размер инсулина, который бы самопроизвольно сворачивался бы в единственную функциональную конформацию.

Природа разрешила эту проблему просто – инсулин синтезируется в составе полипептида *значительно большей длины*, фолдинг которого и формирует пространственную структуру инсулина. Затем, *после окончания фолдинга* и образования дисульфидных мостиков, "лишние"

участки белка удаляются, а то, что остается после такой "стрижки", и является функциональным инсулином.

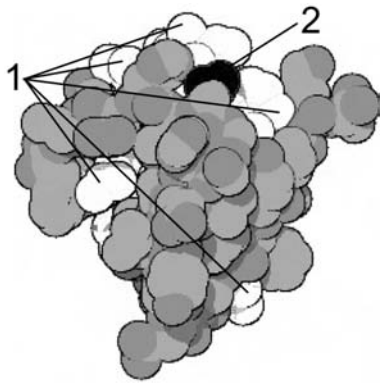


Рисунок 127 – Схема молекулы инсулина: 1 – полипептид А; 2 – дисульфидный мостик

Контрольные вопросы и задания

1. Почему не все возможные белковые последовательности сворачиваются в стабильные структуры?
2. Сколько известно уровней структурной организации белков?
3. В чём состоит функциональность вторичных структур белка при формировании третичной структуры?
4. В чём заключается принцип позитивного дизайна?
5. Конкуренция каких двух энергетических вкладов формирует энергию стабилизации белковой структуры?
6. В чём заключается принцип негативного дизайна?
7. Каким образом структурные особенности формы аминокислот могут быть использованы в негативном дизайне?
8. Какие два процесса ограничивают скорость, с которой белки достигают свою функциональную трёхмерную форму?
9. Почему малые белки синтезируются первоначально в виде проформы?

Глава 6
Самоассемблирование и самоорганизация

6.1. Принцип локального упрочнения биоструктур

Поскольку белки способны сворачиваться в глобулярные структуры (фолдинг), то они могут и разворачиваться, денатурировать (антифолдинг). *Экстремальные* значения температуры, pH, солевой состав раствора и другие внешние факторы могут *стимулировать денатурацию* и потерю активности белка (см. [8], п.5.3).

Одним из первых промышленных применений белковой инженерии была стабилизация ферментов для использования их в небиологическом окружении. Одной из задач таких исследований было создание ферментов, которые можно было бы использовать при экстремальных температурах.

Термофильные бактерии, которые живут при температурах 60-80°C, и *гипертермофилы*, которые живут при температурах 110°C и выше, синтезируют белки, которые являются стабильными и высокоактивными при этих повышенных температурах. Белки этих микроорганизмов интересны с точки зрения промышленного использования, поскольку они *более устойчивы* к воздействию *растворителей* и с их участием можно проводить реакции при повышенной температуре, что позволяет использовать *повышенные концентрации* исходных веществ и зачастую *ускоряет скорость реакции*. Кроме того, термостабильность таких белков облегчает их *очистку* и *сепарацию* – достаточно нагреть раствор и все нетермостабильные белки денатурируют, а останутся только термостабильные. Неожиданным оказался тот факт, что структура таких термоустойчивых белков *практически не отличалась* от структуры их *термолабильных* (термонеустойчивых) "родственников", синтезированных обычными организмами.

Аминокислотная последовательность термоустойчивых белков на 40-85% идентична аминокислотной последовательности термолабильных

белков, а их *трёхмерная* пространственная структура практически *идентична* структуре термолабильных белков. При этом такие пары ферментов, как правило, используют *идентичные* каталитические механизмы. Они *в высшей степени подобны* по структуре и функциям, но имеют более термоустойчивую поверхность.

По-видимому, основное отличие обусловлено именно *повышенной* "прочностью" *поверхности* белка.

Стабилизация не может быть за счёт улучшения упаковки гидрофобного ядра белка. Гидрофобное ядро и в обычных белках упаковано *практически идеально*. А вот на поверхности белковой молекулы даже небольшие улучшения прочности поверхности препятствуют тем процессам, которые приводят к началу денатурации. Такие модификации включают добавление новых электростатических взаимодействий между *парами заряженных аминокислот*, новых *дисульфидных мостиков* или *ионов металлов*, добавление жёстких *пролинов* или замена гибких *глицинов*.

Прежде всего, эти новые взаимодействия должны ограничивать "свободу" *белковых петель*, которые обычно являются гибкими и подвижными, или должны иммобилизовывать *концы белковой цепи*, которые обычно являются свободными и гибкими.

Также важными для повышения термоустойчивости ферментов являются те изменения, которые *замещают* или *защищают* те *аминокислоты*, которые могут быть разрушены при нагревании, такие, как, например, *глутамин или аспаргин*, которые могут потерять свои термочувствительные аминогруппы при повышении температуры.

Ферменты из термофильных или гипертермофильных организмов оптимизированы для функционирования при высоких температурах 75–125°C. На первый взгляд можно было ожидать, что скорость ферментативных реакций у гипертермофилов будет *намного выше*, поскольку скорость химических реакций удваивается при каждом повышении температуры на 10°C. Однако оказалось, что у природных *термофильных* ферментов *скорость реакций практически такая же*, как у обычных ферментов. Такова плата за термостабильность –

каталитическая активность теряется при увеличении термоустойчивости, поскольку увеличение жёсткости поверхности молекулы фермента снижает способность фермента "подстраиваться" под особенности топологии субстрата, и механизм индуцированного соответствия (см. [8], п.12.2) становится намного менее эффективным.

Кроме того, скорость протекания биохимических процессов должна *соответствовать* общему характеру клеточного метаболизма. Нет никакого смысла резко ускорять один из метаболических этапов, если остальные "звенья" метаболической цепочки продолжают функционировать в прежнем темпе. Именно поэтому, поскольку *нет естественной необходимости* улучшать каталитические возможности ферментов выше уровня, имеющегося в обычных организмах, термофилы не создали суперферменты, которые бы в полной мере использовали преимущества высоких температур.

Но такие суперферменты вполне могут быть созданы инженерами-бионанотехнологами. Очевидные промышленные применения таких суперферментов будут следствием ускорения химических процессов при высоких температурах.

6.2. Принцип контролируемого разупорядочения структуры

В большинстве случаев мы представляем себе белки как объекты, которые имеют вполне определённую стабильную структуру. Они могут иметь несколько подвижных частей, соединённых петлями, но в основном пространственная структура белка является вполне определённой.

Однако по мере исследования и расшифровки геномов, становится очевидным, что большое количество белков *не имеют единственной заданной пространственной структуры*, а, напротив, функционально используют специфические переходы между разупорядоченностью и упорядоченностью своей структуры.

Например, *гормон глюкагон*, малый белок, состоящий из 29 аминокислот, является бесструктурным в цитозоле. Но, когда он связывается

с рецептором, он принимает специфическую конформацию для распознавания.

Многие сигнальные белки становятся упорядоченными только при связывании с соответствующим рецептором. *Переходы порядок-беспорядок* важны для сигнальных белков.

Разупорядоченные белки *быстро удаляются* из клетки протеолизом, поэтому сигнальные белки имеют *малое время жизни*, что важно для быстрого отклика на сигнал и позволяет *тонко регулировать* сигнальные системы.

Кроме того, разупорядочение позволяет распознавать один и тот же белок *различным* образом. Сигнальные пути в клетках очень сложные и некоторые сигнальные белки могут различным образом воздействовать на различные компоненты сигнальной системы организма.

Другим примером использования принципа разупорядочения являются молекулы, которые *связываются с очень большими объектами*.

Например, белки, которые связываются с ДНК, зачастую используют разупорядоченные линкеры.

К примеру, *белок p53*, который имеет *антиканцерогенную* функцию, состоит из четырёх доменов, которые связываются с четырьмя соседними сайтами в ДНК. Эти домены соединены в единый комплекс гибкими белковыми цепями (рисунок 128).

Рисунок 128 – Схема ДНК-связывающего белка p53

Ещё один пример белков, в которых используется разупорядочение белковой цепи – это *антитела*, в которых гибкие линкеры позволяют свободно перемещаться антиген-связывающим доменам ("рукам"), обеспечивая точную состыковку с поверхностями различных целей (рисунок 129).

Все антитела имеют *Y-образную форму* и образованы из двух идентичных "тяжелых" H-цепей (*heavy*) и двух идентичных "легких" L-цепей (*light*). Каждая "рука" (*arm*) молекулы антитела образована одной H-цепью и одной L-цепью, (см. [6], п.6.6). На конце каждой руки расположены *шесть* полипептидных петель, образующих *область связывания антигена – участок комплементарности*, CDR (*complementary-determining region*), к эпитопу антигена.

Продолжая рассмотрение структурной разупорядоченности, которая является необходимым компонентом функциональности белка, необходимо отметить, что разупорядоченные белки должны конструироваться *специальным образом*, чтобы *избегать образования* устойчивых глобулярных структур. Этого можно достичь, например, используя, гидрофильные и не используя гидрофобные аминокислоты.

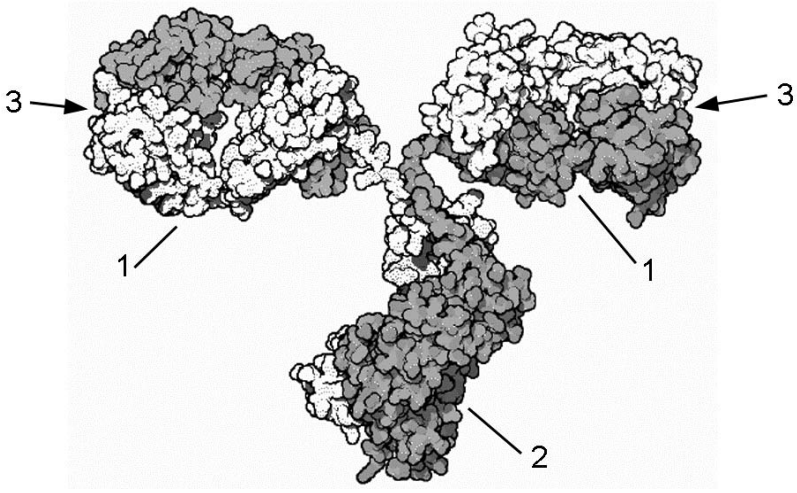


Рисунок 129 – Схема молекулы антитела: 1 – антиген-связывающие домены, 2 – центральный домен, 3 – области связывания антигена CDR

Кроме того, использование *глицина* и *пролина* увеличивает разупорядочение, поскольку глицин обеспечивает максимальную гибкость пептидной цепи, а пролин образует жёсткий излом.

6.3. Принципы самоассемблирования биообъектов

Совершенно невозможно представить себе, чтобы после того как в плавательный бассейн высыпать набор деталей двигателя, всевозможные гайки, винты и болты, колеса, оси, крылья, крышки капота, дверцы, бамперы и прочие детали автомобиля, и затем всё это тщательно перемешать, то в результате этого самопроизвольно произойдет "сборка" полнофункционального легкового автомобиля. Однако *именно таким образом* происходит "сборка" бионаномашин.

Все компоненты (детали) бионаномашины сначала "изготавливаются" в виде достаточно легко деформируемых полимеров. Каждая из этих частей предварительно *спонтанно сворачивается* в компактную структуру, и только затем все эти структуры ассемблируются, опять-таки, самопроизвольно, в функциональные комплексы.

Такой процесс называется – *самоассемблирование* (*self-assembly*).

Самоассемблирование, как логичное следствие стратегии "снизу-вверх", широко распространено в биологии.

Самоассемблирование обеспечивает создание *трёхмерных* бионаномашин на основе только лишь *одномерной* информации, которая записана в ДНК. На основе генетической информации происходит только синтез белковой цепи, а последующие процессы фолдинга и ассемблирования происходят уже *без дополнительного источника информации* об этапах и технологии образования финальной структуры.

Такой подход радикально отличается от методов "*направленного конструирования*" (*directed construction*), которые используются в макроскопическом машиностроении.

В процессе создания макромашин на каждом следующем этапе необходимо *добавлять информацию* (в виде чертежей, схем и технологических инструкций) к тому "исходному" количеству информации,

которое было "вложено" в детали машин при их изготовлении. Каждая деталь будущей конструкции тщательно изготавливается именно той формы и размеров, которые предусмотрены схемами и чертежами, а затем каждая деталь индивидуально помещается на своё место при сборке.

Именно таким образом и представлялась поначалу молекулярная нанотехнология, в которой каждый индивидуальный атом должен был помещаться в его индивидуальное место в собираемой структуре, исходя из некоторого "сборочного чертежа", созданного конструктором.

Эволюционный опыт ассемблирования бионаномашин показывает, что такой "индивидуальный" контроль за укладкой каждого элемента вовсе *не является необходимым* для создания (сборки) функциональной наноструктуры.

Сама идея самоассемблирования представляет собой *революционную* концепцию. Исследователи, вне зависимости от того, какой отрасли знания они посвятили себя, должны *прочувствовать* все те преимущества, которые дает такой подход, и *внедрять* концепцию самоассемблирования везде, где она до сих пор не использована.

Некоторые примеры применения этой стратегии мы рассмотрим позднее.

При этом следует чётко осознавать, что дизайн самоассемблирующихся структур гораздо более *лимитирован*, чем в случае направленного конструирования, когда разум слесаря-сборщика и внешний технологический контроль являются *дополнительными* источниками информации, вносимой в собираемое изделие уже в ходе сборки.

Для успешного завершения процесса *самоассемблирования* каждая часть будущей структуры должна

1) быть изначально рассчитана и сконструирована так, чтобы в финале образовывался стабильный комплекс;
2) содержать в себе всю информацию, которая будет необходима в процессе самосборки, программируя весь механизм ассемблирования, в том числе и защиту от образования неправильно собранных структур.

Общие принципы конструирования, которые используются в природных бионаномашинах, обеспечивая самоассемблирование:

1) *модульность*;
2) тщательная проработка межмодульных *интерфейсов*;
3) обеспечение *уникальности* взаимодействий между субъединицами;
4) обеспечение *спонтанности* самоассемблирования;
5) *кооперативность*.

1. Модульность. Модульность обеспечивает несколько преимуществ. Во-первых, большие комплексы могут быть образованы из множества идентичных модулей, как стены складываются из кирпичей. Это позволяет программировать образование *больших* структур *небольшим* количеством информации.

В биосистемах *особая симметрия* идентичных субъединиц зачастую используется, чтобы *управлять* процессом и *контролировать* размер и форму конечной структуры, которая ассемблируются.

Модульность также облегчает *контроль* ошибок самоассемблирования. Те модули, которые неверно встроились в создаваемую структуру могут быть удалены *ещё в процессе* самоассемблирования.

2. Межмодульные интерфейсы. Самоассемблирование требует *специфической геометрии взаимодействий* между модулями.

Модули ассемблируются только во вполне определённых взаимных ориентациях, образуя структуру со вполне определённой геометрией, а не разупорядоченный агрегат. Это достигается *детальной проработкой* поверхностей модулей, которые комплементарны друг другу по форме и взаимодействуют друг с другом посредством множества слабых нековалентных взаимодействий, тех взаимодействий, которые обеспечивают молекулярное распознавание.

Такое сочетание *топологического* и *химического* подобия поверхностей модулей называют *межмодульным интерфейсом*.

3. Уникальность взаимодействий. Самоассемблирование предполагает *уникальность взаимодействий* между субъединицами. Для данной системы каждое из взаимодействий, которое используется для самоассемблирования, *должно быть уникальным* и отличаться от других взаимодействий настолько, чтобы исключить разночтение встроенных "инструкций", которое может привести к ошибочному соединению частей.

В масштабах клетки этот принцип требует существования *тысяч и тысяч* уникальных межмодульных интерфейсов.

Для *малых* молекул следование этому принципу составляет существенную *проблему*, поскольку их поверхность слишком мала для обеспечения уникальности взаимодействия. Например, именно эта проблема является одной из основных при разработке лекарственных препаратов.

Малые органические молекулы, которые разрабатываются в качестве лекарств, должны идеально находить *только один* (целевой) белок, однако, эти молекулы зачастую также связываются и с другими белками, которые имеют центры связывания лигандов аналогичные активному центру целевого белка, тем самым, вызывая нежелательные побочные эффекты действия лекарств.

Эта проблема не столь критична для *межбелкового* взаимодействия, поскольку ассемблирующиеся поверхности белков обычно намного больше, чем поверхность взаимодействия белка с малой органической молекулой.

4. Спонтанность самоассемблирования. Самоассемблирование должно быть *самопроизвольным*, не требующим дополнительной информации или энергии от внешнего источника. Финальная структура самоассемблирующегося комплекса определяется термодинамикой. А это означает, что *ещё на этапе конструирования* необходимо тщательно *учитывать баланс* между *энтальпийным* и *энтропийным* вкладами.

Энтальпия самоассемблирования, вследствие образования множества ван-дер-ваальсовых и водородных связей, как правило, *стимулирует* формирование комплекса, в то время как *энтропия*

объединения множества изначально свободных субъединиц в единый комплекс *препятствует* самоассемблированию.

5. Кооперативность. *Кооперативность* процесса, когда присоединение одного модуля облегчает присоединение последующих модулей, часто *меняет кинетику* процесса спонтанного ассемблирования. Это часто приводит к реализации принципа "всё или ничего" ("*all-or-nothing*"), при котором, если самоассемблирование начинается, то далее уже происходит быстрая сборка всего комплекса.

Таким образом, самоассемблирующиеся структуры являются модульными, для их образования необходима специфическая геометрия взаимодействий между модулями и в случае сложного окружения, необходима уникальность взаимодействия субъединиц.

6.4. Использование симметрии при самоассемблировании

Симметрия обеспечивает множество возможностей для самоассемблирования больших комплексов из модульных субъединиц. На рисунке 130 представлены примеры молекул белков, для наиболее характерных точечных групп симметрии.

В первой колонке приведены примеры *циклической* симметрии, при которой субъединицы расположены вокруг *общей оси симметрии*.

Простейший случай, это мономер, у которого нет симметрии, например такой фермент как пепсин.

Ось симметрии *второго* порядка используется в случае Мах-белка, чтобы образовать зажим, которым захватывается ДНК.

Два канальных белка используют различный подход для образования поры в мембране: *порин*, имеющий ось симметрии *третьего* порядка, формирует три отдельные поры, а *калиевый канал* образует одну пору вдоль оси симметрии *четвертого* порядка, используя четыре идентичных субъединицы.

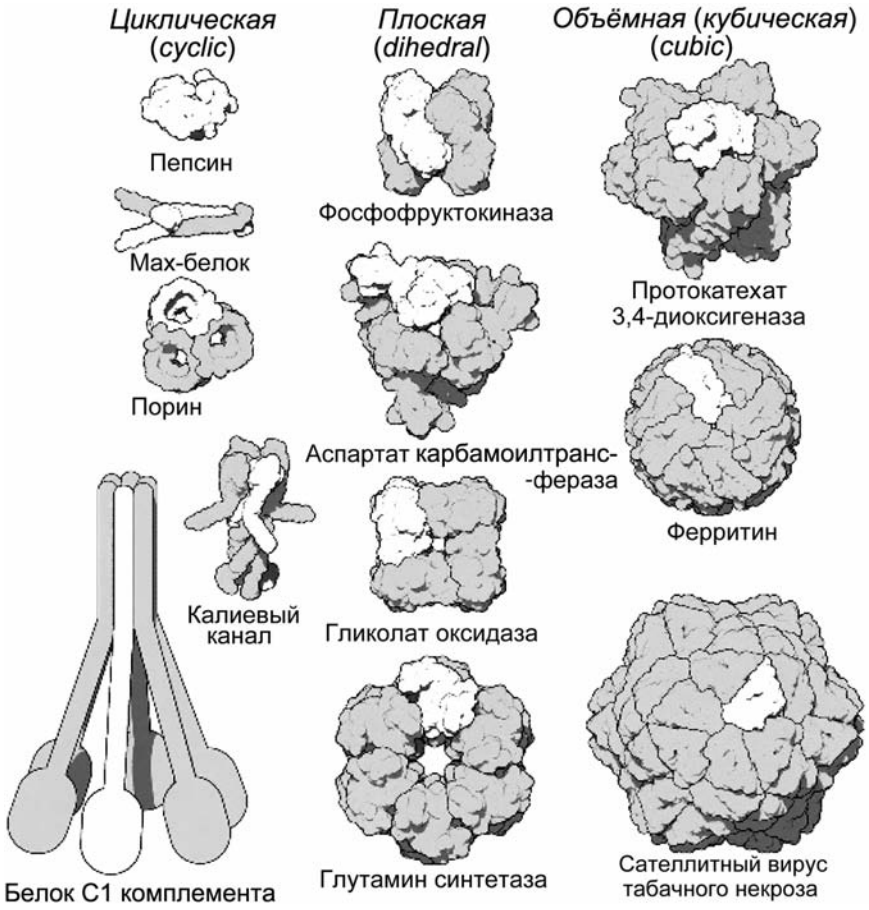


Рисунок 130 – Симметрия биомолекул

Молекула белка С1 комплемента использует ось симметрии *шестого* порядка для связи шести идентичных линкеров так, что образуется прочный "многорукий" захват для белка-цели.

Четыре фермента *в средней колонке* рисунка 130 представляют симметрию относительно плоскости, объединяя 4, 6, 8 и 12 субъединиц соответственно.

В каждом из этих ферментов взаимодействие субъединиц определяет активность белка.

В правой колонке на рисунке 130 представлены примеры *объёмной* или *кубической* симметрии.

Тетраэдрическая симметрия является редкой, она использована здесь для связи вместе 12 субъединиц диоксигеназы.

Октаэдрическая симметрия, как в случае *ферритина*, и *икосаэдрическая* симметрия, как в случае *вирусного капсида*, часто используются для создания полых белковых оболочек.

Наиболее очевидным *преимуществом* использования симметричных структур является *принцип экономии*. Для того чтобы сформировать весь комплекс, в геноме надо хранить только информацию необходимую для синтеза одной субъединицы, вместо информации для синтеза и сборки всего комплекса.

Симметричные комплексы также "выгодны" с точки зрения *исправления ошибок* сборки. Бракованные субъединицы не смогут участвовать в сборке, поэтому единичная ошибка испортит только одну субъединицу, а не весь комплекс. Такое полезное свойство симметричности часто используется в природных системах, поскольку размер большинства белковых цепей, которые могут быть синтезированы без ошибок в ходе белкового синтеза, *ограничивается* несколькими сотнями аминокислот. При этом белковые структуры большого размера формируются комбинированием (ассемблированием) нескольких малых белковых цепей.

Помимо этих преимуществ при сборке белковых ассоциатов, симметричное ассемблирование имеет также множество *функциональных* преимуществ.

Комплексы из нескольких субъединиц могут использовать явление *кооперативности*, когда функция данной субъединицы изменяется в зависимости от состояния соседних субъединиц. В природных белках такая *межмодульная коммуникация* используется довольно широко.

Симметрия также используется для образования молекул с несколькими *идентичными* центрами связывания, усиливая тем самым

связывание с необходимым объектом. Наиболее известный пример использования такого подхода – это две "руки" молекулы антитела.

Наконец, для формирования бионаномашин с необходимой морфологией, использование симметрии даёт возможность как для *формирования* большого набора *стандартных* деталей и узлов, таких, как захваты, обручи и оболочки, так и для *образования универсальной* молекулярной *инфраструктуры*, такой, как филаменты, мембраны и объёмные биоматериалы.

В симметричных комплексах у каждой субъединицы *идентична* структура и окружение. Каждая субъединица взаимодействует с соседями одинаковым образом. Как будет показано ниже, взаимодействие биомолекул между собой осуществляется через *интерфейсные участки* поверхности достаточно большой площади, которые *точно ориентируют* молекулы друг относительно друга в пространстве.

Симметричные комплексы образуются, если создать молекулу с двумя и более *участками* межмолекулярного *связывания* на поверхности, которые комплементарны друг другу. При этом следует продумать необходимую *взаимную пространственную ориентацию* этих интерфейсных поверхностей (рисунки 131 и 132). При соответствующем дизайне могут быть образованы замкнутые структуры из двух и более субъединиц. Некоторые вариации дизайна позволяют формировать незамкнутые полимерные одно-, двух- и трёхмерные структуры.

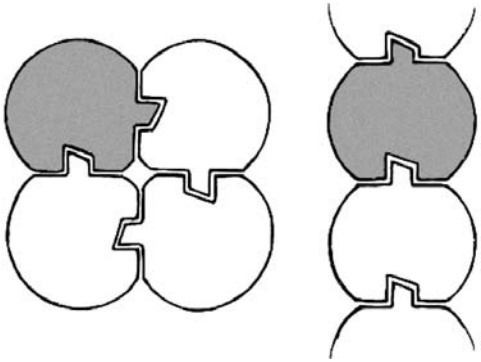


Рисунок 131 – Пространственное расположение интерфейсных поверхностей

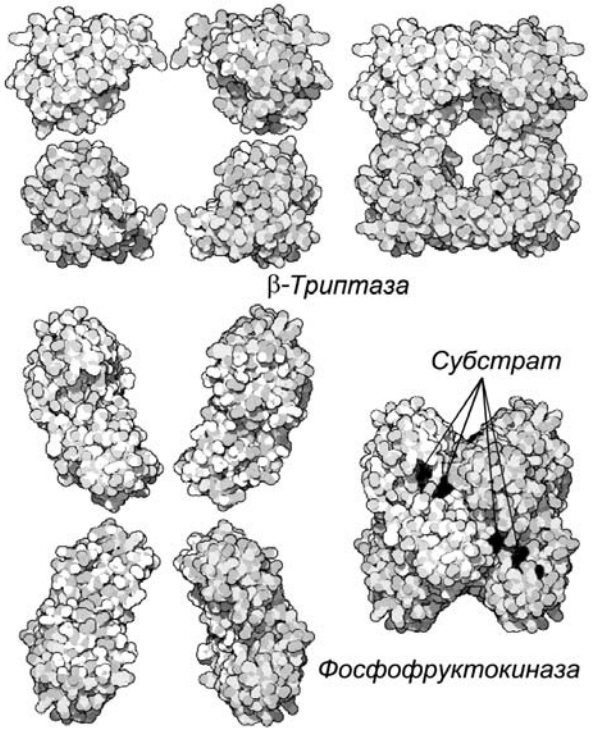


Рисунок 132 – Использование симметрии природными биомолекулами

На рисунке 131 показано, как, помещая интерфейсные участки в *различные* места на поверхности молекулы, можно формировать молекулярные ассоциаты различной симметрии.

Слева две интерфейсные поверхности расположены под углом 90°. Такой модуль, объединяясь с тремя другими, образует *замкнутый тетрамер*. *Справа*, две интерфейсные поверхности размещены на противоположных концах молекулы. Такие молекулы ассемблируются в *филамент*.

На рисунке 132 показано, как идентичная симметрия может быть использована для реализации различных функций, помещая интерфейсные поверхности в *различные* положения. Здесь изображены два фермента имеющих одну и ту же группу симметрии D_2.

β-*Трипта́за* (вверху) имеет два небольших интерфейса. При ассоциации субъединиц образуется *тетрамерное* кольцо, защищающее активные центры фермента, которые находятся внутри кольца.

В другом примере, четыре субъединицы *фосфофруктокиназы* (рисунок 132, внизу) тесно сцеплены.

После связывания с субстратами (показаны черным цветом на рисунке) субъединицы фермента активно взаимодействуют друг с другом через области интерфейса, скоординировано изменяя форму, регулируя тем самым активность фермента в целом.

Таким образом, природные бионаномашинаы ассемблируются из симметричных модулей для того, чтобы (1) минимизировать объём генетической информации, (2) обеспечить эффективный контроль ошибок сборки и (3) формировать ассемблированные комплексы симметричной функциональной формы.

6.5. Использование точечных групп симметрии при формировании биоструктур

Для того чтобы сформировать ассоциат определённого размера и состава зачастую используются *точечные группы симметрии*. В этих группах одна или более осей вращения проходит через одну точку, образуя замкнутую ограниченную конструкцию. Точечные группы симметрии можно подразделить на *три* больших группы по мере усложнения структур:

1) точечные группы низшей симметрии или осевые (циклические) группы;
2) точечные группы средней симметрии или плоские группы;
3) точечные группы высшей симметрии или объёмные группы.

1. Осевые, или *циклические* (*cyclic*) группы имеют *единственную* ось вращательной симметрии, образуя кольцо симметрически упорядоченных субъединиц. Симметрия с осью вращения *второго* порядка

широко распространена в природных биомолекулах, образуя множество молекулярных "зажимов", "ножниц" и других функциональных структур.

Циклические группы высших порядков менее распространены.

Тримеры образуются из субъединиц, у которых угол между интерфейсами равен 120° (ось вращения *третьего* порядка), *тетрамеры* образуются, когда угол между интерфейсами равен 90° (ось вращения *четвёртого* порядка), и так далее, используя целые части деления 360° для осей вращения высшего порядка.

Бионаномашины с осями вращения *высших* порядков используются для выполнения *специальных* функций, в которых важным является направленность и пространственная ориентация комплекса, как, например, при встраивании в биомембрану или при вращательном движении. Ассоциаты с осевой симметрией также полезны для функций, которые требуют образования полых *трубок* или *ёмкостей*.

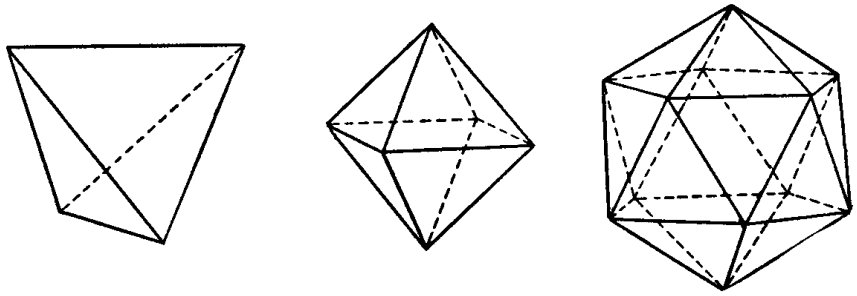
2. Плоские (*dihedral*) группы (от названия "плоский угол", *dihedral angle*) характеризуются центральной осью вращения второго или более высоких порядков, перпендикулярной другой оси вращения второго порядка. (Вместо второй оси может быть плоскость симметрии перпендикулярная центральной оси.)

Комплексы с такой симметрией имеют *множественные* различные области интерфейсов. Простейшей является симметрия D_2 с четырьмя субъединицами, симметричными относительно двух взаимно перпендикулярных осей второго порядка. В таких комплексах *должны быть три различных интерфейса*, хотя во многих случаях один из этих возможных интерфейсов в действительности не участвует в формировании межмодульных контактов, что приводит к образованию кольцевых структур вместо тетраэдров (четырёхгранников).

Структуры *более высокого порядка* плоской симметрии обычно представляют собой два кольца субъединиц размещенных стопкой друг над другом. Такие структуры и, в частности, тетрамеры с симметрией D_2, широко представлены в природных биомолекулах. Различным типам интерфейсов в "плоских" комплексах присуща богатая инфраструктура,

которая обеспечивает и формирование структур, и взаимодействие между субъединицами. "Плоскую" симметрию широко используют для конструирования ферментов, которые меняют свою активность благодаря взаимодействию между субъединицами.

3. Объёмные или кубические (*cubic*) группы содержат *неперпендикулярные оси вращения третьего и более высоких порядков*.



а *б* *в*

Рисунок 133 – Правильные многогранники: *а* – тетраэдр, *б* – октаэдр, *в* – икосаэдр

Соответственно симметрии трёх типов правильных многогранников (рисунок 133):

1) *тетраэдр* (правильный четырёхгранник, составленный из четырёх равносторонних треугольников);
2) *октаэдр* (правильный восьмигранник, составленный из восьми равносторонних треугольников);
3) *икосаэдр* (правильный двадцатигранник, составленный из двадцати равносторонних треугольников),

возможными являются три типа молекулярных структур:

- *тетраэдрические* с осями симметрии *второго* и *третьего* порядка;

- *октаэдрические* с осями *второго, третьего* и *четвёртого* порядка;
- *икосаэдрические* с осями *второго, третьего* и *пятого* порядка.

Объёмные группы, поскольку они состоят из такого большого количества субъединиц, зачастую формируют *полые сферообразные структуры*.

Симметрия октаэдра полностью совпадает с симметрией куба. Тетраэдр получается, если расположить его вершины в вершинах куба, не имеющих общих рёбер. Симметрия тетраэдра получается из симметрии куба отбрасыванием части элементов симметрии. Поэтому тетраэдрические и октаэдрические структуры часто называют *кубическими*.

Для кубических групп конструкция интерфейсов должна быть особо тщательной, а субъединицы имеют вид специально обработанных фрагментов сферической поверхности. В некоторых случаях субъединицы имеют идеальную геометрическую форму с чёткими углами. Кубические группы, с их точным взаимным расположением осей симметрии, используются в специальных целях для формирования контейнеров для хранения и транспорта.

Икосаэдрическая симметрия прекрасно подходит для формирования больших *полых оболочек*, таких, в которых простые сферические вирусы хранят свой генетический материал.

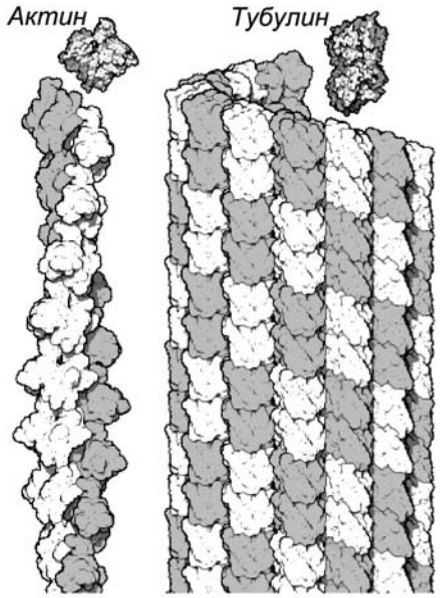
6.6. Использование пространственной симметрии при формировании биоструктур

Трансляционная симметрия (периодичность) в одном, двух и трёх измерениях используется для формирования протяжённых структур.

В биомолекулах чаще всего трансляционная симметрия комбинируется с вращательной симметрией. Трансляционные симметрии незамкнуты, в отличие от точечных групп симметрии, и могут формировать структуры *неограниченной* длины.

В биологических системах рост таких структур тщательно *контролируется*, как правило, посредством регуляторных биомолекул, которые кэпируют растущий конец, или с помощью разрезающих белков, которые разрушают те структуры, которые выросли слишком большими или перестали быть нужными.

Линейная (трансляционная или продольная) симметрия представляет собой одномерную трансляцию. Если к этой одномерной трансляции добавить *вращательную* симметрию относительно трансляционной оси, мы получим *спиральную* структуру (рисунок 134)



а *б*

Рисунок 134 – Наиболее распространенные спиральные бионаноструктуры: *а* – актиновая нить, *б* – микротрубочка

Размещая интерфейсные области в различных местах субъединиц можно получить самые разные структуры. Например, субъединицы *актинового* филамента, G-актины, полимеризуясь, образуют стопкообразное волокно. Интерфейсы мономеров *тубулина*, однако, расположены по всей поверхности субъединицы. Они располагаются как кирпичи в круглой печной трубе, формируя микротрубочку.

Использование в сочетании с трансляционной симметрией *осей вращения второго порядка*, перпендикулярных трансляционной оси, формирует двойную *спираль* или переплетённую спираль более высокого порядка.

Еще задолго до того, как были исследованы структуры белков, Лайнус Полинг (*Linus Carl Pauling*) предположил, что белковые субъединицы с *двумя* комплементарными интерфейсами должны ассемблироваться в полые спиральные фибриллы. С тех пор многие из таких структур были обнаружены, включая микротрубочки цитоскелета, жгутики бактерий, трубчатый капсид вируса табачной мозаики.

Спиральная симметрия также используется для формирования более узких структур *без центральной полости*, ориентируя интерфейсные области так, чтобы малое число субъединиц входило в каждый шаг спирали. Пример такой структуры – актиновые филаменты.

Планарная (плоская) симметрия. Симметрия в плоскости или *планарная* симметрия (*plane symmetry*) формируется, если трансляционная симметрия распространяется в двух измерениях, возможно с добавлением вращательной симметрии. Примером плоской симметрии является расположение кирпичей в кирпичной стене.

Планарная симметрия редко используется в природных биомолекулах, но, возможно, её роль будет возрастать, когда бионанотехнология будет пытаться создать большие структуры. Примеры использования симметрии в плоскости в естественных объектах – это существование S-слоёв – плоских решеток S-покровных белков, обнаруженных у сотен видов бактерий, обладающих клеточной стенкой, и у всех археобактерий. За миллиарды лет эволюции сборка S-слоёв стала столь совершенной, что не имеет себе равных по упорядоченности и эффективности самосборки среди двумерных биологических систем.

Плоские S-слои образуются из одинаковых субъединиц-гликопротеинов, которые самоассемблируют упорядоченный белковый монослой,

который полностью покрывает поверхность клетки. Этот слой демонстрирует чёткую решёточную структуру. В зависимости от индивидуальной геометрии субъединиц формируются *наклонные* ("косые" или косоугольные, *oblique*), *квадратные* (*square*) или *гексагональные* (*hexagonal*) решётки (рисунок 135).

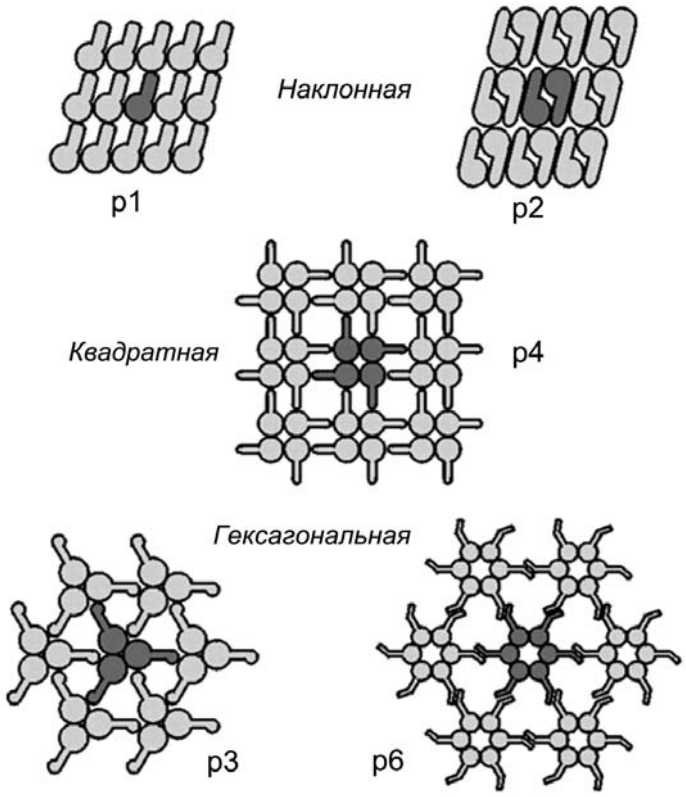


Рисунок 135 – Способы организации S-слоёв

В зависимости от типа решётки одна морфологическая единица-протомер (выделенные тёмно-серым цветом на рисунке 135) состоит из одной, двух, трёх, четырёх или шести идентичных белковых субъединиц, расположенных на расстоянии 5–30 нм друг от друга.

На рисунке 136(а) показана микрофотография S-слоя *B. sphaericus*, имеющего квадратную решётку, а на рисунке 136(б) – микрофотография S-слоя *Thermoplasma thermohydrosulfuricus*, демонстрирующую пример гексагонально упакованного S-слоя.

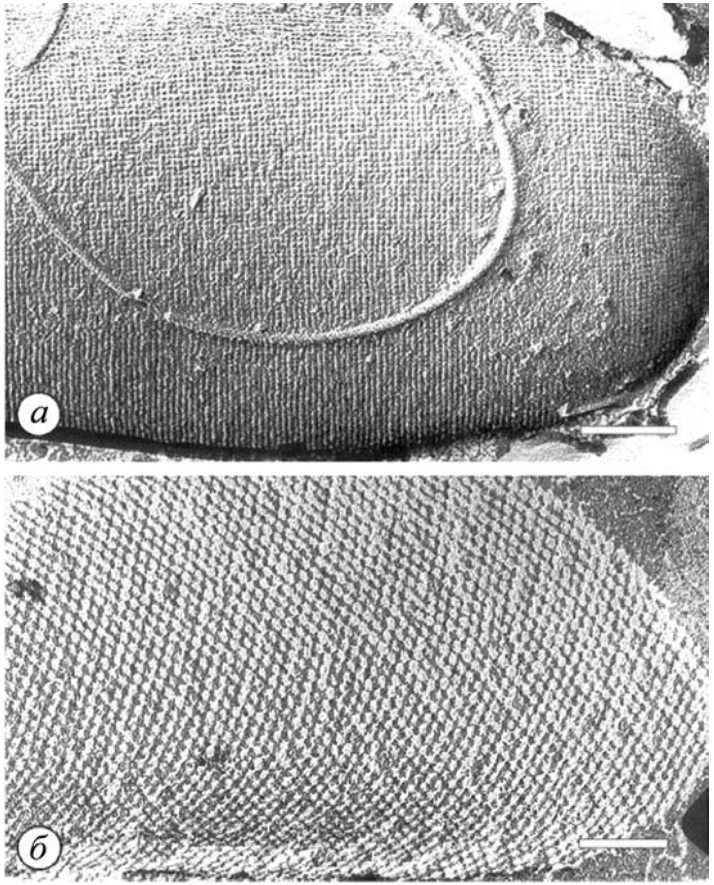


Рисунок 136 – Микрофотографии S-слоёв: *а – B. sphaericus*; *б – Thermoplasma thermohydrosulfuricus*

Трёхмерная (объёмная или пространственная) симметрия. Пространственные группы симметрии, в которых трансляционная

симметрия существует в трёх измерениях, являются *редкими* в природных биомолекулярных системах.

Примеры такого рода симметрии – трёхмерная решетка *коллагена* в соединительной ткани и кристаллообразная упаковка гемоглобина в эритроците.

Малые *кристаллические матрицы* также используются для хранения гормонов перед их высвобождением и для хранения таких ферментов как каталаза в компактной форме внутри пероксисом.

Трансляционную симметрию следует применять *осторожно*. Спиральные упаковки, двумерные и трёхмерные решетки *не имеют собственных ограничителей*, останавливающих рост. Поэтому они могут расти *бесконечно*.

И в природных биосистемах, и в применениях бионанотехнологии это свойство может представлять *опасность*.

Для ограничения размера таких полимеров могут быть использованы *различные способы*.

(1) Самым очевидным является *использование матрицы* (кронштейна или каркаса) *или направляющих молекул* определённого размера, чтобы ограничить необходимую длину (и ширину) полимера. Такой подход использован в конструкции саркомеров мышц: *небулин* определяет длину актинового филамента, а *титин* – миозинового. Эти длинные белковые цепи могут растягиваться, задавая длину полимера. Аналогично, в капсиде бактериофага используется трёхмерная матрица (каркас) вместо икосаэдра, чтобы определить его вытянутую форму.

(2) Ещё один способ ограничения размеров трансляционного наращивания структур – *использование встроенных таймеров*, которые запускают переключатели, активирующие ассемблирование или дизассемблирование протяжённых структур в нужное время.

Например, *микротрубочки* ассемблируются и дизассемблируются динамически, под управлением химических таймеров, основанных на гидролизе связанных с тубулинами молекул ГТФ. Микротрубочки медленно растут, а затем быстро дизассемблируются, когда количество гидролизованных ГТФ достигает определённого (критического) уровня.

Это гарантирует, что в клетке в данный момент времени наличествует набор микротрубочек с длинами, лежащими в определённом диапазоне.

(3) Альтернативным способом является *ограничение числа синтезированных субъединиц* (ограничение самого процесса синтеза), при котором размер пространственных структур будет ограничен числом модулей и ассемблирование остановится, когда будет исчерпан запас субъединиц. Такой подход используется при формировании больших единичных структур. Например, этот метод предложен для объяснения механизма, контролирующего длину бактериального жгутика.

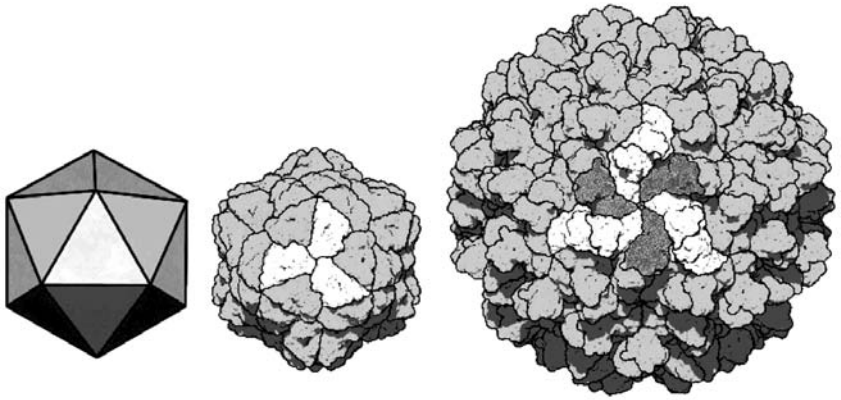
6.7. Использование квазисимметрии при формировании биоструктур

Точечные группы симметрии позволяют конструировать комплексы размером приблизительно в 10 раз больше размера среднего белка. Конечно, можно сконструировать комплексы гораздо бóльшего размера, если в качестве единичного модуля использовать не одну белковую молекулу, а *мультибелковый ассоциат*, состоящий из нескольких молекул. Но в этом случае каждый белок, входящий в ассоциат, необходимо индивидуально синтезировать, что, соответственно, усложняет задачу создания конструкции в целом.

Вирусы используют *промежуточный* метод – некоторым вирусам необходимо собирать очень большие капсиды, но при этом размер вирусного генома ограничен и он не может кодировать достаточно генов для синтеза множества различных типов субъединиц. Вместо этого вирусы используют *квазисимметрию* для формирования капсида, размер которого оказывается больше, чем это было бы возможным с использованием идеальной симметрии (рисунок 137). Основной принцип прост, но проблемой является его детальная реализация на практике в каждом конкретном случае.

На рисунке 137(б) показан икосаэдрический капсид малого вируса, собранный из 60 идеально симметричных фрагментов. Каждую из треугольных граней икосаэдра образуют три тождественные

субъединицы. На рисунке 137(в) показан другой вирус, имеющий размер капсида намного больше чем первый. Капсид большого вируса построен из 120 субъединиц. Субъединицы химически идентичны, но *слегка отличаются* по способу взаимодействия с соседями. Каждую из треугольных граней икосаэдра образуют шесть субъединиц, имеющих *слегка различные* конформации.



а *б* *в*

Рисунок 137 – Использование квазисимметрии при дизайне ассемблирующихся комплексов: *а* – икосаэдр, *б* – икосаэдрический капсид малого вируса, *в* – икосаэдрический капсид большого вируса

Квазисимметричные комплексы образуются при симметричной упаковке блоков-протомеров, каждый из которых образован из нескольких идентичных молекул. Например, идеально симметричный икосаэдрический вирус содержит 60 идентичных субъединиц, а квазисимметричный вирусный капсид образуется из 120, 240 и большего числа субъединиц.

Квазисимметрия требует, чтобы субъединицы имели *слегка отличающиеся конформации* в различных несимметричных положениях.

Изначально концепция квазисимметрии подразумевала, что небольших *деформаций* субъединиц будет достаточно для включения

субъединиц в различное несимметричное окружение, подобно тем небольшим вариациям в длине растяжек, которые использовал Бакминстер Фуллер для создания больших геодезических сводов архитектурных сооружений (*Richard Buckminster Fuller* – архитектор-авангардист, автор геодезического купола, спроектированного для Всемирной выставки в Монреале в 1967 году, в честь него молекулы C_{60} были названы фуллеренами (см. п. 3.5.4)).

Но исследование атомной структуры вирусов показало, что основным способом создания квазисимметрии является использование структурных конформаций в субъединицах. Такие субъединицы имеют *две или более стабильные конформации с различной ориентацией интерфейсов*.

Можно представить иерархический процесс ассемблирования, при котором *сначала* несколько субъединиц, имеющих различные конформации, ассемблируются, образуя протомерный комплекс, а *затем* из этих протомеров уже ассемблируется финальная симметричная структура. Хотя эта модель слишком упрощена по сравнению с тем, как это происходит в действительности, но она может быть принята в качестве рабочей при дизайне искусственных самоассемблирующихся бионаноструктур.

Таким образом, квазисимметрия используется для формирования ассемблированных комплексов, размер которых превышает размер, который может быть получен с использованием идеальной симметрии.

Контрольные вопросы и задания

1. Чем интересны гипертермофилы для белковых инженеров?
2. Какие модификации могут увеличить прочность поверхности молекулы фермента по отношению к термической денатурации?
3. В чём состоит функциональность исходной разупорядоченности пространственной структуры некоторых белков?
4. Как разупорядоченность сигнальных белков используется в сигнальных цепях?

5. Как разупорядоченность белков используется для их связывания с протяжёнными объектами?
6. Какие существуют способы повышения разупорядоченности белковых структур?
7. Какой процесс называется самоассемблированием?
8. Какие два условия должны быть выполнены при конструировании всех компонентов самоассемблирующейся структуры?
9. Перечислите общие принципы конструирования, которые обеспечивают самоассемблирование в природных бионаномашинах.
10. Что называется межмодульным интерфейсом и какими свойствами должен он обладать для успешного протекания процесса самоассемблирования?
11. Каким образом использование симметричных субъединиц повышает эффективность самоассемблирования?
12. Каким образом, изменяя положение интерфейсных участков на поверхности молекулы, можно программировать синтез структур различной топологии?
13. Как добавление трансляционной симметрии к точечным группам симметрии влияет на морфологию ассемблирующихся комплексов?
14. Какие клеточные структуры имеют продольную пространственную симметрию?
15. Какие вы знаете биологические структуры, имеющие планарную пространственную симметрию?
16. Приведите примеры биологического использования пространственной симметрии в трех измерениях.
17. Почему не выгодно формировать большие белковые комплексы из мультибелковых ассоциатов?
18. Какой метод использован при формировании икосаэдрических капсидов больших вирусов?
19. Что такое принцип квазисимметрии, применительно к самоассемблированию белковых ассоциатов большого размера?
20. Какова роль протомеров в иерархическом ассемблировании больших белковых структур?

Глава 7
Формирование молекулярных комплексов

7.1. Использование молекулярной толчеи при ассемблировании биомолекул

Цитозоль клеток заполнен макромолекулами и малыми органическими молекулами, причем макромолекулы расположены *очень близко* друг к другу (большинство из них разделено лишь несколькими молекулами воды), и представляет собой, образно выражаясь, "густой суп" (см. [6], п. 2.3). На рисунке 138 схематически изображён *участок цитоплазмы Escherichia coli* (длиной около 100 нм), составляющий 1/600 объёма клетки; увеличение 1×10^6.

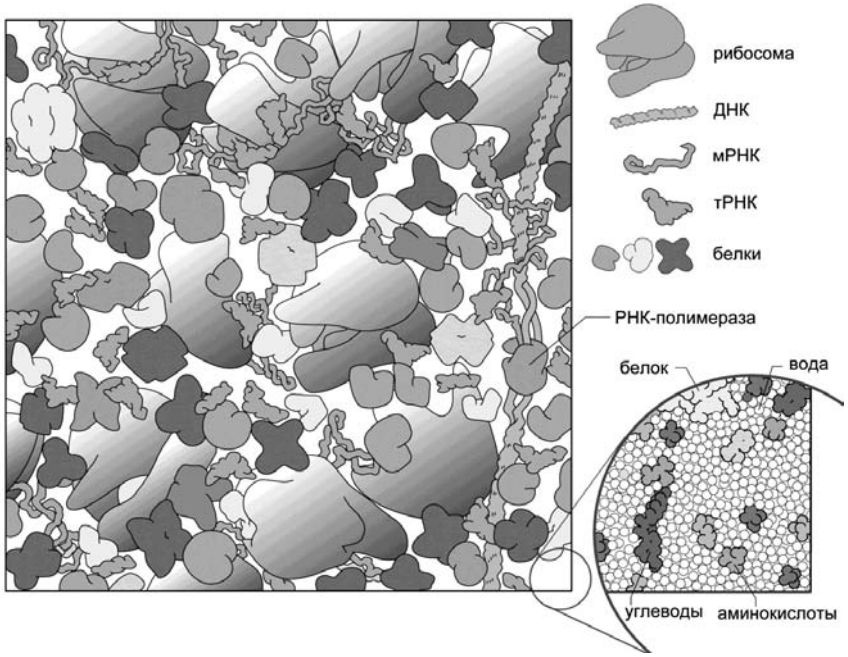


Рисунок 138 – Содержимое бактериальной клетки *Escherichia coli*

При таком увеличении размер атома углерода соответствует крупинке соли, а молекулы АТФ – рисовому зёрнышку. В целях упрощения небольшие по размерам молекулы, такие, как вода, кофакторы и метаболиты, на рисунке не приведены (они показаны в увеличенном виде внизу справа). В таком участке цитоплазмы содержатся: сотни *макромолекул*, необходимых для синтеза белков; около 300 молекул *других ферментов*, включая 130 гликолитических ферментов и 100 ферментов цитратного цикла; 30 000 *небольших органических молекул* с молекулярной массой от 100 до 1000 Да, например продукты промежуточного метаболизма и коферменты (показаны в 10-кратном увеличении внизу справа); наконец, 50 000 *неорганических ионов*. Природные бионаномашины созданы для оптимального функционирования *именно в клеточном цитозоле*, переполненном крупными молекулами, в условиях "толчеи" и "давки". Бионаномашины занимают 20-30% объёма цитозоля. Такая "молекулярная толчея" чрезвычайно важна именно для ассемблирования и функционирования бионаномашин.

В условиях "молекулярной давки" каждая макромолекула окружена множеством других макромолекул, поэтому пространство вокруг данной макромолекулы *постоянно заблокировано* присутствием соседних молекул. Такая физическая блокировка макромолекул в десятки и сотни раз *затрудняет* (ингибирует) *диффузию* метаболитов. А диффузия самих макромолекул снижается еще больше.

Однако, хотя это и не так очевидно, "молекулярная давка" *ускоряет* ассоциацию молекул в макромолекулярные комплексы.

Экспериментальные и теоретические исследования показали, что именно "молекулярная толчея" *стимулирует* образование компактной формы молекул и *способствует* формированию функциональных мультимерных структур.

Рассмотрим, например, димерный белок, мономеры которого объединены слабыми нековалентными взаимодействиями. В слабоконцентрированном растворе предпочтительнее было бы индивидуальное существование *мономеров*. Однако, в концентрированном растворе, будет предпочтительнее *димерная* форма белка, даже если буферные молекулы

не взаимодействуют прямо (химически) с мономерами. Такой *сдвиг равновесия* в сторону димеризации вызывается изменениями энтропии. Уменьшение свободного объёма затрудняет диффузию молекул. Поэтому, как только два мономера найдут друг друга, они будут сопровождать (держаться около) друг друга, не разлетаясь, сохраняя димерную форму. Слабые нековалентные взаимодействия, которые были бы несущественными в слабоконцентрированном растворе, становятся важными в условиях "молекулярной давки" в цитозоле клетки. Такое усиление ассоциативности в первую очередь относится к большим молекулам.

Подобная *активизация* процессов ассоциации может иметь интересные следствия. Например, может происходить *изменение топологии продуктов, которые формируются ДНК-лигазой* (фермент, соединяющий концы фрагментов ДНК). Если применить ДНК-лигазу к *разбавленному* раствору фрагментов ДНК, она будет соединять их, формируя *линейную* молекулу ДНК. Если же к раствору добавить *большую* концентрацию буферных молекул, то вместо линейных молекул будут образовываться *кольцевые*. В условиях "молекулярной толчеи" фрагментам ДНК труднее "найти" друг друга, поэтому лигазе легче найти второй конец "своего" фрагмента, чем конец другого фрагмента, и она замыкает фрагменты, формируя кольцевые молекулы ДНК.

Примечательно, что эти два эффекта:

1) затруднение диффузии и
2) интенсификация ассоциирования,

противоположно влияют на скорость ферментативных реакций.

"Молекулярная толчея" затрудняет диффузию субстрата к ферменту – *препятствует* протеканию ферментативной реакции, снижает скорость реакции.

Но когда субстрат таки протолкается к ферменту и свяжется с ним, то эта же толчея будет препятствовать разрушению фермент-субстратного комплекса – *способствует* завершению ферментативной реакции, увеличивает скорость реакции.

Поэтому, в действительности, скорость ферментативной реакции может *сложным образом* зависеть от величины концентрации буферных молекул в растворе.

Для бионанотехнологии может оказаться *необходимым* добавление буферных молекул в раствор, для того, чтобы воспроизвести среду (окружение), которая необходима для протекания процессов в природных биомолекулах.

Для многих ферментов отмечено *возрастание* эффективности их действия, если в реакционную среду добавлены буферные молекулы, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ) или нейтральный белок сывороточный альбумин (*serum albumin*). Такая добавка стимулирует ферменты к тому, чтобы они приняли необходимую конформацию, и улучшает их взаимодействия со всеми их партнерами по взаимодействиям (субстраты, эффекторы), которые присутствуют в растворе.

7.2. САМООРГАНИЗАЦИЯ И БИОМЕМБРАНЫ

Самоассемблирование идеально приспособлено для сборки наномашин определённого размера и формы. Однако, в некоторых случаях, необходимы строительные материалы и принципы сборки *не настолько чётко определённые*, как в случае самоассемблирования.

Самоорганизация (еще используют термин *самосборка*) является как раз таким методом, который прекрасно приспособлен для формирования систем, которые являются *гибкими, эластичными и самовосстанавливающимися*.

В самоорганизующихся системах *нет* того *чёткого контроля* за взаимным расположением модулей, который присущ самоассемблированию, но, зачастую, *необходимым* качеством формируемой системы является *именно отсутствие* чётко определённой структуры.

В природных системах самоорганизация используется, прежде всего, при формировании *биомембран*.

В бионанотехнологии используется несколько типов липидных и других амфифильных молекул для формирования новых инфраструктур и создания средств доставки препаратов в наномедицине.

Подобно самоассемблирующимся структурам, *самоорганизующиеся* системы являются *модульными*. Но *отличаются* они именно *отсутствием специфических интерфейсных поверхносте*й.

При самоассемблировании модули имеют чёткую топологию взаимодействий, поэтому финальная структура образуется из определённого числа модулей точно уложенных в совершенно определённый ассоциат.

В самоорганизующихся системах, напротив, присутствуют большие поверхности *неспецифических* взаимодействий, допускающих *широкий диапазон* подобных взаимодействий между соседними модулями. Модули данного типа, могут самоорганизовываться в ассоциаты *различной* формы.

Самоорганизация липидов в биомембраны. Липиды являются малыми молекулами, в состав которых входит как гидрофобный углеводородный хвост так и гидрофильная функциональная группа.

В природных клетках используется всего несколько вариантов такого амфифильного дизайна (см. [13], п.2.2), но для создания искусственных конструкций для различных бионанотехнологических применений вполне возможно разрабатывать и использовать искусственные амфифильные конструкции отличные от тех, которые используются природой.

Длинные гидрофобные углеводородные хвосты нерастворимы в воде, и такое стремление избежать контакта с водой, как и в случае фолдинга белков, является *движущей силой* процесса самоорганизации липидов в биомембраны.

Для каждого липида существует определённая критическая концентрация. Если концентрация липидов становится выше этого критического значения, происходит самопроизвольная самоорганизация в структуры, в которых гидрофобные хвосты липидов "спрятаны" внутрь и не контактируют с водным окружением. Величина таких критических концентрация очень *низка*, причем она тем ниже, чем больше длина

углеводородного хвоста липида. Например, типичный липид с 16 углеродами в каждом хвосте имеет критическую концентрацию лежащую в *пико*молярном диапазоне (порядка 10^{-12} моль/литр).

Форма индивидуального липида *определяет* форму самоорганизующегося агрегата. Конусообразные липиды стремятся формировать сферические *мицеллы*. Цилиндрические молекулы, такие как доминирующие в клетках фосфолипиды, формируют протяжённые липидные *бислои*. Бислои образуются двумя монослоями липидов, ориентированных взаимно таким образом, чтобы гидрофильные головки были направлены наружу, а гидрофобные хвосты спрятаны внутрь бислоя (рисунок 139).

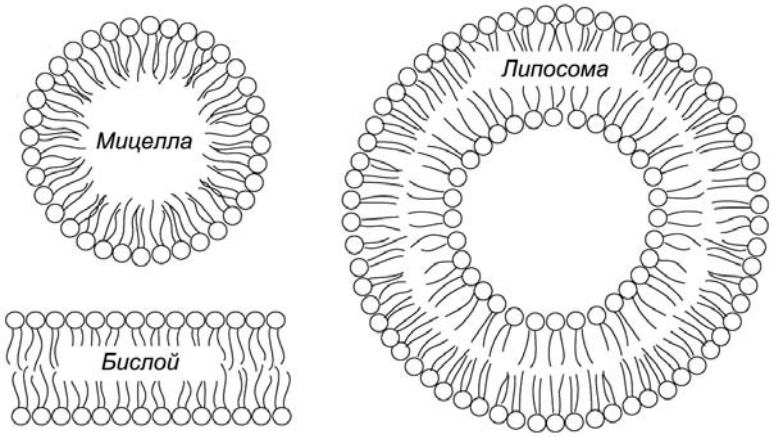


Рисунок 139 – Самоорганизация липидов в мицеллы, липосомы и бислойные мембраны

Особые свойства липидных бислоёв. Поскольку липидные бислои образованы из множества химически несвязанных между собой молекул, то они являются *динамическими* структурами.

Хотя липиды могут формировать разнообразные кристаллические структуры при соответствующих условиях, но при физиологических условиях липидные бислои являются *жидкими* и молекулы липидов хаотически движутся относительно друг друга в пределах бислоя.

Латеральное движение происходит быстро, а *флип-флоп* липидов из одного монослоя бислоя в другой происходит редко (см. [8], п. 7.3). Жидкое состояние липидного бислоя является очень "полезным" качеством, поскольку это позволяет самопроизвольно "*залечивать*" повреждения. Жидкое состояние также обеспечивает необходимую интенсивность "*коммуникации*" между молекулами в мембране, поскольку они быстро диффундируют и взаимодействуют с окружающими молекулами.

Жидкое состояние липидных бислоёв зависит от *структуры* составляющих липидов и от *температуры*. Бислои, составленные из липидов одного типа, и, в частности, из липидов с насыщенными хвостами, стремятся кристаллизоваться в замороженное состояние. Липиды с хвостами, имеющими *двойные* углерод-углеродные связи (ненасыщенные связи), и *смеси* различных липидов ингибируют кристаллизацию и способствуют сохранению жидкого состояния бислоя.

В клетках высших организмов для управления фазовым состоянием липидной фазы используется *холестерол*. При добавлении холестерола в значительных количествах (5–20%) холестерол взаимодействует с углеводородными хвостами вблизи полярных головок, уменьшая подвижность хвостов. Это делает мембрану жёстче и уменьшает её проницаемость. В то же время, это помогает избежать кристаллизации фосфолипидной фазы.

Биологические мембраны чрезвычайно гибкие, что допускает сложные *трансформации* формы. Экстраординарная гибкость красных кровяных телец (эритроцитов) представляет собой прекрасный пример – в нормальном состоянии эритроциты имеют форму диска, но они могут сворачиваться так, что они проходят через капилляры с диаметром вдвое меньшим, чем диаметр такого диска.

Процессы *отпочкования* везикул, когда малая везикула отделяется от большой, и *слияния*, когда несколько везикул образуют единую везикулу, являются примерами процессов, в которых требуется высокая гибкость и жидкое фазовое состояние мембраны.

С другой стороны, мембраны оказывают существенное сопротивление силам, которые направлены вдоль мембраны. Основную роль в

сохранении целостности биомембраны играют гидрофобные силы, которые удерживают молекулы липидов вместе. Растяжение мембраны, при котором её площадь увеличивается на 1%, приводит к разрушению (разрыву) мембраны.

Особенности процесса самовстраивания белков в липидные мембраны. Идеально организованная мембрана является прекрасным барьером, обеспечивающим компартментацию клетки. Однако для обеспечения процесса обмена веществ с окружением, для переноса веществ через мембрану необходимы специальные "транспортные устройства" в составе мембраны. В природных мембранах такими устройствами являются специальные белки, которые встроены в мембрану и взаимодействуют с ней. Мембранные белки ассоциируются с липидным бислоем используя множество способов (рисунок 140).

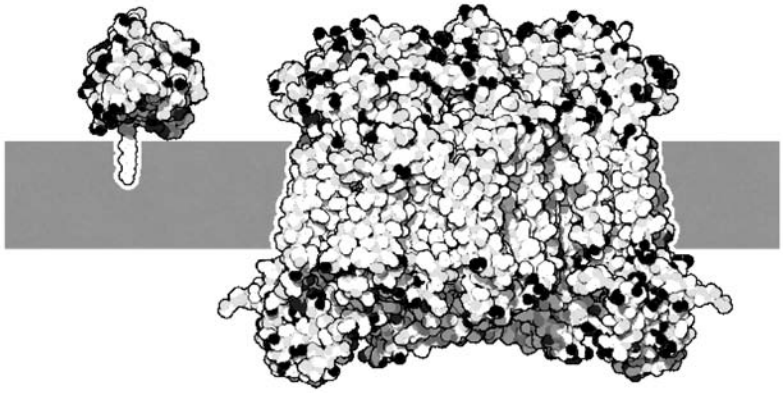


Рисунок 140 – Примеры взаимодействия белков с мембраной. Черным цветом показаны заряженные атомы, а серым – гидрофобные участки

В простейшем случае липидоподобные группы "торчащие" из белковой глобулы могут быть встроены в монослой мембраны, как в случае белка Ras, к которому в ходе посттрансляционной модификации присоединяется короткая углеводородная цепь, которая играет роль "*якоря*", закрепляющего белок в мембране (рисунок 140, слева).

Множество других белков устроены таким образом, что их гидрофобные участки стремятся погрузиться в гидрофобную фазу мембраны. В результате белки либо встраиваются в мембрану насквозь, либо погружаются только в один из монослоёв (см. [13], п. 5.2).

Как правило, такие белки содержат участок из приблизительно 20–25 преимущественно гидрофобных аминокислот. Такой участок обычно принимает форму α-спирали, в которой гидрофобные аминокислоты экспонированы наружу, а гидрофильные не контактируют с гидрофобной частью мембраны. Такая α-спираль *проходит сквозь мембрану* перпендикулярно её плоскости, оставляя остальные части белка снаружи мембраны по обе её стороны.

Наглядным примером такого рода белков является *гликопротеин А*, основной белок плазматической мембраны эритроцитов. Его трансмембранным доменом является одна α-спираль (рисунок 141).

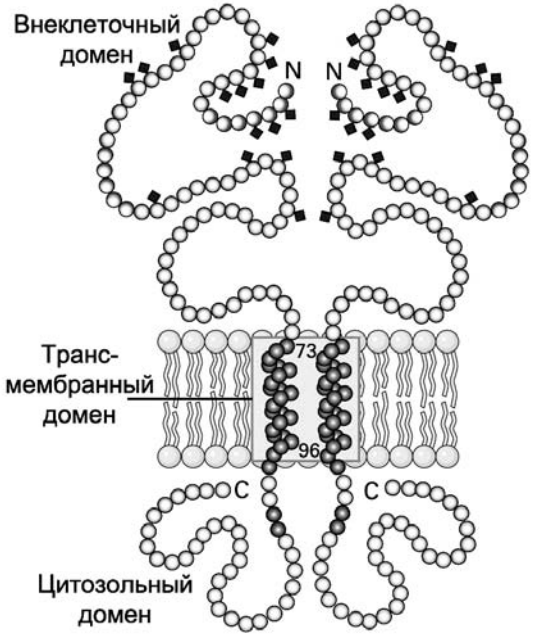


Рисунок 141 – Схема димера гликопротеин А

У гликопротеина А трансмембранная α-спираль состоит из 23 аминокислот. Длина такой спирали составляет порядка 3,75 нм, что хорошо согласуется с данными о толщине липидного бислоя.

Еще один способ включения белков в мембрану, это окружение трансмембранной части белка *поясом гидрофобных структур*, который и выталкивает белок из воды (в гидрофобную часть мембраны), подобно тому, как это делает с пловцом надувной спасательный пояс.

Цитохром-оксидаза, показанная на рисунке 140 справа, представляет собой пример именно такой организации белковой глобулы с гидрофобным "поясом" фиксирующим белок в мембране. В цитозоль экспонированы гидрофильные заряженные аминокислоты.

Поскольку мембраны являются жидкими, то мембранные белки свободно диффундируют (плавают) вдоль мембраны. Множество биологических процессов обеспечивается перемещением и взаимодействием белков в мембране.

7.3. Принцип молекулярного узнавания при формировании структуры биообъектов

Макроскопические машины состоят из взаимодействующих узлов и деталей. Например, автомобиль состоит из большого числа деталей прочно соединённых с помощью болтов, заклёпок, сварки, и других приёмов для соединения деталей. Перемещение сочленённых частей друг относительно друга определяется наличием тщательно обработанных осей, поршней, шарниров. Степень свободы таких перемещений между такими сочленёнными деталями изменяется искусственно в зависимости от их функции, например, максимально снижается трение на осях колёс, или же, напротив, увеличивается трение на тормозных колодках колёс автомобиля.

Большинство бионаномашин также состоят из набора взаимодействующих частей, и для контроля взаимодействия между этими частями необходимы методы *молекулярного распознавания*.

К сожалению, большинство принципов, которые используются в *макро*-машиностроении, неприменимы в *нано*-мире.

В частности, присущая нанообъектам *атомная гранулярность* представляет собой одно из наиболее часто встречающихся и сложнопреодолимых препятствий. Нанообъекты обычно взаимодействуют посредством прямого контакта всего лишь нескольких десятков атомов.

В *нано*-масштабах невозможно обеспечить любые желаемые допуски и посадки, и нет того диапазона материалов для обеспечения сочленения частей машин, как это принято в *макро*-машиностроении.

Мы ограничены всего несколькими *типами атомов* и их взаимодействиями посредством дисперсионных и электростатических сил, или через образование водородных связей. Более того, мы ограничены определённой *геометрией связей*, которые связывают атомы в молекулах. Мы не можем спроектировать нанокомпоненты *любой* произвольной формы. Каждая из нанодеталей должна быть "изготовлена" из целого числа атомов, соединённых в соответствии с простыми правилами образования ковалентных связей.

Принципы молекулярного узнавания Крейна. Еще до того, как была определена атомная структура первых биомолекул, физик Крейн (*Horace Richard Crane*) сформулировал два принципа, в соответствии с которыми должно происходить макромолекулярное узнавание в самоассемблирующихся системах [35].

Принцип множественности слабых парных взаимодействий. Для обеспечения высокой специфичности между интерфейсными поверхностями обеих взаимодействующих частей должно образовываться *много слабых взаимодействий*. Этот принцип совсем не очевиден. Может показаться, что, наоборот, лучше использовать одну, но сильную связь. Использование одной или нескольких прочных связей, действительно, обеспечит высокую *стабильность*. Но не обеспечит *специфичность*. Поскольку одинаковое пространственное расположение всего двух (или нескольких) атомов может быть (случайно) достигнуто для, вообще

говоря, произвольной комбинации взаимодействующих частиц, то это увеличивает риск образования случайных *неверных* комплексов. А вот использование целого *массива слабых* парных взаимодействий гарантирует специфичность, ибо каждая пара взаимодействующих атомов вносит свой вклад в суммарное взаимодействие, обеспечивая, тем самым, необходимую силу связи между двумя нанообъектами.

Принцип комплексной комплементарности. Взаимодействующие поверхности двух нанообъектов должны быть геометрически (топологически) *подобны*, точнее, должны быть *комплементарны* друг другу. Именно такая комплементарность обеспечит правильное взаимное расположение атомов так, чтобы сформировалась система множественных взаимодействий.

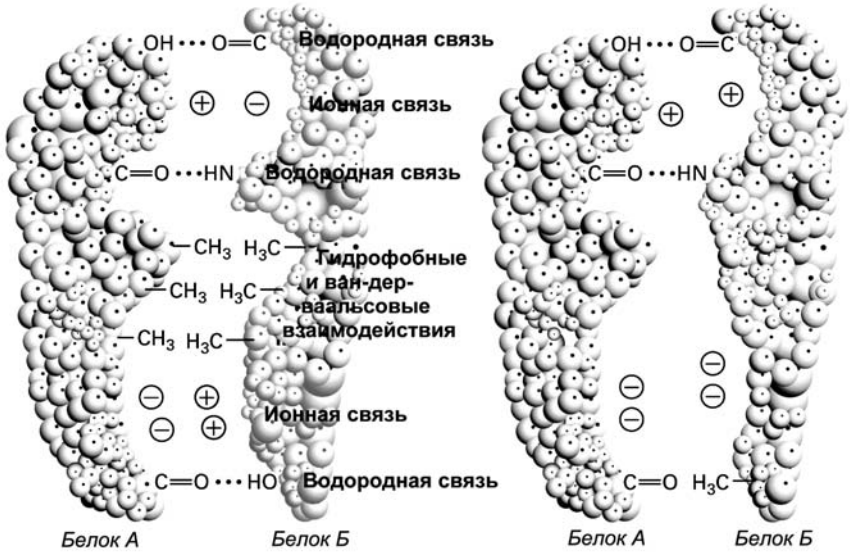
В биологических молекулах эта комплементарность включает в себя как "*геометрическую комплементарность*", когда выступы на поверхности одной молекулы точно совпадают с впадинами на поверхности другой молекулы, так и "*химическую комплементарность*", при которой в нужных позициях оказываются именно те атомы и функциональные группы, которые и формируют водородные связи или электростатическое притяжение.

Такая *комплексная геометрически-химическая комплементарность* является важной для реализации *специфичности* взаимодействий.

Так выступ на одной из поверхностей не только должен точно подходить к впадине на другой, комплементарной, поверхности, но и должен *не дать* сформировать связь с поверхностью, у которой нет соответствующей впадины.

Добавление одной метильной группы в роли такого выступа на одной из взаимодействующих поверхностей может быть достаточно для того, чтобы *исключить* связывание макромолекул. Например, метилирование рестрикционных сайтов защищает ДНК бактерий от действия рестрикционных ферментов. С другой стороны, если по какой либо причине одна из множества водородных связей не будет сформирована, это не дестабилизирует фатально процесс межмолекулярного связывания.

Рисунок 142 иллюстрирует *систему нековалентных связей* в интерфейсных областях двух макромолекул, посредством которой образуется стабильный комплекс.



а *б*

Рисунок 142 – Молекулярное узнавание: *а* – комплексная комплементарность приводит к образованию прочного комплекса; *б* – отсутствие комплементарности

Грамотно сконструированный белок должен иметь *уникальную интерфейсную поверхность*, обеспечивающую связь *только* с необходимым партнёром и *исключающую* связь с любыми другими конкурирующими молекулами.

Два принципа Крейна: *множественность слабых парных взаимодействий* и *комплексная комплементарность* – работают в сотнях исследованных природных бионаномашин. Биомолекулы взаимодействуют через развитые интерфейсные поверхности, формируя множественную систему слабых взаимодействий, расположенных вдоль идеально комплементарных поверхностей. В *молекулярном* узнавании в

большинстве случаев используются *нековалентные* взаимодействия, а ковалентное связывание происходит достаточно редко.

Ковалентное связывание используется *только* при необходимости образования прочных (неразъёмных) структур. *Вместо* ковалентного связывания обычно используется *комбинация водородных связей, электростатических* взаимодействий между заряженными атомами и *гидрофобные* взаимодействия.

7.4. Примеры реализации молекулярного узнавания при формировании биоструктур

В природных белковых ассоциатах интерфейсные поверхности демонстрируют широкий набор способов решения проблемы молекулярного узнавания.

Приблизительно *треть белок-белковых интерфейсов* имеет *классическое* устройство и стабилизируется силами, подобными тем, которые используются при стабилизации третичной структуры белка во время белкового фолдинга. В центре интерфейсов расположены *гидрофобные* участки, зачастую изогнутой формы. Когда две субъединицы ассоциируются в димер, эти области обеспечивают гидрофобную стабилизацию и соответствующее понижение энергии, которое ведет к димеризации. Интерфейсы имеют форму, которая обеспечивает спаривание *только необходимых* пар белков. *Вокруг* этой гидрофобной области располагается *кольцо водородных связей и электростатических межбелковых взаимодействий*, обеспечивающих "стыковку" периметров интерфейсов. Часто отдельные молекулы воды также участвуют в образовании водородных мостиков между двумя белками.

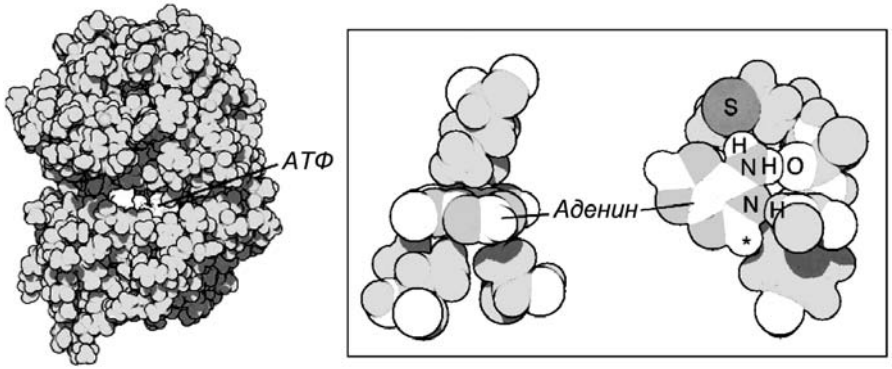
Другие белки демонстрируют *меньшую определённость* в конструкции интерфейсов, которые в этом случае представляют собой *чередующиеся области* (лоскутное одеяло) гидрофобных участков, участков водородных связей и мостиков из молекул воды. Только точное соответствие таких мозаик двух взаимодействующих интерфейсов обеспечивает межмолекулярное узнавание.

Аналогичные принципы используются и при *распознавании малых молекул белками*. Вследствие малости размера этих молекул во взаимодействии участвует меньше атомов белка, но это же обеспечивает и более сильное взаимодействие.

Обычно центры связывания лигандов расположены *в глубоких* "*карманах*" или *полностью погружены* в белок и становятся доступными только вследствие конформационных смещений доменов белка, открывающих и закрывающих центр связывания. Эти карманы устроены так, чтобы распознавать *только данную молекулу*, используя систему водородных связей и гидрофобные карманы, которые точно соответствуют химическому строению и форме лиганда.

Пример такого распознавания аденина ферментом протеин-киназа А приведен на рисунке 143.

Бионаномашины, которые используют нуклеотиды аденина, *должны распознавать адениновые кольца*, и, в то же время, не допускать связывание *гуаниновых* колец, которые подобны адениновым по химическим параметрам и также наличествуют в цитозоле в большом количестве. Эта задача решена *сочетанием* тщательного *расположения* водородных связей со "стратегическим" физическим *блокированием*.



а *б*

Рисунок 143 – Молекулярное распознавание аденина: *а* – протеин-киназа А, *б* – сайт связывания аденина цАМФ

Аденин-связывающие центры обычно являются глубокими, узкими *карманами*, которые сконструированы так, чтобы соответствовать молекулам имеющим форму диска. Дополнительные функциональные группы, обеспечивающие формирование водородных связей, расположены вдоль *краев* этого кармана и выполняют функцию *сенсора*, информирующего о том, что активный центр занят нужной молекулой. Но эти водородные связи не исключают связывания молекулы гуанина.

Для селекции используется другой подход. У гуанина есть *аминогруппа*, которой нет у аденина. Внутри активного центра один или несколько атомов белка занимают то место, которое необходимо было бы для идеальной подгонки гуанина, и гуанин просто *не помещается* в карман, так как это делает аденин.

Специфическое структурное блокирование такими *специальными блокирующими группами атомов* обеспечивает молекулярное узнавание аденина.

На рисунке 143 представлена схема *протеин-киназы А*. Циклический аденозин монофосфат (цАМФ) – это одна из основных сигнальных молекул клетки (рисунок 144).

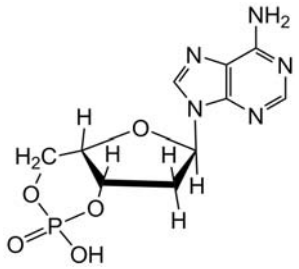
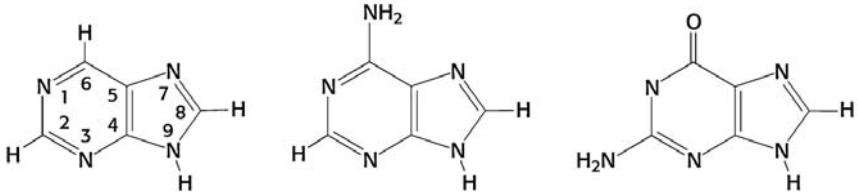


Рисунок 144 – Схема молекулы цАМФ

Несколько гидрофобных аминокислот *цАМФ-зависимой протеин-киназы* формируют *плоский карман*, в который входит плоская молекула аденина. Внутри кармана формируются водородные связи N–H–S и N–H–O. Прямо напротив атома С2 (отмечен звездочкой "*" на

рисунке 143(б)) расположен тирозин, который *блокирует* связывание с гуанином. У гуанина к углероду в позиции С2 присоединена аминогруппа (рисунок 145), которая просто не поместится в карман из-за блокирующего тирозина.



а *б* *в*

Рисунок 145 – Схемы пуринов: *а* – пурин, *б* – аденин, *в* – гуанин

Специфическое блокирование может быть использовано для недопущения связывания нежелательных (но подобных данной) молекул, "габариты" которых *больше*, чем у данной молекулы.

Селективность связывания малых молекул. Гораздо интереснее разобраться, как удаётся избежать связывания с молекулами, чьи размеры *меньше* размеров той молекулы, для которой сформирован центр распознавания, или же с молекулами, которые формируют слегка *отличную* систему водородных связей. В этих случаях энергия взаимодействия будет меньше, поскольку число связей будет меньше, но этого может быть недостаточно для того, чтобы гарантировать связывание только с определённой молекулой. Это представляет собой существенную проблему в бионанодизайне.

Пруфридинг. В некоторых случаях эта проблема решается соответствующим "*пруфридингом*" (*proofreading*, корректура) – исправлением ошибок, которое производится уже после связывания молекулы.

Такую задачу решают ферменты, которые присоединяют аминокислоты к соответствующим тРНК, – аминоацил-тРНК-синтетазы.

Фермент *лейцил-тРНК-синтетаза* присоединяет аминокислоту лейцин к соответствующей тРНК.

Активный центр синтетазы, который катализирует присоединение лейцина к соответствующей тРНК, имеет небольшой карман, в который идеально входит *четырёхуглеродный* радикал *лейцина*, позиционируя лейцин нужным образом для присоединения к тРНК (присоединяющий центр на рисунке 146).

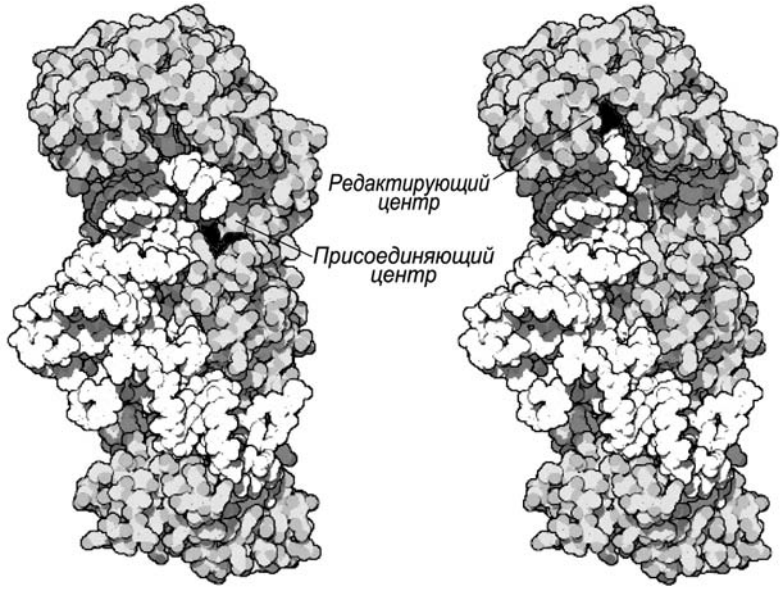


Рисунок 146 – Компоненты пруфридинга лейцил-тРНК-синтетазы

Однако *трёхуглеродный* радикал *валина* тоже подходит к этому присоединяющему активному центру и в 1 из 200 случаев валин связывается с присоединяющим центром фермента.

Проблема пруфридинга решается с использованием *второго* активного центра, отделяющего аминокислоту от фермента, – *редактирующего центра*, – который также представляет собой небольшой карман, и в который идеально встраивается *валин*, но не вписывается *лейцин*.

Такой *двухцентровый* (или двухкарманный) механизм пруфридинга устраняет неверное связывание молекул, и в 10 раз повышает надежность работы синтетазы.

Пруфридинг также используется в генетических процессах белкового синтеза для того, чтобы повысить надежность этого синтеза. Примером может быть работа ДНК-полимеразы.

ДНК-полимераза копирует генетическую информацию, разделяя нити ДНК и синтезируя новые, дочерние нити. Каждое новое присоединяемое азотистое основание должно *точно* соответствовать матричному основанию: аденин всегда спаривается с тимином, а цитозин – с гуанином. Такой процесс должен происходить с высокой точностью, хотя "правильное" спаривание всего лишь слегка более энергетически выгодно, чем "неправильное". ДНК-полимераза использует этап пруфридинга для повышения точности синтеза.

В ДНК полимеразе (также как и в аминоацил-тРНК-синтетазах) есть *два* активных центра. *Первый* контролирует пространственное расположение и соответствие матричной цепи каждого следующего нуклеотида и катализирует синтез сахарофосфатной связи между новым нуклеотидом и уже синтезированным участком цепи ДНК. После окончания "работы" первого активного центра *второй* активный центр *оттягивает* это последнее нуклеиновое основание, пытаясь оторвать его от синтезированной двойной цепи ДНК. Если связь нового основания недостаточно прочная – второй активный центр отрывает его и удаляет. Такой *дополнительный этап* устраняет нестандартное спаривание и в тысячи раз увеличивает точность матричного синтеза.

7.5. Роль атомной дискретности в структуре биомолекул

Макроскопические механизмы могут быть сконструированы с высокой точностью. Сочленяемые детали могут быть подогнаны друг к другу идеально, часто с допусками в диапазоне *микрометров* (микронов), то есть абсолютная величина погрешности при изготовлении деталей

(~ 10^{-6} м = 1 мкм) в миллионы раз меньше линейных размеров самих деталей (~ 1 м). А это в свою очередь позволяет использовать колоссальный *диапазон размеров* при конструировании машин, и очень большой и разнообразный набор сочленяющих устройств.

При сочленении узлов макромашин используют болты, заклёпки, шпильки и другие соединители. Подвижные части механизмов включают оси, шарниры, шестерни и т. д.

Информация в макроинженерии хранится, используя изменения цвета материала (типографская печать), или магнитных свойств малых частиц (все магнитные носители), или физически, с помощью небольших насечек и выпуклостей (от клинописи до лазерных дисков).

Для *молекулярных конструкций* такой уровень точности принципиально недостижим. Наномашины должны быть собраны *из отдельных атомов*, каждый из которых можно представлять в виде сферы, и эти атомы соединяются во вполне определённые геометрические структуры по законам образования ковалентных связей и нековалентных взаимодействий.

Для иллюстрации проблем, возникающих при попытке "точно" позиционировать элементы системы на атомном уровне, рассмотрим схематический пример "решения" задачи распознавания "малого" атома наномашиной, состоящей из "больших" атомов (рисунок 147).

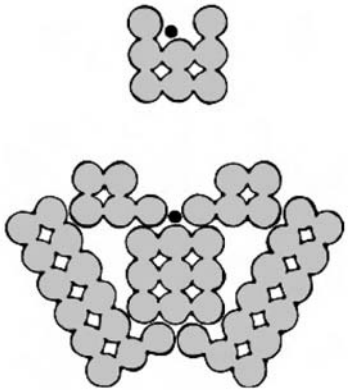


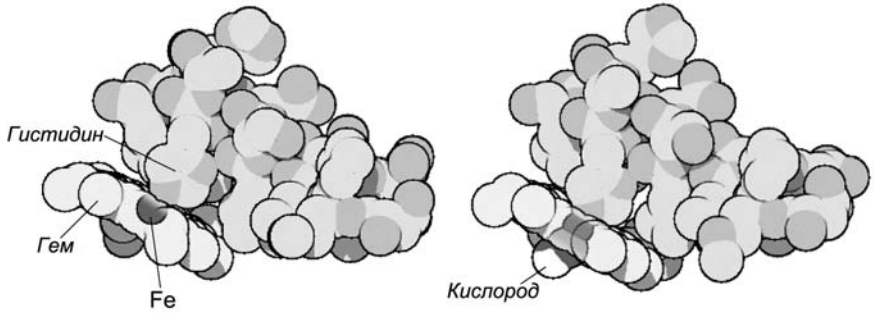
Рисунок 147 – Ограничение точности бионаномашин их атомной структурой

В верхней части рисунка в виде сечения квадратной атомной решетки изображен активный центр, который не может обеспечить достаточную точность в распознавании "малого" атома, изображённого черной точкой. Для формирования активного центра необходимо использовать намного более громоздкую конструкцию (на рисунке 147 внизу), которая и позволяет нужным образом позиционировать несколько атомов активного центра в пространстве.

В бионаномашинах *взаимодействующие поверхности всегда грубые, бугристые* (в наномасштабе, конечно), поскольку молекулярные структуры не могут быть сконструированы так, чтобы обеспечить идеальное, бесшовное, взаимодействие поверхностей.

Например, рассмотрим некую конструкцию из углеродных атомов с решеткой типа алмаза. Атомность решетки ограничит предел точности размерами порядка 1 Å = 10^{-1} нм, но не выше. Такое ограничение в подгонке молекулярных деталей наномашины *ограничивает* и *точность* любого *распознавания и сенсорики*.

Тем не менее, природные бионаномашины добиваются гораздо бóльшей точности в *ключевых* узлах своей структуры. Фолдинг белка способен разместить в пространстве десятки атомов в идеально точных пространственных положениях, как, например, в случае *молекулы гемоглобина* (рисунки 148, 149).



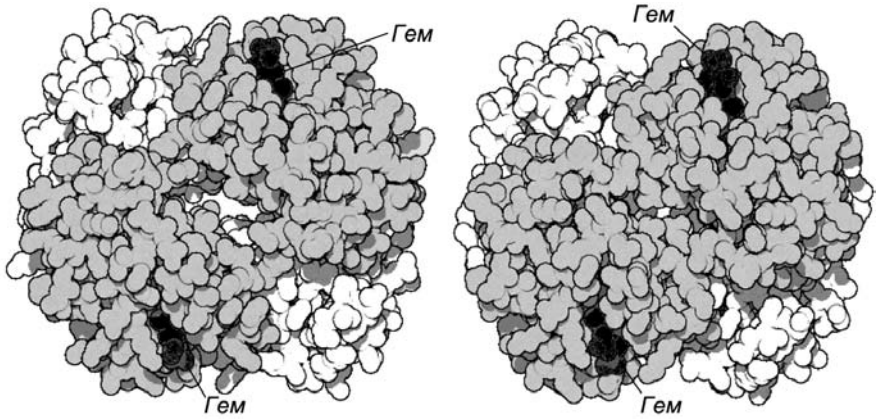
а *б*

Рисунок 148 – Смещение атома железа в геме гемоглобина: *а* – гем без кислорода, *б* – гем с присоединённой молекулой кислорода

Функциональные особенности гемоглобина будут обсуждаться в гл. 10. Сейчас лишь отметим, что связывание кислорода одним из четырёх гемов приводит к смещению всего на 0,5 Å соответствующего атома железа из плоскости гема (рисунок 148).

Соседний *гистидин* чувствует это смещение и передает его всему остальному четырёхсубъединичному белковому комплексу гемоглобина, превращая небольшое смещение одного атома в конформационный переход всей белковой макромолекулы.

На рисунке 149(а) показана схема гемоглобина без кислорода, а на рисунке 149(б) – с кислородом. Оксигенизированная форма гемоглобина более сжата, субъединицы смещены навстречу друг другу.



а *б*

Рисунок 149 – Конформации гемоглобина при связывании молекулы кислорода: *а* – гемоглобин без кислорода, *б* – оксигенизированный гемоглобин

Оптимизированные эволюцией белки *вовсе не всегда* нуждаются в высокой точности позиционирования в пространстве всех аминокислот белка. Напротив, они оптимизированы так, чтобы *только в нескольких* определённых *критических* местах их структуры атомы располагались в точных пространственных позициях.

Остальной объём белковой глобулы используется как некая инфраструктура, с достаточно произвольной и, в некоторых случаях, даже рыхлой, разупорядоченной структурой, служащая только для того, чтобы точно сформировать интерфейсные участки – точно расположить в пространстве компоненты этих участков.

Это одна из основных проблем при конструировании белков: *предугадать нужный баланс множественных взаимодействий, которые стабилизируют структуру белка, при котором и образуется эта локальная точность в пространственном расположении нескольких "нужных" атомов в активном центре.*

Природные бионаномашины комбинируют стабильные глобулярные структуры, в которых точность подгонки молекулярных фрагментов не задана жёстко, с несколькими локальными участками биомолекулы, в которых реализуется заданный высокий уровень точности пространственного позиционирования атомов.

Эволюционный метод отбора является идеальным для создания подобных бионаномашин, структура которых сочетает в себе следующие свойства:

1) стабильная глобулярная структура с неопределённой (произвольной) точностью расположения атомов;
2) несколько локальных участков, в которых выдерживается высокая точность позиционирования атомов.

7.6. Использование структурной гибкости биомолекул

Большинство *макроскопических* технологий основывается на использовании *жёстких и прочных* узлов, выполненных из металла, пластика или других материалов, которые сопротивляются деформациям. *И уже потом*, если для работы макромашины необходимы гибкие участки, то при конструировании *в состав механизмов включаются* шарниры, пружины, рессоры или другие локально гибкие компоненты, которые соединены с жёсткими деталями.

Большинство молекулярных нанотехнологий, поскольку они исторически произошли из макротехнологий, используют такой же подход, в котором жёсткие компоненты связаны между собой мобильными связями или шарнирами.

Природные бионаномашины, сформированные в результате трёх миллиардов лет эволюции, напротив, *исходно*, первоначально *гибкие*.

Эволюционное совершенствование существующих сегодня бионаномашин было начато с прямо *противоположных* стартовых условий – сначала создавались гибкие, мобильные структуры, а затем, по мере необходимости, эволюция встраивала в эти структуры участки с необходимым уровнем жёсткости для выполнения специфических функций.

Гибкость и подвижность – это ключевое качество, которое закладывается в конструкцию биомолекул. Множество биологических процессов, которые осуществляют биомолекулы, и в частности ферментативный катализ, происходят, когда биомолекулы находится в такой конформации, которая существенно отличается от равновесной с минимальной свободной энергией.

Бионаномашины по принципу конструкции скорее можно сравнить с резиновой шиной колеса автомобиля или с ювелирными ожерельями, чем с точно изготовленными макромеханизмами, в которых есть оси и подшипники.

Гибкость является ценным качеством биомолекул, обеспечивающим "нежность" в функционировании и эластичность, которые и являются отличительным признаком живой жизни. Однако это создает большую проблему, когда мы пробуем разработать бионаномашины, в которых используется гибкость.

Биомолекулы используют гибкость на всех уровнях. Биомолекулярные объекты демонстрируют гибкость на всех уровнях и во всем диапазоне размеров от атомного уровня и до уровня макромолекулярных ассоциатов.

На нижайшем, атомном, уровне в результате тепловых колебаний длина межатомных связей и углы между связями все время флуктуируют.

Эти *флуктуации* могут играть решающую роль в химических реакциях, катализируемых ферментами.

Временное *ослабление* химической *связи* вследствие, например, её растяжения в данный момент, ускоряет химическое преобразование, или небольшое *искажение* в данный момент *угла* между связями может облегчить переход к другой конформации молекулы.

Движение боковых цепей, петель, или целых доменов на поверхности биомолекул активно используется в молекулярном узнавании. Такое "поведение" получило название "*индуцированное соответствие*", поскольку поверхность одной молекулы конформирует, "подстраивается" под топологию партнёрской молекулы. Индуцированное соответствие позволяет связывающему центру буквально окружить, облечь, связываемый лиганд.

Локальные изменения в расположении боковых цепей белковой нити могут увеличить связывание лиганда, а движение домена целиком может вообще окружить лиганд со всех сторон, отгораживая его от воды и погрузить его в полностью гидрофобную среду.

Например, в термолизине (рисунок 150) аминокислота тирозин играет роль ворот, которые открыты, и которые закрываются, когда субстрат связан с ферментом.

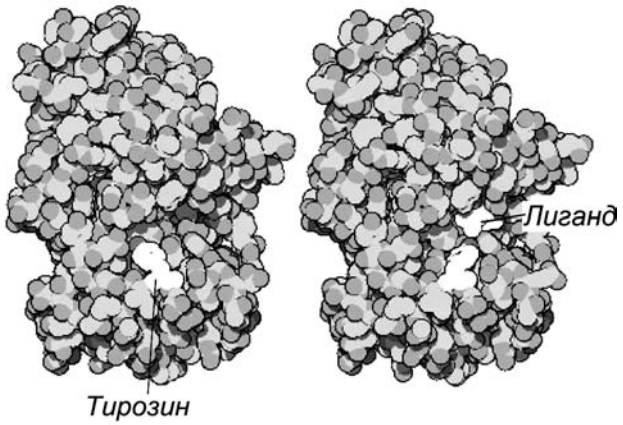


Рисунок 150 – Индуцированное соответствие на примере термолизина

Аденилат-киназа (рисунок 151) смыкается вокруг субстрата, отгораживая его от воды. В реакции фосфорилирования фосфат переносится от АТФ к АМФ.

Если бы во время этого переноса в активном центре присутствовала молекула воды, то фосфат с легкостью бы присоединился к ней, и фосфорилирования АМФ не произошло. Активный центр аденилат-киназы устроен таким образом, что он активизируется только после того, когда различные домены фермента смыкаются, вытесняя воду из реакционной области.

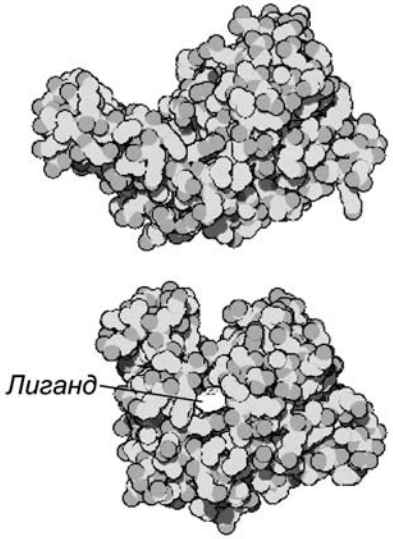


Рисунок 151 – Индуцированное соответствие на примере аденилат-киназы

В стабильных глобулярных белках существует "*дыхательное*" *движение* (*breathing motion*), при котором все α-спирали и β-листы смещаются друг относительно друга постоянно разрывая и формируя водородные и другие связи.

Такие дыхательные моды очень важны для, например, *облегчения диффузии субстратов* при их погружении в активные центры.

Глядя на молекулярную структуру гемоглобина (рисунок 149) создаётся впечатление, что кислород никак не сможет "пробраться" к центру связывания вблизи атома железа. Но именно дыхательные моды гемоглобина обеспечивают открытие тех небольших каналов в теле гемоглобина, через которые и диффундирует кислород к гему.

Многие белки состоят из нескольких относительно жёстких доменов, которые *соединены* между собой *гибкими линкерами*. Эти белки изгибаются, и "открываются", и "закрываются" подобно раковинам моллюсков. Гибкие линкеры играют важную роль в функционировании мультидоменных белков, в частности тех, которые задействованы в системах регуляции внутриклеточных процессов и в связывании с большими объектами.

Например, многие *молекулы иммунной системы* состоят из нескольких связывающих доменов, показанных на рисунке 152 звездочками (*), которые соединены между собой гибкими линкерами.

Две CD молекулы (CD4 и CD8) выходят за пределы поверхности клетки иммунной системы. Для эффективного связывания этих рецепторов с соответствующими эпитопами чужеродных клеток сами молекулы CD должны быть гибкими.

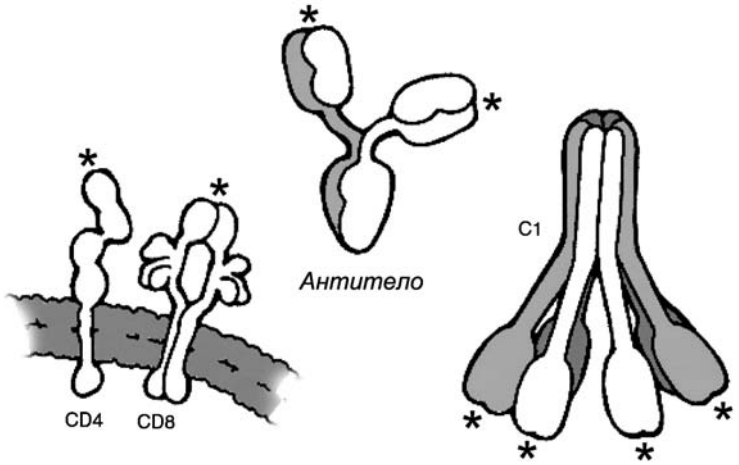


Рисунок 152 – Использование гибкости при связывании с биообъектами

Другой пример: *антитела* и C1-*белки* имеют несколько центров узнавания связанных вместе. Образование таких "пучков" рецепторов позволяет *одновременно присоединяться* к *нескольким эпитопам* на поверхности антигена, тем самым усиливая, упрочняя контакт.

Примерами использования гибких линкеров могут служить:

- связывание клеток иммунной системы с клетками-мишенями;
- связывание белковых факторов с ДНК в системах регуляции экспрессии генов.

В этих случаях линкеры используются для присоединения специфических участков молекул к сигнальным элементам, которые в свою очередь взаимодействуют с соседними молекулами. Такие линкеры содержат *специфические аминокислотные последовательности* обычно насыщенные глицином и пролином, что уменьшает вероятность фолдинга в стабильные глобулярные структуры.

И, наконец, *многокомпонентные ассоциаты* могут "*переключаться*" *между* несколькими специфическими *конформациями*, каждая из которых имеет собственные функциональные свойства. В ферментах это называется аллостерической модификацией и широко используется для регуляции ферментов. Аллостерия более подробно будет рассмотрена в п. 10.4.

Многокомпонентные белковые переключатели широко используются также *в вирусах* для переходов *между компактными* стабильными структурами, в которых вирусы существуют вне клетки и в которых происходит инфицирование клеток, *и более открытыми* структурами, которые принимают вирусы после проникновения в клетку.

Движения, сопровождающие такие переключения, зачастую включают структурные переключения с участием доменов, соединённых гибкими линкерами, подобными переключателям, используемым в квазисимметричных ассоциатах.

Биомолекулы могут "*намеренно*" *повышать степень жёсткости*, чтобы снизить энтропию до уровня необходимого в процессе самоассемблирования или при функционировании.

Как отмечалось выше (п. 6.1), термостабильные белки создаются методом упрочнения их поверхности, фиксации поверхностных петель, то есть повышением степени жёсткости (или снижением гибкости) поверхностных участков глобулы. Это приводит к ингибированию процесса расплетания белкового клубка.

Еще один яркий пример использования *жёстких структур* – *планарная пептидная связь* между аминокислотами в полипептидной цепи. Жёсткость пептидной связи в сочетании с определённым набором возможных взаимодействий прилегающих к ней аминокислот ограничивает гибкость белковой цепи и делает энергетически выгодным образование только нескольких фиксированных вторичных структур, таких как α-спирали и β-листы. А это, в свою очередь, *критически важно* для реализации "правильного" фолдинга и ассемблирования белков, поскольку ограничивает число возможных конформаций этих сложных молекул.

Нити *нуклеиновых кислот* гораздо более гибкие по сравнению с белковыми нитями, но на формирование пространственной структуры нуклеиновых кислот оказывает большое влияние "*стэкинг*" плоских нуклеиновых оснований.

Именно *сочетание* стэкинга нуклеиновых оснований с их специфическим спариванием (например, в уотсон-криковские пары) и *ограничивает* диапазон возможных конформаций нуклеиновой кислоты.

Гибкость при конструировании бионаномашин. Использование гибкости и подвижности на всех уровнях организации бионаномашин добавляет соответствующие многоуровневые движения в бионаномашине, как в системе.

Это, с одной стороны, *усложняет* эту систему, но, с другой стороны, использование гибкости создаёт *дополнительные возможности для оптимизации* функций бионаномашины.

Однако гибкость добавляет дополнительные *проблемы при разработке бионаномашин*. Разработчику необходимо кроме определения стабильной равновесной структуры молекулы *предвидеть также и все*

типы дыхательных и изгибающих движений, и торсионных кручений молекулы.

В то же время, эволюционный подход к такому конструированию (имеется ввиду естественный отбор) идеально приспособлен для решения такой конструкторской задачи. Небольшие модификации уже существующих структур внедряются шаг за шагом, что закрепляется в появляющихся оптимальных структурах. Таким методом можно создать даже такие биоструктуры, которые невозможно рассчитать заранее (при разумных затратах усилий).

Биомолекулярная гибкость будет как порождать возможно самые трудноразрешимые проблемы, так и создавать потенциальные преимущества и перспективы в бионанотехнологии.

Таким образом, гибкость используется на всех уровнях для улучшения функциональности бионаномашин. Сюда входит использование теплового движения для интенсификации биокатализа, использование индуцированного соответствия для молекулярного узнавания, конструирование различных конформационных состояний для использования в процессах регулировки, использование селективной гибкости для соединения нескольких различных функциональных узлов (доменов).

Контрольные вопросы и задания

1. Почему молекулярная давка ускоряет ассоциацию молекул в макромолекулярные комплексы?
2. Как молекулярная толчея влияет на скорость ферментативных реакций?
3. Чем самоорганизация отличается от самоассемблирования?
4. В какие структуры самособираются липиды?
5. Перечислите основные свойства липидных бислоёв.
6. Как фазовое состояние липидного бислоя определяет свойства биомембран?
7. Какие структурные особенности мембранных белков обеспечивают их самовстраивание в липидные структуры?

8. Как атомная гранулярность компонентов бионаномашин ограничивает диапазон возможных конструкционных решений?
9. Почему множественность слабых парных взаимодействий обеспечивает более эффективное молекулярное узнавание?
10. Что такое геометрическая комплементарность?
11. Что такое химическая комплементарность?
12. Как устроены классические белок-белковые интерфейсы?
13. Как функционируют интерфейсы типа "лоскутного одеяла"?
14. В каких случаях удобно использовать метод специфического структурного блокирования для обеспечения специфичности связывания белка с лигандом?
15. Что такое пруфридинг применительно к молекулярному распознаванию?
16. Почему атомная дискретность ограничивает диапазон допусков при конструировании бионаномашин?
17. Как в природных бионаномашинах реализуется точная пространственная ориентация компонентов межмолекулярных интерфейсов?
18. Почему сочетание стабильности белковой глобулы с точным пространственным позиционированием функционально важных аминокислот является одной из основных проблем при конструировании белков?
19. Как эволюционный метод отбора обеспечил сочетание стабильности глобулярной структуры с точным расположением атомов в локальных участках природных бионаномашин?
20. Как структурная гибкость биомолекул может облегчить протекание ферментативных реакций?
21. Каким образом структурная гибкость и подвижность биомолекул используется в белковых переключателях?
22. Для чего в природных бионаномашинах используется повышение структурной жёсткости?
23. Какие преимущества и проблемы создает использование структурной гибкости и подвижности при конструировании бионаномашин?

Раздел 3
Функциональные принципы бионанотехнологии

Глава 8
Информационно-управляемое наноассемблирование

8.1. Информационно-управляемое ассемблирование бионаномашин

Сам факт того, что инструменты, которые создала природа (рибосомы, ферменты, ДНК) постоянно функционируют в живой клетке, позволяет нам в настоящее время пытаться создавать работающие бионаномашины. Но сразу же возникает вопрос, *с чего начать*?

Можно придумать массу воображаемых применений нанотехнологии, но спроектировать *функциональную* бионаномашину – это представляется труднопреодолимой проблемой.

К счастью природа снабдила нас множеством примеров, которые помогают решить эту задачу функционального конструирования в наномасштабе. *Нанофункциональность* – это как раз та область, в которой эволюция достигла превосходных результатов. Мы можем обнаружить природные бионаномашины, которые выполняют практически все

мыслимые *функции*. В клетке мы можем найти *работающие* ассемблеры, сенсоры, моторы, целые конвейеры, жёсткие и эластичные материалы, адгезионные материалы и этот список можно продолжать бесконечно. И что примечательно, всё это создано с использованием *ограниченного* набора "строительных модулей".

Сложность природных бионаномашин поражает воображение. Поскольку они были созданы эволюционным образом, они имеют непривычную для нас органическую архитектуру, для которой не характерны чёткие обводы привычных нам макромашин. Но множество базовых функций бионаномашин можно свести, в конце концов, к *надлежащему позиционированию в пространстве* всего лишь нескольких ключевых атомов.

А для функциональности всё равно, каким образом она будет достигнута: либо используя кристаллическую решетку (наподобие алмазной), либо используя белковую архитектуру – в обоих случаях функция, выполняемая этими несколькими функциональными атомами, будет одинаковой.

Ассемблирование, синтез, строительство, которое управляется определённым образом *организованными* данными, то есть информацией, являются фундаментальным признаком любой технологии. Успешность любой технологии определяется нашей способностью организовать, ассемблировать исходные материалы в конечный продукт, руководствуясь определёнными *наборами инструкций* – компьютерными программами, сборочными чертежами, технологическими картами и регламентами – теми информационными пакетами (той проектной документацией), которые разрабатываются до начала собственно применения технологии.

Эти информационные пакеты собственно и определяют последовательность использования более-менее стандартных ассемблеров (инструментов, станков, другого оборудования) для достижения нужного результата. Иначе нам бы пришлось для каждого технологического процесса создавать уникальный ассемблер (оборудование), что непомерно бы удорожало практическую реализацию новых методов или устройств.

Если же *изначально разработать и создать* те универсальные ассемблеры, работу которых можно программировать с помощью соответствующих наборов инструкций (*информацинно-управляемые ассемблеры*), то дальнейшее использование таких ассемблеров сводится просто к написанию соответствующих информационных пакетов.

Этот принцип используется везде в макроинженерии. Тысячи различных зданий могут быть построены из стандартного набора кирпичей и балок с помощью чертежей. Компьютеры и прочие радиоэлектронные устройства конструируются по принципиальным и монтажным схемам из стандартных электронных деталей.

Молекулярная нанотехнология надеется создать ассемблер, который сможет, основываясь на заранее составленной программе, непосредственно соединять атомы друг с другом, "прижимая" их соответствующим образом.

Вся жизнь на Земле, равно как и большинство бионанотехнологий, связаны с ассемблерами, которые синтезируют белки *по тем инструкциям, которые записаны и хранятся в ДНК*. Эти ассемблеры – *рибосомы* – синтезируют белки любой длины и любого состава, основываясь на наборе инструкций, записанном генетическим кодом. Информационно-управляемый синтез белков является чрезвычайно сложным процессом, требующим согласованного действия сотен наномашин.

Клетки содержат наборы "инструментов" для хранения, изменения (редактирования), копирования (дуплицирования) и восстановления повреждённых "чертежей", и молекулярные устройства для использования (чтения) этой информации для синтеза белков. Вся эта система работы с генетической информацией настолько надежна, что её можно изъять из клетки, и она будет успешно осуществлять синтез белков под нашим контролем.

С другой стороны, сами клетки могут быть изменены таким образом, чтобы они использовали существующие в них биосинтетические системы для синтеза необходимых нам белков. В любом случае, созданная природой система биосинтеза белков позволяет нам конструировать искусственные бионаномашины.

8.2. Информационная функция нуклеиновых кислот в ассемблировании бионаномашин

"Технологические инструкции" для процесса биосинтеза белков хранятся в молекулах ДНК. Информация закодирована последовательностью *четырёх* азотистых оснований. Генетический код очень прост и универсален.

Для примера рассмотрим малый белок *инсулин* (GenBank Accession: J00265.1; GI: 186429). Молекула инсулина содержит две полипептидные цепи A и B, соединённый дисульфидными мостиками (см. рисунок 125).

Фрагмент генома человека, в котором закодирован инсулин показан на рисунке 153. Он содержит два участка (2) и (5), кодирующих две полипептидные цепи, входящие в молекулу инсулина, разделенные некодирующим сегментом.

Рисунок 153 – Фрагмент генома человека с участками, кодирующими инсулин

Первоначально каждая из цепей синтезируется более длинной: первая полипептидная цепь содержит участки (1), (2) и (3), вторая – участки (4) и (5). Участок (1) является временной адресной последовательностью (сигнальный пептид), которая направляет инсулин в секреторную систему клетки, выводит его за пределы клетки, и затем удаляется (см. [13], п. 8.1). Средний фрагмент, образующийся из участков (3) и (4) необходим для правильного самоассемблирования инсулина. Этот участок вырезается после завершения фолдинга. Финальный TAG-кодон участка (5) является стоп-кодоном. Функциональная молекула инсулина, содержащая две полипептидные цепи, показана на рисунке 127.

Процесс переноса генетической информации универсален для всех организмов на Земле. Генетическая информация переносится *с одной* нити нуклеиновой кислоты *на другую*, благодаря специфическому взаимодействию нуклеиновых оснований: аденина с тимином (или урацилом) и гуанина с цитозином. Этот перенос информации является *прямым* (без посредников) – нуклеиновые кислоты реплицируются непосредственным выстраиванием комплементарных нуклеотидов вдоль одинарной родительской нити с последующим соединением их в полинуклеотид.

В природных системах перенос информации с одной нуклеиновой кислоты на другую осуществляется ферментами *полимеразами*. Эти ферменты двигаются шаг за шагом вдоль нити нуклеиновой кислоты и подбирают комплементарные нуклеотиды для каждого нуклеинового основания нуклеиновой кислоты, формируя комплементарную нуклеиновую нить.

РНК-полимераза синтезирует РНК-нить по ДНК-матрице (см. рисунок 19). *ДНК-полимераза* синтезирует ДНК-нить по ДНК-матрице.

Некоторые *вирусы* имеют специфические ферменты, которые переносят генетическую информацию нестандартным образом:

- *РНК-зависимые полимеразы* синтезируют РНК-нити по РНК-матрице;
- *обратные транскриптазы* синтезируют ДНК-нити по РНК-матрице.

Для того чтобы полимераза была эффективной, необходимо, чтобы она обладала рядом свойств, главным из которых является *точность* (безошибочность) синтеза комплементарного полинуклеотида. Многие полимеразы чрезвычайно точно осуществляют операцию копирования. Например, бактериальная ДНК-полимераза ошибается примерно один раз на триллион (10^{12}) добавляемых нуклеотидов, и при этом синтезирует новый полинуклеотид со скоростью 1000 нуклеотидов в секунду. Для бактерий это означает приблизительно одну ошибку на тысячу поколений клеток.

В действительности, специфичность стандартного связывания нуклеиновых оснований оказывается намного ниже – только одна ошибка на 10–100 тысяч спариваний. Такое повышение точности синтеза более чем в миллион раз достигается использованием *механизма пруфридинга*.

Работа полимеразы значительно улучшается, если на время синтеза она дополнительно фиксируется на молекуле ДНК специальным *белковым* "*захватом*", например, белком PCMA (*proliferating cell nuclear antigen*) (рисунок 154), который фиксирует на ДНК полимеразу Polδ в репликационной вилке вируса SV40 (см. [7], п. 6.2).

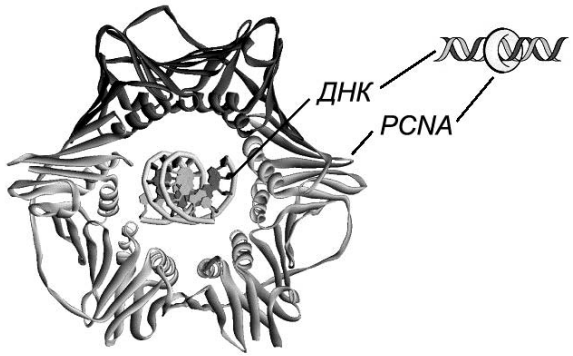


Рисунок 154 – Схема белка PCNA, выполняющего функцию захвата ДНК

Наличие такого "захвата" в 500 000 раз увеличивает безошибочность работы полимеразы по сравнению со случаем, когда такого захвата нет.

Примечательно, что *рибосома* также как и ДНК-полимераза "захватывает" мРНК между малой и большой субъединицами, что позволяет "прочесть" без сбоев всю длину мРНК при синтезе белка.

Все ферментативные "инструменты" для работы с генетической информацией достаточно хорошо исследованы. Большинство из них доступны на рынке биотехнологических продуктов и широко используются в лабораторных исследованиях. В этот набор ферментов входят:

1. **Полимеразы**, которые синтезируют новые нуклеиновые нити по матричным нитям.
2. **Нуклеазы**, которые разрезают нуклеиновые нити. Сюда входят как неспецифические нуклеазы, которые разрезают нити в нескольких неспецифических местах, так и специфические нуклеазы, такие, как *ферменты рестрикции*, которые разрезают нуклеиновую нить только в месте, имеющем определённую нуклеотидную последовательность. *Концевые* мононуклеотиды отщепляются *экзонуклеазами*, расщепление *внутри* полинуклеотидной цепи осуществляется *эндонуклеазами*.
3. **Лигазы**, которые соединяют фрагменты нуклеиновых цепей (катализируют образование фосфодиэфирной связи между крайними нуклеотидами цепей, формируя непрерывный ковалентно связанный сахарофосфатный остов).
4. **Репрессоры, факторы транскрипции, энхансерные белки** и другие **регуляторные белки**, связывающиеся с нуклеиновой кислотой и регулирующие скорость и способ использования генетической информации. Они могут просто физически блокировать одну из нитей, или, напротив, облегчить связывание полимеразы с ДНК, или же модифицировать физическую структуру ДНК (например, сформировать резкий изгиб ДНК).
5. **Вырезающие нуклеазы**, специфические к данному нуклеиновому основанию. Эти ферменты часто специфичны к модифицированным (нестандартным) нуклеиновым основаниям или к тем

нуклеотидам, которые ошибочно вставлены в цепь. Они используются *для коррекции* ошибок синтеза.
6. **Топоизомеразы** разрешают топологические проблемы, которые возникают при манипулировании с длинными молекулами ДНК. Они снимают напряжение в сверхспирализованных молекулах и позволяют "пройти" одной молекуле ДНК через другую ДНК, которая "пересекает" ей путь.
7. **Рекомбиназы** отрезают фрагмент одной нити ДНК и заменяют его подобным фрагментом с другой нити ДНК.
8. **Сплайсосомы** "редактируют" про-РНК, удаляя интроны и соединяя экзоны.
9. **Нуклеосомы** и другие белки *упаковывают ДНК в хроматин* для "длительного хранения" генетической информации.

Именно наличие этих молекулярных инструментов позволило создать *технологию рекомбинантных ДНК*, которая сегодня даёт возможность исследователям модифицировать ДНК и использовать их для создания искусственных белков и для генной инженерии организмов.

Конечно же, при исследовании природных систем всё оказывается не таким простым, как этого можно было бы ожидать.

Генетическая информация с ДНК не обрабатывается непосредственно рибосомой, а используется *промежуточный носитель – мРНК*. Сначала информация копируется (транскрибируется) в РНК, и затем уже эта РНК (непосредственно, как в прокариотах, или после посттранскрипционной модификации, как в эукариотах) используется для синтеза белка рибосомой. С точки зрения конструктора такой промежуточный этап вовсе не является необходимым, однако все живые организмы используют именно такой *двухстадийный* метод экспрессии генов.

Отметим, что в некоторых вирусах *ДНК вообще не используется* – геном хранится в виде РНК, и при размножении вирусов он просто реплицируется.

Возможно, такая двухстадийность является ещё одним примером сохранившейся "памяти" о "*РНК-мире*", который, по мнению некоторых специалистов, предшествовал нынешнему миру ДНК. Генетическая

информация прежде хранилась в РНК, а более стабильная молекула ДНК появилась позднее, когда для хранения всё более усложняющейся генетической информации потребовалась более совершенная система хранения и архивации. Однако эта дополнительная стадия обработки информации обеспечивает возможность *регулирования* процесса биосинтеза белков. Эту возможность широко используют клетки, её также можно различным образом использовать и в бионанотехнологии.

8.3. Рибосома как информационно-управляемый наноассемблер

Информационно-управляемым молекулярным наноассемблером, осуществляющим синтез белка, является рибосома (рисунок 155). Она осуществляет синтез белка согласно информации, записанной в мРНК. Этот процесс является достаточно сложным, поскольку информационный генокод не сводится к химическому коду.

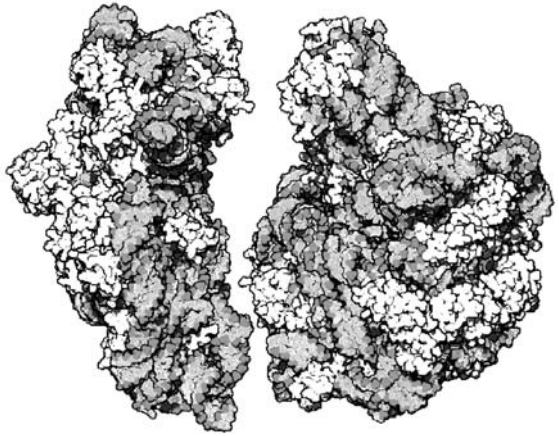


Рисунок 155 – Субъединицы рибосомы; серым цветом выделены рибосомные РНК, белым – рибосомные белки

В процессе *транскрипции ДНК в РНК* используется именно *химический код* – каждое нуклеиновое основание ДНК химически

соответствует соответствующему нуклеиновому основанию РНК. Всё, что требуется от РНК-полимеразы, это "оголить" ДНК-нить и катализировать присоединение нужного нуклеотида к растущей РНК-цепи всякий раз, когда этот нуклеотид образует правильную уотсон-криковскую пару с нуклеиновым основанием ДНК.

Процесс *трансляции*, напротив, *не основан* на химическом взаимодействии между РНК и аминокислотами. Вместо этого используется *перевод* с одного химического языка на другой. Для перевода с одного языка на другой необходимо иметь словарь, в котором собраны соответствия слов одного и другого языков. Во всех клетках таким словарем являются транспортные РНК (тРНК).

L-образные молекулы тРНК (рисунок 156) имеют один участок на одном конце, который распознает информацию в РНК, и другой участок на другом конце, который химически связан с соответствующей аминокислотой (см. [7], п. 4.3).

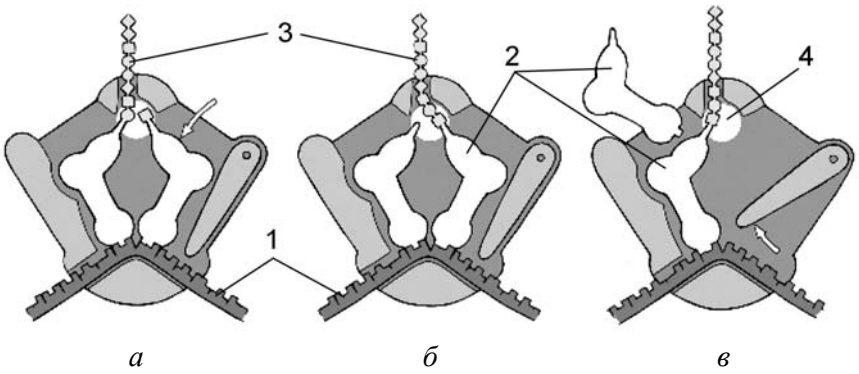


Рисунок 156 – Схема работы рибосомы: *а* – связывание тРНК с кодоном мРНК, *б* – присоединение аминокислоты к растущей белковой цепи, *в* – транслокация рибосомы на один кодон, сброс "пустой" тРНК и экспонирование следующего кодона. 1 – мРНК; 2 – тРНК; 3 – растущая белковая нить; 4 – каталитический центр рибосомы

В природных системах генетический код является *последовательным, непрерывным и триплетным*. Кодон из *трёх* нуклеотидов обозначает одну из 20 аминокислот, несколько кодонов соответствуют

командам "старт" и "стоп". Кодоны располагаются *непрерывно* и *последовательно* вдоль РНК без "пробелов". Код является *вырожденным*, поскольку более чем один кодон соответствует аминокислоте. Как будет показано ниже (п. 14.2), модификация генетического кода уже сейчас используется для нанотехнологических нужд.

Рибосома является очень сложной бионаномашиной с множеством подвижных частей. Она *охватывает* нить мРНК и *перемещается* вдоль РНК шаг за шагом, сдвигаясь при каждом шаге на один кодон. Для каждого кодона она "*подбирает*" соответствующую ему тРНК (рисунок 157).

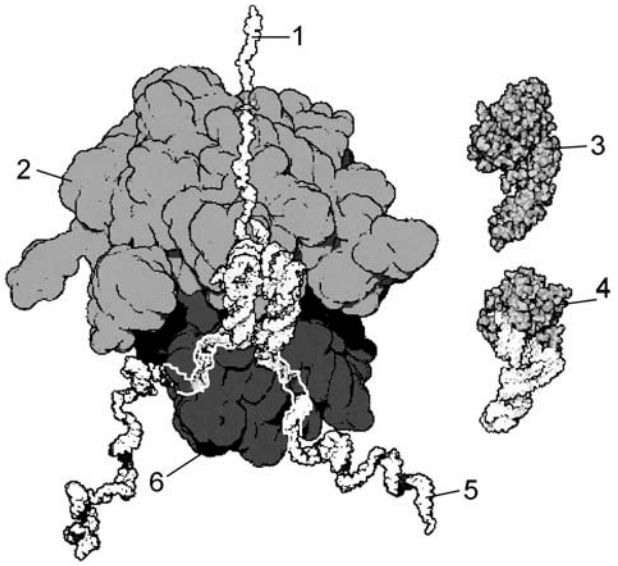


Рисунок 157 – Некоторые молекулярные компоненты белкового синтеза: 1 – растущая белковая нить; 2 – большая субъединица рибосомы; 3 – белковый фактор элонгации G (выполняет функцию рычага на рисунке 6); 4 – белковый фактор элонгации Tu доставляет новую тРНК к рибосоме; 5 – мРНК; 6 – малая субъединица рибосомы

После этого рибосома *катализирует* образование пептидной связи между аминокислотой, которая находится на противоположном конце "подходящей" тРНК, и растущей белковой цепью. Схематически процесс

наращивания белковой цепи показан на рисунке 156. Процесс биосинтеза "обслуживается" десятками белков, которые *инициируют* её начало, *стимулируют* элонгацию, и *терминируют* трансляцию в конце гена. Атомная схема строения рибосомы демонстрирует, как приблизительно должен выглядеть такой молекулярный ассемблер, предназначенный для создания молекул с атомной точностью в соответствии с заданной программой (рисунок 157).

Рибосомный комплекс является одной из самых сложных природных бионаномашин, всё ещё не до конца изученный, поскольку он состоит главным образом из РНК, а не из белков. Но он обладает всеми свойствами, которые необходимы для биосинтеза белков.

Малая субъединица имеет "захват", который закрепляет и позиционирует её на мРНК. РНК проходит сквозь проход между двумя субъединицами, обеспечивая последовательный синтез от начала до конца мРНК.

Синтез пептидной связи осуществляется в *активном центре*, хотя при этом и используются химические группы РНК, а не аминокислот, как в ферментах. Использованные тРНК *удаляются* из рибосомы факторами элонгации G, которые механически (используя энергию гидролиза АТФ) выталкивают тРНК, сдвигая рибосому на один кодон (рисунок 156(в)).

Для каждой аминокислоты имеется специфический фермент *аминоацил-тРНК-синтетаза*, который присоединяет эту аминокислоту к соответствующей тРНК (рисунок 158).

Рибосомы осуществляют синтез белков *с высокой точностью*, хотя и не с такой высокой, как работают полимеразы, перенося информацию между нуклеиновыми кислотами.

В бактериях рибосома ошибается 1 раз на 2000 аминокислот, то есть один из четырёх белков средней длиной 500 аминокислот синтезируется с ошибкой. Однако большинство таких *миссенс*-ошибок не являются радикальными, поскольку большинство точечных мутаций в белках только незначительно влияют на функции белков (см. [7], п. 4.2).

Более опасными являются *ошибки трансляции*, при которых происходит преждевременная *терминация* трансляции (*нонсенс*-ошибки).

В бактериях частота таких преждевременных терминаций составляет один на 3000 кодонов, поэтому синтез *каждого седьмого* белка (средней длины) прерывается до того, как его полипептидная цепь будет синтезирована окончательно. И чем длиннее белок, тем сложнее довести до конца синтез его полипептидной цепи.

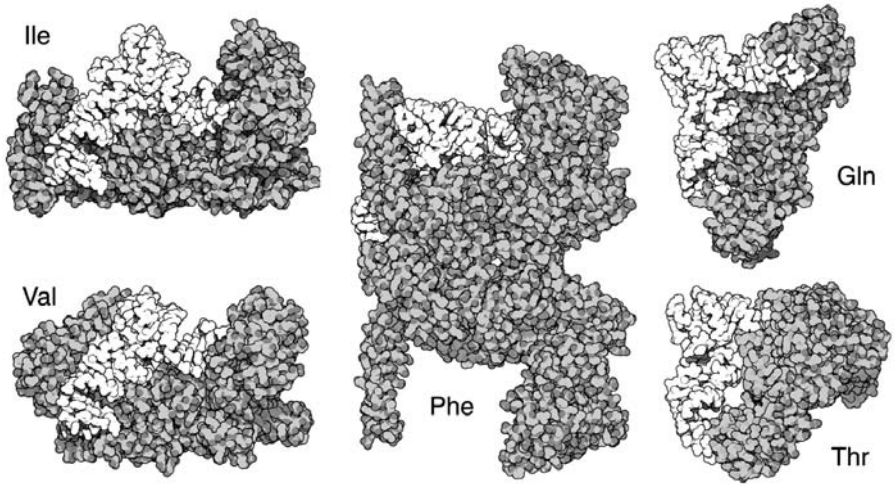


Рисунок 158 – Пять из двадцати аминоацил-тРНК-синтетаз (тёмно-серые), используемых в процессе биосинтеза белков – для изолейцина, валина, фенилаланина, глутамина и треонина. Светло-серые субъединицы – это соответствующие тРНК

Таким образом, рибосома является молекулярным ассемблером, который конструирует линейные полимеры, используя информацию, записанную на линейный носитель. На примере рибосомы эволюция демонстрирует возможность информационно-управляемого наноассемблирования атомов.

8.4. Компактность хранения информации в ДНК

Сам по себе перенос информации от ДНК через РНК к белку показывает, что информация может храниться в *чрезвычайно компактной* форме на наноуровне. Прямой перенос информации посредством

химических взаимодействий позволяет реализовать очень компактное хранение и обработку информации.

Каждая позиция нуклеотида в ДНК несет два бита информации (поскольку она может быть занята одним из четырёх нуклеотидов). При этом необходимо *всего около 30 атомов*, чтобы нужным образом расположить в пространстве нуклеиновое основание и обеспечить возможность сохранения, копирования и чтения этих двух битов информации. Это очень высокая плотность хранения информации – *15 атомов на один бит*.

В принципе ДНК, если её защитить соответствующим образом, может хранить информацию миллионы лет, то есть она может быть использована в качестве *долговременной памяти*. Например, ДНК, находящаяся в бактериальных спорах, может быть "активирована" и использована спустя многие годы после спорообразования.

Однако чтение информации с ДНК является очень сложным и медленным процессом (по сравнению с чтением, например, жёстких дисков современного компьютера). Но, с другой стороны, рассматривая возможность сохранения информации *на возможно более длительный* промежуток времени, необходимо отметить, что ДНК имеет несомненные преимущества.

Современные технологии архивации и хранения информации устаревают и сменяются более новыми каждые 10–20 лет. А ДНК, как сама по себе, так и способы записи и чтения информации, поскольку она связана с живыми системами, останется неизменной и через тысячелетия.

Контрольные вопросы и задания

1. Почему информационно-управляемое ассемблирование является основой любой технологии?
2. Приведите примеры информационно-управляемого ассемблирования в традиционных технологиях.
3. Приведите примеры информационно-управляемого ассемблирования в биологии.
4. Какие биополимеры используются в качестве универсального носителя информации в бионанотехнологии?

5. Какие два функциональных принципа позволяют значительно увеличить эффективность работы наноассемблеров?
6. В чем состоит функциональное значение двухстадийности переноса генетической информации с ДНК через мРНК на белок?
7. В чём состоит информационное различие процессов транскрипции и трансляции?
8. Перечислите информационные особенности генетического кода.
9. Какими свойствами молекулярного ассемблера обладает рибосома?
10. Какова плотность хранения информации в ДНК?
11. Какими преимуществами обладает используемый в ДНК способ хранения информации?

Глава 9
Бионаноэнергетика

9.1. Энергопитание бионаномашин

Множество желательных нанопроцессов не происходят спонтанно, и мы должны *стимулировать* их энергетически, чтобы эти процессы развивались в желательном для нас направлении.

К счастью существует множество других высокоэнергетичных процессов, таких как

1) разрыв химических связей;
2) поглощение света;
3) рекомбинация предварительно разделенных зарядов;

которые мы можем использовать в качестве доноров энергии для эндергонических процессов (см. [9], п. 4.4).

В природных бионаномашинах можно найти множество примеров использования всех трёх "источников" дополнительной энергии – энергии *химических связей*, энергии *света* и *электрической* энергии.

Эти дополнительные "источники" используются главным образом двумя способами:

1) чтобы активировать *химические* реакции;
2) для стимуляции *механического* движения.

Живые клетки не пользуются теми способами утилизации энергии, которые использует человек. Человек обычно аккумулирует большое количество энергии, а затем использует этот запас. Примером такого подхода является двигатель автомобиля, в котором взрывное сгорание бензина является источником механического движения. Клетки не используют реакции, в которых выделяется много энергии, поскольку термическая энергия быстро рассеивается, и наносистема *не успевает* её использовать.

При этом следует помнить, что при необходимости тепло в большом количестве *может* продуцироваться живыми организмами, причём на уровне всего организма. Значительное тепловыделение происходит либо в результате механического трения при работе клеток мускулатуры, либо вследствие химических экзотермических реакций при интенсификации гидролиза молекул жиров (см. [6], п. 7.9).

На клеточном уровне энергия выделяется *небольшими порциями* так, чтобы она могла быть контролируемо и эффективно использована.

Природные бионаномашины используют энергетическое *сопряжение* процессов. Две химические реакции могут быть сопряжены, и экзергоническая реакция будет стимулировать эндергоническую (см. [9], п. 4.4).

Например, фермент *пируват-киназа* сопрягает реакции отщепления фосфат-группы от фосфоэнолпирувата (экзергоническая реакция) и присоединения этой фосфат-группы к АДФ (эндергоническая реакция). Вторая реакция не происходит спонтанно, но, будучи сопряженной с первой, весь процесс может протекать самопроизвольно.

Аналогично химические реакции могут быть сопряжены с электрическими процессами, или поглощение света может быть использовано для стимуляции химических реакций, или могут быть использованы другие

комбинации процессов. Ключевым моментом здесь является перенос энергии на нанорасстояния.

9.2. Функциональная роль топливных молекул в биосистемах

Один из наиболее общих подходов для активации химической реакции, который используется в природных системах, состоит в сопряжении эндергонической реакции с другой экзергонической реакцией (см. [8], п. 1.3).

Такое сопряжение можно осуществить *двумя* путями.

1. Можно для каждого случая искать свою, *уникальную* комбинацию сопрягаемых реакций.
2. Или же можно создать некоторую общую "*топливную*" молекулу, которую затем и сопрягать к любой активируемой реакции.

Второй подход является наиболее широко используемым в клетках. Конечно, необходимо разработать *механизм синтеза* таких топливных молекул, равно как и разработать *методы для включения* этих молекул в различные реакции, что усложняет задачу. Однако существенным преимуществом второго подхода все же остается его *универсальность*, позволяющая реализовать модульность проектируемых систем.

Все топливные молекулы, которые используются в клетке, имеют схожее строение. В их состав входят два обязательных компонента:

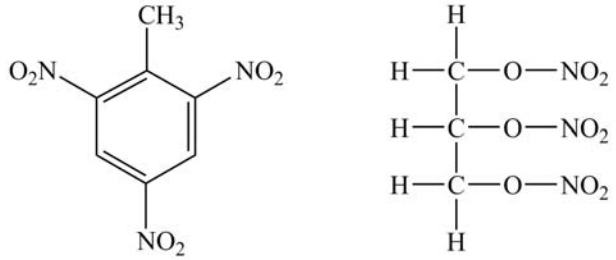
1) переносящая энергию функциональная группа;
2) некоторый молекулярный кронштейн, который является, как правило, стандартным биомономером.

Энергонасыщенная (топливная) функциональная группа находится в химически нестабильном (метастабильном) состоянии.

Существует множество известных молекул, которые могут быть нестабильными, и которые можно использовать для запасания энергии.

Например, *ацетилен* (H–C≡C–H) имеет нестабильную углерод-углеродную тройную связь, которая при соединении с кислородом разрывается, что проявляется в пламени ацетиленовых горелок.

Тринитротолуол (ТНТ, тротил, тол, 2,4,6-тринитрометилбензол) (рисунок 159(а)) и *нитроглицерин* (рисунок 159(б)) имеют атомы азота и кислорода, находящиеся в метастабильном равновесии (уравновешенные) рядом с атомами углерода и водорода. Резкое встряхивание приводит к перестановке атомов в более стабильное газовое облако смеси азота, углекислого газа и водных паров. Эти молекулы сложно синтезировать, но легко разрушить.



а *б*

Рисунок 159 – Топливные молекулы: *а* – 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ, тротил), *б* – нитроглицерин (тринитрат глицерина)

Биологические топливные молекулы клетки *не являются* такими "экстремальными". Метастабильность биологических топливных молекул достигается двумя способами:

1) они помещены в энергетически невыгодное окружение,
2) они содержат атомы, "замороженные" в метастабильном состоянии.

И хотя сформировать такие напряжённые связи не просто, но при их разрыве та энергия, которая выделяется, может быть использована для активации других процессов.

Те молекулярные кронштейны (стыковочные узлы), к которым присоединены такие метастабильные резервуары энергии, устроены таким образом, чтобы их могли легко распознать те бионаномашины, которые используют топливные молекулы.

Молекулы ацетилена или ТНТ *не имеют* таких кронштейнов, поэтому они годятся только для высвобождения энергии *в объём* реакционной системы.

Биомолекулярные топливные молекулы, напротив, имеют разнообразные кронштейны, построенные из органических молекул, которые позволяют использовать это топливо *по одной молекуле за раз*. Эти кронштейны содержат, как правило, много атомов кислорода и азота, что позволяет наномашинам использовать *систему* специфических водородных связей для распознавания этих кронштейнов.

АТФ (аденозинтрифосфат) является самой распространенной биологической топливной молекулой (рисунок 160).

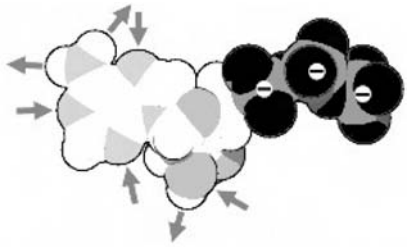


Рисунок 160 – Схема молекулы АТФ. Стрелками указаны положение и направление водородных связей, которые могут быть образованы для распознавания аденинового кольца

Существует несколько способов получения АТФ, например, при гликолизе в процессах субстратного фосфорилирования и окислительного фосфорилирования, или при поглощении света при фотосинтезе.

А затем уже гидролиз молекулы АТФ используется для энергетической подпитки энергозависимых биомолекулярных процессов. АТФ используется для стимуляции энергетически невыгодных химических преобразований, а также во множестве *механических* процессов, где

необходимо изменить конформацию или местоположение молекулы. Аденинoвое кольцо обеспечивает возможность распознавания аденозинового кронштейна АТФ.

Ферменты распознают АТФ используя *и геометрическую, и химическую комплементарность*. Обычно адениновое кольцо связывается в глубоком плоском кармане, который соответствует плоскому кольцу. Пример организации сайта связывания аденина рассмотрен в п. 7.4.

Другой пример, фермент аспартил-тРНК-синтетаза использует АТФ для активации реакции присоединения аминокислоты к тРНК (рисунок 161).

Фермент начинает присоединять к себе тРНК, АТФ и аминокислоту (аспарагиновую кислоту). Затем, как показано на рисунке 161, фермент соединяет аминокислоту с АТФ, при этом высвобождаются две фосфатные группы в виде пирофосфата. И, наконец, фермент переносит аминокислоту на тРНК. Гидролиз АТФ и дает ту энергию, которой не хватает для протекания этой реакции.

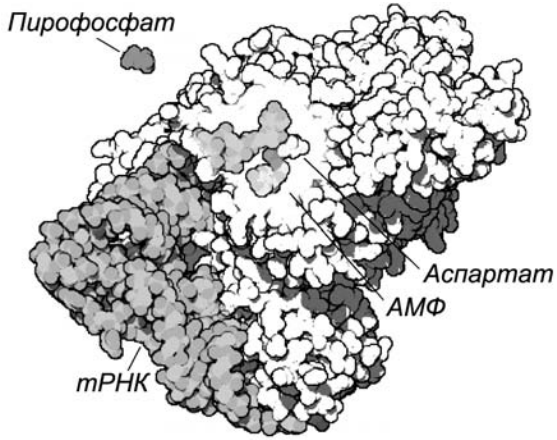


Рисунок 161 – Фермент аспартил-тРНК-синтетаза

АТФ также используется *для генерации механического импульса* молекулами *миозина* в клетках мышц (рисунок 162). АТФ связывается внутри молекулы миозина, контролирует связывание миозина с *актином*

через щель (справа в теле миозина) и трансформирует энергию гидролиза фосфата в движение длинного плеча молекулярного рычага (белковая цепь слева на рисунке).

Рисунок 162 – Схема молекулы миозина с молекулой АТФ внутри

Молекула АТФ нестабильна вследствие того, что в ней соединены три фосфатные группы. Каждый фосфат заряжен отрицательно, поэтому для того, чтобы их сблизить необходимо совершить работу, часть которой и запасается в молекуле АТФ. При разрыве связи между фосфатами фосфаты разлетаются вследствие электростатического отталкивания, и запасённая *энергия выделяется*. Эту энергию и использует клетка для того, чтобы гарантировать протекание в нужное время и в нужном месте важных *химических* преобразований и механических смещений, даже если такие реакции энергетически невыгодны.

9.3. Поглощение света специализированными малыми молекулами в биосистемах

Практически все живущие на Земле организмы непосредственно или опосредованно используют энергию Солнца. Поглощение квантов

солнечного излучения осуществляется *классом белков*, которые называются *фотосинтетические реакционные центры*. Эти белки поглощают фотоны света и используют поглощённую энергию для генерации *высокоэнергетичных* электронов, которые затем и используются в качестве источника энергии. Реакционные центры содержат *наборы кофакторов* – хлорофилл, филлохиноны, и кластеры атомов железа и серы – которые и выполняют работу по генерации электронов.

Фотосинтетический центр, который показан на рисунке 163, расположен в мембране *цианобактерии*. Он использует *специальную пару* молекул *хлорофилла* (показаны темно-серым цветом в центре молекулы) для генерации высокоэнергетичного электрона. В обычных условиях такой электрон *быстро разменивает* энергию в виде тепловых фононов или *переизлучает* квант света несколько меньшей энергии, чем была поглощена (флуоресценция). Но фотосинтетический реакционный центр устроен так, чтобы *обойти* этот естественный путь энергетической релаксации. Вместо этого возбужденный электрон *уводится* от хлорофилла *по эстафете* вдоль цепи *электронных акцепторов* – кофакторов *филлохинонов* и трёх *железо-серных кластеров* (путь показан стрелками). В конце концов, электрон помещается на водорастворимый белок-переносчик такой, как металлопротеин *ферредоксин*, с тем, чтобы быть отнесенным к месту использования. Затем белок *пластоцианин*, показанный внизу рисунка 163, замещает недостающий в реакционном центре электрон низкоэнергетичным электроном (см. [6], п. 9.2).

В итоге мы имеем перенос электрона от низкоэнергетичного источника к высокоэнергетичному переносчику.

В большинстве фотосинтетических организмов источником электрона является молекула *воды*, которая окисляется до молекулярного кислорода (см. [6], п. 10.4). Электрон возбуждается в фотосинтетическом центре, затем помещается на металлопротеин (такой как ферредоксин) для перемещения его в необходимое место системы.

Фотосинтетические центры также содержат эффективные молекулы, которые поглощают свет и доставляют его к реакционному центру. На рисунке 164 изображен светособирающий антенный комплекс

цианобактерии, в который встроены три реакционных центра (те же что и на рисунке 163, только вид сверху).

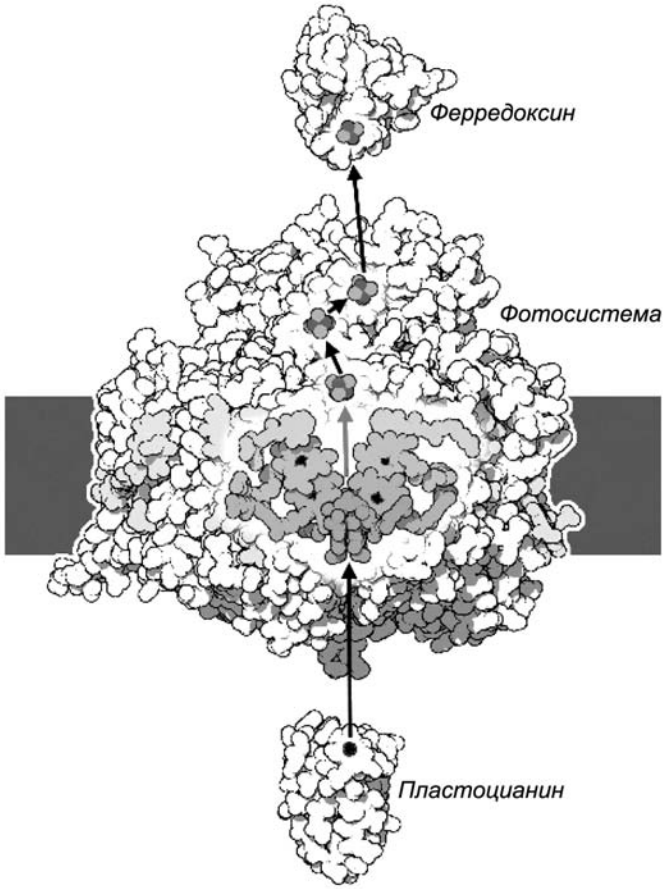


Рисунок 163 – Фотосинтетический реакционный центр цианобактерии

Фотосистема состоит из трёх идентичных субъединиц, каждая из которых имеет собственный фотосинтетический центр и собственную цепь отвода высокоэнергетичных электронов (показаны темно-серым цветом). Окружающие их десятки молекул *хлорофилла* и *каротеноидов* работают как светособирающая *антенна*, поглощая свет разных длин

волн и передавая энергию от молекулы к молекуле (резонансным переносом энергии) к реакционным центрам субъединиц.

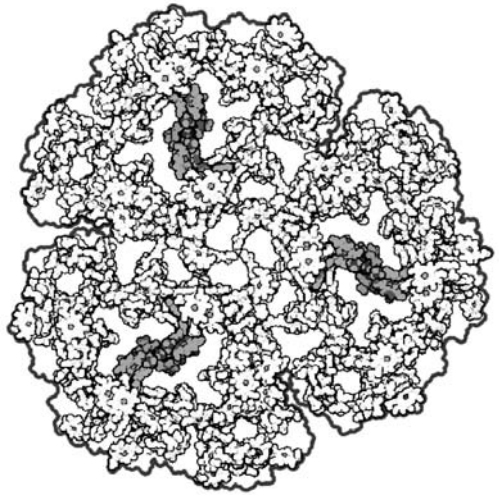


Рисунок 164 – Светособирающий антенный комплекс цианобактерии (вид сверху)

Энергия света также используется для совершения *механической* работы. Например, белок бактериородопсин транспортирует протоны через мембрану, используя энергию поглощённого света, а светочувствительный белок опсин (см. п. 13.2) изменяет форму глобулы, когда поглощает свет.

9.4. Бионаноэлектрические цепи переноса электронов

Электроника является одним из краеугольных камней макротехнологии. Электрическая проводимость представляет собой *транспорт зарядов* (*charge transport*), когда электроны перемещаются в объёме проводника. Атомы металла в проводнике (за счет коллективизации валентных электронов) обеспечивают возможность электронам свободно

перемещаться по металлу даже при отсутствии внешнего электрического поля.

Если к проводнику не приложена внешняя разность потенциалов, то электроны в проводнике движутся хаотично, если же приложить внешнее напряжение, то движение электронов становится *упорядоченным*, согласованно направленным и формируется электрический ток электронов через проводник. Электрический ток является *коллективным* процессом, в котором индивидуальность каждого электрона теряется, а главным действующим лицом является вся электронная подсистема проводника.

Такого рода электрическая проводимость не используется в биологии на наноуровне. Вообще говоря, ДНК является проводником электронов, но природа не использует это свойство ДНК.

В клетках реализованы более эффективные системы, которые позволяют чётко контролировать перемещение *каждого* электрона персонально. Биологические системы перемещают электроны по одному от одного переносчика к другому вдоль строго определённых бионаноэлектрических цепей (*bionanocircuits*).

Такой процесс называется *перенос заряда* (*charge transfer*) или *передача заряда*. Перенос одиночных электронов вдоль сложных цепей переноса широко распространен в биологических системах, поэтому мы имеем много эффективно функционирующих и наглядных примеров, которые и следует использовать в качестве прототипов при разработке наших собственных (искусственных) бионаноэлектрических цепей.

Некоторые примеры компонентов бионаноэлектрических цепей представлены на рисунке 165. Прежде всего, это малые органические молекулы, которые переносят электрон от точки к точке, от узла к узлу бионаноэлектрической цепи.

Некоторые из них водорастворимы, как *НАДН*, другие, как *убихинон* (кофермент Q), липофильны и переносят электроны внутри биомембраны. Малые белки, такие, как *ферредоксин*, также используются для переноса электронов по клетке. Эти малые переносчики используются для доставки электронов к большим белковым бионаномашинам, для которых эти электроны являются источником энергии.

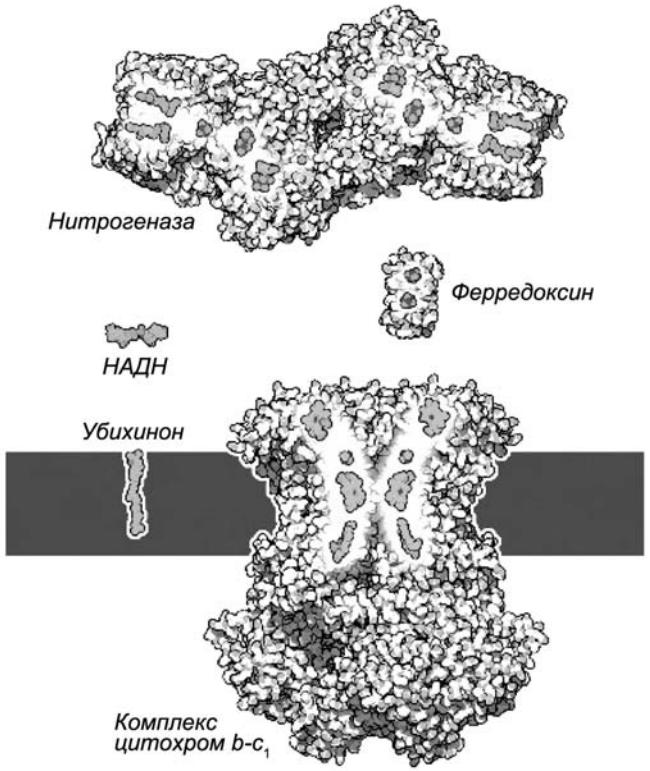


Рисунок 165 – Примеры компонентов био*нано*электрических цепей

Примерами таких больших бионаномашин, "питающихся" электронами, являются *цитохромный комплекс* b-c_1 и фермент *нитрогеназа*, которые катализируют окислительные реакции. Эти белки используют разнообразные простетические группы для осуществления переноса электронов.

На рисунке 166 изображена схема электронно-транспортной цепочки, которая представляет собой бионаноэлектрическую цепь, которая сопрягает перенос электронов с процессом формирования градиента протонов. Высокоэнергетичные электроны, которые получаются в процессе окисления глюкозы, доставляются в бионаноэлектрическую цепь молекулами НАДН. Затем поток электронов проходит через три

больших мембранных *насоса*. Электроны переносятся между насосами малыми мобильными переносчиками: *убихиноном* (CoQ) и *цитохромом* с.

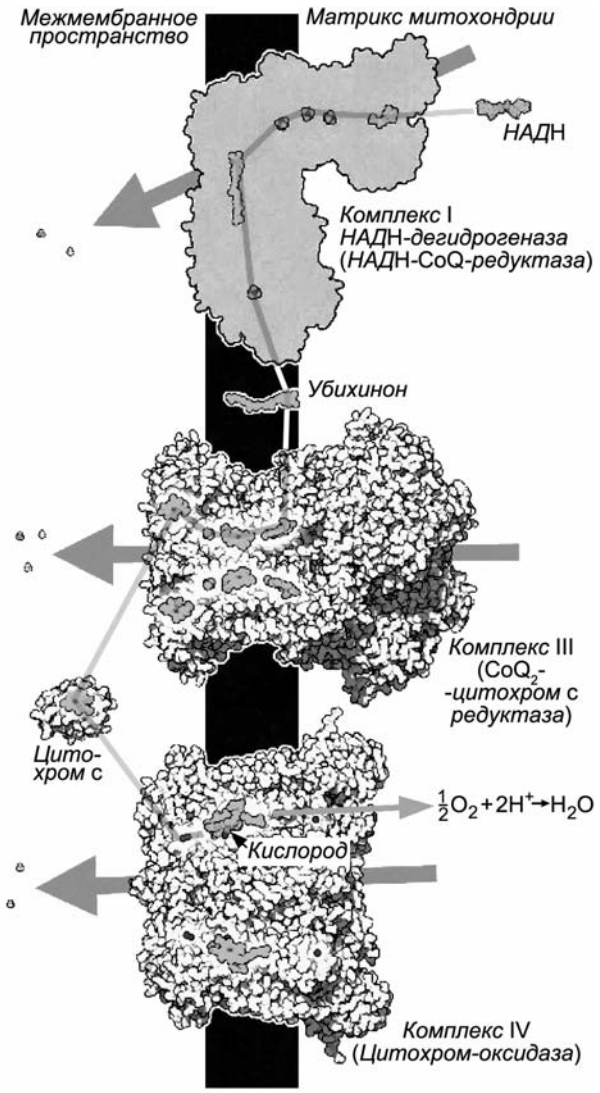


Рисунок 166 – Бионаноэлектрическая цепь сопряжения электронного транспорта с созданием протонного градиента (дыхательная цепь)

В процессе перемещения электронов по цепи простетических групп внутри каждого из насосов энергия этого перемещения используется для переноса протонов через мембрану. Трансмембранный перенос протонов показан схематически на рисунке 166 серыми стрелками. В конце этой бионаноэлектрической цепи электроны связываются молекулами кислорода с последующей конверсией их в молекулы воды.

Эти примеры демонстрируют общие свойства бионаноэлектрических цепей. Индивидуальные электроны переносятся между специфическими *акцепторами* и с помощью специфических молекул. Для транспортировки и передачи электронов используется множество простетических групп, включающих кластеры атомов железа и серы, ионы меди, ионы железа встроенные в гемы, гетероциклические органические соединения.

Кроме того, малые органические молекулы, такие как НАД (никотинамидадениндинуклеотид) или ФАД (FAD, флавинадениндинуклеотид) могут быть использованы для переноса электронов между белками в этой бионаноэлектрической цепи.

Каждый акцептор электрона имеет характерный *восстановительный потенциал*, который количественно описывает его сродство к электрону. Белковое окружение простетических групп в био*нано*-электрических цепях может в сотни и тысячи раз *изменять* величину этого потенциала группы, изменяя в непосредственной близости от простетических групп пространственное положение определённых аминокислотных остатков, которые стабилизируют или дестабилизируют связывание электрона с простетической группой. Соответственно, потенциал каждого акцептора может быть установлен таким образом, чтобы обеспечить необходимую последовательность перемещения электрона от начала до конца цепи.

Движимый такими *ступенчатыми* понижениями свободной энергии электрон перемещается от одного объекта к другому вдоль заданной цепи. От одного акцептора к другому электроны переносятся квантовомеханическим *туннелированием*, которое является эффективным на расстоянии до 1,4 нм.

Если необходимо перенести электрон *на бóльшие расстояния*, то используется выстроенных *цепочкой* акцепторов, расположенных на расстояниях менее 1,4 нм друг от друга. На таких расстояниях скорость переноса электрона чрезвычайно высока, время переноса составляет 10^{-7}–10^{-13} секунды. Причём сам процесс переноса, как показали недавние исследования, не зависит от аминокислотного окружения тех акцепторов, между которыми происходит туннелирование электрона. Если реакционные центры находятся достаточно близко, то туннелирование электрона происходит без учёта окружения, и мастерство дизайнера ограничивается расположением необходимых редокс-центров в цепочку правильной последовательности на необходимом расстоянии.

Природный транспорт электронов ограничен двумя основными задачами:

1) доставка электрона в объём реакционной системы для использования его в реакции *восстановления*,
2) снабжение *энергией* других процессов таких, как перекачка протонов через мембрану.

Это удивительно, но природные системы *не используют* одноэлектронный транспорт для "вычислений". Природные биологические "компьютеры" на *нано*-уровне основаны на сети жёстко связанных генетических и биохимических процессов, а на *микро*-уровне – на программируемой сети нервных волокон. Именно бионанотехнология может заняться разработкой *одноэлектронных компьютеров*.

9.5. Электропроводность и перенос заряда в ДНК

ДНК содержит множество ароматических нуклеиновых оснований, расположенных стопкой друг над другом. Молекулярные π-орбитали этих оснований перекрываются, образуя цепь для перемещения электронов вдоль ДНК.

ДНК является *потенциальным кандидатом* для разработки наноэлектронных устройств.

В настоящее время синтез ДНК является уже хорошо изученной и хорошо отработанной технологией, и, в принципе, конструкция любой сложности от простого проводника до сложной сети может быть разработана и синтезирована. Это очень перспективная идея, однако детали электронного транспорта и переноса заряда вдоль ДНК все ещё активно исследуются.

Были обнаружены несколько интересных процессов. Перенос заряда одиночным электроном интенсивно исследовался с помощью плоских молекул, которые взаимодействуют со спиралью ДНК. Эти молекулы активировались светом и перехватывали один электрон с одного из близлежащих азотистых оснований, образуя *электронную дырку*. Затем исследователи отслеживали перемещение этой дырки вдоль спирали ДНК до определённого удалённого участка.

Количественно такой перенос характеризуется появлением заряда на последовательности ДНК, содержащей *множественные гуаниновые основания* (polyG), которые легко теряют электрон и, соответственно, стремятся захватить электронную дырку.

Заряженный гуанин чувствителен к разрезанию определёнными химическими реагентами, которые использовались в количественном анализе переноса электронов.

Анализ кинетики такого переноса выявил *два* процесса:

1) "короткодействующий" *механизм сверхбыстрого переноса* (*superexchange mechanism*), эффективность которого резко снижается с увеличением расстояния;
2) *прыжковый механизм*, который обеспечивает перенос на большие расстояния.

Проводимость электронов вдоль ДНК исследовалась, присоединяя два электрода к короткой спирали ДНК или к жгуту из множества ДНК и, после подачи напряжения, измеряя электрический ток через ДНК-нити.

В одном из экспериментов было показано, что ДНК может проводить значительный ток порядка 100 нА (10^{12} электронов в секунду) через одну молекулу ДНК длиной 10 нм. Однако другие эксперименты

показывали другие результаты, демонстрируя изоляционные, полупроводниковые и даже сверхпроводниковые свойства ДНК. Главными проблемами, которые влияли на результаты исследований, были – изоляция единственной молекулы ДНК и осуществление контакта с электродами.

9.6. Электрохимический градиент на биомембранах как источник энергопитания бионаносистем

Энергия на наноуровне может быть аккумулирована по принципу *батареек* или *конденсаторов*.

Идея состоит в том, чтобы *разнести* заряженные объекты в два отдельных компартмента так, чтобы в одном был избыток отрицательного заряда, а в другом – положительного. Когда заряжают *конденсаторы*, то электроны переносятся с одной металлической обкладки на другую, тем самым заряжая последнюю отрицательно. После зарядки конденсатора обратный ток электронов может быть использован в качестве источника энергии для работы электрических машин.

Единственное отличие в природных системах аккумулирования электрической энергии состоит в том, что в клетках вместо электронов используются *ионы* и вместо металлических обкладок конденсатора используются *компартменты*, разделённые мембраной, которая не пропускает ионы.

Ионы перекачиваются через мембрану специализированными белками-насосами, образуя электрохимический градиент. После чего используется *организованный поток* электронов через мембрану для совершения *электрической* или *механической* работы.

Электрохимические градиенты используются в качестве источника энергии *двумя* способами.

1. Просто как источник градиента концентрации ионов – при перекачке ионов через мембрану их концентрация растёт по одну сторону мембраны.

2. Перекачка ионов приводит к образованию мембранного (электрического) потенциала.

В обоих случаях, позволив ионам двигаться через мембрану, самопроизвольно выравнивая либо градиент концентраций, либо градиент электрического потенциала, можно заставить их *совершать работу*. Объединение этих двух сил обеспечивает тот источник энергии, который используется во многих биологических процессах. Наиболее распространенным является *простое использование протонного градиента*. Протонный градиент, создающий "протондвижущую силу", широко используется для вращения протонных моторов и для синтеза АТФ (см. [6], п. 7.1).

На рисунке 167 представлена схема *циклического фосфорилирования*, при котором поглощённый свет используется для синтеза АТФ, и на примере которого можно рассмотреть типичные энергетические технологии, используемые природой.

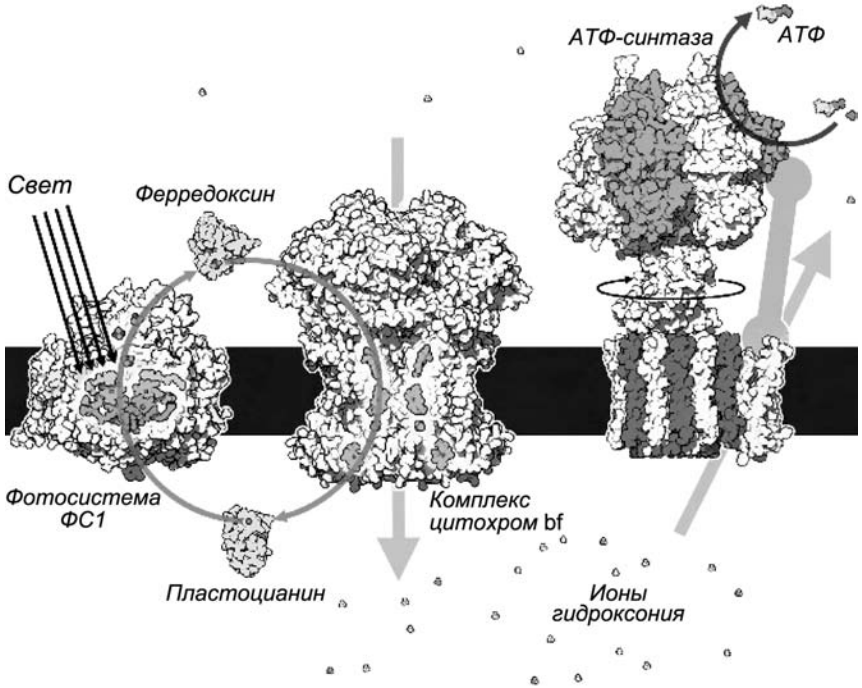


Рисунок 167 – Схема процесса циклического фосфорилирования

Свет поглощается фотосистемой и используется для генерации высокоэнергетичных электронов. Эти электроны переносятся белком *ферредоксин* на протонную помпу (комплекс *цитохром bf*), которая и создаёт электрохимический градиент протонов. Таким образом, протонный градиент создаётся за счет энергии потока высокоэнергетичных электронов. Отдав энергию протонной помпе, электроны переносятся белком *пластоцианин* назад на фотосистему. Протоны под действием градиента движутся *обратно через мембрану*, приводя в движение ротор АТФ-синтазы. Вращение ротора механически изменяют форму каталитических субъединиц АТФ-синтазы, обеспечивая энергией реакцию присоединения фосфат-иона к АДФ с образованием АТФ.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие источники дополнительной энергии используются в природных бионаномашинах для стимуляции энергетически невыгодных процессов?
2. Для стимуляции каких двух типов процессов используются экзергонические реакции?
3. Чем отличается способ использования энергии в бионаномашинах от утилизации энергии в макромашинах?
4. Какие существуют два основных способа осуществления энергетического сопряжения эндергонических и экзергонических процессов?
5. Какие два компонента содержит в себе топливная молекула?
6. Какими двумя способами достигается метастабильность биологических топливных молекул?
7. Как устроен, и какие функции выполняет фотосинтетический центр цианобактерии?
8. Как устроен, и какие функции выполняет светособирающий антенный комплекс?
9. В чём отличие процессов переноса заряда в биосистемах от процессов транспорта зарядов в проводниках?

10. В чём сходство и различие переноса электронов акцепторами и переносчиками?
11. Каковы две основные задачи решает транспорт электронов в биосистемах?
12. Какие два процесса обеспечивают перенос заряда по молекуле ДНК?
13. Какие существуют основные проблемы при исследовании электрической проводимости молекул ДНК?
14. В чём сходство и отличие аккумулирования электрической энергии на конденсаторах и в биосистемах?
15. Какие используются два способа использования электрохимического градиента в биосистемах?
16. Как электрохимический градиент используется в схеме циклического фосфорилирования?

Глава 10
Бионанотрансформации и регулирование

10.1. Особенности химических нанотрансформаций

Сотни лет химики производят специфические химические преобразования, синтезируя структурно "чистые" молекулы для использования их в медицине и промышленности. Эти преобразования обычно представляют собой *определённую последовательность* специфических химических модификаций таких, как присоединение новых функциональных групп, изменение специфических связей и прочие малые химические изменения.

На каждом этапе должна быть разработана *особая реакция*, при этом зачастую не удается избежать образования побочных продуктов, конкурирующих с необходимыми продуктами реакции. Поэтому на каждом этапе химик должен *очищать* необходимый продукт реакции от

побочных веществ для того, чтобы добиться максимального выхода. Для органических молекул, таких как молекулы многих лекарств, содержащих сотни атомов, такой пошаговый синтез может содержать *десятки этапов*, и результирующий выход продукта может быть *крайне низким*.

По способности производить необходимые химические трансформации биологические системы, безусловно, *превосходят* все лабораторные и индустриальные рецептуры.

Подобно химикам, клетки синтезируют специфические молекулы, совершая определённую последовательность химических трансформаций. Но, в отличие от химиков, клетки сначала создают специальные бионаномашины – *ферменты*, которые и проводят каждый этап химического преобразования эффективно и аккуратно.

Рассмотрим в качестве примера функционирование фермента *триозофосфатизомераза* (EC 5.3.1.1) (рисунок 168).

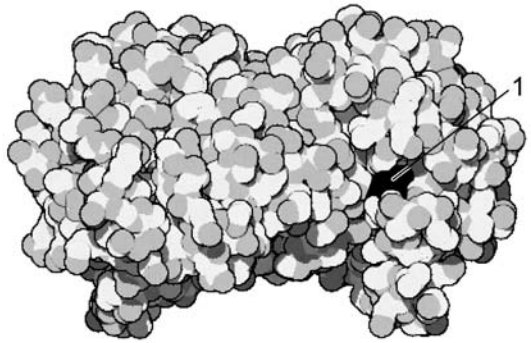


Рисунок 168 – Фермент триозофосфатизомераза: 1 – молекула субстрата в активном центре фермента

Триозофосфатизомераза является ферментом, имеющим *диффузионные* ограничения скорости протекания реакции, – это означает, что фермент производит химические трансформации с бóльшей скоростью, чем скорость диффузии субстратов к ферменту. Триозофосфатизомераза использует все приёмы ферментативного катализа. Сам фермент представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц,

каждая из которых имеет свой активный центр, в котором связывается молекула субстрата.

Молекула фермента намного больше молекулы субстрата. Практически весь объём молекулы фермента является той необходимой "инфраструктурой", единственное *назначение* которой – это точно расположить в пространстве те несколько ключевых аминокислот, которые и осуществляют химическую трансформацию.

Триозофосфатизомераза катализирует реакцию *изомеризации*, удаляя два атома водорода от *дигидроксиацетон-фосфата*, а затем добавляя эти же атомы в другие позиции в молекуле, образуя *глицеральдегид-3-фосфат* (рисунок 169).

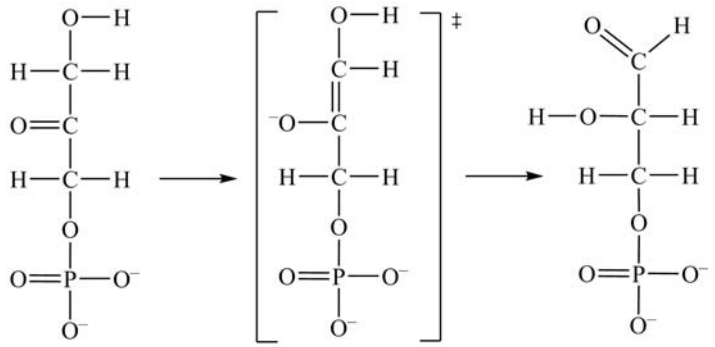


Рисунок 169 – Схема реакции изомеризации, катализируемая ферментом триозофосфатизомераза

Реакция осуществляется в два этапа. На первом этапе, изображённом в верхней части рисунка 170, глутаминовая кислота *принимает* на себя один из атомов водорода от субстрата, а гистидин *добавляет* к молекуле субстрата другой атом водорода.

На втором этапе, изображенном в нижней части рисунка 170, глутаминовая кислота *присоединяет* этот "лишний" атом водорода к субстрату, *но уже в другой позиции*, а гистидин "*отнимает*" себе

недостающий ему атом водорода от субстрата, но не оттуда, куда он добавлял водород, а из другой позиции.

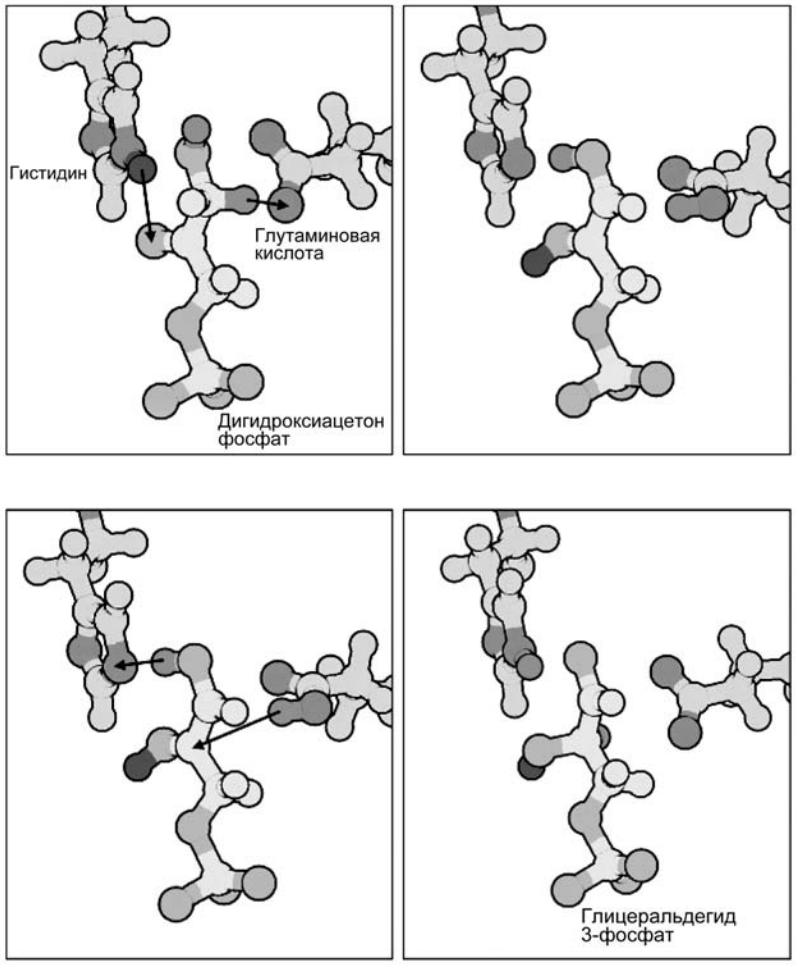


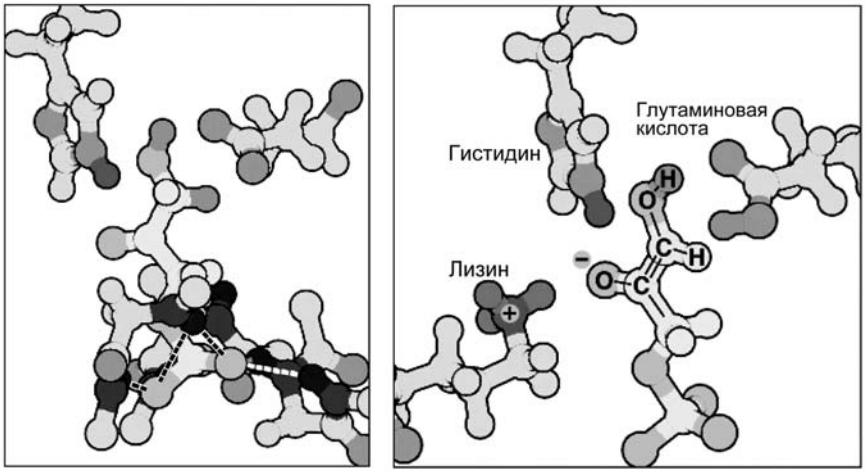
Рисунок 170 – Схема реакции изомеризации, катализируемая ферментом триозофосфатизомераза

Заметим, что фермент в итоге оказался в том же состоянии, что и до начала реакции – со свободной глутаминовой кислотой и с атомом

водорода, связанным с гистидином (хотя этот атом водорода уже не "тот самый", который был у гистидина изначально).

Таким образом, по завершении реакции, молекула фермента готова к следующему преобразованию субстрата в продукт, как только диффузия "доставит" новую молекулу субстрата к ферменту.

Фосфатная группа субстрата окружена набором аминокислот фермента, которые расположены в пространстве так, что они образуют "карман" в теле фермента (рисунок 171(а)).



а *б*

Рисунок 171 – Схемы: *а* – ориентации субстрата в ферменте; *б* – стабилизации переходного состояния

Фосфатная группа молекулы субстрата *точно позиционируется* в этом кармане благодаря системе водородных связей с окружающими аминокислотами (показаны пунктиром на рисунке 171), при этом область изомеризации *оптимальным* образом располагается по отношению к глутаминовой кислоте и гистидину активного центра фермента.

Фермент ускоряет химическую реакцию, *стабилизируя переходное состояние* в обоих этапах. Переходное состояние первого этапа показано на рисунке 171(б). Глутаминовая кислота *уже приняла* на себя атом

водорода, а гистидин ещё *не отдал* свой водород субстрату. В результате субстрат оказался избыточно отрицательно заряженным (энергетически невыгодно), но этот избыточный отрицательный заряд, сконцентрированный на одном из атомов кислорода, стабилизируется расположенным рядом положительно заряженным лизином.

Как правило, каждый фермент предназначен для совершения определённого химического преобразования, ускоряя химическую реакцию в десятки миллионов раз. Причём образование *побочных* веществ сведено практически *к нулю*, и, следовательно, выход продукта реакции, даже в случае, когда его синтез требует десятков этапов, *несоизмеримо более высокий*, чем в случае неферментативной реакции.

Например, на рисунке 172 показана *схема синтеза пенициллина* из исходного пирувата, который реализуется *во многих бактериях*.

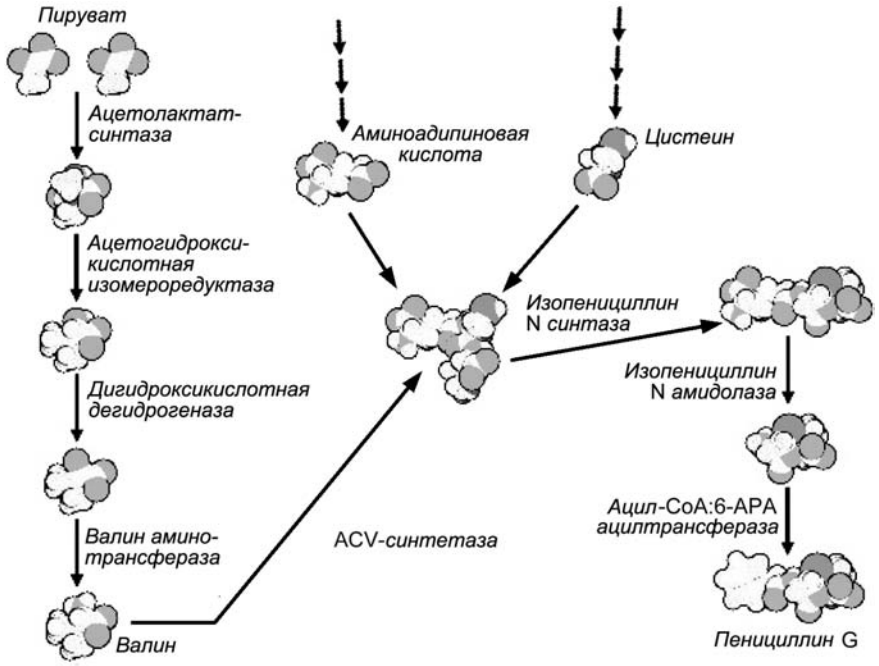


Рисунок 172 – Схема бактериального синтеза пенициллина

Две молекулы *пирувата* превращаются в аминокислоту *валин* в *четыре* этапа. Затем *валин объединяется* с двумя другими аминокислотами, каждая из которых также предварительно синтезирована в несколько этапов, в результате образуется "заготовка" для пенициллина. Ещё *три* этапа преобразования необходимо, чтобы сформировать продукт – молекулу *пенициллина*.

Био*нано*машины ферментов, как правило, имеют "встроенные системы управления", поэтому продукты могут быть синтезированы именно там и тогда, где и когда это необходимо организму. Ферменты являются бесценным подарком природы, той точкой отсчета, тем прототипом, той опорой, начиная с которой можно планировать бионанотехнологические разработки.

Ферменты осуществляют химические трансформации, прокладывая путь реакционной системе в необходимом направлении *снижая* препятствующие барьеры. Протекание химической реакции можно образно сравнить с процессом "ломания" карандаша. Вначале карандаш прямой и твердый. Когда мы начинаем его сгибать, карандаш сопротивляется, в нем нарастают напряжения. Наконец он ломается, и у нас в руках остаются два прямых и твёрдых куска карандаша. Химическая реакция разрыва связи совершенно аналогична. Когда мы расщепляем молекулу на две части, мы должны приложить силу, чтобы ослабить связь.

И исходное состояние, и конечные фрагменты молекулы являются стабильными, но *переходное состояние*, в котором химические связи напряжены и растянуты, является нестабильным и энергетически невыгодным. Ферменты снижают величину энергетического барьера в переходном состоянии за счет двух факторов:

1) облегчая его формирование из исходного состояния субстрата;
2) облегчая преобразование субстрата именно в необходимые продукты.

Так в примере с карандашом, если ногтём процарапать глубокую поперечную бороздку на карандаше, то карандаш ломается гораздо легче,

причём именно в том месте, которое мы отметили. Мы "катализировали" реакцию "слома" карандаша, "изменив" ногтём переходное состояние, и облегчив начало "разлома" в нужном месте. Совершенно аналогично ферменты создают такое молекулярное окружение, в котором переходное состояние стабилизируется, и снижается барьер (облегчается переход) к формированию продуктов реакции. Все эти события и действия происходят в *активном центре* фермента.

В активном центре специфические аминокислоты располагаются в стратегически важных пространственных положениях, они идеально позиционированы для стабилизации переходного состояния молекулы субстрата.

10.2. Принципы химических нанотрансформаций в биосистемах

В ферментах реализовано множество различных приёмов, позволяющих повысить каталитическую активность. На первый взгляд кажется, что каждый активный центр должен быть устроен по-своему как результат эволюционного отбора. Однако *несколько общих принципов* используются в конструкции активного центра большинства ферментов:

1) снижение энтропии;
2) химическая стабилизация переходного состояния;
3) использование специализированных химических инструментов.

Трёхмерные структуры тысяч ферментов, расшифрованных на сегодняшний день, хранятся в Базе Данных Белков (*Protein Data Bank*, http://www.pdb.org). Эта база данных является фундаментом для бионанотехнологии, поскольку в ней представлены примеры сотен работающих бионаномашин.

Используя природные ферменты *в качестве прототипов*, можно на их основе конструировать искусственные ферменты для конкретных, в том числе и для небиологических, применений.

Уменьшение ферментами энтропии химических реакций. Ферменты ускоряют химические реакции, собирая все необходимые компоненты *в нужном месте и в нужное время*. Энтропия препятствует протеканию химических реакций, снижая вероятность того, что реагирующие молекулы встретят друг друга и провзаимодействуют необходимым образом.

В бимолекулярных неферментативных реакциях энтропия снижает *вероятность встречи* обеих реагирующих молекул. В реакциях требующих однозначной ориентации реагентов для преобразования химических связей, энтропия снижает *вероятность выбора* такой строгой ориентации из большого числа других взаимных ориентаций реагентов.

Ферменты как раз и являются теми молекулярными приспособлениями, которые *минимизируют* энтропийный фактор, оптимально позиционируя реагенты в пространстве и стимулируя перенос функциональных групп в нужном направлении.

Активные центры топологически и химически соответствуют молекулам субстратов (*комплементарны*), образуя гидрофобные, электростатические, водородные и (редко) ковалентные связи субстрата с ферментом. Фермент обычно контактирует с бóльшей частью молекулы субстрата, а некоторые ферменты полностью закрывают активный центр со связанным субстратом, используя белковые петли и домены в качестве "ворот" и "крышек".

Как правило, активный центр фермента содержит *две* области.

Первая – это область (карман, складка) *специфичности*, которая распознает необходимый субстрат и прочно связывается с ним.

Вторая область является *каталитической*, в которой собственно и происходят химические трансформации субстрата в продукт.

Область специфичности (которой зачастую является практически весь активный центр) в большинстве ферментов является необходимым компонентом, поскольку каталитический центр обычно стимулирует протекание достаточно экзотических химических преобразований, и при этом сама структура каталитического центра должна быть "подогнана"

под субстрат для оптимизации каталитического процесса, а не просто для связывания субстрата.

Типичные "допуски" при "подгонке" ферментов и их субстратов составляют *доли нанометров*. Именно такая высокая точность обеспечивает экстраординарную специфичность ферментов. Природные ферменты в большинстве своем способны отличать молекулы субстратов, различающихся одним единственным атомом. Они также демонстрируют высокую *стереоспецифичность*, чётко разделяя левые и правые формы молекул или синтезируя только одну из множества возможных форм продукта.

Стабилизация ферментами переходного состояния химических реакций. После присоединения субстрата к ферменту фермент формирует белковое окружение, которое стимулирует необходимые химические преобразования. А именно это – присоединение или удаление определённого атома – как раз и является целью нанотехнологии.

Ферменты именно потому и способны катализировать химические реакции, что они стабилизируют промежуточное, переходное состояние реакции. Это достигается различными способами, выбор которых определяется спецификой конкретной реакции.

(1) Иногда химические группы соседних аминокислот или простетических групп *воздействуют на субстрат*, *модифицируя* его *электронную структуру* и делая его (или некоторый его участок) более реакционноспособным. *Заряженные аминокислоты* могут *поляризовать* близлежащие химические связи субстрата, облегчая преобразование связей определённого атома, или, наоборот, активируя определённый атом для его "атаки" на конкретную химическую группу.

(2) *Водородная связь* может *стабилизировать* ту конформацию субстрата, которая обычно редко встречается в молекуле свободного субстрата, но которая как раз и нужна для осуществления данной реакции.

(3) Во многих случаях формирование переходного состояния может приводить к образованию *нестабильных* заряженных форм молекулы с одним или несколькими атомами, находящимися в *неоптимальном*

состоянии. Такое состояние может быть *стабилизировано* посредством размещения рядом с таким атомом противоположно заряженной аминокислоты. В этом случае *стабилизировать* переходное состояние будет *электростатическое взаимодействие*.

(4) Ферменты могут также индуцировать *геометрические напряжения* в субстратах. В случае, когда геометрия субстрата изменяется в ходе реакции, форма активного центра является комплементарной именно переходному состоянию субстрата, а не его исходной форме. В этом случае связывание субстрата с таким активным центром фермента будет индуцировать *трансформацию* субстрата из исходного состояния в переходное состояние.

Использование ферментами химических инструментов для проведения реакций. Большинство ферментов используют *специфические химические инструменты* для непосредственного химического воздействия не субстрат. Важно, что эти инструменты оказываются в исходном состоянии после того, как фермент завершит химические преобразования субстрата.

В этом и состоит определение *катализатора*: он может претерпевать некоторые изменения в ходе реакции, чем он собственно и способствует её интенсификации, но он обязательно возвращается в исходное состояние, после чего он снова готов катализировать эту же реакцию.

Ферменты обычно используют *реакционноспособные аминокислоты* для направленной химической модификации субстратов.

Например, многие ферменты *используют* определённые аминокислоты *для переноса атома водорода* в пределах молекулы. В частности, для этого часто используется *гистидин*. При нормальных физиологических условиях достаточно легко удалить один из водородных атомов гистидина, а затем вернуть его на место.

Гистидин используется во многих реакциях, в которых перестраивается структура молекулы. На гистидин переносится атом водорода, а затем этот атом возвращается на молекулу субстрата, но уже в другую позицию.

В результате либо (1) изменяется геометрия молекулы, либо (2) смещается местоположение двойной связи в молекуле субстрата.

В других реакциях требуется *более* "*силовое*" воздействие. В таких случаях аминокислоты ферментов атакуют субстрат, *формируя ковалентную связь*. Как правило, получившееся переходное состояние является нестабильным, и на следующем этапе реакции либо эта вновь сформированная связь, либо одна из других нестабильных связей разрушается и образуется необходимый продукт реакции.

Так, например, в *сериновой протеазе* серин атакует пептидную связь в субстрате, разрывая пептидную цепь, и образует нестабильную ковалентную связь с одним из фрагментов. После чего в активный центр входит молекула воды, диссоциирует на OH^- и H^+, OH^- взаимодействует с субстратом, нестабильная связь рвется, и фермент возвращается в исходное состояние (см. [8] п. 13.3).

В некоторых реакциях ферменты *добавляют новые атомы* или *функциональные группы* к растущей молекуле.

Когда мы собираемся сделать новый табурет у себя дома, мы редко используем действительно исходное сырье. В самом деле, мы не рубим деревья (на древесину) и не добываем железную руду (чтобы сделать гвозди). Мы просто идем в магазин строительных товаров и покупаем нужные доски, брус и гвозди. Аналогично и ферменты обычно строят новые молекулы из предварительно синтезированных определённых химических групп, которые легко добавить к создаваемой молекуле. Многие молекулы являются носителями таких специфических атомов и групп.

На рисунке 173 приведены примеры таких молекул. Темно-серым цветом показаны "носители" на основе аденина (1), которые служат для распознавания этих молекул и фиксированного связывания их с ферментами. Светло-серым цветом показаны те участки молекул (2), которые легко отдают химические группы (3,4,5), а сами эти группы (3,4,5) показаны темно-серым цветом.

АТФ (ATP) легко отдает *фосфат* (3), поскольку существует электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными фосфатными группами.

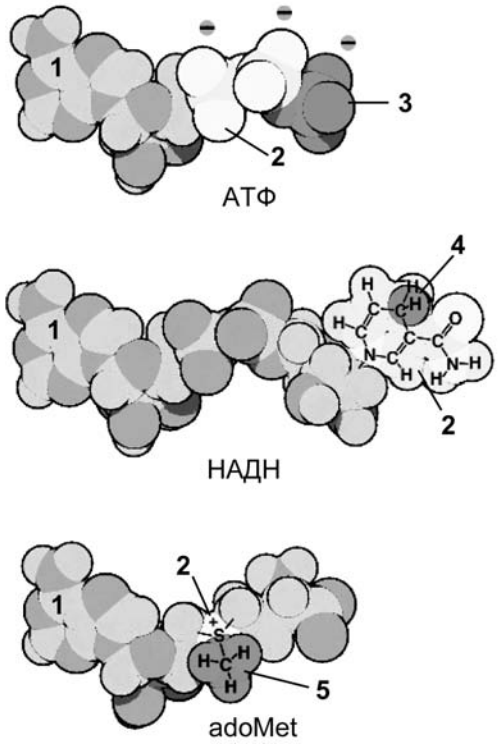


Рисунок 173 – Некоторые малые молекулы – переносчики химических групп. На рисунке показаны: 1 – аденин; 2 – участки молекул, которые легко отдают химические группы 3–5; 3 – фосфат-ион; 4 – гидрид-ион H^-; 5 – метильная группа

Никотинамидадениндинуклеотид, НАД (NAD), переносит *гидрид-ион* (H^-, атом водорода с дополнительным электроном). Уход гидрид-иона с НАД (реакция НАДН→НАД⊕) переводит последний в более стабильную ароматическую структурную форму.

Аденозилметионин (adoMet, или S-аденозилметионин (другие обозначения: SAM, SAMe, SAM-e)) переносит *метильную* группу CH_3, которая присоединена к атому серы. Когда метильная группа удаляется с adoMet, атом серы переходит в более выгодное состояние, в котором он связан с двумя, а не с тремя, соседними атомами.

Различные молекулы-носители (*коферменты*) переносят различные группы, присоединенные к носителям нестабильными связями. Коферменты, в свою очередь, должны быть предварительно синтезированы для дальнейшего их использования ферментами.

В некоторых реакциях требуется всего лишь перенос нескольких *электронов*. В таких случаях, как правило, используются *ионы металлов,* поскольку они могут легко переключаться между разными зарядовыми состояниями.

Ионы *меди* и *цинка* прочно удерживаются внутри небольших аминокислотных кластеров. А вот ион *железа*, обычно захватывается в центре *гема* – достаточно большой молекулярной структуры, которая, в свою очередь, расположена внутри глубокого кармана в теле фермента. Редко встречающиеся в биосистемах атомы металла, такие как *молибден* и *ванадий*, используются тогда, когда необходимо приложить *большую силу*, как, например, в случае разрыва молекулярных связей в молекуле азота, который катализирует фермент *нитрогеназа*.

10.3. Функциональные особенности регуляции бионаносистем

Для того чтобы достижения нанотехнологии были действенными и безопасными необходимо контролировать работу наномашин.

Работу макро-машин можно контролировать, используя множество методов.

1. Можно управлять работой машин, *включая* и *выключая источник энергии*.
2. Можно сконструировать такие устройства, которые (наподобие коробки сцепления в автомобилях) *переключаются* между активным и неактивным состояниями.
3. Можно *блокировать* работу механизма (например, дверной фиксатор не позволяет двери самопроизвольно закрыться).

Природные бионаномашины *используют все эти способы* контроля и управления.

Как говорилось выше (гл. 9), используется несколько различных методов для снабжения энергией бионаномашин, включая химическую энергию АТФ, электрохимические градиенты и энергию фотонов света. Во всех случаях *регулировка энергетического потока* будет обеспечивать контроль за функционированием бионаномашин.

Два других способа – (1) создание машин с двум состояниями и (2) физическая блокировка действия машин – будут описаны ниже.

Молекулярными аналогами этих двух процессов являются (1) аллостерическая регуляция и (2) ковалентная модификация, или ингибирование.

Так же как и в *макро*мире, эти системы управления могут комбинироваться таким образом, что получаются *сверхвысокочувствительные* системы тонкой регуляции слаженности биологических процессов.

10.4. Функциональные особенности аллостерической регуляции

Пространственное перемещение белковых доменов или целых субъединиц в пределах биомолекулярных ассоциатов, которое называется *аллостерическим* движением, широко используется для регулировки ферментативной активности.

Принцип аллостерии был сформулирован Монодом с соавторами в 1965 году, причём они считали, что обнаружили *второй* после открытия структуры ДНК *секрет жизни*.

Они определили **аллостерические белки** как белки*, которые могут находиться в двух (или более) стабильных структурных конформациях и могут легко переключаться между этими состояниями*.

В одном, *напряженном* (*tense* или Т-состоянии), белок не связывается с субстратом.

В другом, *релаксированном* (*relaxed* или R-состоянии), белок может связываться с субстратом.

Регулирование осуществляется многими методами, которые переводят белок в одно из этих состояний, включая или выключая активность белка.

В классическом примере для объяснения нелинейной активности *гемоглобина* к связыванию кислорода белковая молекула, вследствие аллостеричности, демонстрирует кооперативность к связыванию субстрата.

Молекула гемоглобина состоит из четырёх идентичных белковых доменов, каждый из которых имеет активный центр связывания с кислородом. *Кооперативность связывания* означает, что связывание одного лиганда с белком увеличивает сродство для связывания остальных лигандов к оставшимся центрам связывания.

Аллостерические белки используют *изменение формы* для достижения такого кооперативного эффекта. Связывание лиганда с первым центром затруднено, если центр находится в Т-состоянии, *но после связывания с первым лигандом* вся молекула белка *переключается в R-состояние*, что облегчает связывание для остальных лигандов. Последующие исследования показали, что эта модель слишком *упрощенная*, и что домены гемоглобина переключаются из Т в R форму поочерёдно.

Чаще используется *более общий аллостерический подход*. Аллостерический комплекс имеет *два типа центров* связывания: один – для субстрата, другой – для регуляторных молекул (эффекторов). Связывание эффекторов с регуляторными центрами индуцирует изменение конформации молекулы, что сопровождается изменением сродства субстрат-связывающих центров.

Преимущество ферментов, обладающих таким видом аллостерии, заключается в том, что *нет необходимости в непосредственном контакте субстратов и молекул-эффекторов*. Регуляция каталитической активности обеспечивает изменение белковой инфраструктуры между

этими двумя типами центров. Поэтому субстраты и эффекторы *могут* иметь *совершенно различные физические характеристики*.

Например, некоторые *белковые факторы*, регулирующие генетические процессы, в ответ на изменение концентрации малых молекул таких, как *триптофан*, изменяют свою силу связывания с молекулой ДНК. Эти аллостерические белки являются мощными инструментами регуляции многоэтапных процессов, позволяя в каждой ключевой точке процесса обеспечивать тонкие механизмы обратной связи.

Многие аллостерические белки, исследованные с атомным разрешением, демонстрируют такие *структурные переключения*.

Примером реализации аллостерического управления сродством субъединиц белка к лиганду является рассмотренный в п. 7.5 гемоглобин, в котором связывание кислорода одним из четырёх гемов приводит к смещению всего на 0,5 Å соответствующего атома железа из плоскости гема (рисунок 148). Это смещение чувствует соседний *гистидин* и передает его всему остальному четырёхдоменному белковому комплексу гемоглобина, превращая небольшое смещение одного атома в конформационный переход всей белковой макромолекулы.

Пример гемоглобина демонстрирует, как *малое смещение* ключевой аминокислоты *индуцирует переключение* всей белковой глобулы между двумя конформациями.

Белки, которые способны переключаться между двумя стабильными состояниями, преодолевают энергетический барьер между этими состояниями благодаря связыванию с эффекторами. Для создания таких парных метастабильных состояний используется множество *структурных особенностей*.

В одних случаях при переключении между этими двумя состояниями изменяется *взаимное расположение доменов* в мультидоменной молекуле.

В других случаях молекулярный комплекс представляет собой *два кольца* субъединиц, которые *поворачиваются* друг относительно друга, изменяя форму всего комплекса. Два состояния стабилизируются двумя

различными ориентациями соответствующих химических групп и топологическим соответствием выступов впадинам.

Очень часто центры связывания и эффекторов, и субстратов располагаются в *складке между субъединицами*, и в состав этих центров входят аминокислоты обеих субъединиц. Поэтому связывание эффектора приводит к смещению обеих субъединиц, что изменяет структуру центра связывания субстрата.

Например, активная форма *фруктозо-1,6-бифосфотазы* (рисунок 174, слева) представляет собой комплекс, состоящий из четырёх идентичных субъединиц. Когда эффекторы связываются с ферментом в регуляторных центрах, расположенных между субъединицами, молекула фермента изменяет форму, субъединицы сдвигаются друг относительно друга и фермент дезактивируется.

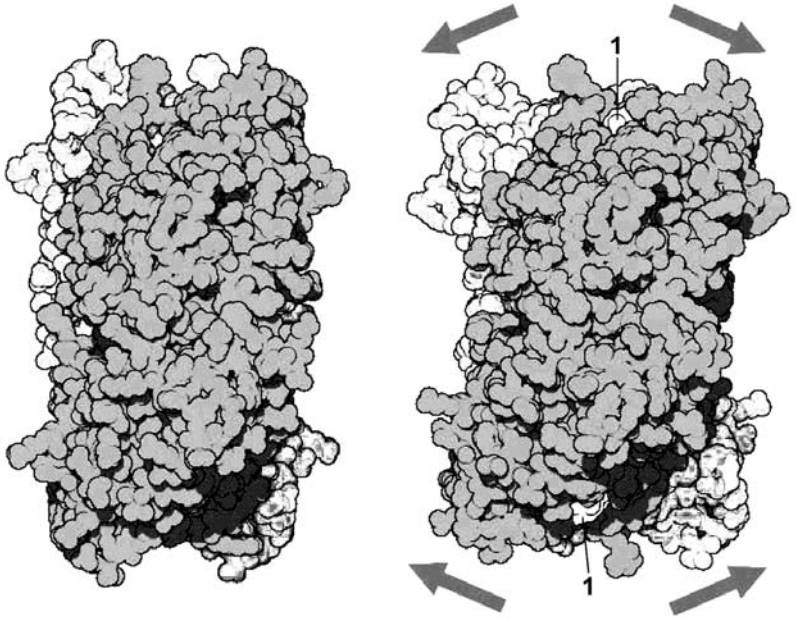


Рисунок 174 – Аллостерическое изменение фермента фруктозо-1,6-бифосфотаза в результате связывания молекул-эффекторов. 1 – эффектор. Стрелками показаны направления смещения субъединиц фермента

10.5. Функциональные особенности регуляции бионаносистем ковалентными модификациями

Активность биомолекул также может быть обратимо изменена *ковалентными модификациями*.

При этом:

1) определённые химические группы, будучи связанными с белковой молекулой, могут *блокировать* связывание субстрата или стимулировать аллостерическое изменение конформации;
2) *заряженные химические группы* изменяют *зарядовое состояние* белка, что может привести к изменению силы связывания с субстратом;
3) *химическая модификация* ключевых химических групп в активном центре фермента может изменить *каталитические* свойства белка.

Фосфорилирование. Поскольку значительная часть созданных эволюцией природных бионаномашин использует АТФ в качестве источника энергии, то существует множество молекулярных инструментов, позволяющих присоединять или удалять фосфатные группы к различным аминокислотам в белках – осуществлять фосфорилирование.

Оксиаминокислоты *серин, треонин и тирозин* являются *наиболее часто* используемыми аминокислотами для присоединения фосфатных групп. Фосфатные группы несут в себе отрицательный заряд, поэтому они могут вызывать значительные структурные изменения в фосфорилированных белках или в целых молекулярных комплексах.

Например, фосфорилированный белок *SRC-тирозин-киназа* неактивен (рисунок 175, слева). Фосфат связан с тирозином в глубине кармана на поверхности белка, что стимулирует поддержание закрытой, шарообразной формы белковой глобулы. *Дефосфорилирование* приводит к конформационному переходу, при котором открывается активный центр, с которым может связаться АТФ (рисунок 175, справа).

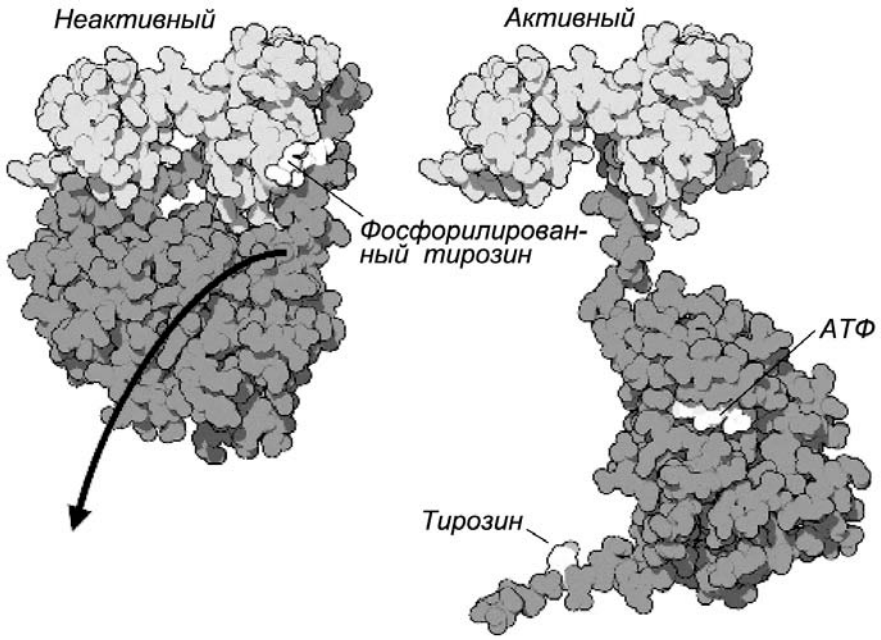


Рисунок 175 – Регулирование активности белка SRC-тирозин-киназа фосфорилированием

Фосфорилирование широко используется для внутриклеточной сигнализации, когда сигнал с рецептора плазматической мембраны передается к месту исполнения в клетке. Фосфатные группы добавляются ферментами *киназами* и впоследствии, после "доставки сообщения", удаляются ферментами *фосфатазами*.

Протеолитическое разрезание. *Разрезание белковой цепи* также широко используется для регулирования белковой активности в случаях, когда белок должен быть доставлен в определённое место организма, а только потом активизирован.

Например, фермент *трипсин* (рисунок 176) активизируется вырезанием регуляторного пептида, который блокирует каталитический центр, находящийся внутри глубокой впадины на поверхности фермента.

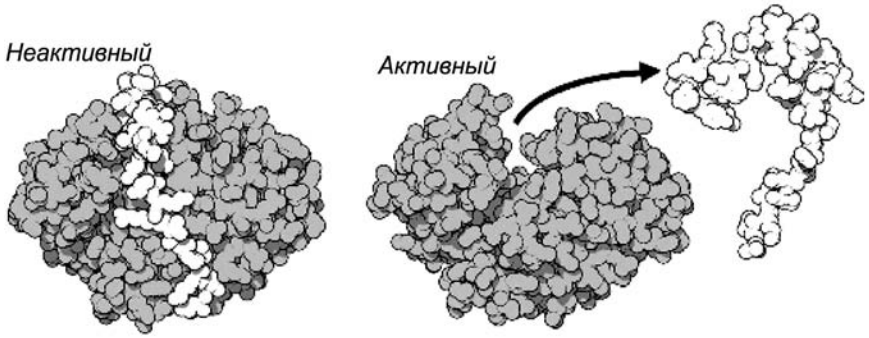


Рисунок 176 – Активизация трипсина протеолитическим вырезанием регуляторного пептида

Это, в частности, важно в случае синтеза пищеварительных ферментов, которые, после синтеза в клетке, должны оставаться безопасными (неактивными) до тех пор, пока они не секретируются из клетки. Протеолитическое разрезание также используется для регуляции *свёртывания крови*, когда компоненты, формирующие сгусток (тромб) присутствуют в крови в большой концентрации, но активируются только в месте повреждения кровеносного сосуда. Это позволяет ассемблировать тромб размером порядка миллиметра за время порядка секунды.

Разрезание также используется *иммунной* системой, когда молекулы активизируются только в необходимом месте организма. Во всех этих случаях белок синтезируется в форме *профермента*, с лишними сегментами, которые блокируют активный центр или удерживают фермент в неактивной форме.

Это напоминает выдергивание чеки из гранаты – активизация фермента происходит вследствие удаления блокирующего белкового сегмента.

Контрольные вопросы и задания

1. Опишите стадии наномодификаций субстрата в ходе ферментативной реакции изомеризации дигидроксиацетонфосфата в глицеральдегид-3-фосфат.

2. Чем ферменты ценны для бионанотехнологии?
3. За счёт каких двух факторов ферменты снижают величину энергетического барьера в переходном состоянии преобразования субстрата в продукт?
4. Какие три общих принципа используются в конструкции активного центра большинства ферментов?
5. Каким образом энтропия препятствует протеканию химических реакций?
6. Какие две функциональные области содержат в себе активные центры большинства ферментов?
7. Каким требованиям должно удовлетворять область специфического связывания субстрата в активном центре фермента?
8. Какими способами фермент может стабилизировать переходное состояние реакции?
9. Каким образом заряженные аминокислоты фермента могут способствовать стабилизации переходного состояния реакции?
10. Какие структурные особенности гистидина используются для активации биохимических реакций в активных центрах ферментов?
11. Как образование ковалентной связи с субстратом сериновой протеазы стимулирует разрыв пептидной связи?
12. Какие молекулы являются носителями функциональных групп в ферментативном катализе?
13. Каким образом ионы металлов используются в составе активных центров ферментов?
14. Какие три основных метода используются для контроля и управления машин?
15. Молекулярными аналогами каких макропроцессов являются аллостерическая регуляция и ковалентная модификация, или ингибирование?
16. Какой вид перемещения называется аллостерическим движением?
17. Какие белки называются аллостерическими?
18. Что называется кооперативностью связывания?

19. Какие преимущества даёт расположение центров лигандов между субъединицами белка?
20. Какие три вида воздействия на активность биомолекул вызывает их ковалентная модификация?
21. Каковы функциональные особенности регуляции бионаносистем протеолитическим разрезанием?

Глава 11
Биоматериалы

Нанотехнология стремится освоить синтез таких экзотических материалов, как алмазы или углеродные нанотрубки. При этом ошибочным будет представлять себе, что для манипулирования и обработки материалов в наномире достаточно просто соответствующим образом уменьшить макромашины и станки и получить наномашины и нанороботы, которые даже в наномасштабах собраны из традиционных, привычных для нас по *макро*миру материалов таких, как металл, стекло и пластмассы.

Природные материалы построены с использованием *иного* подхода, нежели материалы, используемые в макро-технологиях. Поскольку организмы постоянно изменяются, растут и реагируют на изменения в окружающей среде, то биоматериалы являются *динамическими* структурами.

Они синтезируются для выполнения определённой функции, а затем быстро дизассемблируются. Некоторые клеточные структуры сохраняются в клетке только *одну секунду*, после чего они модифицируются.

Даже в наиболее стабильных биоструктурах, таких как, например, кости, постоянно происходят процессы репарации и перестройки.

Только *ограниченное* число биоструктур такие, как кости, раковины моллюсков и шерсть, можно использовать после смерти организма, однако примечательно, что именно их человек использовал для своих нужд с самого начала истории промышленной технологии.

Сегодня мы владеем необходимыми знаниями и инструментами для обработки и преобразования этих природных биоматериалов и

использования принципов их построения для создания аналогичных наноматериалов.

11.1. Спиральное ассемблирование биоматериалов

Ассемблирование биологических филаментов программируется соответствующим *дизайном интерфейсных областей* на поверхности белков-мономеров (рисунок 131).

Использование самоассоциирующихся глобулярных белков для образования филаментов имеет *несколько преимуществ*.

Поскольку филаменты собираются из множества модулярных структур, то они представляют собой своеобразный каркас (*scaffold*), к которому могут присоединяться другие структуры. Филаменты устроены так, что они могут быть быстро собраны и разобраны, позволяя быстро *реагировать* на изменение потребности в филаментах.

Поскольку взаимодействие между модулями филаментов происходит через интерфейсные область на поверхности, то можно *управлять* процессом ассемблирования филаментов, изменяя эти интерфейсные области посредством присоединения лигандов, ионов или других белков.

Спиралеобразные белковые филаменты *обнаружены во всех* природных объектах, они являются одними из наиболее распространённых белковых объектов в клетках.

Разрабатывая необходимым образом соответствующие *интерфейсные* "стыковочные" области самоассемблирования каждой индивидуальной субъединицы, можно сформировать филаменты произвольной формы (рисунок 177).

Если "стыковочные" области располагаются на противоположных концах субъединицы, то ассемблирование субъединиц формирует *тонкий филамент*, в котором модули располагаются подобно бусинкам в нитке бус. Если интерфейсы ассоциации слегка сдвинуты, несимметричны, то образуются спиральные структуры. Если же существуют дополнительные стыковочные сайты по бокам субъединиц, то из таких спиралей образуются прочные цилиндры.

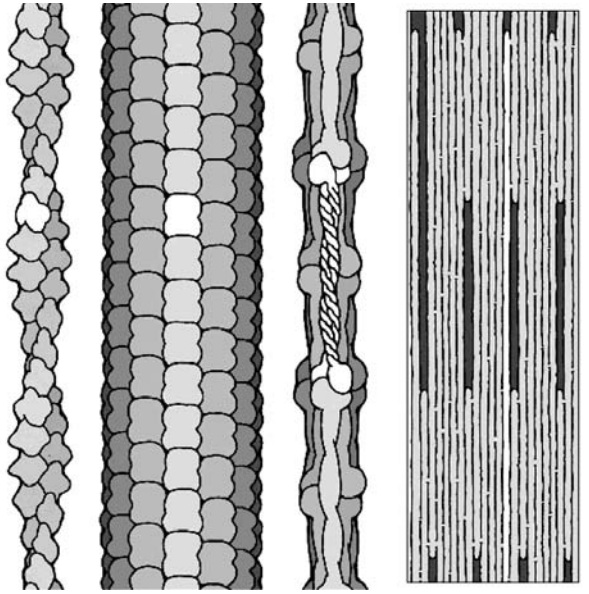
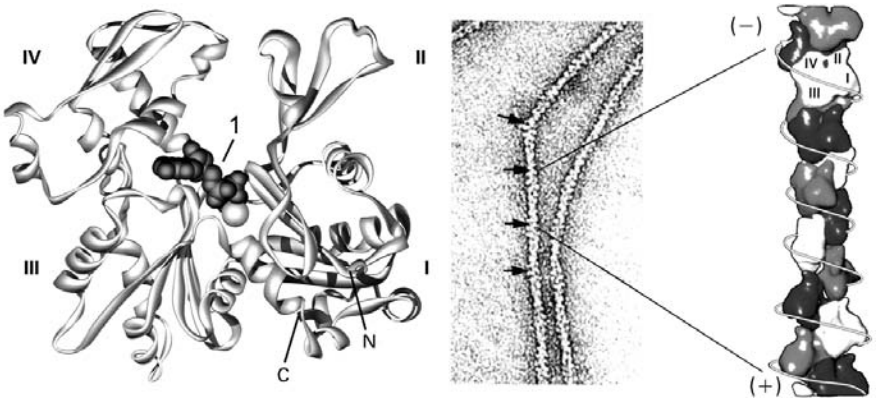


Рисунок 177 – Модульные филаменты: *а* – актиновая нить, *б* – микротрубочка, *в* – промежуточный филамент, *г* – коллаген

Актиновые нити являются примером тонкого филамента (рисунок 177(а)). Актин – наиболее распространенный филаментообразующий белок в клетке – может существовать в виде мономера (*G-актин*, глобулярный актин) или полимера (*F-актин*, фибриллярный актин) (рисунок 178). Из актина формируется большинство структур цитоскелета и большая часть инфраструктуры, которая обеспечивает подвижность клетки. Ассоциация актина в филамент приводит к образованию протяжённой спиральной структуры с несимметричными концами.

G-актин – асимметричный глобулярный белок (42 кДа), состоящий из *двух доменов* (каждый из которых состоит из двух субдоменов). По мере *повышения* ионной силы G-актин обратимо агрегирует, образуя линейный скрученный в спираль полимер, F-актин. Молекула G-актина несёт прочно связанную молекулу АТФ, которая при переходе в F-актин,

медленно гидролизуется до АДФ, т. е. F-актин проявляет свойства *АТФазы*.



а *б* *в*

Рисунок 178 – Структура глобулярного и фибриллярного актина: *а* – модель мономера G-актина; 1 – складка, в которой связывается АТФ, C- и N- концы находятся в субдомене I; *б* – спираль F-актина в электронном микроскопе; *в* – модель полимера актина

Количество мономеров и полимеров различным образом зависит от концентрации актина в клетке (рисунок 179). С увеличением концентрации актина в клетке, начиная с некоторого *критического значения* $C_C \approx 0{,}1$ μM, начинается полимеризация F-актина.

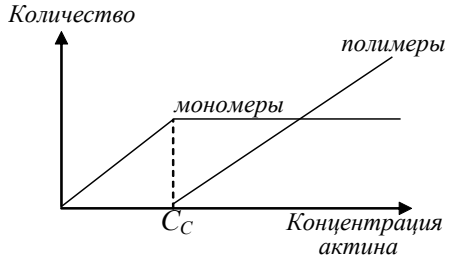
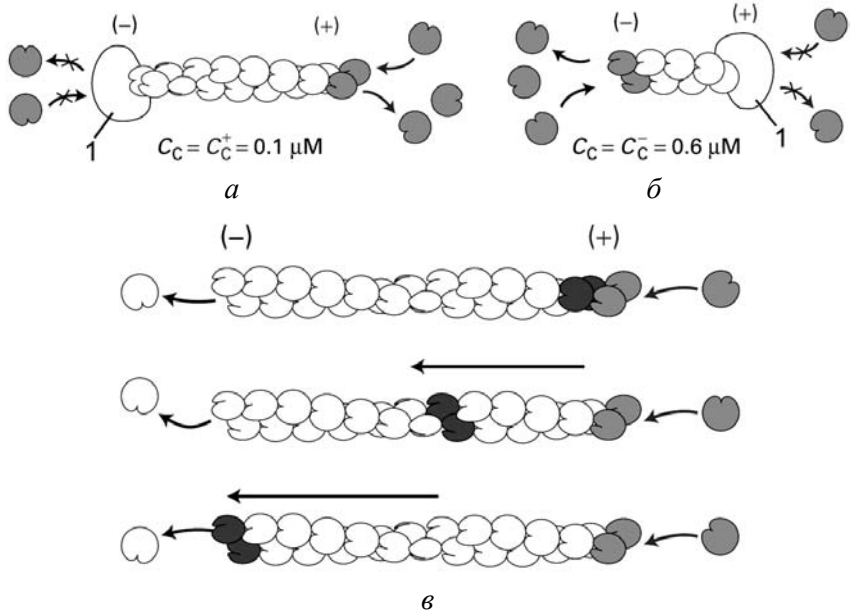


Рисунок 179 – Зависимость количества мономеров и полимеров от концентрации актина

При полимеризации G-актина в F-актин ориентация всех мономеров одинакова, поэтому F-актин обладает *полярностью*. Волокна F-актина имеют *два конца*: (+) и (–), которые полимеризуются с различной скоростью, поскольку имеют различную критическую концентрацию: $C_C^+ \approx 0{,}1$ μM, $C_C^- \approx 0{,}6$ μM. Поэтому, при полимеризации (+)-конец растёт со скоростью в 5–10 раз большей, чем (–)-конец, что приводит к *векторному* росту филамента (рисунок 180).



а *б*

в

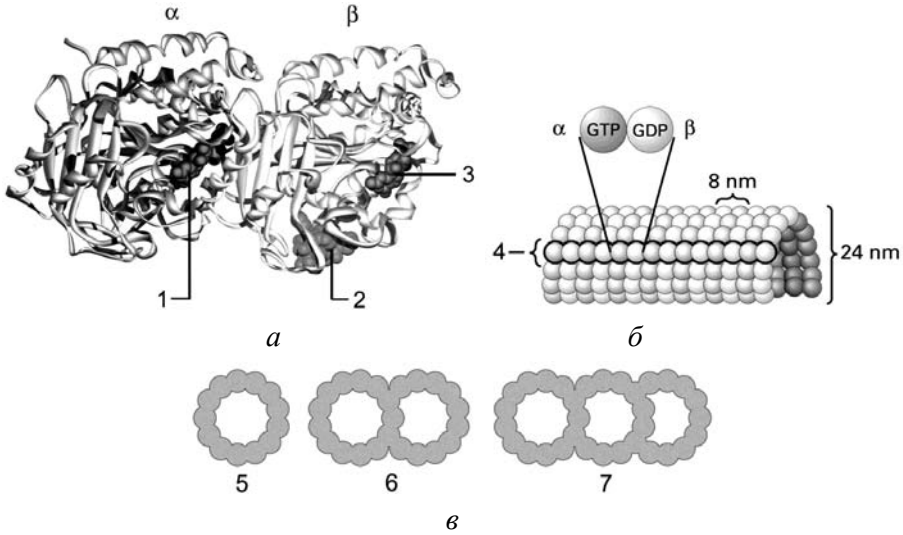
Рисунок 180 – Полимеризация актина: *а* – рост (+)-конца; *б* – рост (–)-конца; *в* – течение филамента; 1 – кэпирующий белок

Актиновые филаменты чрезвычайно *динамичны* в живой клетке, они постоянно ассемблируются и дизассемблируются в зависимости от потребностей клетки. Рост каждого филамента регулируется связыванием АТФ, который стимулирует рост, и набором обслуживающих белков, которые стабилизируют или разъединяют филаменты.

Динамическая структура актиновых филаментов в сочетании с их векторной структурой, при которой два конца структуры неэквивалентны, обусловило появление необычного их свойства, которое называется *течение филаментов* (*trademilling*, эффект *бегущей дорожки*).

Эффект течения филаментов состоит в том, что субъединицы постоянно *диссоциируют* с запаздывающего конца (*lagging end*) филамента и присоединяются (*реассемблируют*) на растущем конце (*leading edge*) филамента. В результате, филамент, оставаясь приблизительно неизменной длины, "движется" относительно окружения. Эффект течения филаментов используется клеткой как часть аппарата, обеспечивающего клеточную подвижность.

Микротрубочки представляют собой пример *более жёсткого* цилиндрического дизайна. Они построены из глобулярного белка тубулина, представляющего собой *димер* α- и β-субъединиц (рисунок 181(а)).



а *б* *в*

Рисунок 181 – Строение микротрубочек: *а* – гетеродимер тубулина; *б* – цилиндрический полимер; *в* – "упаковка" протофиламентов; 1 – ГТФ (GTP); 2 – молекула таксола (*taxol*); 3 – ГДФ (GDP); 4 – протофиламент; 5–7 – одинарные, двойные и тройные микротрубочки

α,β-Гетеродимеры тубулинов образуют линейные цепочки, называемые *протофиламентами*. Тринадцать протофиламентов образуют *циклический* комплекс (рисунок 181(5)). Затем кольца полимеризуются в длинную трубку. Микротрубочки ресничек и жгутиков имеют дублетную структуру (рисунок 181(6)), а базального тела и *центриолей* – триплетную (рисунок 181(7)). Микротрубочки "толще" актиновых филаментов. Они имеют диаметр порядка 25 нм и полый канал вдоль оси трубочки диаметром около 14 нм.

Как и микрофиламенты, микротрубочки представляют собой динамические полярные структуры с (+)- и (–)-концами.

(–)-Конец стабилизирован за счет связывания с *центросомой* (центр организации микротрубочек или *клеточный центр*), в то время как для (+)-конца характерна *динамическая нестабильность*. Он может либо медленно расти, либо быстро укорачиваться.

Так же, как и актиновые нити, микротрубочки являются *динамическими* структурами, в которых состояние каждой субъединицы, как свободной, так и входящей в состав микротрубочки, контролируется состоянием связанной с ней молекулы ГТФ. Тубулиновые мономеры являются ГТФазами – они связывают гуанозинтрифосфат (ГТФ), который медленно гидролизуется в гуанозиндифосфат (ГДФ).

Микротрубочки демонстрируют интересный эффект, который называют *динамической нестабильностью*. Микротрубочка удлиняется по мере присоединения субъединиц к растущему концу, и, внезапно, этот растущий конец начинает "растрёпываться", и микротрубочка распадается на субъединицы. Благодаря такому свойству микротрубочки постоянно растут, но для стабилизации их структуры необходимы специфические стабилизирующие белки.

Микротрубочки выполняют важную функцию "рельсов", по которым моторные белки *динеины* и *кинезины* перемещают "грузы" в клетке. Наиболее впечатляющими "грузами" являются целые *хромосомы*, которые транспортируются вдоль митотического аппарата, состоящего из микротрубочек, от "экватора" делящейся клетки к клеточным полюсам в процессе клеточного деления.

Конструкция актина и тубулина обеспечивает *быстрое* ассемблирование и дизассемблирование.

Однако способ ассемблирования одновременно и *ограничивает прочность* получающихся филаментов. Тонкие актиновые нити являются гибкими, но они легко рвутся, если их согнуть или растянуть.

Микротрубочки также не выдерживают сильного растяжения, но они гораздо прочнее актиновых нитей по отношению к изгибу.

Для создания структур, которые более устойчивы к растяжению, необходимо использовать более сильные взаимодействия.

Если клетке необходимы прочные и долговечные структуры, то в этом случае используются *фибриллярные белки*. Такие фибриллы тоже имеют модульную структуру, но комбинация *перекрестных линков между субфибриллами* и *способа соединения модулей* "*внахлестку*" формирует структуры, которые устойчивы к дизассемблированию. Характерными представителями такого способа организации фибриллярных структур в высших организмах являются промежуточные филаменты и коллаген.

Промежуточные филаменты (названные так, поскольку их диаметр больше, чем у актиновых нитей, но меньше, чем у микротрубочек) образуются из вытянутых белковых мономеров, которые расположены внахлёст друг другу вдоль филамента, что обеспечивает сильное взаимодействие вдоль всей длины мономеров (рисунок 177(в)).

Тело мономера белка образуется двумя белковыми цепями, которые свернуты в α-спирали, которые затем закручены друг относительно друга, образуя так называемый мотив "скрученная спираль" (*coiled coil*) (рисунок 182(а)). Такие димеры ассоциируют антипараллельно, образуя тетрамер. Глобулярные домены на концах белковых модулей формируют видимые узлы на промежуточных филаментах. Агрегация тетрамеров по принципу "голова к голове" дает *протофиламент*. Жгут протофиламентов образует промежуточное волокно. В отличие от микрофиламентов и микротрубочек свободные мономеры промежуточных волокон едва ли встречаются в цитоплазме. Их полимеризация ведет к образованию *устойчивых* неполярных полимерных молекул.

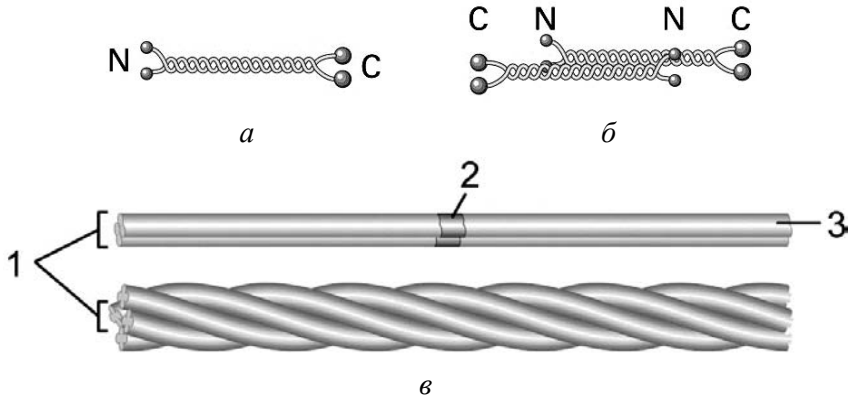


Рисунок 182 – Промежуточные волокна: *а* – скрученная спираль; *б* – тетрамер; *в* – промежуточное волокно: 1 – протофибрилы, 2 – тетрамер, 3 – протофиламент

Промежуточные филаменты используются для связывания ключевых структур в клетке, формируя нежёсткую сеть в цитоплазме и прочный многослойный каркас *ядерный ламин* за ядерной мембраной внутри клеточного ядра.

Подобным же образом белок *кератин* формирует *кератиновые филаменты*, которые обеспечивают прочность *волос и ногтей*. В кератиновых филаментах дополнительная прочность обеспечивается формированием дисульфидных мостиков между цистеинами белков.

Коллаген является наиболее распространенным белком в теле человека (рисунок 177(г)). Фибриллярная структура коллагена поддерживает и объединяет клетки в ткани. В простейшей форме коллаген представляет собой длинный белок, состоящий из трёх белковых цепей, которые скручены в спиралеобразный жгут. Такая прочная структура требует частого повторения специальной аминокислотной последовательности (глицин–Х–пролин), где Х может быть любой аминокислотой (рисунок 6).

Глицин нужен для правильной укладки тройного жгута в данной точке, а *пролин* необходим для фиксированного жёсткого изгиба пептидной цепи, с тем, чтобы образовалась спиральная структура.

Кроме того, многие пролины *модифицированы* добавлением дополнительных гидроксильных групп (гидроксилированы), что обеспечивает формирование дополнительных водородных связей между соседними пептидными цепями. Такие длинные жгуты затем ассоциируются в шахматном порядке, формируя коллагеновые фибриллы. Белки образуют дополнительные лизин-лизиновые кросс-линки для увеличения прочности.

11.2. Функциональные особенности формирования фибриллярных микроструктур

Для формирования микроструктур (и более масштабных образований) из наноузлов наноструктуры должны обладать качествами, которые необходимы для их объединения в объёмные биоматериалы. Проще всего представить себе формирование крупной биоструктуры из наноблоков наподобие строительства стены из модулей-кирпичей.

Однако такой подход крайне редко встречается в биосистемах. Большинство биологических инфраструктур формируется в виде *сетеобразного прочного каркаса*, в котором наномодули надежно связаны друг с другом. При этом известны двумерные структуры наподобие рыбацких сетей, трёхмерные каркасы наподобие строительных лесов (*scaffolds*), или же различные комбинации этих конструкций. Такие образования одновременно и *прочные*, и *эластичные*. Они обычно являются *пористыми*, позволяя свободно проходить воде и малым молекулам.

Одной из наиболее распространённых подобных структур является *двумерная сеть*, придающая необходимую форму и прочность биомембранам. Липидный бислой является прекрасным барьером, но сама по себе биомембрана не может противостоять внешним механическим и осмотическим напряжениям. Специализированная сеть (каркас) из полимерных молекул используется для поддержания биомембраны.

Бактериальные клетки используют *оболочку из пептидогликанов* для защиты их плазматической мембраны. Пептидогликаны состоят из

длинных углеводных цепей, соединенных *кросс-линками* из коротких пептидов. Для ассемблирования такого каркаса используется набор специализированных *ферментов* (антибиотик пенициллин как раз и ингибирует один из таких ферментов). Простая конструкция пептидогликановой бактериальной наружной оболочки, которая напоминает рыбацкую сеть, позволяет реализовать очень *эффектный способ* увеличения её площади в ходе клеточного деления.

Вследствие высокой концентрации биомолекул внутри клетки плазматическая мембрана клетки находится под *высоким* осмотическим *давлением*. Поэтому пептидогликановая оболочка *должна быть цельной* в течение всего клеточного цикла. Предполагается, что такая цельность обеспечивается синтезом *новых* углеводных цепей параллельно уже существующим парам углеводных цепей с кросс-линками между ними. После синтеза новая цепь *образует* кросс-линки с каждой из двух старых цепей, а кросс-линки между двумя старыми цепями *удаляются*, что позволяет оболочке постепенно расширяться, не теряя цельности.

В клетках животных белковая сеть поддерживает плазматическую мембрану *изнутри*. К цитозольной части якорных мембранных белков присоединяются актиновые волокна, которые являются частью цитоскелета клетки. Белковая сеть из двухнитиевых белков *спектринов* располагается под плазматической мембраной, соединяя актиновые нити.

Одним из наиболее простых примеров, иллюстрирующих образование такой *спектриновой подоболочки*, является спектриновая сеть *эритроцитов* (красных кровяных телец), в которых к якорным мембранным белкам присоединены только лишь короткие актиновые сегменты, служащие местами крепления спектриновой сети.

На рисунке 183 показан участок мембраны эритроцита, двойные нити спектринов изображены белым цветом. Эритроциты являются чрезвычайно гибкими клетками и могут сворачиваться так, что способны проходить в капилляры, диаметр которых вдвое меньше диаметра эритроцита. Но спектриновая подоболочка поддерживает постоянной площадь поверхности эритроцита при его движении по капиллярам кровеносной системы.

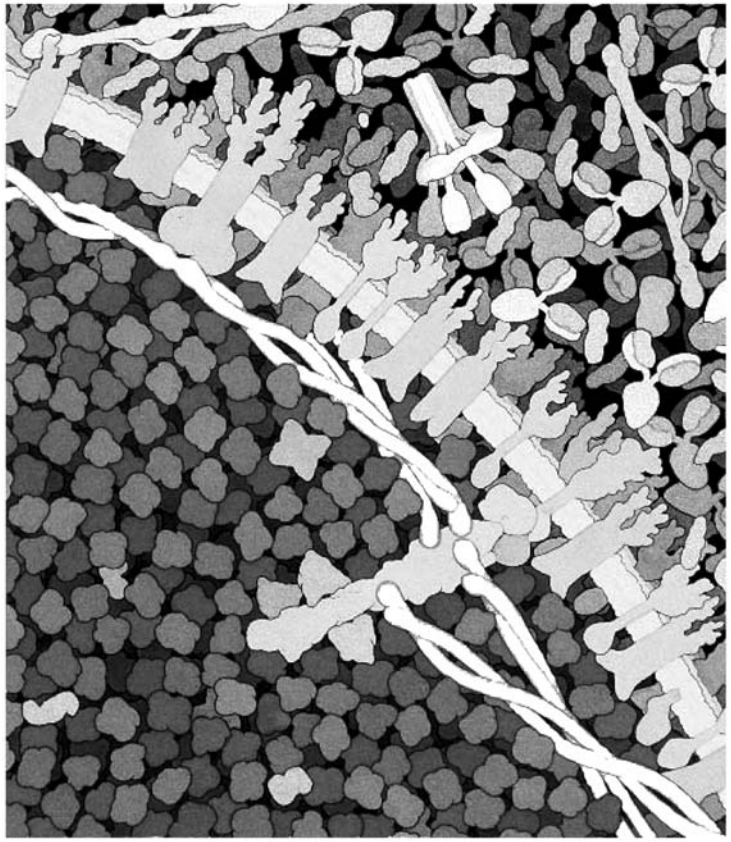


Рисунок 183 – Участок мембраны клетки эритроцита

Трёхмерная сеть актиновых нитей, промежуточных филаментов и микротрубочек формирует цитоскелет клетки, который используется как для поддержания необходимой топологии клетки, так и в качестве "рельсов" для внутриклеточного транспорта.

Актиновые нити соединяются *актин-связывающими белками* для формирования протяжённых внутриклеточных структур. На рисунке 184 показаны примеры связывания актиновых нитей в плотный пучок малыми белками *фимбринами*, и образование более рыхлой структуры с помощью шарнироподобных белков *филаминов*.

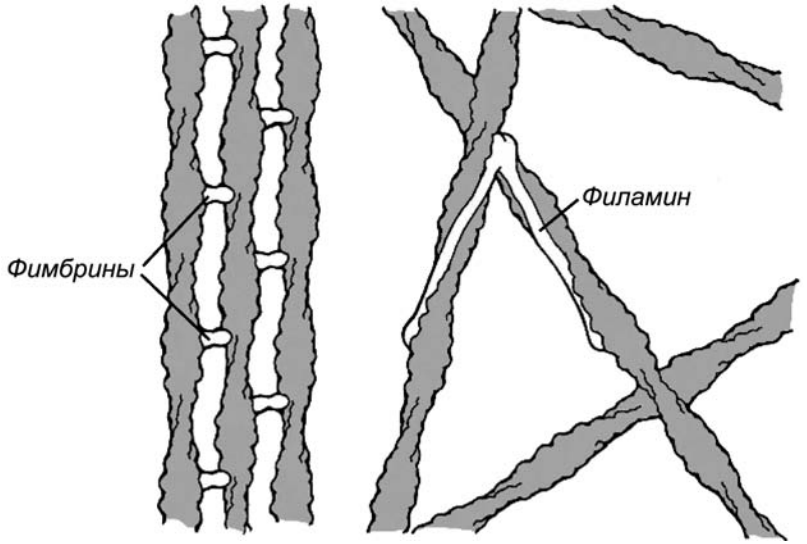


Рисунок 184 – Связывание актиновых нитей в различные инфраструктуры с помощью актин-связывающих белков, изображенных белым цветом

Сам по себе раствор актиновых нитей представляет собой вязкую жидкость. Если же добавить в него белок *филамин*, он формирует кросс-линки, и жидкость превращается в студнеобразный гель.

Для формирования различных структур используются различные актин-связывающие белки. *Филамины*, имеющие вид шарниров, формируют беспорядочную актиновую сеть. Малые белки *фимбрины*, имеющие два актин-связывающих участка, напротив, выравнивают актиновые нити параллельно и используются для формирования более-менее упорядоченных актиновых жгутов. Они используются в некоторых клетках для поддержки микроворсинок на поверхности клетки.

При формировании *многоклеточных* организмов всё большего размера биоматериалы усложняются. Необходимым является *следующий уровень* "*крепежа*" *макроструктур*. Множество структур, обеспечивающих топологию многоклеточных организмов, используют концепцию "*армированного бетона*". В них жёсткие *линейные фибриллы* (аналог арматуры) сочетаются с менее жёсткой *матрицей-наполнителем* (аналог

бетона). Вместе они образуют композит, сочетающий достоинства каждого из компонентов.

Основные (базальные, *basement*) *мембраны* представляют собой прочные двумерные структуры, которые используются в высших организмах при формировании тканей из клеток. На рисунке 185 показана такая структура, состоящая из длинных тонких *коллагеновых волокон*, крестообразных молекул *ламинина* и *матрицы-наполнителя* из трёхлучевых молекул *протеогликанов*.

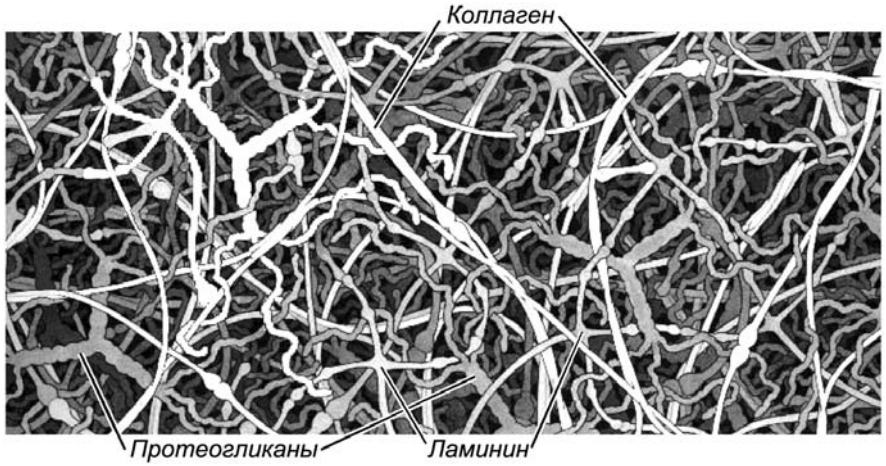


Рисунок 185 – Структура базальной мембраны

Базальные мембраны также выполняют функцию *молекулярного сита*, которое блокирует движение больших биомолекул, но позволяет свободно диффундировать малым молекулам.

Такие мембраны сочетают в себе прочную сеть фибриллярных структур с углеводной гелиевой матрицей. Фибриллярная основа этой мембраны состоит из двух взаимопересекающихся подрешеток *коллагена* и *ламинина*.

Коллаген (тип 4) формирует длинные "канаты", которые, соединяясь своими концами, образуют сложную многогранную сеть.

Аналогичным образом *ламинины*, крестообразные комплексы трёх белковых цепей с липкими концами, соединяясь этими концами, образуют сеть.

Эти две сети *взаимно переплетены*, кросс-линки между ними обеспечивают белки *энтактины*.

Такая хаотичная, но прочная конструкция заполнена внутри гепарин-сульфатными *гликопротеинами* – белковыми комплексами, содержащими множество углеводных цепей. Эти углеводные цепи содержат отрицательно заряженные *сульфатные группы*, с которыми связываются ламинины, что приводит к образованию единой *протеогликан-коллаген-ламининовой* сети.

Растения используют аналогичную технологию при формировании клеточных стенок. Фибрильными компонентами у них является, главным образом, *целлюлоза* – углеводный полимер, состоящий из нескольких тысяч мономеров глюкозы. Целлюлозные нити ассоциируются параллельно, образуя прочные *микрофибриллы*. Между соседними целлюлозными цепями возникает настолько хорошо организованная сеть водородных связей, что целлюлоза формирует кристаллическую структуру внутри таких микрофибрилл.

Множество подобных целлюлозе, но более коротких углеводных полимеров *соединяют* целлюлозные микрофибриллы, образуя водородные связи с поверхностями микрофибрилл. А затем образовавшиеся *пустоты* между микрофибриллами заполняются молекулами *пектинов*.

Пектины (от древнегреческого πηκτός – свернувшийся, замёрзший) являются линейными или разветвлёнными углеводными цепями с большой долей *d-галактуроновой кислоты* (отрицательно заряженный сахар). А с ними в свою очередь электростатически связываются ионы *кальция*, образуя *гелеобразную* сеть связанных углеводных цепей.

Все эти процессы вместе формируют те настолько прочные биоструктуры, которые служат несущим каркасом самых высоких деревьев и которые человек использует для производства бумаги, пластмасс, лаков, бездымного пороха и т. д.

11.3. Биоминерализация тканей

Минералы включаются в состав биоматериалов тогда, когда требуется *усилить* прочность биоматериалов или ещё каким-нибудь образом изменить их свойства. В составе биосистем было обнаружено *более 60* минералов.

Минералы включаются в состав костной ткани, зубов, скорлупы яиц, раковин моллюсков для увеличения их *прочности*. Кроме того, минералы исполняют некоторые менее очевидные функции. Например, инерционность кристаллов *отолита* используется для гравитационной сенсорики, а ориентация малых кристаллов *магнетита* используется для детектирования слабого магнитного поля Земли.

Примеры биоминерализации с использованием кальция приведены на рисунке 186.

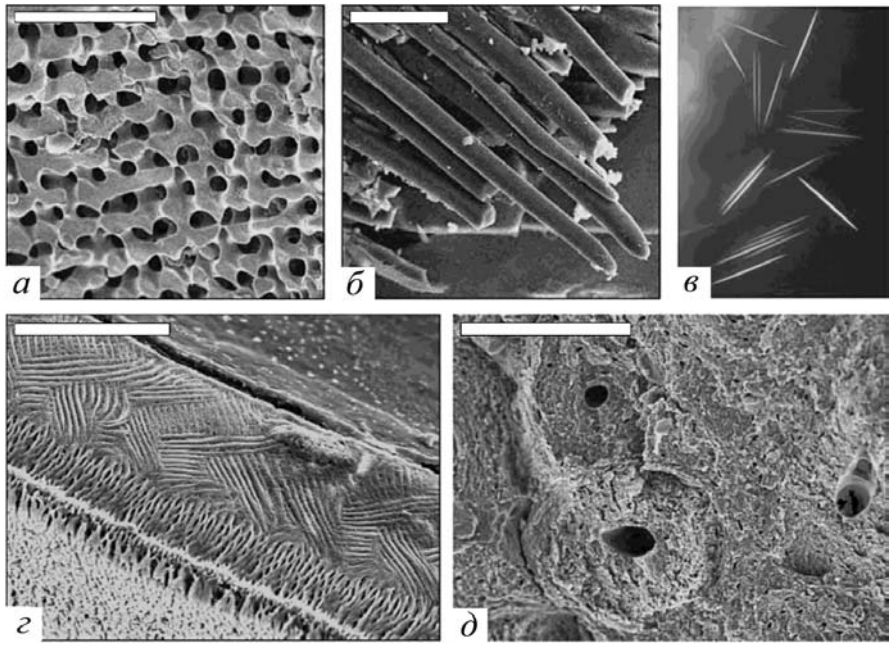


Рисунок 186 – Примеры кальциевой биоминерализации

На рисунке 186(а) представлена микрофотография иглы морского ежа, состоящего из сросшихся монокристаллов магний-содержащего кальцита (линейный масштаб (*scale bar*) рисунка – 100 мкм).

Зуб морского ежа имеет аморфную кальций-карбонатную основу минерализованную палочкообразными кристаллами кальцита (рисунок 186(б), масштаб 20 мкм).

Иглообразные кристаллы оксолата кальция (CaOx) *рафиды*, которые растут в везикулярных компартментах листьев растений показаны на поляризационной микрофотографии на рисунке 186(в).

Позвоночные также имеют волокнистые минералы, например, эмаль зубов крысы сформирована "палочками" гидроксиапатита, уложенными внахлёст (рисунок 186(г), масштаб 50 мкм).

Скелет позвоночных также содержит маленькие кристаллы гидроксиапатита встроенные в коллагеновые фибриллы, которые образуют концентрические оболочки вокруг капилляров кровеносной системы в остеонах (структурная единица компактного вещества кости, обеспечивающая её прочность) (рисунок 186(д), масштаб 200 мкм).

Разнообразие минеральных кремнезёмных панцирей диатомей (*Diatomeae*, диато́мовые кремнистые водоросли, *Bacillariophyta*) показано на рисунке 187.

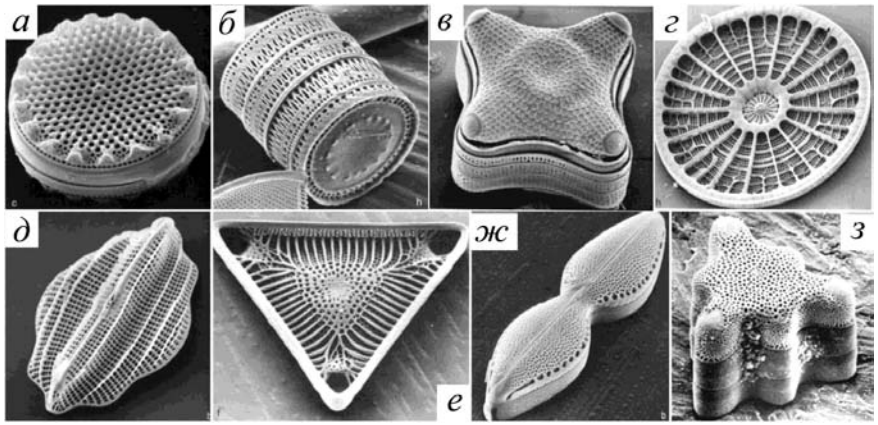


Рисунок 187 – Примеры диатомитовых кремниевых панцирей

На рисунке 188 представлены примеры кремнистых структур (шестилучевые кремнистые иглы), формирующих скелет стеклянных губок *F. occa* (*glass sponges* или *Hexactinellid sponges*, рисунок 188(а,б)) и каменистых губок *Neopelta* sp. (*Lithistidae* или *lithistid sponges*, рисунок 188(в,г)).

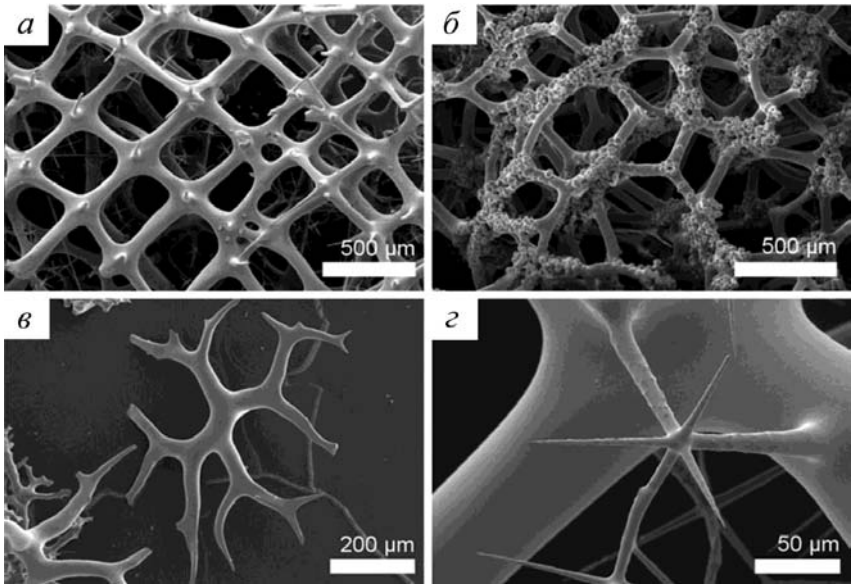


Рисунок 188 – Примеры кремнистых скелетов губок

Ещё один пример изящных биоминеральных структур – это иглы плоского морского ежа необыкновенного (*Scaphechinus mirabilis* или *Sand dollar*), которые в процессе эволюции утратили свою первоначальную защитную функцию и используются для закапывания в песчаный грунт и фильтрации и перемещения питательных веществ к ротовому отверстию (рисунок 189). На рисунках 189 (б) и (в) представлены увеличенные изображения вершины и основания (*tubercle*) иглы. Огромное разнообразие строения таких иголок, однозначно связанного с выполняемыми ими функциями, может быть использовано бионанотехнологами для

разработки пористых, иерархически структурированных искусственных биоматериалов.

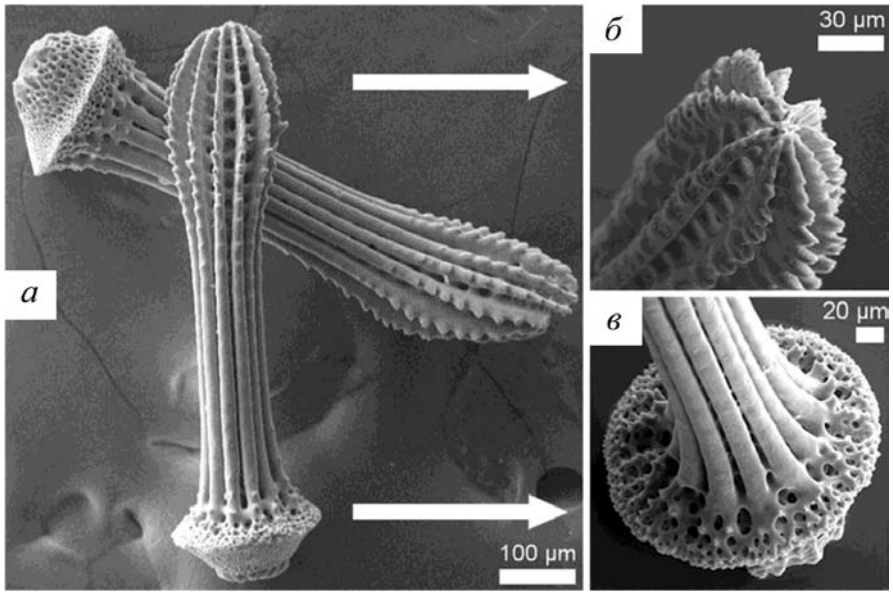


Рисунок 189 – Микрофотографии иголок *S. mirabilis*

Другой пример ажурных биоминеральных структур – это кальцитные кокколиты (*coccoliths*) – экзоскелет кокколитофоридов (*Coccolithophores* или *Coccolithophorids*) – одноклеточных планктонных водорослей, составляющих существенную (до 98 %) часть нанопланктона, чей известковый скелет, входящий в состав донных отложений, часто используются для определения возраста горных пород. Несмотря на их малый размер (1–10 мкм), кокколиты представляют собой детально проработанные биоминеральные конструкции, характеризуемые точным контролем как образования кристаллического зародыша, так и роста кальцитных кристаллов, контролируемых биологической системой. Кокколиты широко используются в геологии как маркерные окаменелости, чтобы определить возрасты осадков, особенно при бурении пород. Диплоидные и гаплоидные формы кокколитофоридов формируют

гетерококколиты (*heterococcoliths*) и холококколиты (*holococcoliths*), соответственно (рисунок 190). Представленная на рисунке 190 комбинированная коккосфера *Calcidiscus leptoporus* ssp. *quadriperforatus* с кокколитами двух типов встречается очень редко.

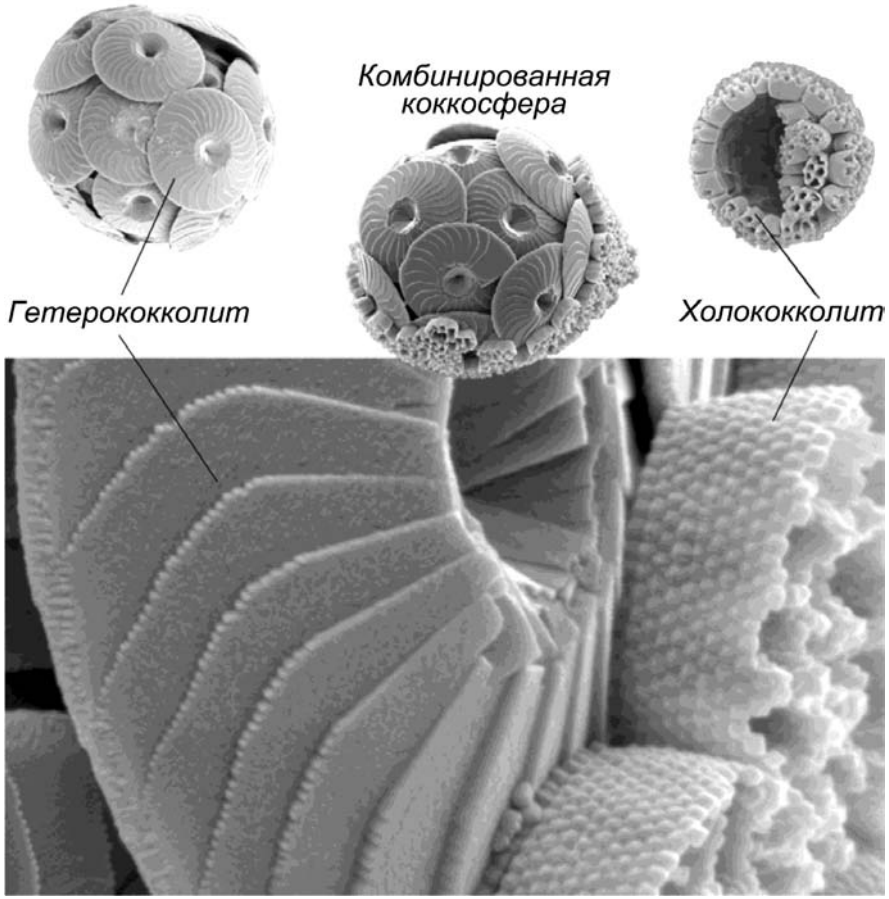


Рисунок 190 – Кокколиты *Calcidiscus leptoporus* ssp. *quadriperforatus*

Более экстремальный (и эффектный) пример бионанодизайна кокколитов демонстрирует *Rhabdosphaera clavigera* (рисунок 191).

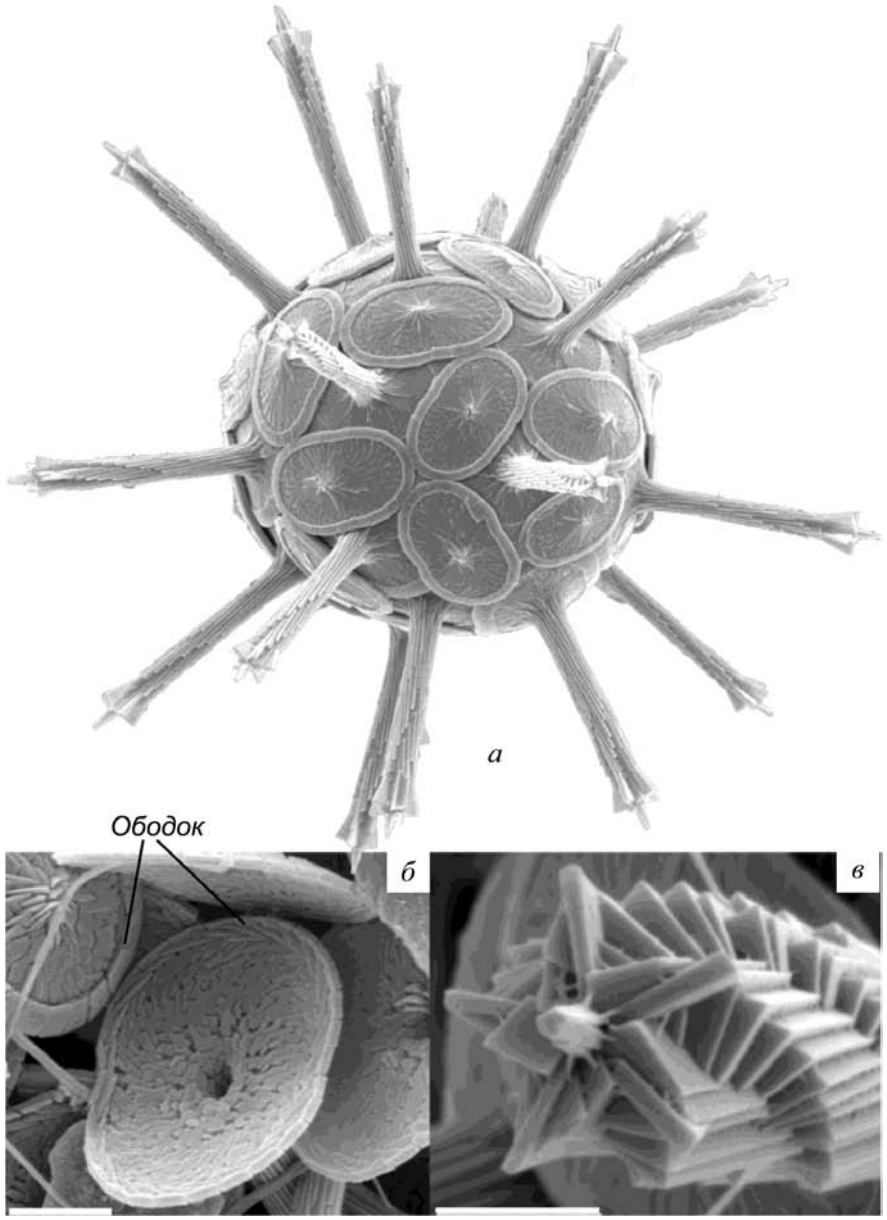


Рисунок 191 – Кокколит *Rhabdosphaera clavigera*. Scale bars = 1мкм

Коккосфера *Rhabdosphaera clavigera* выложена овальными элементами с чётко выраженным ободком и центральной областью, покрытой индивидуально кристаллизованными чешуйчатыми элементами с ромбическими гранями (рисунок 191(б)). На поверхности коккосферы располагаются ажурные спиральные шипы, сформированные пятью стопками смещённых друг относительно друга ромбических монокристаллов (рисунок 191(в)).

Ещё примеры биоминерализации представлены на рисунке 192. Кристаллы кальция оксолата моногидрата ($CaC_2O_4 \cdot H_2O$) синтезируются в клетках растений (рисунок 192(а), масштаб 10 мкм).

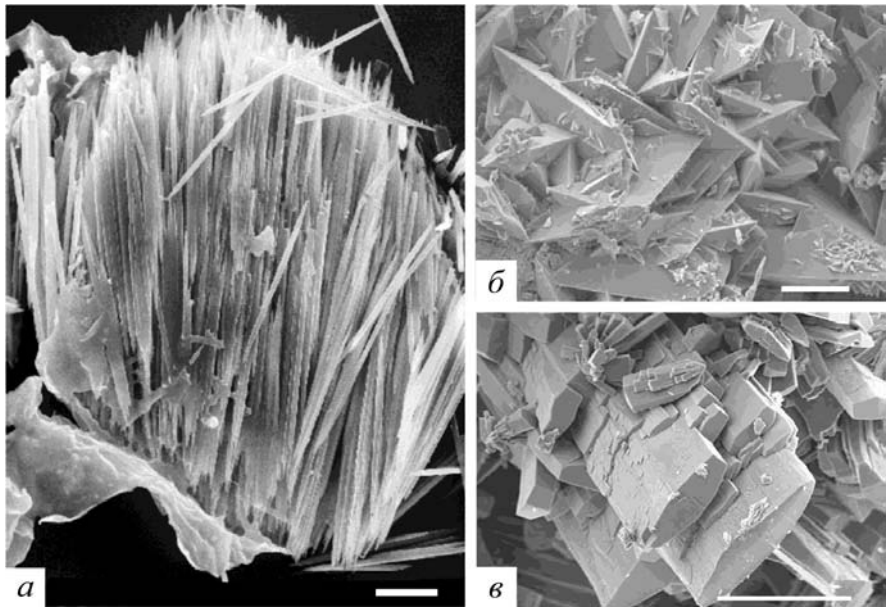


Рисунок 192 – Примеры биоминерализации

Кристаллы кальция оксолата дигидрата ($CaC_2O_4 \cdot 2H_2O$, рисунок 192(б), масштаб 200 мкм) и брушита (фосфат кальция, $Ca(PO_3OH)2H_2O$, рисунок 192(в), масштаб (*scale bar*) 100 мкм) входят в состав мочевых конкрементов (камни, плотные образования, встречающиеся в полостных

органах и выводных протоках желёз человека), образующихся при мочекаменной болезни.

Оптические свойства некоторых кристаллов также используются в природе. Так, например, *трилобиты* используют кристаллы *кальцита* в конструкции их глаз, а металлический блеск панцирей некоторых жуков-скарабеев объясняется использованием кристалликов *мочевой кислоты*.

Рост необходимого кристалла в ходе биоминерализации требует выполнения *четырёх* условий.

1. Должно быть *достаточно пространства* внутри биологической матрицы для роста кристалла.
2. Необходимо обеспечить *доставку* к месту кристаллообразования значительного количества ионов.
3. Кристаллы или их агрегаты должны расти именно *в том месте*, в котором необходима минерализация.
4. Рост и ориентация кристаллов минералов должны *тщательно контролироваться* для того, чтобы в результате получился биоматериал необходимого размера и необходимой формы.

Используя различные подходы к реализации этих процессов, природа задействует *различные типы* минералов для специфических ситуаций. Одним из наиболее распространенных *приёмов* является *формирование липидной везикулы*, и закачивание внутрь неё необходимого количества ионов для начала спонтанного зародышеобразования кристаллов. Это наиболее быстрый способ биоминерализации, в результате чего формируется *пористая*, напоминающая керамику масса *хаотически ориентированных кристалликов*.

Если предусмотреть определённые центры начала кристаллизации, то можно формировать *более упорядоченные* биоминеральные структуры. В яичной скорлупе птиц *сульфатированые полисахариды* располагаются на внутренней поверхности везикул, в которых идёт минерализация.

На этих полисахаридах происходит зародышеобразование кристаллов, и в процессе роста наружу от стенки эти кристаллы *выравниваются*.

Морские ежи демонстрируют ещё большую степень контроля процесса биоминерализации. В процессе формирования их колючей оболочки морские ежи выращивают *каждую иглу* в виде одного кристалла кальцита. Сначала, вследствие слияния нескольких ячеек, формируется большая везикула.

Затем инициируется рост монокристалла, причём его пространственный рост тщательно контролируется использованием специализированных *белков*, которые *управляют скоростью* роста кристалла в различных направлениях. В результате формируется либо монокристаллическая пластинка, либо монокристаллическая иголка длиной до *сантиметра*. Подобно этому костная ткань млекопитающих формируется посредством нуклеации и роста *монокристаллов далита* в матрице коллагена.

Использование минерализованных биоматериалов может *упрочнить композит*. Использование таких прочных *органически-неорганических* композитных материалов в качестве сырья для бионанотехнологии является одним из наиболее привлекательных направлений исследований. Такие материалы *соединяют* в себе прочность неорганических материалов с эластичностью органических биоматериалов.

Например, *кристаллы кальцита* в иглах морского ежа являются хрупкими и легко растрескиваются, поэтому морские ежи включают в состав иголок 0,2% *малых пептидов*, которые упрочняют их структуру и предотвращают растрескивание.

Комбинация коллагена с минералами делает костную ткань прочной, но эластичной, устойчивой к растрескиванию.

Перламутровое покрытие раковин устриц и других моллюсков представляет собой более искусный гибридный материал синтезированный природой. Он состоит из *чередующихся слоев* биомолекул и минералов. Биомолекулярные слои в свою очередь состоят из отдельных слоев: слой хитина (полисахарид) по центру, между слоями белков, сходных с белком шелка. Специальные белки стимулируют образование и параллельный рост кристаллов арагонита, которые и формируют минеральные слои между слоями биомолекул. Множество кристаллических

слоёв, организованных в пространстве таким способом, приводят к *интерференции* света, что обеспечивает радужный глянец раковин.

Сегодня уже выяснены некоторые особенности *молекулярных механизмов* кристаллообразования и роста минералов в биоструктурах, и эти знания используются в бионанотехнологии.

Так, например, минералы на основе *кремния*, такие, которые используются в *губках* и *диато́мах* (кремневых водорослях) формируются при помощи белков с избытком аминокислот *серина* или *цистеина*. Эти аминокислоты *катализируют* объединение многих кремниевых молекул в *аморфное стекло*.

Другой пример, минералы на основе *кальциевых* ионов формируются полимерами *отрицательно* заряженных *аминокислот*. Радикалы таких аминокислот ассоциируются с поверхностью растущих кристаллов, блокируя рост, что обеспечивает механизм *модификации формы* поверхности минерала. Однако же, если соответствующим образом иммобилизовать эти радикалы на поверхности, то они могут *инициировать* кристаллообразование.

Глобулярные белки, аналогично, могут стимулировать образование кристаллического зародыша, если соответствующие радикалы аминокислот будут нужным образом расположены на поверхности белка.

11.4. Функциональные особенности формирования эластичных биоматериалов

Эластичные материалы должны обладать способностью *восстанавливать* свою форму после снятия напряжения.

На молекулярном уровне эластичные материалы состоят из *множества* хаотично переплетённых *скрученных* в *спираль нитей*. При растяжении такие спирали раскручиваются, уменьшая число межатомных нековалентных взаимодействий внутри спирали. Если убрать растягивающую силу, то спирали скручиваются обратно в плотный клубок. До тех пор, пока нити не смещаются друг относительно друга, материал будет принимать первоначальную форму.

Натуральный каучук, который получают из молочного латекса, секретируемого каучуковым деревом и другими растениями, образуется из длинных полимеров *изопрена*. Поскольку эти углеводородные цепи просто расположены параллельно, то возможны определённые необратимые *смещения* их друг относительно друга, что нарушает эластичность.

В 1839 году Чарльз Гудьир (*Charles Goodyear*) изобрел способ предотвращения таких смещений, названный *вулканизацией*. Резина нагревается вместе с серой, которая образует множество *дисульфидных мостиков* между изопреновыми цепями. Образующаяся *сеть* со множеством кросс-линков чрезвычайно устойчива, поэтому вулканизированная резина может многократно деформироваться без необратимой потери свойства восстанавливать первоначальную форму.

Белок *эластин*, который обеспечивает эластичность кожи, использует аналогичный принцип сохранения эластичности (рисунок 193).

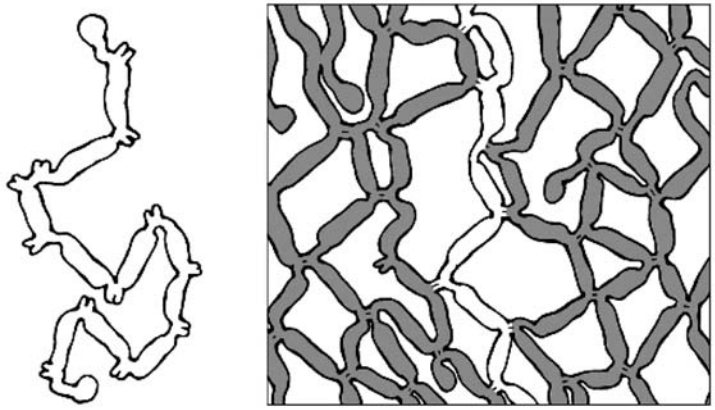


Рисунок 193 – Структура эластина

Эластин состоит из *секций*, которые богаты *пролином* и имеют ту самую спиральную структуру, которая и растягивается при растяжении кожи. Между этими спиралями находятся *короткие сегменты*, богатые *лизином* (показаны в виде парных выступов на рисунке 193). Боковые

цепи лизинов образуют *кросс-линки* между соседними цепями, формируя эластичную сеть, которая растягивается при наложении напряжения и восстанавливает структуру после снятия напряжения.

Гигантский белок *титин*, который обеспечивает эластичность мышечной ткани, использует *два* различных *механизма*. Титин представляет собой длинный белок, состоящий из множества индивидуально свернутых *доменов* упорядоченных наподобие *цепочки бус* (рисунок 85(а)). На одном конце титина находится *специальный участок*, который называется PEVK-участок, поскольку он преимущественно состоит из пролина (P), глутаминовой кислоты (E), валина (V), и лизина (K), и который обеспечивает эластичность титина при *обычных* уровнях прикладываемых напряжений. В релаксированном состоянии этот участок образует *бесформенную* компактную глобулу, в которой нет определённой внутренней структуры. При растяжении молекулы титина эта глобула медленно *раскручивается*, сопротивляясь, поскольку разделяются взаимодействующие компоненты этой глобулы. Если снять растяжение, то нить *снова* скрутится в эту *неупорядоченную* глобулу. Однако если титин растянуть *сильнее*, то друг за другом начнут раскручиваться "бусины" стабильных *доменов*. Такие небольшие "шажки" длиной 20 нм, соответствующие разворачиванию очередного домена наблюдались, когда молекула титина растягивалась оптическим пинцетом или кантилевером атомно-силового микроскопа (см. п. 3.5.2).

Похожий подход может быть использован при разработке *гидрогелей*. Природные гидрогели, например, на основе желатина, хорошо известны. При охлаждении нагретого водного раствора желатина происходит *захват* молекул *воды* желатином, и образуется гель. Этот процесс *обратим*. Гель может быть разжижен нагреванием и снова конденсирован охлаждением. Молекулярный механизм гелеобразования недостаточно изучен, но исследователи стараются разработать и улучшить молекулы с такими свойствами. Подобно эластичным материалам гели образуют длинные неупорядоченные цепи, которые соединяются между собой в определённых точках. При этом такие соединения *не должны быть постоянными*, они должны образовываться в геле, но

должны разрушаться при плавлении геля. Неупорядоченные участки, в свою очередь, должны быть доступны для молекул растворителя во время формирования геля, и должны иметь достаточно места для конденсации при охлаждении. Поэтому они *не должны образовывать упорядоченные структуры* подобно структурам, которые образуются при фолдинге белков.

Давид Тирел (*David A. Tirrell*) с сотрудниками [57] разработал *искусственную белковую систему* для тестирования такой методики при проектировании гидрогелей. Разработанные ними белки состоят из *двух* частей. На каждом из концов белковой нити расположены аминокислотные последовательности, которые при комнатной температуре формируют α-спирали, у которых *вдоль одной* из сторон расположены *лейцины*. Если расположить параллельно две такие α-спирали, то образуется так называемая *лейциновая застёжка* (*leucine zipper*), соединяющая две спирали вместе. Лейциновая застёжка была впервые открыта в бактериальных ДНК-связывающих белках. Такая застёжка соединяет две подобные α-спирали, но она легко "расстёгивается" при нагревании.

Между двумя α-спиралями "застёжки" поместили *длинную цепь*, которая содержала много *глицина, пролина* и *глутаминовой кислоты*. Этот участок образует длинную неупорядоченную в широком диапазоне температур структуру, соединяющую две "застёжки". Как и предполагалось, сконструированные таки образом искусственные белки образовывали гель после нагрева и последующего охлаждения. *Модульность* такой системы делает её перспективной для разработки других гелеобразующих систем с программируемыми свойствами, если *изменять длину* и *специфику* различных модулей.

11.5. Функциональные особенности формирования адгезивных биоматериалов

Адгезия (слипание поверхностей разнородных тел) обеспечивает один из наиболее экономически эффективных способов формирования конструкций. При правильном дизайне адгезивные материалы (*адгезивы*)

могут соединять многие несхожие материалы. Адгезивные материалы должны отвечать двум условиям.

1. Они должны образовывать прочные связи с соединяемыми поверхностями.
2. Они должны затвердевать, чтобы сам соединительный слой был стабильным.

В частном случае *водного окружения* адгезивы должны быть устойчивы к действию воды. Вода может образовывать тонкий слой на поверхностях, блокируя взаимодействие адгезивных материалов с поверхностью. Вода может также воздействовать на уже соединённые поверхности, разрушая адгезивный материал или просачиваясь вдоль стыка между адгезивом и подложкой.

Природные системы используют *два* основных метода для адгезии.

Специфическая адгезия. Большинство механизмов адгезии, которые удерживают вместе клетки многоклеточных организмов, связывают клетки и межклеточную инфраструктуру, – являются результатом *специфической адгезии*. В этом случае осуществляются непосредственные специфические белок-белковые или белок-углеводные взаимодействия. Множество белков образуют специфические взаимодействия, которые и удерживают клетки вместе. Сюда входят соединительные белки такие, как *клаудины* (*claudins*), которые обеспечивают плотные контакты клеток, *коннексины* (*connexon proteins*), которые формируют щелевые контакты, и *кадхерины* (*cadherins*), которые выступают над поверхностью клетки и ассоциируют в присутствии ионов кальция.

Фибриллярные трансмембранные адгезивные белки кадхерины (рисунок 194(1)) закреплены в клеточной мембране (4). Дистальные домены кадхеринов одной клетки имеют специальные триптофаны (2), которые связываются с кадхеринами другой клетки в межклеточном пространстве (5), соединяя тем самым две клетки. Внутри клетки цитозольные домены кадхеринов с помощью адаптерных белков (6) прикрепляются к цитоскелету (7). Кальций связывается в кальций-связывающих

сайтах между доменами кадхерина (3), обеспечивая необходимую жёсткость.

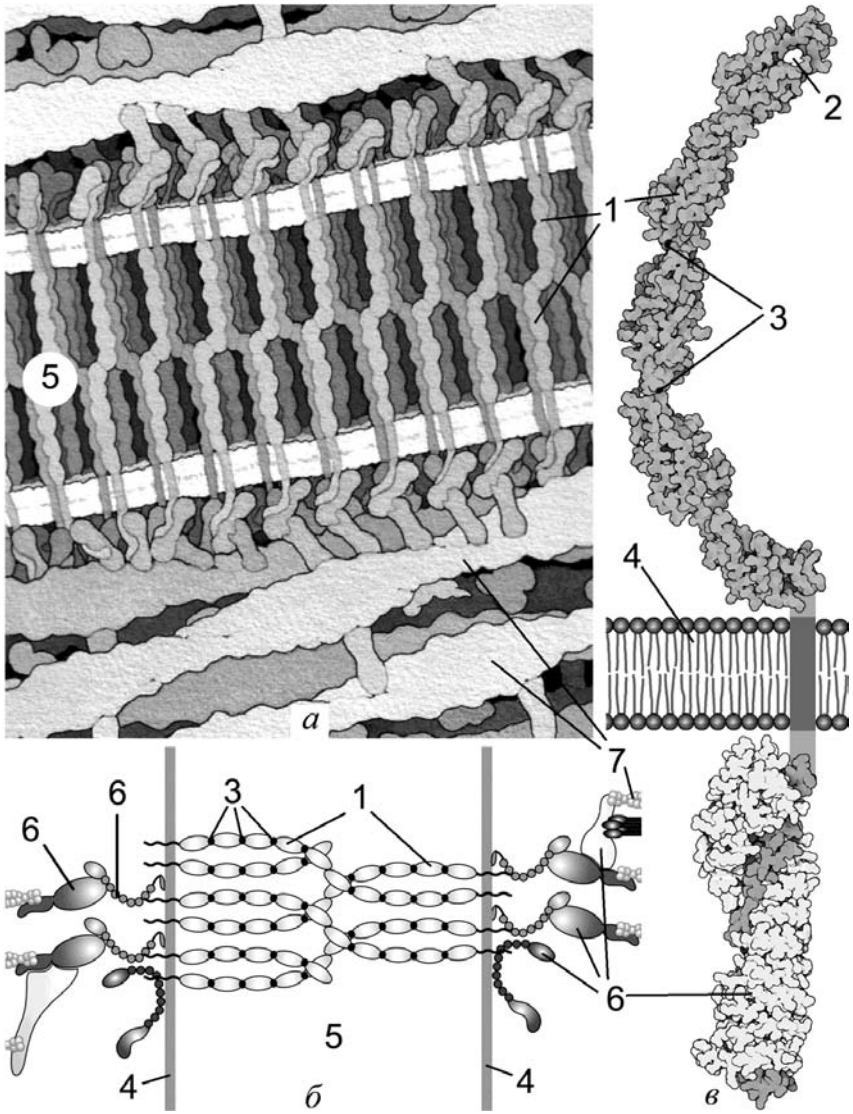


Рисунок 194 – Межклеточное соединение с помощью белков кадхеринов

Белки *интегрины* (*integrin proteins*) выступают над поверхностью клетки и присоединяются к инфраструктуре в межклеточном (экзоплазматическом) пространстве.

Все взаимодействия в перечисленных случаях являются *сильными*, поскольку при их формировании используются методы белкового распознавания. Эти способы адгезии являются *чрезвычайно специфичными*. Они работают только тогда, когда на взаимодействующих поверхностях присутствуют оба партнера по взаимодействию, и, поэтому, они используются для формирования адгезивного контакта только *там* и *тогда*, где и когда этот контакт необходим.

Неспецифическая адгезия. В специальных случаях клетки используют *общеадгезивные неспецифические контакты*, которые работают на разных поверхностях. Примером является класс адгезивов, которые используют *морские моллюски* для прикрепления своих раковин к камням. Эти адгезивы образуются в морской воде и являются очень крепкими, удерживая моллюсков на камнях даже в условиях прибоя во время шторма. Такие адгезивы образуются с использованием *специальных белков*, содержащих множество аминокислот, которые имеют дополнительные гидроксильные группы (химически модифицированные, *гидроксилированные* аминокислоты). Этим достигаются две цели.

Во-первых, поскольку гидроксильные группы могут быть как *донорами*, так и *акцепторами* водородных связей, и поскольку они сильно взаимодействуют с *ионами металлов*, то они превосходно образуют множественные взаимодействия с теми поверхностями, к которым должен быть прикреплен моллюск.

Во-вторых, эти модифицированные аминокислоты используются для создания множественных *кросс-линков* внутри собственно адгезива при его *затвердевании*, превращая адгезив из густой жидкости в жёсткую "резину".

Такие адгезивы послужили прототипами при разработке материалов для стоматологии и других медицинских применений, в которых адгезивы должны быть водоустойчивыми.

Контрольные вопросы и задания

1. В чём заключается специфика биоматериалов как динамических структур?
2. Какова функциональная роль интерфейсных областей при спиральном ассемблировании биоматериалов?
3. Каковы функциональные особенности молекулярной организации актиновых нитей?
4. Каковы функциональные особенности молекулярной организации микротрубочек?
5. Каковы функциональные особенности молекулярной организации коллагена?
6. Каковы функциональные особенности формирования двумерных сетей и оболочек?
7. Какие существуют способы увеличения прочности фибриллярных структур?
8. Каковы функциональные особенности молекулярной организации прочных эластичных композиционных биоматериалов?
9. В каких случаях происходит биоминерализация тканей?
10. Какие четыре условия должны быть выполнены для того, чтобы происходил рост кристаллов в ходе биоминерализации?
11. Приведите примеры молекулярных механизмов кристаллообразования и роста минералов в биоструктурах.
12. Каковы функциональные особенности строения эластичных белков?
13. Каковы функциональные особенности строения молекул гелеобразующих белков?
14. Какими двумя свойствами должны обладать адгезивные материалы?
15. В чем функциональное различие специфической и неспецифической адгезии?
16. Каким образом можно управлять адгезивными свойствами биополимеров?

Глава 12
Бионанотранспорт

12.1. Функциональные особенности строения линейных АТФ-моторов

В макромире машины представляют собой набор движущихся частей, приводимых в движение некоторыми *моторами*. Поначалу наномашины представлялись как просто соответственным образом уменьшенные копии, также состоящие из вращающихся колёс, зубчатых передач, подшипников и наномоторов, сообщающих им движение.

Работа машины за счет энергии специализированного мотора удобна для непосредственного *контроля* за действием машины.

В бионаномашинном мире моторы встречаются *редко*.

Бóльшая часть работы по наномасштабному перемещению и движению осуществляется за счет *диффузии* и *сорбции* без использования направленного движения.

Диффузия является настолько быстрым процессом для белков в компартментах размером со среднюю клетку, что не требуется дополнительных механизмов. Биомоторы задействуются тогда, когда необходимы перемещения на *большие* расстояния порядка *микрометров*, как в случае разделения хромосом или перемещения клеточных органелл, и вплоть до *метровых* шкал, когда речь идет о сокращении мускулатуры.

Однако существует *несколько* примечательных *исключений* из этого правила, когда природа действительно использует моторы для нанозадач, как, например, в случае вращательного мотора в АТФ-синтазе.

Линейные АТФ-моторы. В клетке используется *несколько* подходов к решению задачи направленного перемещения вдоль фиксированной траектории.

Два наиболее изученных моторных белка, это *миозин* (*myozin*), который перемещается вдоль актиновых нитей, и *кинезин* (*kinesin*),

который перемещается вдоль микротрубочек. Эти два моторные белка имеют *различные* принципы реализации механического движения. Каждая *миозиновая* молекула осуществляет *один* "рабочий ход" ("*power stroke*") за раз – она связывается с актином, тянет его (точнее, дёргает), а затем отсоединяется от актина.

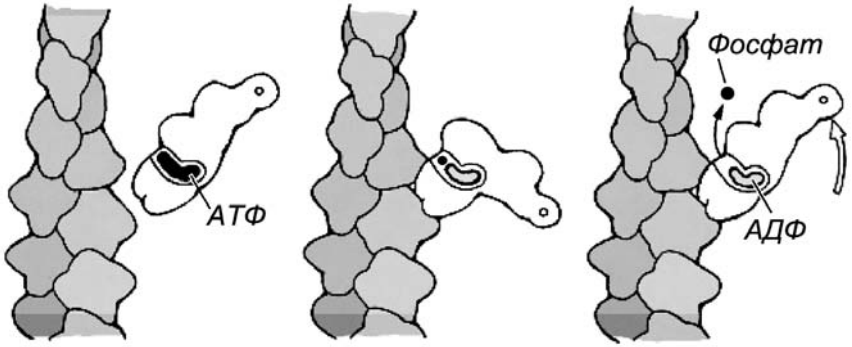
Кинезин, напротив, после присоединения к микротрубочке совершает множество "актов" перемещения, и только в конце "работы" кинезин отсоединяется от микротрубочки. Эти *функциональные различия* используются для *различных* биологических *операций*.

Молекулы *миозина* входят в состав толстых (массивных) миозиновых филаментов (комплексов), которые и перемещаются вдоль актиновых нитей – каждый миозин совершает свой "рабочий ход" и уходит в сторону, уступая пространство для работы соседних миозинов (рисунок 22).

Кинезин работает более автономно. Он используется в качестве "грузовика" для перевозки груза вдоль микротрубочки. Он должен соединиться с трубочкой и двигаться вдоль неё.

Несмотря на эти функциональные различия, миозин и кинезин демонстрируют *подобие* в молекулярной организации, которая используется для создания "действующей силы".

Моторный глобулярный домен миозина удлинён, а центр связывания АТФ находится вблизи его центра (рисунки 195–197).

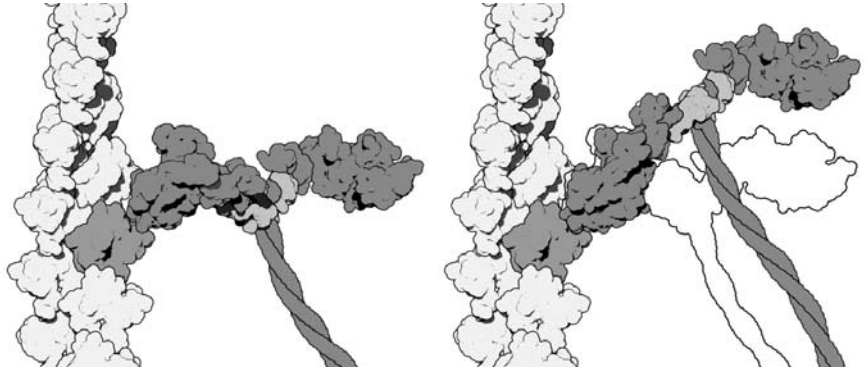


а *б* *в*

Рисунок 195 – Три стадии рабочего цикла миозина

В релаксированном состоянии миозин *изогнут*, а конформационный переход, индуцированный связыванием с АТФ, переводит миозин в *распрямлённое* состояние. Моторный домен миозина состоит из *нескольких* функциональных *частей*. Большой *каталитический* домен связывается с АТФ и с актином. Индуцированное связыванием с АТФ изменение конформации каталитического домена стимулирует изменение *конверторного* (передающего) домена, которое усиливается *доменом-рычагом* (*lever arm*) и совершает смещение конца рычага на 10 нм. В разных формах миозина концы этого *рычага* присоединены к соответствующим опорам для выполнения специфической работы.

Рабочий цикл миозина содержит *три* этапа (рисунок 195). На *первом* этапе (в *исходном* состоянии) миозин связан с АТФ и не связан с актином (рисунок 195(а)). На *втором* этапе АТФ гидролизуется на АДФ и фосфат, что вызывает такую конформацию актин-связывающего интерфейса, которая позволяет связывание с актином, а миозин принимает изогнутую форму (рисунок 195(б)). На *третьем* этапе фосфат диссоциирует, вызывая выпрямление миозина, что и позволяет совершить "рабочий ход" (рисунки 195(в) и 196)).



а *б*

Рисунок 196 – Рабочий ход миозина: *а* – начало; *б* – конец рабочего хода

Замена АДФ на АТФ приводит к диссоциации миозина от актиновой нити и переводит миозин в *исходное* состояние

На рисунке 197 представлены результаты кристаллографического исследования моторного домена миозина. АТФ связывается в глубокой *щели* (*cleft*) между актин-связывающим интерфейсом и рычажным белковым механизмом.

Переключающая α-*спираль* (*relay helix*) работает как *поршень*, передавая другим белковым доменам (*конвертору* и *рычагу*) малые конформационные смещения в результате гидролиза АТФ и диссоциации фосфата.

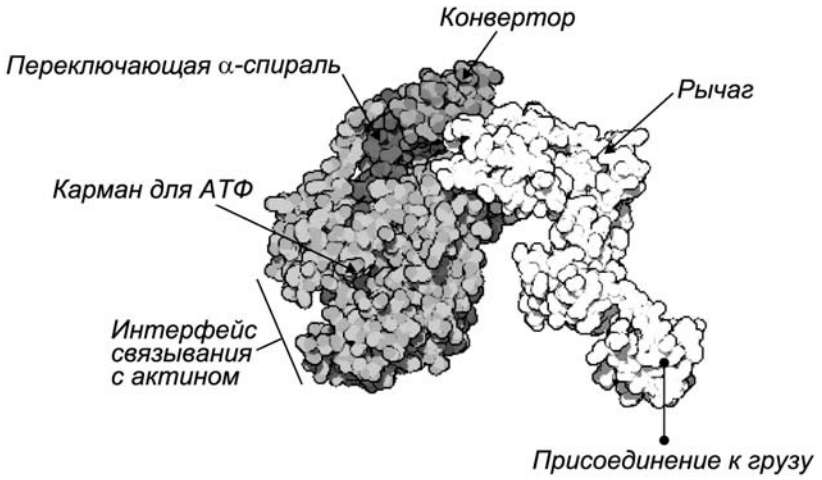


Рисунок 197 – Схема моторного домена миозина

Поршень переключающей α-спирали толкает *конвертор*, смещение которого и вызывает движение с большим размахом *домена-рычага* (*lever arm*) (рисунок 198).

В *изогнутой* конформации моторного домена миозина, показанной на рисунке 198 слева, переключающая α-спираль сдвинута *вверх* в домен-конвертор. В конце "рабочего хода" рычага, когда моторный домен *распрямлён*, переключающая α-спираль сдвинута *вниз* (рисунок 198, справа).

Кинезин использует принципиально другой подход для движения (рисунок 199). В кинезине реализуется необычное *чередование* переходов

порядок-беспорядок (или упорядочение-разупорядочение) в коротком участке белковой цепи, который называется *шейка* (или *шейка-линкер*, *neck linker*), связывающий глобулярный моторный домен с фибриллярным хвостом.

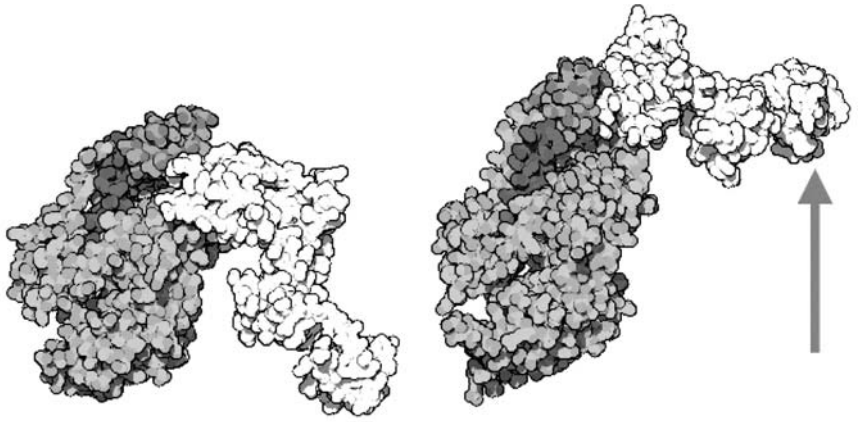


Рисунок 198 – Работа рычажного белкового механизма миозина

Вследствие гидролиза АТФ шейка изменяет конформацию из *неупорядоченного* (*disordered*) состояния в *упорядоченную* (*ordered*) форму, совершая при этом "*рабочий ход*" (*power stroke*).

Моторный домен кинезина имеет особый *паз-жёлоб* (*groove*), в который входит (укладывается) и из которого выходит шейка-линкер, в зависимости от химической "команды", временно *обратимо* связываясь с моторным доменом.

"Рабочий ход" совершается тогда, когда шейка упорядочивается и укладывается в паз, объединяясь с моторным доменом. Весь тот "груз", который присоединён к шейке-линкеру, за один "рабочий ход" перемещается на 8 нм.

Рабочий цикл кинезина начинается с *исходного состояния*, в котором одна (обозначена белым цветом) субъединица пуста, а с другой (серой) связана АДФ (рисунок 199, вверху). АТФ *связывается* с пустой субъединицей, что вызывает *конформационный переход* в "белой"

субъединице, шейка упорядочивается, "укладывается" в жёлоб и прочно связывается с глобулярной головкой. При этом белая субъединица *отрывает* "серую" субъединицу от микротрубочки, *перемещает* её "*вперёд* по ходу движения" (средняя часть рисунка 199), где "серая" субъединица *снова связывается* с микротрубочкой. В результате связывания "серой" субъединицы с микротрубочкой АДФ *диссоциирует*.

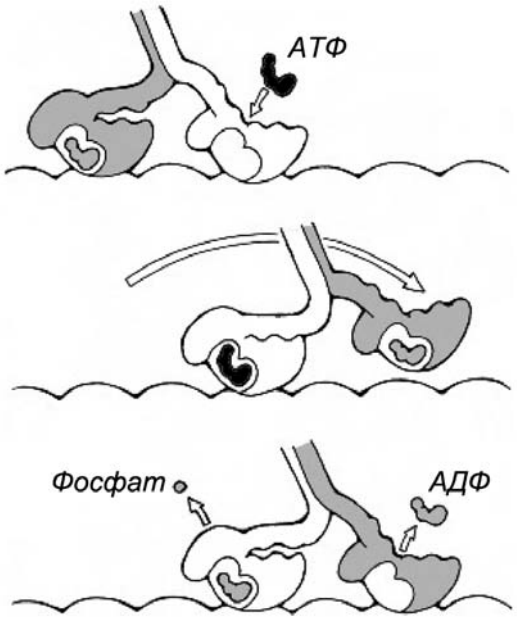


Рисунок 199 – Этапы рабочего цикла кинезина

Диссоциация АДФ от "серой" субъединицы и высвобождение фосфата из "белой" субъединицы приводят к *обратному переходу* шейки "белой" субъединицы *из упорядоченной в разупорядоченную* форму и *отсоединению* её от жёлоба глобулярной головки, что *возвращает* всю систему в исходное состояние. Последовательные *циклы-шаги* позволяют кинезину *двигаться* вдоль микротрубочки

И *миозин*, и *кинезин* реагируют на *наличие* третьей фосфатной группы в молекуле АТФ и *используют* гидролиз АТФ для генерации

силового импульса в результате конформационного перехода. В обоих белках для превращения акта связывания молекулы АТФ в изменение структуры моторного домена используются *две сенсорные переключающие белковые петли*.

Эти сенсорные переключающие петли, образуя водородные связи с фосфатной группой, работают как *пружина* в подпружиненной двери: "дверь закрыта", когда петли связаны с фосфатной группой, но "пружина открывает дверь", когда фосфатная группа отделяется от АТФ и диссоциирует.

Главные структурные *изменения* в моторных доменах происходят тогда, когда (1) *связывается АТФ*, что приводит к блокированию сенсорных переключающих петель, и (2) когда *высвобождается фосфатная группа*, что освобождает переключающие петли.

В *миозине* связывание АТФ вызывает значительный структурный переход от жёсткой распрямлённой формы к изогнутой форме моторной головки, а высвобождение фосфата приводит к обратному переходу.

В *кинезине* связывание АТФ приводит к упорядочению шейки (становится жёсткой) и связыванию её с жёлобом моторного домена, а высвобождение фосфата позволяет шейке-линкеру диссоциировать в разупорядоченную несвязанную форму.

На рисунке 200 представлена схема моторного домена кинезина.

Сайт связывания с микротрубочкой расположен в *нижней* части молекулы на рисунке 200. Связывание с АТФ приводит к *сдвигу* переключающей спирали, вследствие чего *открывается жёлоб* в теле головки, в который и погружается шейка-линкер. Импульс силы генерируется тогда, когда шейка прочно *связывается* с желобом, как это и показано на рисунке 200.

Конформационный переход сенсорных переключающих петель *передается* к подвижным элементам с помощью переключающей спирали (*relay helix*). Она представляет собой стабильную α-спираль и поэтому является прочной и несжимаемой. Она работает *как поршень*, передающий движение петель. Переключающая спираль движется в

сторону АТФ, когда переключающие петли связываются с АТФ, и, наоборот, движется от АТФ, когда высвобождается фосфатная группа.

В *миозине* переключающая спираль соединяется с конвертором, заставляя его поворачиваться наподобие петли вокруг двух гибких *глициновых* аминокислот. Это вращение передается рычагу, который жёстко связан с конвертором.

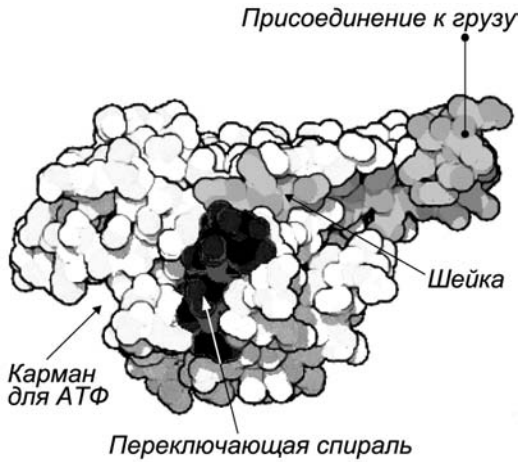


Рисунок 200 – Структура моторной головки кинезина

В *кинезине* движение переключающей спирали открывает паз-жёлоб, позволяя связаться в нём шейке-линкеру. В шейке тоже используется *глицин* для обеспечения необходимой гибкости как при связывании с моторной головкой, так и при высвобождении линкера, контролируемого спиралью переключателем.

Примечательно, что миозины и кинезины могут быть *изолированы* и *использованы* для выполнения специфических операций. Например, молекулы кинезина могут быть выделены и связаны с плоской поверхностью на предметном стекле микроскопа. Затем, если сверху на предметное стекло поместить раствор, содержащий микротрубочки, то кинезины будут перемещать эти микротрубочки.

12.2. Функциональные особенности строения вращательных моторов

Кроме линейных моторов природа создала также и *вращательные* моторы. Наиболее известным примером такого рода моторов, который уже использован для бионанотехнологических применений, является АТФ-синтаза (см. [13], п. 7.4).

АТФ-синтаза (или комплекс F_0F_1) состоит из двух главных компонентов F_0 и F_1 (рисунки 21 и 201), которые ещё называют *мембранным* и *цитозольным моторами* и которые используют различные источники энергии для генерации механического вращения.

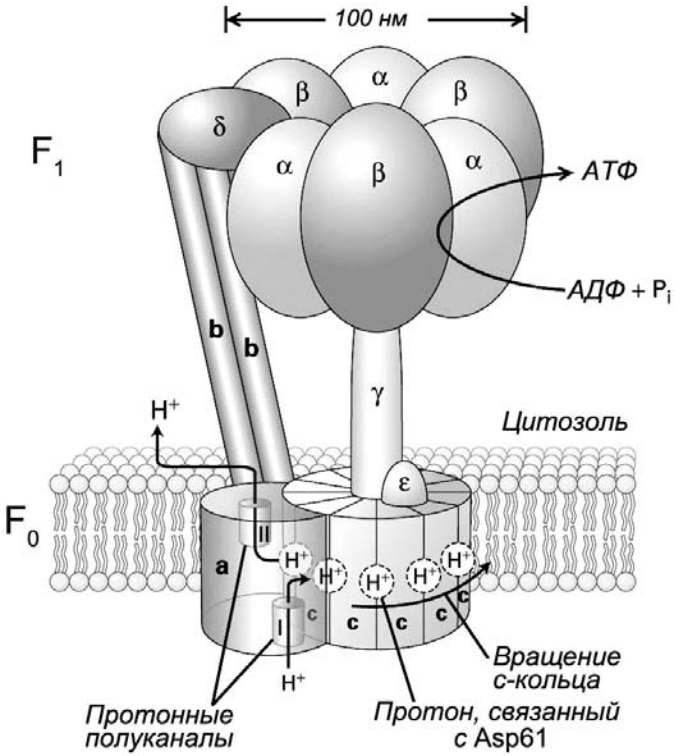


Рисунок 201 – Схема АТФ-синтазы в плазматической мембране бактерий

Мембранный компонент F_0 состоит из трёх типов интегральных мембранных белков, которые обозначаются **a**, **b** и **c**. В клетках *бактерий и дрожжей* часть F_0 состоит из *одной* субъединицы **a**, *двух* субъединиц **b** и *десяти* субъединиц **c**, поэтому состав компонента F_0 записывают как $\mathbf{a_1b_2c_{10}}$.

Компонент F_0 митохондрий клеток *животных* содержит 12 субъединиц **c**, а хлоропластов растений – 14 субъединиц **c**. Субъединицы **c** образуют кольцо в плоскости мембраны. Субъединицы **a** и **b** прочно связаны между собой, но не связаны с кольцом субъединиц **c**.

Цитозольный компонент F_1 является водорастворимым комплексом пяти различных полипептидов и имеет структуру $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. В нижней части F_1 находится субъединица ε, которая прочно присоединена как к субъединице γ, так и к нескольким субъединицам **c** компонента F_0.

Субъединицы α и β компонента F_1 соединены друг с другом поочерёдно и формируют *кольцевой гексамер* $\alpha\beta\alpha\beta\alpha\beta$ или $(\alpha\beta)_3$, который расположен наверху субъединицы γ. Субъединица δ прикрепляет этот гексамер к субъединицам **b** компонента F_0. В результате **a** и **b** субъединицы компонента F_0 и δ и $(\alpha\beta)_3$ гексамер компонента F_1 образуют *прочно* связанную структуру, которая заякорена в мембране – своеобразный *статор*, который не участвует в механическом движении, и относительно которого вращается *ротор*, состоящий из субъединиц **c** мотора F_0 и субъединиц γ и ε мотора F_1. При вращении ротора эксцентричная субъединица γ поочередно *механически* деформирует (стимулирует) каталитические субъединицы АТФ-мотора F_1, активизируя их для *катализа* реакции присоединения фосфатной группы к АДФ.

Мембранный мотор F_0 использует *электрохимический градиент*, а цитозольный мотор F_1 работает за счет энергии *гидролиза АТФ*.

В АТФ-синтазе эти два мотора *объединены* так, что один из них выполняет функцию мотора, а другой – генератора.

Вращение мотора F_0 вследствие потока протонов через мембрану используется для синтеза АТФ в субъединице F_1. И наоборот, вращение мотора F_1 за счет гидролиза АТФ может быть использовано для

перекачивания протонов через мембрану, тем самым для создания протонного градиента.

Принцип работы мотора F_0, который в настоящее время считается наиболее обоснованным из множества выдвинутых гипотез и реализующий *процесс вращательной диффузии*, показан на рисунке 202. Цилиндрический трансмембранный ротор АТФ-синтазы имеет отрицательно заряженные *центры связывания* протонов (радикалы аспарагиновой кислоты). Поскольку ротор погружён в мембрану, он может вращаться, только если эти центры нейтрализованы протонами.

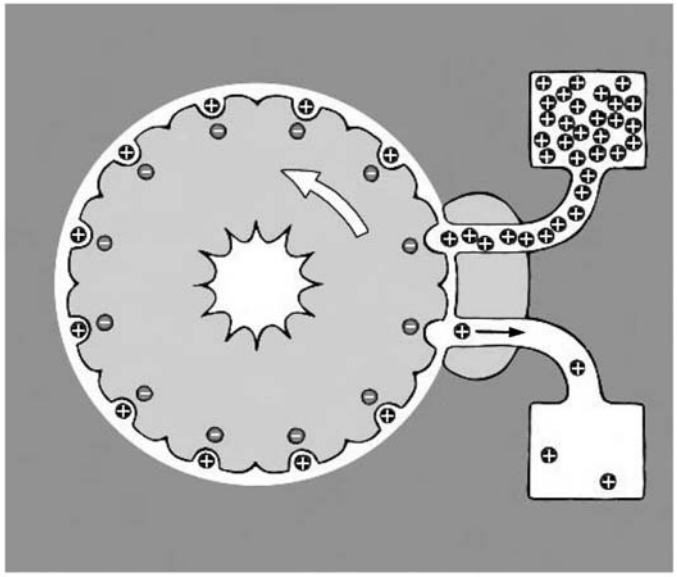


Рисунок 202 – Принцип работы ротора АТФ-синтазы

Протоны достигают ротора через один *полуканал* в статоре (на рисунке 202 схематически показан статорный домен, примыкающий справа к ротору) и, совершив круг вместе с ротором, выходят через другой *полуканал* в теле статора с противоположной стороны мембраны.

В настоящее время подробно исследованы два варианта мотора F_0, приводимые в движение потоками либо *протонов*, либо *ионов натрия*.

В принципе, цилиндрический ротор мотора F_0 может совершать *произвольные* скачки в *обоих* направлениях, стимулированные тепловым движением. Для обеспечения *однонаправленного* вращения необходимо *разрешать* повороты в *нужном* направлении и *блокировать* повороты ротора в *обратном* направлении, т. е. мотор должен "отбирать" только "благоприятные" события.

Отрицательно заряженные радикалы аспарагиновой кислоты в центрах связывания протонов ротора *не позволяют* ротору свободно вращаться в мембране. Через полуканал в статоре (верхний полуканал на рисунке 202) протоны из области с повышенной концентрацией протонов проходят к ротору. В области, закрытой от мембраны статором, аспартаты ротора могут протонироваться, нейтрализуя тем самым свой отрицательный заряд. Нейтрализованные домены ротора могут затем вращаться (против часовой стрелки, как показано на рисунке) внутри мембраны. После завершения оборота протонированный аспартат снова попадает в экранированную от мембраны статором область. Здесь находится второй полуканал, выходящий на противоположную сторону мембраны, где концентрация протонов ниже. Протон диссоциирует с аспартата и выходит через полуканал, а оставшийся заряженный аспартат *не позволяет* ротору вращаться в обратном направлении (своеобразный молекулярный храповик, который ещё называют "*броуновское решето*"). Весь этот процесс *обратим*.

Самопроизвольно мотор F_0 будет захватывать протоны из полуканала, где их концентрация высока, и высвобождать их в полуканал, где концентрация протонов низка.

Однако, *если приложить* к ротору постоянный *вращательный момент* в противоположном направлении, то ротор не сможет вращаться (теперь уже по часовой стрелке в направлении, противоположном указанному на рисунке 202 стрелкой) до тех пор, пока он не захватит протон из полуканала с низкой концентрацией протонов. Завершив оборот, ротор высвободит протон в полуканал с высокой концентрацией протонов. В этом случае, под действием внешней силы, мотор будет работать как *протонная помпа*, перекачивающая протоны через мембрану.

Мотор F_0, который приводится в движение потоком протонов или ионов натрия, соединён с АТФ-мотором F_1. *Мотор* F_1 представляет собой неподвижное *кольцо* из шести субъединиц, трёх α-субъединиц и трёх β-субъединиц. Эксцентричный *ротор* проходит через центр этого кольца, нажимает поочерёдно на каталитические β-субъединицы, чем существенно изменяет их структуру (α-субъединицы выполняют структурную функцию) (рисунок 203).

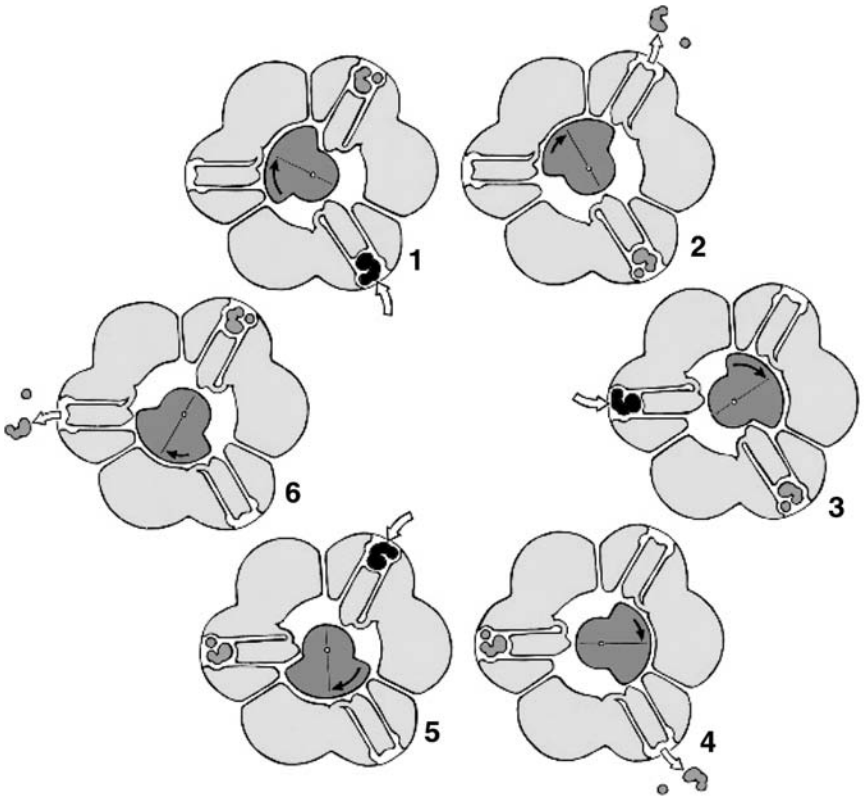


Рисунок 203 – Рабочий цикл F_1 мотора

Различные конформации β-субъединиц имеют *различное сродство* к АТФ. Условно выделяют *три* состояния: сжатое, свободное и открытое.

На рисунке 203 схематически представлены *фазы вращения* ротора в теле мотора F_1 *парами* по два шага – первый на угол 90° и второй на 30°. Данная схема воссоздана на основе прямых наблюдений вращения ротора с прикрепленной нитью флуоресцирующих белков.

Прямое наблюдение механического вращения γ-субъединицы относительно α и β субъединиц было проведено следующим образом. F_1 компонент перевернули, "пришили" к неподвижной подложке, а к γ-субъединице прикрепили актиновую нить, синтезированную из актиновых мономеров с флуоресцентными метками [52]. Затем подали к этой системе энергию в виде АТФ и γ-субъединица начала вращаться. В микроскоп было видно, как светящаяся актиновая нить совершает повороты на 120° (рисунок 204) (см. также п. 16.2).

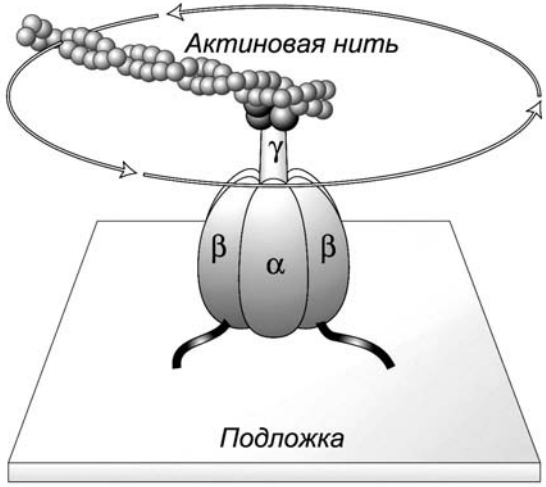


Рисунок 204 – Вращение γ-субъединицы АТФ-синтазы

Каждый поворот мотора F_1 на 120° состоит *двух* шагов. Связывание с АТФ стимулирует поворот ротора на 90°. Диссоциация АТФ на АДФ и фосфат не стимулирует поворот. Поворот на оставшиеся 30° стимулируется диссоциацией фосфата с β-субъединицы.

Работа мотора *обратима*. Диссоциация АТФ стимулирует вращение ротора. И наоборот, вращение ротора так стимулирует каталитические субъединицы, что они катализируют синтез АТФ (рисунок 203). В этом случае АТФ-синтаза работает как *генератор* АТФ.

На рисунке 205 показаны конформационные изменения в моторе F_1 при вращении ротора.

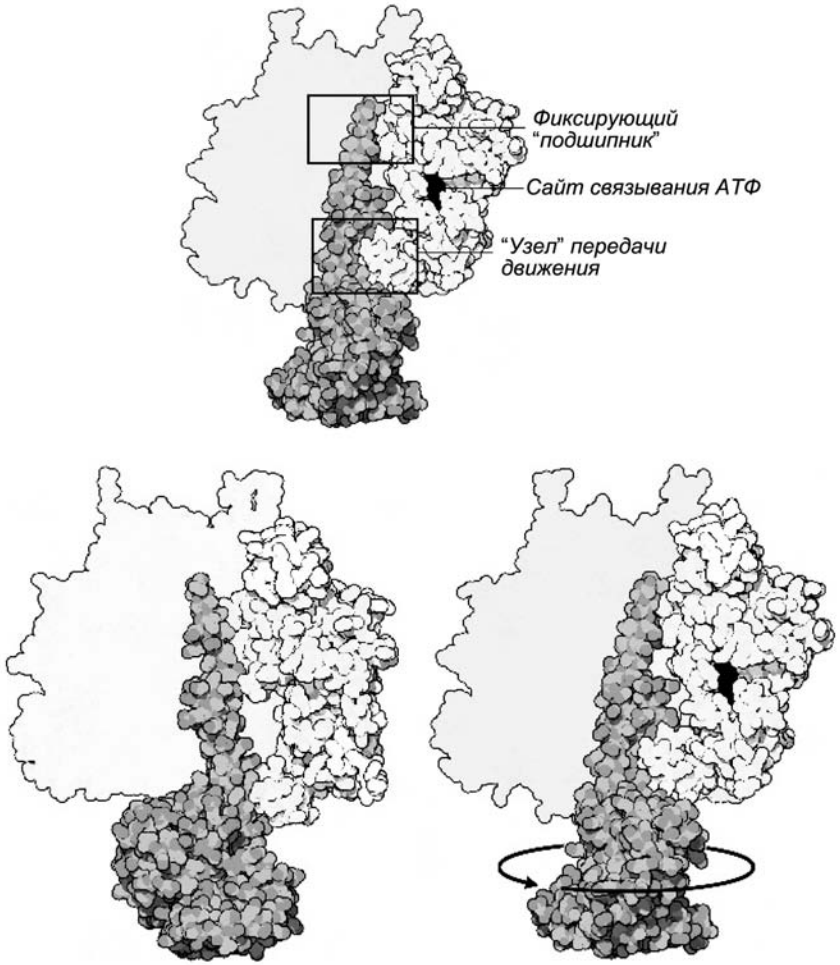


Рисунок 205 – Конформационные изменения в F_1 моторе АТФ-синтазы.

Изображена только одна каталитическая субъединица, а остальная часть мотора F_1 показана контуром. В верхних частях β-субъединицы совместно формируют структуру, функционально подобную *подшипнику*, в которой закреплён конец ротора. Эти верхние части не изменяются при конформациях β-субъединиц, сохраняя "подшипник". В нижней части рисунка 205 показаны два положения ротора. При вращении ротора изменяется конформация только нижней части каждой β-субъединицы по отношению к верхней, неподвижной части. При этом *стимулируется* (прижимаются друг к другу) *объединение* АДФ и фосфата и, при дальнейшем повороте ротора, готовая АТФ *вытесняется* из центра связывания.

Отметим, что F_1 мотор не "запитывается" напрямую диссоциацией АТФ. Диссоциация АТФ обеспечивает *необратимость* процесса вращения на каждом этапе цикла АТФ-синтазы.

Когда АТФ-синтаза работает в качестве мотора, молекуле АТФ легко связаться с каталитическими субъединицами, но сложно высвободиться, а АДФ, наоборот, сложно связаться, но легко высвободиться. АТФ, легко связавшись с АТФ-синтазой, гидролизуется и в виде АДФ легко покидает АТФ-синтазу.

При работе АТФ-синтазы в качестве генератора АТФ внешняя механическая энергия используется *для* реализации *двух* энергозатратных *этапов*: стимуляции связывания АДФ и стимуляции высвобождения АТФ.

Многие бактерии используют гораздо более крупные вращательные моторы для своего *поступательного* движения.

На рисунке 206 представлена схема *жгутикового мотора Escherichia coli*, который проходит сквозь плазматическую мембрану и клеточную стенку бактерии и приводит в движение длинный штопорообразный жгутик. Для масштаба рядом изображена АТФ-синтаза – другой вращательный мотор бактерии.

Вращательный мотор жгутика может вращаться в обоих направлениях. Мотор некоторых бактерий может вращаться со скоростью 100 000 оборотов в минуту, перемещая клетку со скоростью до

200 микрометров в секунду (у *Vibrio*). При этом мотор обеспечивает постоянный вращательный момент в широком диапазоне скоростей.

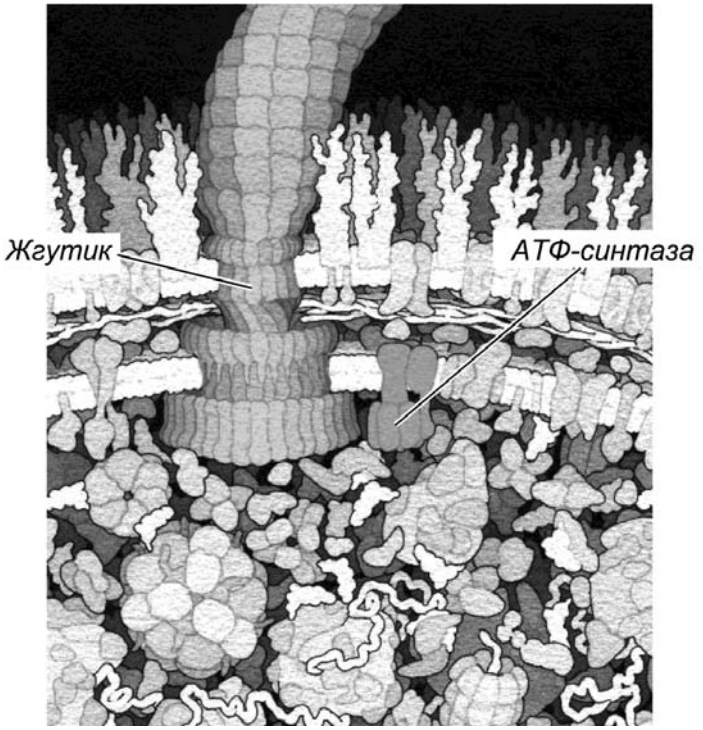


Рисунок 206 – Жгутиковый мотор в клеточной стенке бактерии

Так же, как и F_0 мотор АТФ-синтазы, бактериальный мотор жгутика состоит из мембранного *статора* и трансмембранного *ротора*. Атомарное устройство жгутикового мотора в настоящее время интенсивно исследуется, и основные морфологические и композиционные особенности мотора уже выяснены.

По-видимому, существует целый *набор* идентичных *статорных комплексов*, расположенных в мембране кольцом вокруг ротора. Всего насчитывают *восемь* блоков, в которых создаётся вращательный момент. Чтобы реализовать один оборот жгутика необходимо приблизительно 400

импульсов, создаваемых в этих блоках при прохождении сквозь статор-роторные контакты приблизительно 1200 протонов.

В других бактериях для генерации движения вместо градиента протонов используется градиент ионов натрия.

12.3. Применение броуновского решета для использования энергии теплового движения

Наномир погружён в тепловое движение, и не удивительно, что в ходе эволюции клетки разработали специфические устройства, которые позволяют использовать энергию теплового движения. Идея состоит в том, чтобы отселектировать "правильные" тепловые скачки от "неправильных" – упорядочить тепловое движение.

Например, представим частицу, для которой возможно только одномерное движение. Эта частица совершает случайные тепловые скачки вдоль выделенной линии в обоих направлениях. Теперь поставим на пути частицы такой барьер, чтобы частица могла его преодолевать только в одном направлении (барьер с "односторонним" движением).

Случайное тепловое движение сможет переносить частицу в одном направлении, но не сможет переносить её обратно. Если в системе находится много частиц, то они постепенно будут накапливаться по одну сторону барьера, и такой барьер с помощью теплового движения будет работать как насос.

Рассмотренная схема может быть расширена так, что получатся структуры, называемые *броуновским храповиком* (*Brownian ratchet*), или *броуновским решетом*, которые способны генерировать силу.

Один из примеров такого рода устройств мы уже видели – F_0 мотор в АТФ-синтазе. В этом моторе ротор совершает случайные вращательные движения, которые упорядочиваются и селектируются с помощью потока протонов через мембрану. Градиент концентраций обеспечивает движение протонов через мембрану преимущественно в одном направлении.

Самый наглядный пример броуновского решета представляет собой актин, который используется в процессе "ползания" клеток. На рисунке 207 показан принцип работы такого броуновского решета.

Актин полимеризуется в тонкие филаменты, используя АТФ при полимеризации свободных субъединиц.

На рисунке изображено, как *мембрана позволяет* нарастить актиновую нить вследствие случайных *тепловых флуктуаций*, которые временно приоткрывают щель между мембраной и актиновым волокном настолько, что становится возможным добавление очередного актинового мономера в актиновый полимер.

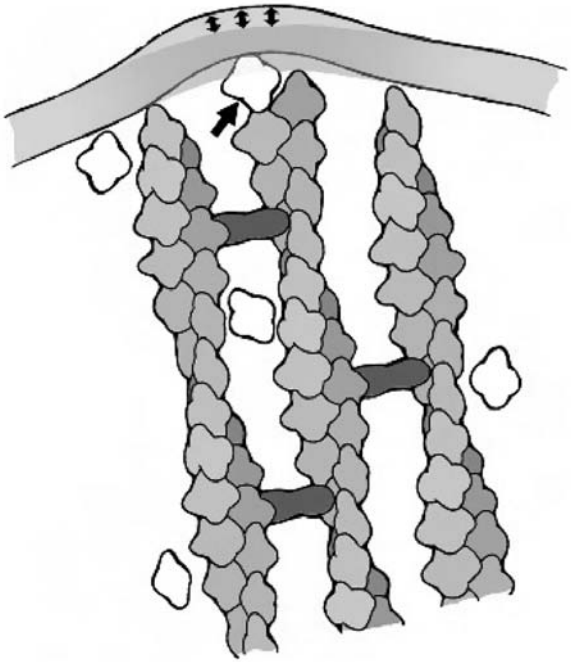


Рисунок 207 – Схема работы актинового броуновского решета для растяжения мембраны

Гидролиз АТФ в этом вновь присоединённом к нити мономере *закрепляет* его на конце нити, и мембрана, продолжая совершать

тепловые флуктуации, теперь находится в новом положении. Процесс может повторяться вновь и вновь.

Броуновское решето создаётся *комбинацией* случайных флуктуаций мембраны и необратимым присоединением мономеров актина, что и создает эффективную "силу" растягивающую мембрану в направлении роста актиновой нити. В данном случае тот барьер с "односторонним" движением, о котором шла речь выше, образуется благодаря гидролизу АТФ, который фиксирует мономеры актина на конце актиновой нити.

В клетках *такое наращивание* актиновых нитей используется для реализации движения клетки. При этом используется такой технологический *подход*, как эффект течения филаментов, который позволяет клетке "экономить" ресурсы – актиновая нить растет с одного ("нужного") конца и диссоциирует на другом конце (рисунок 180).

Диссоциировавшие с "хвоста" нити мономеры актина затем используются для наращивания этой же нити на её другом, растущем конце. Формируется своеобразный замкнутый *конвейер* мономеров актина (*treadmilling*), при котором эта динамическая актиновая нить перемешается относительно клетки. Это напоминает движение отдельных траков гусеницы трактора (или тягача), которые обеспечивают движение как самой гусеницы, так и всего трактора целиком.

Клетка может управлять этой молекулярной "гусеницей" с помощью двух белков: *деполимеризующий актиновый фактор* помогает диссоциировать мономерам актина на хвосте нити, а *профилин* стимулирует такую конформацию актина, которая оптимальна для полимеризации на растущем конце нити.

Кроме того, если в расширяющейся части клетки сосредоточено множество актиновых нитей, то клетка может *кэпировать* растущие концы большинства этих нитей *специальными белками* (рисунок 180). Тогда все мономеры актинов, диссоциировавшие со всех хвостов нитей, будут использованы для наращивания только тех нитей, которые остались *не кэпированными*. Так можно сформировать определённые выступы на поверхности клетки.

12.4. Функциональные принципы трансмембранного транспорта

Компартментация является универсальным подходом, позволяющим реализовать принцип "разделения труда" на уровне клетки. Компартментация реализуется в основном с использованием биомембран. Биомембраны являются гибкими, самозалечивающимися структурами, которые препятствуют перемещению молекул из одного компартмента в другой. Однако при использовании биомембран немедленно возникает проблема обеспечения транспорта необходимых веществ через мембрану.

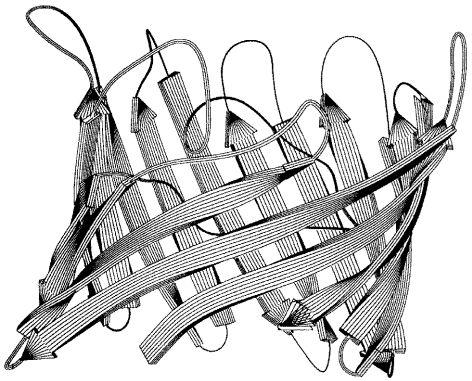
Окружение компартмента идеальной мембраной бессмысленно и бесполезно с точки зрения биологических нужд клетки. Для реализации трансмембранного транспорта в мембранах существует *широкий набор активных* и *пассивных транспортных систем* для перемещения молекул веществ через мембрану (см. [13], гл. 6 и 7).

Каналы являются *пассивными* транспортными устройствами, обеспечивающими поток молекул через мембрану. В простейшем случае каналом является просто белковая молекула, встроенная в мембрану, в теле которой имеется отверстие, соединяющее обе стороны мембраны.

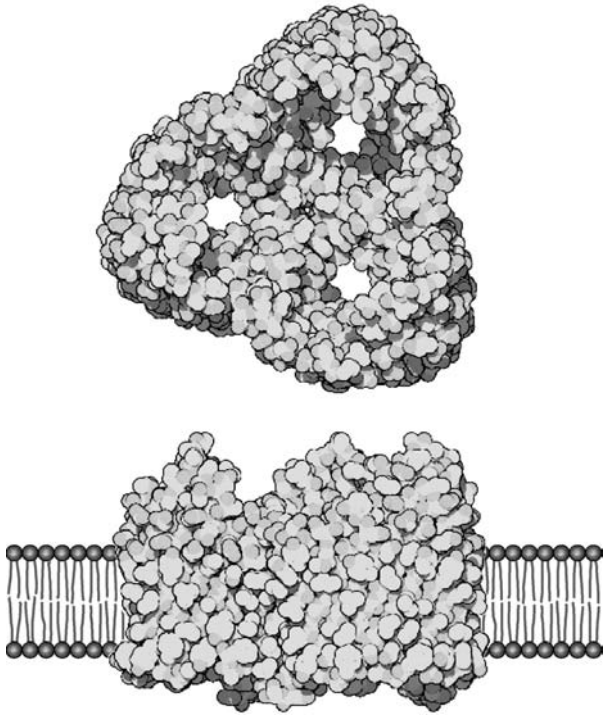
Примером такого трансмембранного канала является *бактериальный порин* (см. [13], п. 5.2). Каналы в порине формируются в виде полых цилиндров, образованных β-структурами (рисунок 208(а)).

Порины в наружной мембране бактерии имеют тримерную структуру (рисунок 208(б)). В высших организмах пориноподобные белки найдены в наружных мембранах митохондрий и пластидов.

Подобные поры позволяют малым молекулам, таким, как сахара или аминокислоты, свободно проходить через мембрану. Порины используются только во внешней, наружной мембране бактерий, обеспечивая свободный доступ питательным веществам к внутренней, плазматической мембране. А плазматическая мембрана должна оставаться цельной, поскольку именно она используется в прокариотах для создания электрохимического градиента, протондвижущей силы и окислительного фосфорилирования.



а



б

Рисунок 208 – Бактериальные порины: *а* – пространственное расположение β-структур белковой цепи в субъединице порина *R. blastica*; *б* – схема порина

Однако наиболее примечательны те мембранные каналы, которые обладают селективностью и могут пропускать только специфические молекулы.

Во многих случаях канальные белки имеют специфические домены-ворота, которые открывают или закрывают канал в теле белка в ответ на один из определённых сигналов:

1) присоединение определённого лиганда (молекулы или иона) к канальному белку;
2) изменение мембранного потенциала;
3) механическое напряжение.

Исследованы сотни таких регулируемых мембранных канальных белков.

Калиевые каналы. Кристаллографические исследования позволили выяснить механизм действия калиевого канала (рисунок 209).

Калиевые каналы пропускают ионы *калия*, но не пропускают ионы *натрия* и *хлора*, которых всегда много в водной среде.

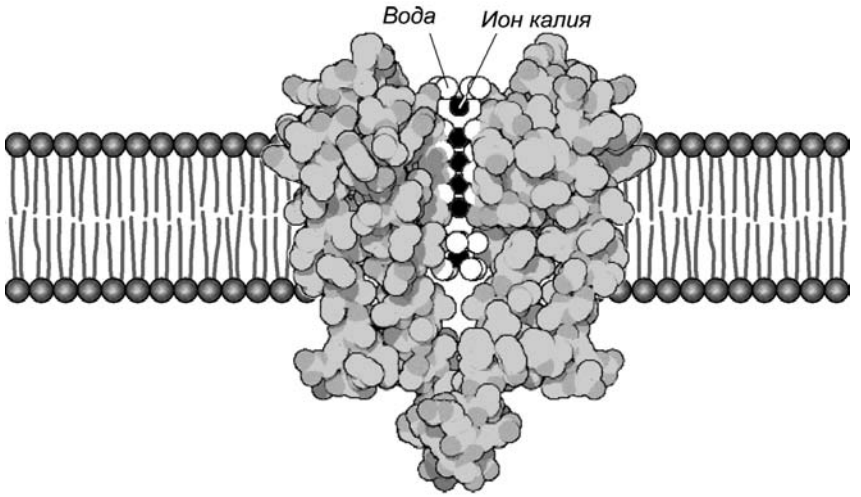


Рисунок 209 – Схема калиевого канала биомембраны

Блокировка движения ионов хлора достаточно проста, поскольку они, в отличие от катионов калия, отрицательно заряжены. Прохождение ионов *хлора* блокируется простым помещением отрицательно заряженных аминокислот у входа в канал. А вот предотвращение прохождения ионов *натрия* представляет собой намного более сложную задачу. Оба иона – и *калия*, и *натрия* – несут одинаковый положительный заряд и поэтому электростатическая блокада не может быть использована. Простая фильтрация по размеру атома не подходит, поскольку ион натрия *меньше* иона калия (0,095 нм для натрия и 0,133 нм для калия).

В конструкции калиевого фильтра использованы свойства водного окружения. В растворе ионы металлов гидратированы молекулами воды. Калиевый канал имеет внутренний диаметр, пропускающий ионы, но не пропускающий гидратную оболочку иона (рисунок 209).

В канале расположены несколько колец из атомов кислорода, входящих в состав аминокислот белка, которые имитируют гидратную оболочку иона калия. Иону калия энергетически выгодно "заменить" гидратную оболочку на положение в центре кольца из атомов кислорода. Для ионов калия геометрия канала оптимальна, а для ионов натрия нет. Поэтому натрию энергетически невыгодно "заменить" гидратную оболочку на положение в центре кислородного кольца (см. [13], п. 10.1).

За секунду через канал проходит порядка 10^8 ионов калия, "одевая" гидратную оболочку на выходе из канала.

И только один ион натрия на десять тысяч ионов калия может пройти через калиевый канал.

12.5. Функциональные принципы действия мембранных ABC-транспортёров

Транспортные белки активно участвуют в переносе молекул через мембрану. Они обычно связывают молекулу, а затем *изменяют конформацию* таким образом, что молекула перемещается через мембрану.

Для реализации такого вида транспорта используется множество механизмов.

В ряде случаев в качестве источника энергии для такого транспорта используется *энергия гидролиза АТФ*. Или же для переноса протонов через мембрану используется энергия квантов света, как в случае бактериородопсина, о котором речь пойдет ниже в п. 12.6.

В других белках-транспортёрах две молекулы переносятся одновременно – так называемый трансмембранный транспорт *котранспортёрами* – по схемам *симпорта* или *антипорта* (см. [13], п. 6.4). Например, *бактериальная лактозо-пермеаза*, которая переносит одновременно и лактозу (дисахарид), и протон, использует энергию электрохимического протонного градиента для перемещения лактозы внутрь клетки.

Уже изучены сотни белков-транспортёров, что обеспечивает надежный фундамент для разработки необходимых молекулярных насосов в бионанотехнологических применениях.

Самыми распространенными транспортными белками в клетках являются *ABC-транспортёры*, где аббревиатура ABC означает АТФ-связывающая кассета (**A***TP*-**b***inding* **c***assette*), которая обнаружена во всех ABC-транспортёрах.

Эти белки имеют форму бельевой прищепки, проходящей сквозь мембрану. АТФ-связывающие домены находятся в "ручках прищепки", а в транспортный механизм входит специальный карман на "зажимах прищепки". Этот карман имеет два входа с обеих сторон мембраны.

Считается, что ABC-транспортёр работает по *флип-флоп* механизму, при котором зажим "прищепки" попеременно открывается и закрывается (см. [13], п. 7.6). В одном состоянии открыт вход в карман со стороны зажима, а противоположный вход со стороны "ручек" закрыт. В другом состоянии, наоборот, закрыт вход со стороны зажима, а открывается вход со стороны ручек "прищепки".

Переход между двумя состояниями стимулируется гидролизом АТФ. Были обнаружены различные ABC-транспортёры, которые осуществляют трансмембранную транслокацию множества различных молекул таких, как аминокислоты, ионы, сахара, витамины, токсины и т. д.

На рисунке 210 показана схема *бактериального* BtuCD-транспортёра, который переносит витамин B_{12} через мембрану. Транспортёр имеет большой карман, который обычно открыт *наружу* клетки.

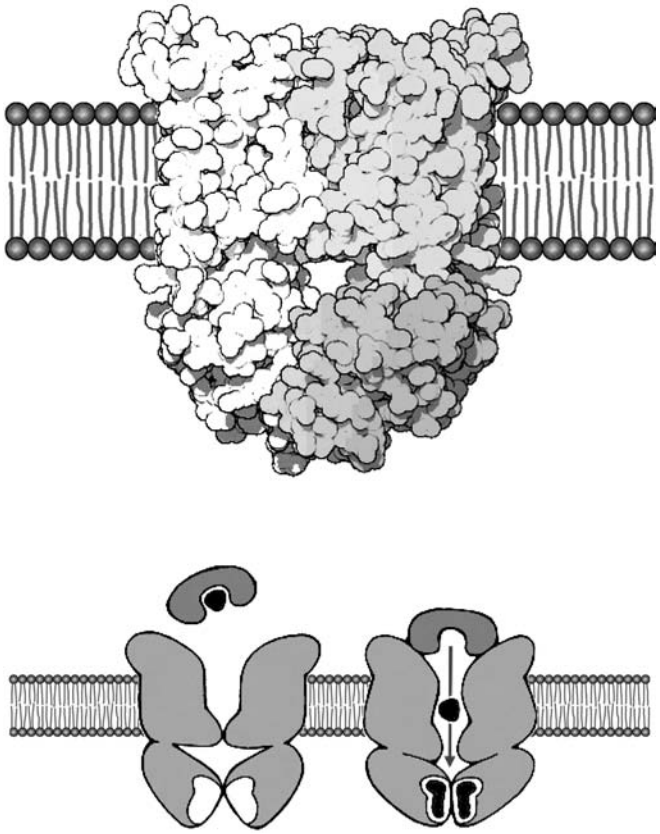


Рисунок 210 – Схема работа бактериального BtuCD-транспортёра

Молекула витамина доставляется к транспортёру с помощью малого переносчика. Связывание АТФ с доменами транспортёра внутри клетки приводит к изменению конформации транспортёра, при котором открывается *дно* кармана, и молекула витамина может войти в клетку.

12.6. Функциональные принципы действия протонной помпы бактериородопсина

Как уже упоминалось выше, для обеспечения множества биомолекулярных процессов используется *электрохимический градиент*. Для создания этого градиента используется несколько различных методов.

Наиболее распространённым является использование *электронных транспортных цепей*, в которых электроны, получаемые при окислении сахаров, переносятся *вдоль мембраны* (см. рисунок 166). Белки этой цепи содержат *цепочки акцепторов электронов* (кофакторов, которые обеспечивают внутрибелковый перенос высокоэнергетичных электронов), окислительно-восстановительный потенциал которых постепенно увеличивается вдоль цепи, и, соответственно, растёт сродство к электрону, а свободная энергия за счёт присутствия в системе электрона – снижается. *Между белками* в цепи электроны перемещаются с помощью специализированных *цитозольных* (водорастворимых) или *мембранных* (жирорастворимых) *переносчиков*.

По мере того, как электроны перемещаются по цепи акцепторов и переносчиков, *выделяющаяся при этом энергия используется для транслокации протонов через мембрану*. Предполагаются *два* механизма такого переноса.

1. Электроны могут *управлять* перемещением переносчиков протонов при их движении от одной стороны мембраны к другой, ориентируя их сначала на одной стороне мембраны так, чтобы захватить протон, а затем, стимулируя движение переносчиков к другой стороне мембраны, чтобы высвободить там протоны.
2. Поток электронов может стимулировать *аллостерические изменения* структуры белков, подобные изменениям у АВС-транспортёров, открывающие их поочередно то с одной стороны мембраны, то с другой.

Бактериородопсин является одним из наиболее хорошо изученных *протонных насосов*. Используя энергию поглощённого света,

бактериородопсин циклически совершает переходы между *тремя* состояниями с различной энергией (рисунок 211).

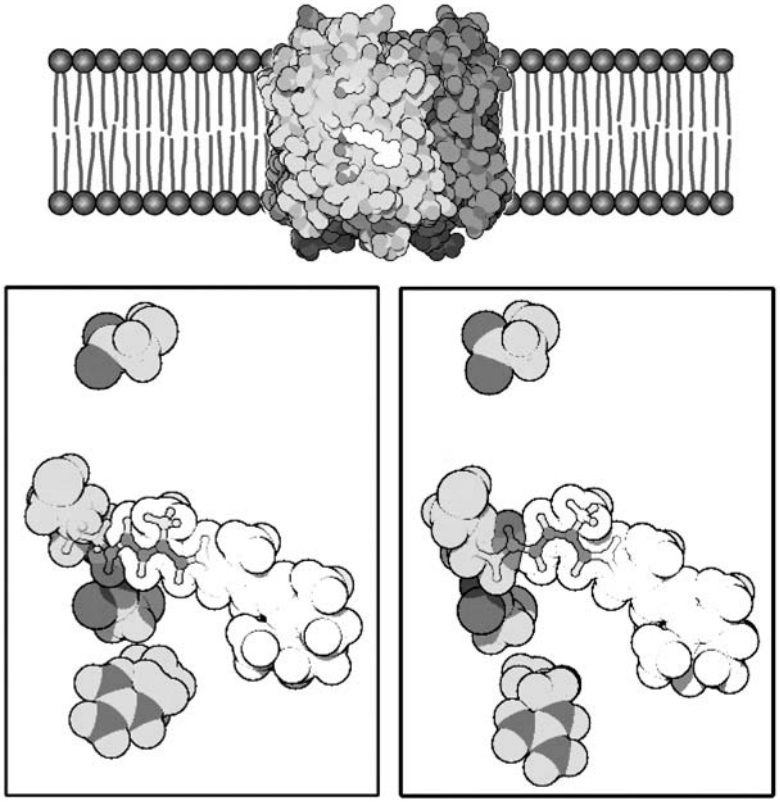


Рисунок 211 – Два состояния компонентов бактериородопсина до и после поглощения света

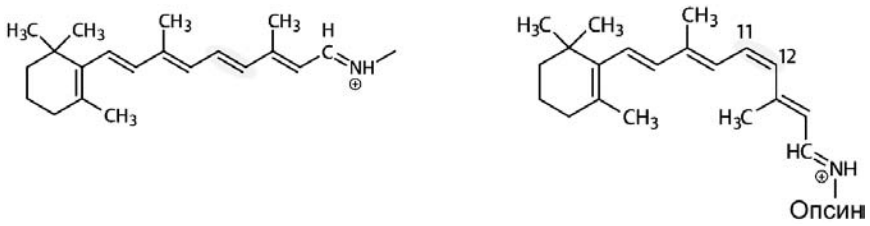
В нерабочем состоянии бактериородопсин находится в состоянии с *промежуточной* энергией в такой конформации, что он способен захватить протон на одной стороне мембраны. После захвата протона бактериородопсин самопроизвольно переходит в состояние с *пониженной* энергией, изменяя при этом конформацию и перенося протон к противоположной стороне мембраны.

Поглощение света возбуждает бактериородопсин в состояние с *наибольшей* энергией, стимулируя одновременно высвобождение протона. Весь комплекс затем релаксирует и переходит в состояние с промежуточной энергией, готовый к захвату следующего протона.

Цикл реализуется только в *одном* направлении, перекачивая протоны в одном направлении через мембрану, поскольку он зависит от поглощения фотона для возбуждения белка из низкоэнергетичного в высокоэнергетичное состояние.

В основе функционирования бактериородопсина лежит изменение конформации малой молекулы-кофактора *ретиналя* (функциональные особенности светосенсорики будут рассмотрены ниже в п.13.2).

Ретиналь содержит цепочку чередующихся двойных и одинарных связей, которые способны поглощать свет в широком диапазоне энергий. В результате поглощения света одна из двойных связей переключается из *линейной транс*-формы в *изогнутую цис*-форму (рисунок 212). Ретиналь ковалентно связан с окружающим белком, поэтому эти изменения в форме молекулы передаются белку, изменяя конформацию и способствуя высвобождению протона.



а *б*

Рисунок 212 – Конформации ретиналя: *а* – полностью-*транс*-ретиналь, *б* – 11-*цис*-ретиналь

На рисунке 211 показаны изменения во взаимном расположении компонентов бактериородопсина в результате поглощения света. Молекула ретиналя показана белым цветом. *Цис-транс переход* при поглощении света изображён в шаро-стержневом представлении.

Значительное пространственное смещение аминогруппы на конце ретиналя изменяет *положение* нескольких *аминокислот* в цепи переноса протона (показанной серым цветом на рисунке).

Контрольные вопросы и задания

1. Почему биомоторы редко используются для генерации механического движения в масштабах клетки?
2. В чём сходство и различие функционирования миозинов и кинезинов?
3. Опишите рабочий цикл миозина.
4. Опишите рабочий цикл-шаг кинезина.
5. Как участие молекулы АТФ влияет на конформационные состояния миозинов и кинезинов?
6. Комбинацией каких моторов является АТФ-синтаза?
7. Каким образом в мембранном моторе АТФ-синтазы реализуется процесс вращательной диффузии?
8. Как фазы вращения ротора АТФ-синтазы связаны с каталитическим циклом синтеза АТФ?
9. Что такое броуновское решето (броуновский храповик)?
10. Приведите примеры реализации броуновского решета в биосистемах.
11. Реализация какого функционального решения позволяет клетке совершать необходимые перестроения структуры, используя ограниченный пул мономеров актина?
12. Почему в биосистемах не существует идеальных мембран?
13. Какие трансмембранные структуры формируют мембранные каналы?
14. Какие свойства каналов используются для создания фильтров, которые селектируют ионы?
15. Как функционирует фильтр селективности калиевого канала?
16. Какова биологическая функция транспортных мембранных белков?
17. Как работают ABC-транспортёры?

18. В чем состоит специфика флип-флоп механизма?
19. Назовите два механизма трансмембранного переноса протонов.
20. Какой из двух механизмов трансмембранного переноса протонов используется в случае бактериородопсина?
21. Какую роль выполняет молекула-кофактор ретиналь в функционировании бактериородопсина как протонной помпы?

Глава 13
Биомолекулярная сенсорика и саморепликация

13.1. Функциональные принципы биомолекулярной сенсорики

В биологических системах детектирование слабых изменений в окружающей среде, таких, как *свет*, *звук*, *давление* – всё то, что называют общим термином *сенсорика*, – обычно осуществляется рецепторными белками, которые чувствуют изменения свойств окружающей среды и преобразовывают эти изменения в сигналы, которые могут быть распознаны стандартными биомолекулярными сигнальными системами.

Чаще всего *сенсоры* биосистем *индуцируют*

1) *конформационные* переходы, которые в дальнейшем детектируются другими белками в сигнальной цепи;
2) *изменения в распределении зарядов*, например, в результате открытия ионного канала в мембране.

Такие изменения состояния рецепторов затем распознаются и усиливаются, приводя, в конце концов, к изменению состояния клетки вообще или к возбуждению нервного импульса.

Задачей бионанотехнологии является *использование* в своих целях таких выделенных из клеток рецепторов. Такие рецепторы используют

чувствительные системы распознавания и усиления *малых* изменений в молекулярной структуре рецептора в *значительный* клеточный или нервный отклик. В некоторых случаях рецепторные системы могут быть *непосредственно использованы* в бионанотехнологии. Например, некоторые рецепторные белки являются *каналами*, которые открываются в ответ на внешний сигнал. Эти рецепторы могут быть *использованы в любых применениях*, в которых есть два резервуара, разделённые мембраной.

Однако для функционирования *зрительных* рецепторов и рецепторов *запаха* необходимы *сложные* и *точные* системы обработки сигналов, что усложняет их непосредственное использование.

Бионаномашины, обеспечивающие восприятие *запаха* и *вкуса*, уже достаточно хорошо исследованы. Запах и вкус основаны на *детектировании* данной *молекулы* в смеси множества молекул. Такое молекулярное узнавание реализуется с помощью белков. Клетки синтезируют большое количество белков-рецепторов запаха и вкуса, каждый из которых *связывается* со специфической молекулой и *возбуждает нервный импульс*, когда детектирует "свою" молекулу. В последнее время изучены молекулярные детали этих полезных сенсоров.

Запахи распознаются рецепторами пахнущих веществ. Млекопитающие имеют около 1000 различных *генов*, кодирующих такие рецепторы, которые в нужных сочетаниях могут детектировать *миллионы* разных запахов. Рецепторы запаха являются мембранными *белками*, расположенными на поверхности обонятельных клеток. При сравнении аминокислотных последовательностей различных обонятельных рецепторов было обнаружено, что на глубине *одной трети* толщины мембраны они имеют чрезвычайно *вариабельные* участки пептидной цепи. Считается, что аминокислоты этих участков формируют *карман* в теле рецептора, открытый наружу клетки, с которым и связываются молекулы душистых веществ.

Расположение центра связывания молекулы запаха в глубине мембраны имеет смысл, поскольку молекулы запахов обычно являются гидрофобными, летучими органическими молекулами. В ответ на связывание с молекулой запаха в рецепторном белке индуцируется

изменение конформации цитозольной части рецептора. В ответ на это изменение активизируется сигнальная цепь внутри клетки.

Вкус включает в себя детектирование большого числа различных молекул – сладких, горьких, соленых, кислых – и использует различные наноподходы для каждой из них.

Вкусовые рецепторы, регистрирующие *горькие* вещества, распознают молекулы, которые могут быть опасны для организма, такие, как кофеин, никотин, стрихнин. Многие рецепторы горечи подобны рецепторам запаха. Аналогично устроены и рецепторы *сладости*, в которых связывание молекулы сахара инициирует соответствующий клеточный отклик.

Солёный и *кислый* вкусы детектируются различным образом. Поскольку для их детектирования регистрируется концентрация *ионов* (ионов *натрия* для солёного вкуса и ионов *водорода* для кислого), то в сенсорике этих вкусов *задействованы мембранные канальные белки*, управляемые соответствующим типом ионов. Такие каналы открываются в ответ на повышение концентрации ионов, что позволяет ионам проходить через мембрану. В результате этого изменяется мембранный потенциал, что и вызывает нервный импульс.

13.2. Функциональные особенности светосенсорики

Биологическая светосенсорика связана с *ретиналем*, малой молекулой, которая изменяет конформацию при поглощении фотона (рисунок 212). Ретиналь содержит цепочку двойных связей, что делает его прекрасным *хромофором*. Он имеет широкую полосу поглощения в видимом диапазоне спектра с максимумом в зеленой области в районе 500 нм. Его коэффициент поглощения близок к максимально возможному для органических молекул. Изменяя химическое окружение ретиналя можно *сместить* максимум полосы поглощения, тем самым *настроить* чувствительность системы на нужный спектральный диапазон (на нужный цвет).

В глазе ретиналь ассоциирован с белком *опсином* (см. рисунок 23), который в больших концентрациях находится в специальных мембранах внутри светочувствительных клеток (*палочек*) сетчатки глаза.

Опсин содержит в себе светочувствительную молекулу ретиналя, погруженную внутрь глобулы. Ретиналь, поглощая фотон, претерпевает *цис-транс переход*. Это изменение формы ретиналя усиливается окружающим белком. Итоговое изменение формы поверхности опсина легко детектируется белками клетки, каскад конформаций которых, в конце концов, превращается в нервный импульс, передаваемый в мозг.

В состав белковой цепи опсина входят *семь* α-спиралей, которые формируют цилиндрический *жгут*, проходящий через мембрану. Ретиналь присоединён к лизину в середине этого жгута по центру мембраны. Так же, как и в случае бактериородопсина (рисунок 211), изменение формы молекулы ретиналя индуцирует изменение конформации всего опсина.

В *родопсине* глаза человека ретиналь находится в форме 11-*цис*-ретиналь (11-*cis*-retinal, рисунок 212(б)). После поглощения фотона за время порядка пикосекунды ретиналь *переходит* в форму полностью-*транс*-ретиналь (all-*trans*-retinal, рисунок 212(а)), вследствие чего весь белок изменяет конформацию, переходя в активную форму *родопсин*(*).

Стимуляция родопсином(*) G-белка запускает *каскад передачи* сигнала, который, в конце концов, возбуждает нервный импульс. А сам родопсин *распадается* на опсин и полностью-*транс*-ретиналь.

В цитоплазме полностью-*транс*-ретиналь *изомеризуется* в *цис*-ретиналь ферментом *ретинальизомераза* (EC 5.2.1.3), после чего может вновь быть *собрана* молекула *родопсина* в исходном состоянии.

13.3. Функциональные особенности механочувствительности

Исследование *механосенсоров* выявило множество интересных особенностей, однако молекулярное строение механосенсоров все ещё активно исследуется. Механосенсоры детектируют механические силы,

вызываемые прикосновением (касанием), ускорением и звуковым давлением. Обнаружено, что механосенсорика является очень *быстрой* и *высокочувствительной*, а это означает, что её рецепторами являются ионные *каналы*. Такие каналы быстро открываются, что позволяет осуществить быстрый переход большого числа ионов через мембрану, тем самым, усиливая слабый сигнал в интенсивный клеточный отклик.

Основной моделью механочувствительного канала является белок, прикреплённый к биоструктурам *по обе стороны* мембраны.

Снаружи клетки канал прикреплен к внеклеточному матриксу, а внутри клетки – к цитоскелету. Смещения внеклеточного матрикса растягивают внеклеточную связь и изменяют структуру канала, приводя к его временному открыванию. Многие такие системы обладают свойством адаптации (или релаксации), при котором постоянная сила, например, гравитационная, не детектируется, а регистрируется только изменение силы.

Примером одного из наиболее изученных механосенсорных каналов является *бактериальный MscL-канал* (рисунок 213). Этот канал *открывается*, если мембрана, в которую он встроен, *растягивается*. Это качество является особенно полезным, если бактерия попадает в среду с низкой концентрацией ионов. Без подобных каналов осмос привел бы к разбуханию клетки и разрыву плазматической мембраны. Но если при растяжении мембраны открываются каналы, то излишек ионов выходит из клетки, и осмотическое давление снижается.

MscL-канал представляет собой *кольцо* из *пяти* белков. Каждый белок имеет *две* α-спирали, пересекающие мембрану. В закрытой форме они плотно прижаты друг к другу так, что образуется кольцо из гидрофобных аминокислот с отверстием порядка 0,2 нм в центре, тем самым пора практически *закрыта*.

Механическое растяжение мембраны открывает канал, образуя *пору* диаметром 4 нм, через которую могут проходить ионы, метаболиты и даже малые белки. Считается, что белковые спирали *сдвигаются* друг относительно друга подобно *ирисовой диафрагме* в объективе фотоаппарата.

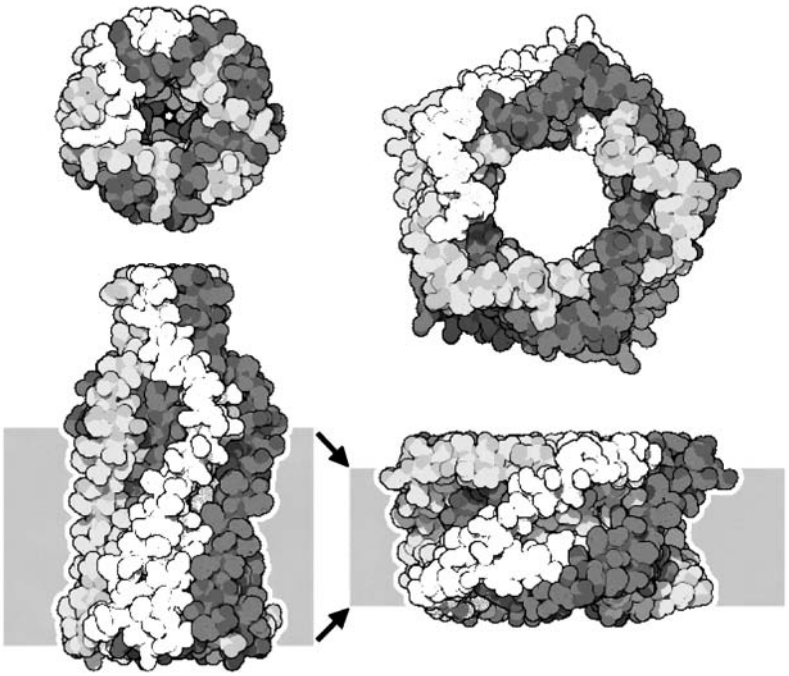


Рисунок 213 – Схема функционирования механосенсорного MscL-канала

Этот канал чрезвычайно прочный. Его можно выделить в чистом виде и *встроить* в мембрану липидной липосомы. Функционирование этого канала связано только с механическими напряжениями в липидной мембране, он не прикреплён к другим структурам внутри и снаружи клетки. Поэтому он представляет несомненный интерес для бионано-технологии.

13.4. Бактериальный механизм детектирования химического градиента

Перед бактериями стоит непростая дилемма. Они должны активно *искать* пищу, перемещаясь из области с низкой концентрацией питательных веществ в область с более высокой их концентрацией.

Однако вследствие малого размера бактерий возникает проблема: Как именно бактерия определяет градиент, то есть, как она выбирает направление к области с большей концентрацией питательных веществ?

Действительно, изменение концентрации вещества на длине бактерии слишком мало, чтобы его можно было зарегистрировать. Поэтому бактерия использует *накопительный механизм* определения градиента концентрации. Измерения концентрации производятся через определённый промежуток времени и затем *сравниваются*.

Однако бактерии могут только определять, становится ли концентрация выше или ниже, но не запоминать предыдущие "измерения", следовательно, они не могут "рассчитывать" наилучшее направление движения. Поэтому эволюция бактерий выработала метод, позволяющий *селектировать* те из случайных блужданий, которые направлены в сторону роста концентрации питательных веществ.

Жгутиковый мотор бактерий может вращаться в *обоих направлениях*. В одном направлении несколько жгутиков формируют *пучок*, который двигает бактерию в определённом направлении. При вращении жгутикового мотора в обратном направлении жгутики разделяются, и бактерия просто *вертится* на месте. Комбинируя два таких движения, бактерия следует градиенту концентрации.

Если клетка определяет рост концентрации питательных веществ, то она "включает аверс" и движется *поступательно*, но если клетка чувствует снижение концентрации питательных веществ, то она "включает реверс", жгутиковый мотор начинает вращаться в обратном направлении, и клетка *вертится* на одном месте, до тех пор, пока не зарегистрирует новое направление, в котором растёт концентрация питательных веществ. В результате клетка *отбирает* только те случайные шаги, которые идут в направлении роста концентрации.

13.5. Принцип саморепликации в бионанотехнологии

Саморепликация (саморазмножение), как считается в настоящее время, является обязательной частью любой нанотехнологии, которая

имеет целью создание макроскопических объектов. Это следует из того очевидного факта, что наномасштабный наноассемблер за разумное время просто не в состоянии сформировать макроскопическую конструкцию.

Даже простое тысячекратное арифметическое увеличение числа наноассемблеров не решает проблему, поскольку размер формируемых объектов также будет увеличен только в 1000 раз, а объём нанообъекта (~нм^3) отличается от объёма макрообъекта (~м^3) в 10^{27} раз, – слишком уж много атомов (каждый из которых, предполагается, индивидуально присоединен наноассемблером к макрообъекту) даже в одном грамме вещества.

Только используя саморепликацию, при которой происходит экспоненциальное увеличение числа ассемблеров и, следовательно, ассемблируемых структур, реально позволит решить проблему создания макрообъектов "силами" наноассемблеров.

Саморепликация является одновременно и перспективным методологическим принципом, и достаточно рискованным технологическим приёмом. Жизнь на Земле демонстрирует достаточно много примеров такой "двуликости" саморепликации.

Любая природная экосистема – лес, луг, долина – демонстрирует совершенную гармонию, которая достигается в результате борьбы за существование её самореплицирующихся составных частей – организмов её составляющих.

А с другой стороны, распространение СПИДа или любой другой эпидемии демонстрирует опасность неконтролируемой саморепликации. Природа снабдила нас инструментами для создания искусственных самореплицирующихся бионаномашин, но следует внимательно и аккуратно использовать эти знания.

Клетки как автономные самореплицирующиеся объекты. Доказательством чрезвычайной эффективности принципа саморепликации является всеобщность и разнообразие проявления форм жизни на Земле. Все клетки земных организмов организованы одинаково и используют одинаковые механизмы саморепликации. В упрощённом виде все системы саморепликации имеют "стандартный" инструментальный набор.

1. *Информационно-управляемый ассемблер.* Эта наномашина синтезирует новые молекулы согласно генетическим инструкциям. У современных клеток таким ассемблером является *рибосома*.
2. *Система хранения информации.* Эта система хранит инструкции для ассемблера, которые определяют конечный результат самоассемблирования. Современные клетки в качестве хранилища генетических инструкций используют *молекулы ДНК*.
3. *Дупликатор*. Эта наномашина дуплицирует генетическую информацию. В клетках таким дупликатором является *ДНК-полимераза*.
4. *Химические процессоры*. Эти наномашины синтезируют те узлы, которые используют ассемблер и дупликатор, из простых исходных веществ. В современных клетках такую работу выполняют тысячи различных *ферментов*.
5. *Инфраструктура*. Эти наномашины создают ту необходимую инфраструктуру, которая характерна именно для клетки данного вида, отделяя её от окружающих клеток, но и обеспечивая возможность обмена веществом, энергией и информацией с клеточным окружением. Эта инфраструктура также обеспечивает необходимыми инструментами процесс клеточного деления. Основным компонентом такой инфраструктуры в современных клетках являются биомембраны со встроенными транспортными и сигнальными белковыми системами.

Сами по себе организмы являются поразительными образованиями – их бесконечное разнообразие и сложность определяется достаточно лаконичным и ограниченным набором технологических инструкций (генов). И строение, и функции человеческого организма задаются информацией, содержащейся в поразительно малом по объёму геноме.

Нынешнее поколение людей является первым поколением, которому стал доступен этот генетический текст, и которое стало использовать эту информацию на практике. Сегодня человек получил доступ к "чертежам", описывающим устройство как бактерий, вирусов, насекомых и растений, так и самого человека. И человек постепенно начинает разбираться в том, как тысячи взаимодействующих белков

функционируют в клетке, и как можно их модифицировать, для использования в промышленности или в медицине.

Согласно современным оценкам для жизни и воспроизводства живого организма в лабораторных условиях необходимо 250-300 генов. Простейший организм *Mycoplasma genitalium* содержит ~550 генов. Однако этот организм живет внутри других клеток и использует продукты метаболизма хозяйской клетки для своих нужд. При этом этот организм самостоятельно осуществляет такие базовые функции как синтез белков, манипулирование ДНК, энергообеспечение. Кроме того, в плазматической мембране такого организма должно быть достаточное количество транспортеров для снабжения себя необходимыми веществами. Сравнительные исследования и эксперименты по блокированию или разрушению белков в таких организмах показали, что только половина из этих белков являются абсолютно необходимыми.

Конечно же, сам по себе геном не является единственным источником "сборочной" и "репродуктивной" информации. Для эффективного функционирования геном должен быть размещен внутри живой, функционирующей, клетки.

В случае простейших клеток используется единственная биомембрана, которая ограничивает клетку и, следовательно, клетка состоит из двух существенно различных частей – внутриклеточный водный раствор, и клеточная мембрана со встроенными мембранными белками. У эукариотических организмов из поколения в поколение должна передаваться ещё и сложная иерархическая структура клеточных органелл. Пока что, например, нет экспериментальных свидетельств того, что клетки человеческого организма способны "собрать" митохондрию из молекул, растворённых в цитозоле клетки. Следовательно, "проектная документация клетки" должна включать в себя и генетическую информацию о структуре макромолекул, и информацию о пространственной структуре клетки.

Эволюция определила принципы устройства современных клеток. Жизнь на Земле использует для создания самореплицирующихся особей единый подход, включающий в себя:

- информационно-управляемое ассемблирование;
- системы синтеза элементарных строительных "блоков";
- инфраструктуру, образующую барьер, отделяющий особь от внешней среды.

Такое устройство самореплицирующихся систем определено тем эволюционным процессом, в ходе которого формировались современные организмы. Сегодня человек использует именно этот вариант решения задачи формирования самореплицирующегося организма, используя или модифицируя уже существующие природные системы для своих нужд. Но в будущем, возможно, будут использованы и другие подходы.

В частности именно необходимость проводить эволюционный отбор потребовала, помещать организм внутрь определённого компартмента, отделяя его тем самым от окружения. Необходимо было помещать генетическую информацию внутрь клетки, тогда такие клетки могли конкурировать друг с другом. Например, если более совершенные, эффективные, ассемблеры будут находиться в одном объёме с несовершенными, то эти совершенные ассемблеры будут равновероятно воспроизводить и себя, и менее удачные ассемблеры. А для задач эволюционного отбора необходимо, чтобы самые лучшие ассемблеры синтезировали только свои копии.

Если же отпадает необходимость в эволюционном отборе, то нет нужды и в существовании границы самореплицирующейся системы. При разработке искусственной системы сам инженер-бионанотехнолог задает степень совершенства компонентов системы. Возможно, будущие самореплицирующиеся искусственные бионаносистемы будут представлять собой не набор нанороботов, а систему бионаномашин, которые, работая вместе, выполнят поставленную задачу, после чего дизассемблируются.

13.6. Бионанотехнология машинной фазы вещества

Одна из новых концепций, предложенных для молекулярной нанотехнологии – это введение новой фазы, в которой может

существовать вещество (в дополнение к традиционным жидкой, твердой, газообразной фазам и плазме).

Машинная фаза вещества (*machine-phase matter*) образуется из набора наноразмерных машин, чётко выделенные части которых выполняют согласованные информационно-управляемые функции.

Большинство природных бионаномашин функционируют не объединяясь в такую атомно-определённую машинную фазу. Если необходимо согласованное действие природных наномашин, то после синтеза они диффундируют в клетке и ассоциируют в более сложные комплексы. Тем самым реализуется функциональный принцип "*диффузия-для-присоединения*" (*diffusion-to-capture*), при котором каждая наномашина не теряет своего "суверенитета".

Однако существует и множество примеров, когда происходит формирование машинной фазы, в результате которого программируется не только работа наночастей отдельной наномашины, но и согласованное функционирование всех наномашин, входящих в систему.

Природные системы, образующие машинную фазу, являются чрезвычайно прочными образованиями. Они состоят из большого числа модулей-наномашин, каждый из которых является стабильным и функционально эффективным модулем. Машинная фаза образуется из множества копий каждого вида наномашин, входящих в систему.

Часто при образовании машинной фазы используется *два уровня иерархичности*. Сначала наномашины ассемблируются в клеточные ансамбли, а затем происходит ассемблирование клеток в макроразмерные системы. На обоих уровнях избыточная мультикопийность каждого вида наномашин гарантирует функциональность и стабильность образуемого ансамбля наномашин, а также защиту от ошибок при синтезе наномашин.

Рассматривая два примера такого рода систем: саркомеры мышц и нейронные сети, следует помнить, что, несмотря на то, что компоненты этих систем уже достаточно хорошо изучены и могут служить прототипами для разработки бионаносистем, человек пока не способен создавать такие сложные в структурном и функциональном аспектах системы машинной фазы.

Саркомеры мышц. Одним из наиболее впечатляющих примеров вещества в машинной фазе являются саркомеры мышц (рисунок 214). В мышцах координируется действие громадного количества молекул миозина для создания макроскопического движения.

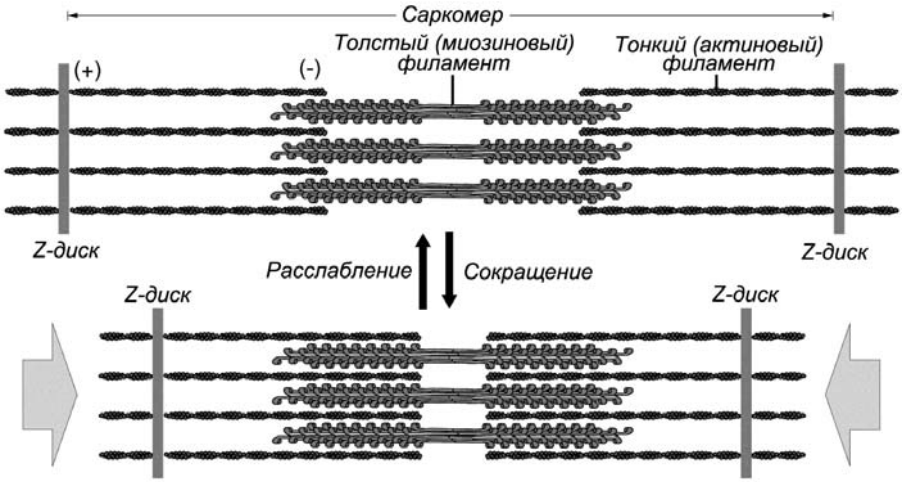


Рисунок 214 – Схема сокращения саркомера

Например, мышца бицепс человека состоит из ~5×10^{19} молекул миозина, которые организованы в машинную фазу так, чтобы по команде осуществлять движение руки. Структурная единица мышечного волокна называется *саркомер*, который состоит из *толстых миозиновых* филаментов, расположенных между *тонкими актиновыми* нитями. Длина каждого саркомера 2–3 мкм, а диаметр 1–2 мкм. Саркомеры соединяются последовательно и заполняют мышечные клетки.

Каждый толстый филамент состоит из нескольких сотен молекул миозина, а каждая молекула миозина имеет два моторных домена. В отличие от кинезина, у миозина только один из моторных доменов активен в данный момент времени. Моторные домены миозина присоединяются к соседним тонким актиновым филаментам и тянут их вдоль толстых миозиновых филаментов.

Толстые филаменты *биполярны* – миозиновые моторные домены могут присоединяться сразу к двум актиновым филаментам по обе стороны миозинового филамента. В результате все актиновые филаменты синхронно протягиваются вдоль миозиновых филаментов к центру саркомера.

Структурно саркомер объединяет множество *белков*, которые:

- связывают между собой *середины миозиновых филаментов*, образуя плотную поперечную "М-линию", которая видна на электронных микрофотографиях;
- связывают *концы актиновых филаментов*, образуя поперечные "Z-диски" на концах саркомера;
- *центрируют* всю конструкцию, соединяя концы толстых миозиновых филаментов с Z-дисками с помощью эластичных белков *титинов*.

Геометрия саркомера позволяет ему сжиматься на 60% длины от 3,65 мкм в релаксированном состоянии до 2,25 мкм в напряжённом состоянии. При этом практически линейно на всем пути сокращения создается тянущая сила. Каждый саркомер создает силу ~0,8 пН, поэтому для простого удержания волейбольного мяча в руках необходима согласованная работа *двух триллионов* (2×10^{12}) миозиновых моторов.

Управление процессом сокращения осуществляется с помощью белков *тропомиозинов*, которые располагаются на поверхности актиновых нитей и мешают связыванию миозиновых головок с актином. При повышении концентрации Ca^{2+} в цитозоле тропомиозины изменяют конформацию и открывают те сайты, с которыми могут связываться моторные домены миозинов. Процесс экспонирования сайтов связывания поначалу идет медленно, но в результате связывания первых миозинов с актинами тропомиозин сдвигается, открывая все большее число сайтов связывания, до тех пор, пока не активизируются все сайты актинового филамента.

При образовании мышечной ткани саркомеры *выстраиваются* друг за другом, образуя машинную фазу из наномашин протяженностью

несколько сантиметров, и их согласованная работа укорачивает мышцу на сантиметры. В скелетных мышцах происходит *слияние* многих клеток, в результате чего формируются длинные мультиядерные мышечные *волокна*. Эти волокна заполнены саркомерами, окружёнными клеточными системами для синтеза АТФ и регуляции уровня кальция в цитозоле.

Нервные клетки. В природных системах биологические "компьютеры" работают на клеточном уровне, а не на молекулярном наноуровне. В определённом организме генетическая информация записана в хроматине, все операции с нею жёстко определены, а изменения в геноме происходят только на эволюционно значимых промежутках времени. В принципе, возможно создать искусственные биокомпьютеры на бионаномашинах и первые успехи на этом пути уже достигнуты, но природа использует микрокомпьютеры на базе нейронов.

Нейроны являются программируемыми электрическими "деталями", с помощью которых возможно осуществлять все известные компьютерные операции.

Хорошо изученный кольчатый червь *Caenorhabditis elegans* содержит всего 308 нейронов, в то время как в человеческом организме более 10^{11} нейронов. Каждый нейрон имеет "вход" сигнала, тело нейрона с присоединёнными дендритами и "выход" – аксон с терминальными высокоскоростными электрическими контактами.

Отдельные участки "выхода" сообщаются с отдельными участками "входов" других нейронов через синапсы, посылая сигналы возбуждения либо сигналы торможения. Суммирование сигналов, получаемых от всех "входных" участков нейрона, определяет, будет ли сформирован нервный импульс, посылаемый нейроном в собственный аксон.

Программирование достигается тем, что те синапсы, которые чаще используются для передачи сигналов, со временем вырабатывают способность генерировать более интенсивные импульсы, чем импульсы у тех синапсов, которые используются реже.

Обычные нейроны человека могут иметь до тысячи "выходных" и до ста тысяч "входных" контактов с другими нейронами обеспечивая беспримерный уровень сложности вычислительной системы.

Сегодня исследователи, используя накопленный опыт по росту нейронов в искусственных конфигурациях, стараются сформировать искусственные нервные сети.

Даниелла Бассет (*Danielle S. Bassett*) из Университета Санта-Барбары (Калифорния) с соавторами обнаружили удивительное сходство между человеческим мозгом, нервной системой червей и компьютерной микросхемой. В статье "Efficient Physical Embedding of Topologically Complex Information Processing Networks in Brains and Computer Circuits" опубликованной в журнале PLoS Computational Biology в 2010 году [29] они пишут, что мозг часто сравнивают с компьютером, но, кроме того факта, что оба они обрабатывают информацию с помощью сложной системы соединений в физическом пространстве, остается неясным можно ли считать такое сравнение чем-то большим чем метафорой.

Используя данные, которые были доступны в свободном доступе: магнитно-резонансная томография мозга человека, карта нервной системы нематодов и стандартный компьютерный чип, было исследовано каким образом разрозненные элементы взаимодействовали друг с другом в каждой из систем. Оказалось, что все три системы объединяли между собой два основных свойства. *Во-первых*, мозг человека, нервная система нематод и компьютерные чипы по своей архитектуре напоминали *матрёшку* – структура повторялась снова и снова в другом масштабе. *Во-вторых*, все три подпадают под так называемое *масштабирование Рента* – правило, которое описывает отношение между количеством элементов на данном участке пространства и числом связей между ними.

Фактически, каждая система имеет систему соединений, которая жёстко зафиксирована в физическом пространстве, подобно тому, как железнодорожные пути жёстко зафиксированы на земле, образуя транспортные пути в жёстко зафиксированном положении. Например, компьютерный чип в начале разработки представляет собой абстрактную модель подключений, которая способна выполнять определённые функции. На второй стадии, разрабатывают карту подключений на двухмерной поверхности чипа. Составление карты – это ключевая

операция, поскольку от неё зависит конечная длина проводов, на которые приходится львиная доля цены микросхемы.

Совершенно аналогично мозг человека обладает точно выверенными соединениями, которые позволяют организму функционировать, длина которых ограничивается только целесообразностью выполняемой ими работы по отношению к затрачиваемой энергии, которая тратится на создание и поддержание длинных "проводов" или "нейронов". Поскольку ограничения мозга и микросхем схожи, можно сказать, что и эволюция и технологический прогресс разработали идентичные оптимальные решения создания системы соединений.

Таким образом, прогресс человечества и естественный отбор независимо друг от друга нашли идентичный компромисс между ценой и сложностью разработки сетей обработки информации двух типов: мозга и компьютерных микросхем. Поразительная схожесть принципов строения мозга и компьютера могут быть объяснены тем, что они представляют собой самый эффективный способ организации сложной сети в ограниченном физическом пространстве – будь то трёхмерный человеческий мозг или двухмерная микросхема компьютера.

Исследования наноуровня функционирования нервных клеток позволяют использовать многие из эволюционных разработок в области нейронной передачи сигналов для применения в бионанотехнологии.

Например:

- механизмы распространения сигналов с использованием малых молекул-месенджеров и электрохимического градиента;
- эффективные липидные изоляторы;
- эффективные амплитудно-цифровые преобразователи;
- метод частотной модуляции, при котором информация об амплитуде внешнего воздействия превращается в частоту следования стандартных импульсов потенциала действия.

Молекулярные нейронные наномашины настолько устойчивы к внешним воздействиям, что возможно, например, отделить аксон кальмара, удалить из него цитоплазму, заполнить его солевым раствором

и использовать для передачи искусственных нервных импульсов. Такие нейронные наномашины вполне могут быть использованы целиком в бионанотехнологии.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие процессы индуцируют сенсоры биосистем?
2. Какие существуют способы преобразования сигнала биосенсорами?
3. В чём сходство и различие функционирования рецепторов солёного и кислого вкусов?
4. Какие особенности строения ретиналя делают его хорошим хромофором?
5. Как функционирует светочувствительный белок родопсин глаза человека?
6. Почему считается, что рецепторами механосенсорики являются ионные каналы?
7. Какие особенности функционирования белка, являющегося основной моделью механочувствительного канала?
8. Как функционирует механочувствительный бактериальный MscL-канал?
9. Почему бактерия не может регистрировать градиент концентрации питательных веществ?
10. Как вращение жгутика позволяет бактерии выбрать направление движения в сторону роста концентрации питательных веществ?
11. Почему нанотехнология макроскопических объектов невозможна без использования саморепликации?
12. Какие пять функциональных подсистем должны иметь самореплицирующиеся системы?
13. Какие принципы построения клеток обусловлены необходимостью обеспечения эволюционного отбора?
14. Что такое машинная фаза вещества? Приведите примеры.
15. Какие свойства машинной фазы вещества демонстрируют саркомеры мышц?
16. Какие свойства машинной фазы вещества демонстрируют нейроны?

Раздел 4
Использование бионанотехнологии

Глава 14
Нанотехнологии

14.1. Белковая инженерия

Эволюция отобрала для инженеров большой набор разнообразных методов дизайна функциональных бионаноструктур. Используя новейшие результаты молекулярной биологии, разработчики бионаномашин переходят от этапа исследования природных прототипов к этапу создания оригинальных бионаноустройств, основанных на структурных и функциональных принципах, рассмотренных в предыдущих разделах.

Модификация природных белков. Проектируя бионаномашины, инженеры стремятся, так же как и в традиционном макромашиностроении, максимально использовать стандартные "узлы" и "детали".

На первый взгляд, это невозможно, и бесконечное разнообразие природных белков практически лишает надежды подобрать такой набор мотивов и блоков, который можно было бы использовать для конструирования нужного белка.

И всё же множество попыток "упростить" конструкцию природных бионаномашин оказались успешными.

Ещё в 1971 году Берн Гутт (*Bernd Gutte*) и Роберт Меррифилд (*Robert Bruce Merrifield*) химически синтезировали фермент рибонуклеазу впервые экспериментально доказав, что белки представляют собой простые химические молекулы, которые возможно искусственно конструировать [41]. На рисунке 215(а) представлена схема синтезированной ими рибонуклеазы, состоящей из 124 аминокислот, с протекторными группами у химически нестойких аминокислот.

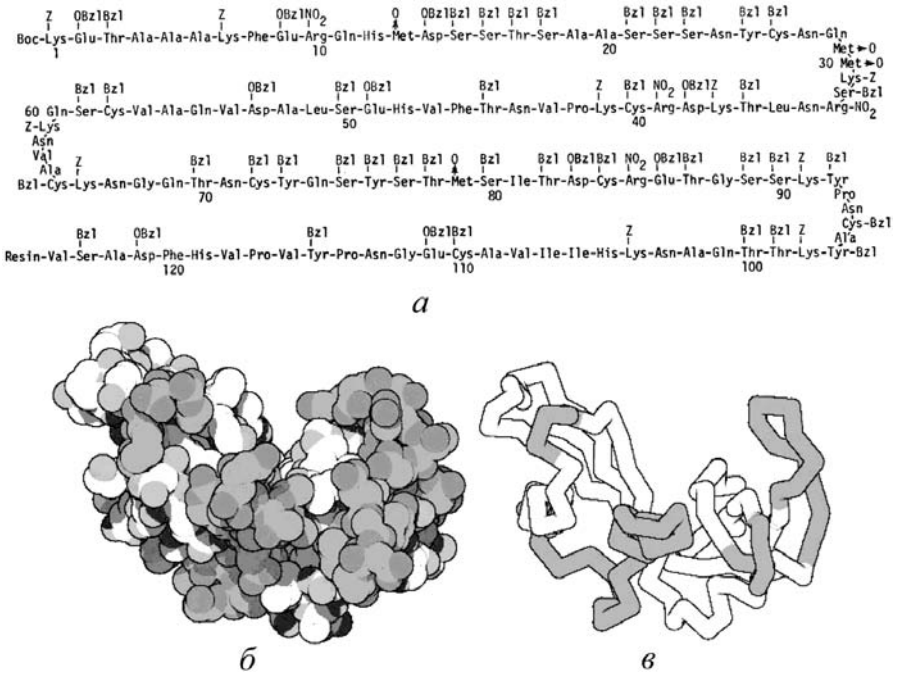


Рисунок 215 – Рибонуклеаза: *а* – схема первичной структуры с протекторными группами; *б* – функциональная глобула; *в* – трассировка полипептидной цепи

Анализируя активный центр рибонуклеазы они определили те боковые петли, которые не влияют на структуру активного центра (показаны тёмно-серым цветом на рисунке 215(б) и (в)). Поочерёдно удаляя эти петли, исследователи показали, что фермент сохраняет

способность фолдинга в функциональную глобулу даже если в его составе остаётся всего 63 аминокислоты.

Ещё одно направление оптимизации аминокислотной структуры белка рассмотрим на примере Src-киназы [31] (рисунок 216).

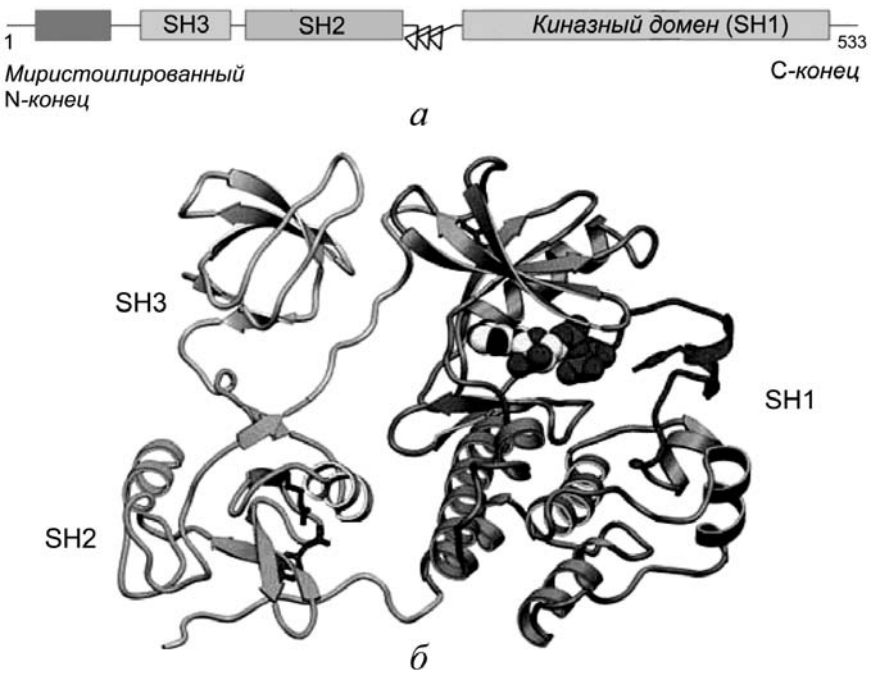


Рисунок 216 – Src-киназа: *а* – модульная структура; *б* – схема укладки глобулы

Src-киназы имеют типичную модульную структуру сигнальных белков. За миристоилированным N-терминальным сегментом следуют домены SH3, SH2, домен тирозинкиназы SH1, и короткая С-терминальная оконцовка. Оптимизировать конструирование белков можно не только сокращая длину полипептидной цепи, но и сужая спектр используемых при синтезе аминокислот. Природные белки синтезируются из 20 протеиногенных аминокислот (см. рисунок 4). Для искусственных белков было бы намного технологичнее использовать минимальный набор из 5-6 аминокислот для синтеза полипептидной цепи, использую остальные

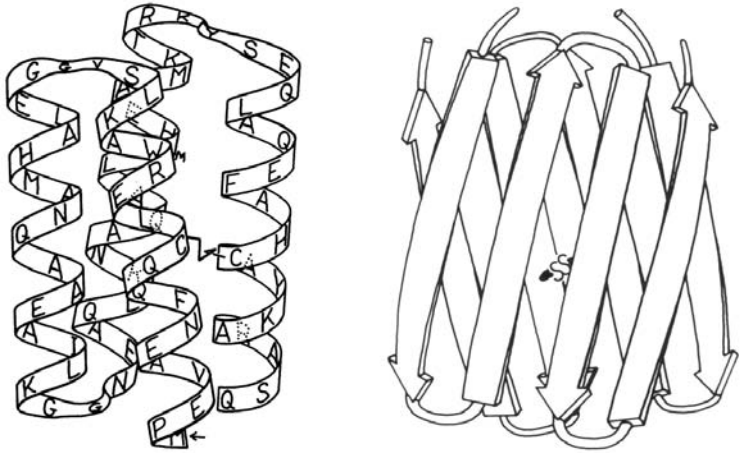
аминокислоты только в исключительно незаменимых специальных случаях. Исследования показали, что, действительно, для успешного фолдинга вторичных, супервторичных, а в некоторых случаях и третичных структур белков достаточно использовать "усечённый белковый алфавит" (*reduced amino acid alphabet*). Например, 57-аминокислотный домен SH3 белка Src-киназа (рисунок 216) может быть (без потери функциональности) укорочен до 45 аминокислот, причём 40 из них принадлежат к "усечённому" набору из пяти аминокислот: изолейцин, лизин, глутаминовая кислота, аланин и глицин.

Искусственные белки. Очевидно, что не для всех задач бионанотехнологии существуют природные белки-прототипы. Поэтому одной из основных целей бионанотехнологии является разработка методик проектирования совершенно новых (*de novo*) полипептидных цепей, способных к фолдингу и выполнению необходимых нанотехнологических операций. При этом имеется ввиду действительно конструирование белковой цепи "с нуля", из набора аминокислот (*from scratch*), а не внесение незначительных правок в уже существующие белки методом гомологического моделирования.

Начиная с 80-х годов XX века по мере накопления опыта такие попытки конструирования белков *de novo* становились всё более успешными. *De novo* дизайн белка *from scratch* начинают с проектирования той укладки полипептидной цепи, которая бы обеспечила функциональность проектируемого белка. Подбирают тот набор мотивов и блоков белковой укладки, который оптимален для данной задачи. Затем под эту укладку подбирают ту последовательность аминокислот, которая обеспечит фолдинг цепи. Для успешного проектирования критически важным является использование принципа негативного дизайна (см. п. 5.3). Аминокислотная цепь должна быть спроектирована так, чтобы энергетически выгодной была только одна, целевая конформация.

Одним из первых успешных попыток разработки искусственного белка был белок "*Felix*", состоящий из 79 аминокислот, формирующих "сноп" (*bundle*) из четырёх α-спиралей [63] (рисунок 217(а)). При этом были использованы 19 из 20 протеиногенных аминокислот. Однако

оказалось, что Феликс имел неудовлетворительную стабильность и ЯМР-анализ показал значительную степень разупорядоченности в его укладке.



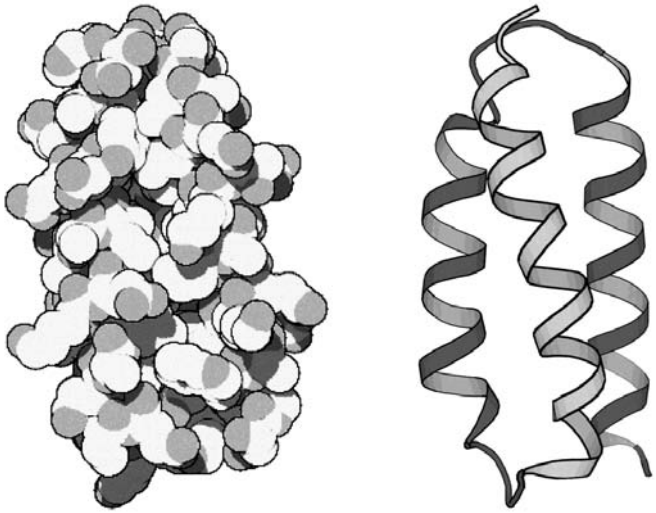
а *б*

Рисунок 217 – *De novo* дизайн белков *from scratch*: *а* – Felix; *б* – betabellin

Ещё один пример *de novo* дизайна белков *from scratch* – белок *бетабелин* (*betabellin*), в структуре которого моделировались те белковые модули, которые содержали β×β-сэндвич-структуру. Потребовалось спроектировать более десятка вариантов бетабелинов, пока не был получен стабильный водорастворимый белок.

Группа исследователей Университета Пенсильвании разработали и синтезировали успешную конструкцию белка, состоящего из уложенных в сноп трёх α-спиралей [37] (рисунок 218). Сначала они проанализировали природные белки, имеющие трёхспиральные укладки полипептидной цепи. Затем они синтезировали белковую цепь, состоящую из трёх α-спиралей, соединённых бесструктурными петлями. На C- и N- концах полипептидной цепи они расположили кэпирующие аминокислоты для стабилизации конструкции. Кроме того пришлось существенно реконструировать "ядро" белка, размещая на соседних α-спиралях как топологически комплементарные гидрофобные аминокислоты, так и

электростатически притягивающиеся пары заряженных аминокислот. В результате такого "итерационного" конструирования был создан белок "αЗD", состоящий из 73 аминокислот, который, как показал ЯМР-анализ, был достаточно стабилен.



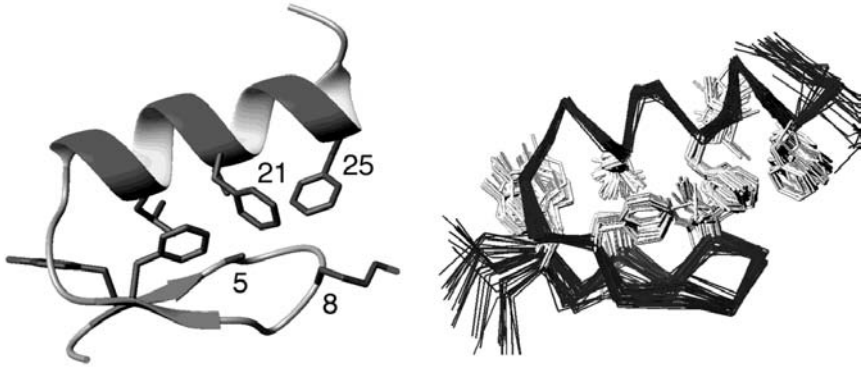
а *б*

Рисунок 218 – Белок αЗD: *а* – объёмная модель; *б* – схема укладки α-спиралей

Бассил Дахият (*Bassil I. Dahiyat*) и Стефен Майо (*Stephen L. Mayo*) разработали автоматизированную систему компьютерного дизайна стабильных белков [36]. Они начали с модели укладки белковой цепи, аналогичной той, которая реализована в цинковом пальце ДНК-связывающего белка Zif268 и состоящей из короткой β-структуры и α-спирали (ββα-мотив). Компьютерный алгоритм "перебрал" $1{,}9\times10^{27}$ вариантов аминокислотной последовательности и выбрал наиболее устойчивую конструкцию, которую назвали белком FSD-1 (*full sequence design*) (рисунок 219(а)).

Множественное выравнивание с использованием алгоритма BLAST показало, что последовательность FSD-1 существенно отличается от всех

известных последовательностей белков. ЯМР-анализ показал, что пространственная структура белка FSD-1 превосходно соответствует выбранному в качестве прототипа ββα-мотиву (рисунок 219(б)).



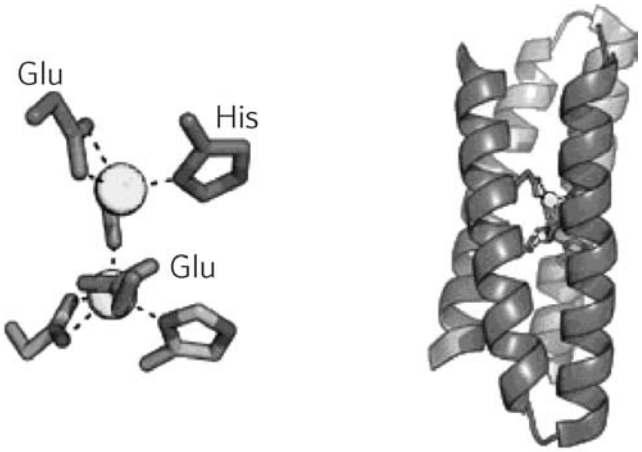
а *б*

Рисунок 219 – Белок FSD-1: *а* – схема укладки; *б* – наложение 41 структуры по результатам ЯМР-анализа

Разумеется, искусственные белки разрабатываются не только для исследования возможностей фолдинга, но и для выполнения нано-технологических операций. В том же Университете Пенсильвании на основе опыта разработки белков, подобных αЗD, был создан металл-содержащий фермент. На первом этапе в трёхспиральной структуре были размещены аминокислоты глутаминовой кислоты и гистидина, способные хелатировать два иона железа. Такой белок был назван Duo Ferro 1 (DF1) [50] (рисунок 220).

Однако оказалось, что такой металл-удерживающий центр расположен внутри белковой глобулы и ион металла может туда попасть только в процессе фолдинга. На втором этапе конструирования были заменены два лейцина, боковые радикалы которых блокировали доступ к металл-связывающему центру, на два аланина. Полученный белок был назван Duo Ferro 2 (DF2). Таким способом удалось обеспечить доступ к ионам металлов субстратов и сформировать активный центр фермента.

Для субстрата 4-аминофенол искусственный белок DF2 в тысячи раз ускорял реакцию окисления бензохинона в моноимин.



а *б*

Рисунок 220 – Белок DF1: *а* – схема металлсвязывающего центра; *б* – схема упаковки полипептидной цепи белка DF1

14.2. НЕСТАНДАРТНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

Биосинтез белков ограничен набором из двадцати стандартных аминокислот, незначительная доля которых может быть посттрансляционно модифицирована. И хотя этого оказывается достаточно для реализации всех структур и функций, которые востребованы эволюцией, для нанотехнологических применений желательно иметь бóльшее химическое разнообразие.

Для размещения нестандартных аминокислот в белковой цепи было разработано несколько методов. Проще всего внедрить такую аминокислоту в полипептидную цепь при полном химическом синтезе белковой цепи. Однако химический синтез белков является слишком дорогой процедурой, чтобы можно было его всерьёз рассматривать в качестве кандидата на промышленное внедрение.

Другой подход состоит в комбинации химического и биологического синтезов – короткие пептиды, содержащие нестандартные аминокислоты, синтезируют химически, а основную массу белковой глобулы – биологически, а затем ковалентно связывают эти фрагменты.

Биологический синтез белков безусловно дешевле химического. Но для включения нестандартной аминокислоты необходимо "обмануть" трансляционный аппарат рибосомы. Один из вариантов заключается в конструировании *дополнительной* транспортной РНК для доставки *нестандартной аминокислоты* к рибосоме и *использование одного из стоп-кодонов* для определения местоположения нестандартной аминокислоты в белковой цепи. Клетки используют три разных стоп-кодона: UAG, UAA и UGA. Один из них и используют для кодирования нестандартной аминокислоты. Соответственно, транспортная РНК для этой аминокислоты должна содержать необходимый антикодон. Затем синтезируют мРНК, в которой во всех позициях, где должна быть расположена нестандартная аминокислота, помещают этот выбранный стоп-кодон. Синтез белков проводят в бесклеточной системе, в которую добавляют необходимую нестандартную аминокислоту. Рибосома вставляет эту аминокислоту всякий раз, когда встречает данный стоп-кодон в мРНК.

При этом остаётся одна проблема – бесклеточные системы белкового синтеза представляют собой, как правило, экстракт цитозоля клетки, содержащий среди всех необходимых компонентов для проведения белкового синтеза также и *факторы терминации трансляции*, которые связываются с трансляционным комплексом как раз при попадании в него стоп-кодона. Эти факторы терминации трансляции будут конкурировать с новой тРНК, несущей нестандартную аминокислоту. В результате связывания рибосомы с факторами терминации трансляции в тех местах мРНК, где должны быть вставлены нестандартные аминокислоты, рибосома прекратит трансляцию и в системе окажется множество укороченных нефункциональных белковых цепей.

Один из способов решения этой проблемы состоит в выборе в качестве источника компонентов для бесклеточного синтеза такого

штамма бактерии, в котором синтезируется несколько факторов терминации трансляции для разных стоп-кодонов. Теперь если удалить из системы тот фактор терминации трансляции, который соответствует выбранному нами стоп-кодону (для включения в аминокислотную цепь нестандартной аминокислоты), то биосинтез такого белка может быть осуществлён с помощью оставшихся факторов терминации трансляции, а в белковую цепь будут вставлена нестандартная аминокислота во всех заданных позициях.

Несмотря на то, что такой метод включения нестандартных аминокислот в полипептидную цепь белков является крайне мало эффективным, требует синтеза специфических молекул мРНК и в результате выход целевых белков совершенно недостаточен для промышленного внедрения, но для лабораторных исследований этот метод вполне пригоден. В результате многочисленных исследований был установлен спектр нестандартных аминокислот, которые возможно вставить в белковую нить таким методом. Оказалось, что рибосома позволяет использовать даже аминокислоты с размерами боковых радикалов намного превышающих стандартные. Но основным лимитирующим параметром при таком нестандартном биосинтезе является *структура самого полипептидного остова* – рибосома способна формировать только такие остовы, в которых между пептидными группами расположен *только один атом углерода*.

Такой метод позволяет модифицировать белки, внося изменения в их структуру на атомном уровне. Так, например, за счёт такого рода изменений удалось модифицировать структуру аминокислотного окружения активного центра белка люцифераза (*luciferase*, окислительный фермент светлячков ЕС 1.13.12.7, катализирующий реакцию, сопровождающуюся испусканием света – биолюминесценцией), что привело к изменению цвета свечения.

Петер Шульц (*Peter G. Schultz*) из Scripps Research Institute (США) с коллегами использовали аналогичную методику для внедрения в белковую цепь нестандартных аминокислот [74] (рисунок 221). Они разработали набор тРНК и соответствующих аминоацил-тРНК-синтетаз для

нестандартных аминокислот и обнаружили, что рибосома безошибочно распознаёт такие нестандартные тРНК. Более того, они разработали тРНК с антикодонами, содержащими четыре и даже пять нуклеотидов. Это позволяет существенно расширить генетический код. Действительно, если количество размещений (с повторами) из 4 нуклеотидов по 3 равно $4^3 = 64$, то, соответственно, $4^4 = 256$ и $4^5 = 1024$.

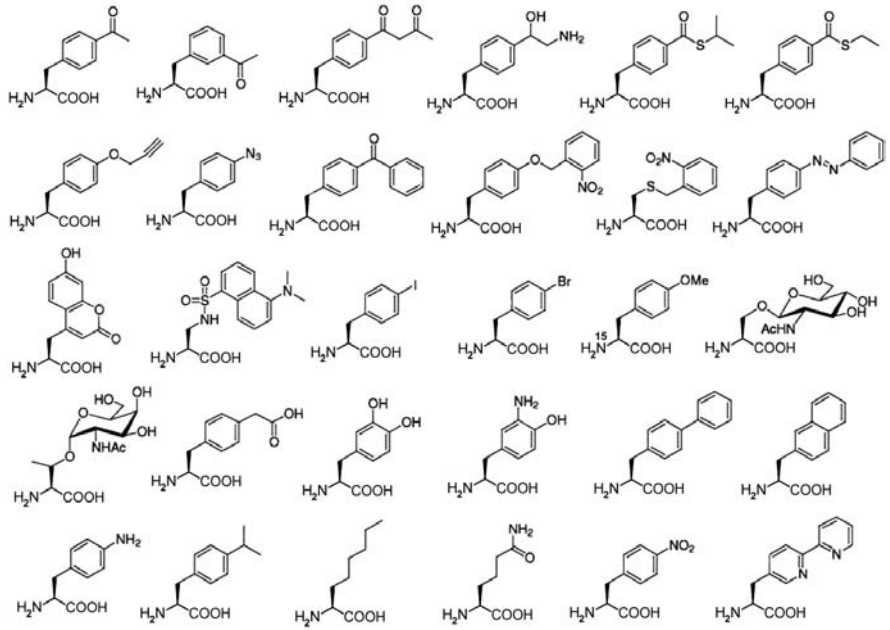


Рисунок 221 – Нестандартные аминокислоты

При таком *расширении генетического кода* нет необходимости использовать один из стоп-кодонов – становится возможным переопределить заново весь генетический код. При исследовании возможности расширения генетического кода оказалось, что возможным является и расширение набора нуклеотидов в структуре ДНК. Так, например, азотистое основание 7-азаиндол в ДНК спаривается с таким же основанием, причём ДНК-полимераза корректно проводит реплицирование

молекулы ДНК с "добавленными" 7-азаиндольными парами. Таким образом, продемонстрирована принципиальная возможность переопределить как нуклеотидный алфавит нуклеиновых кислот, так и аминокислотный алфавит белков и, следовательно, создавать принципиально новые искусственные организмы, отличающиеся от любых природных организмов нашего мира.

14.3. Пептидные нуклеиновые кислоты

Короткие олигонуклеотиды широко используются в наномедицине. Введение таких олигонуклеотидов в клетку может приводить к их специфической гибридизации с целевыми мРНК, блокируя их трансляцию рибосомами. Этим методом можно, например, заблокировать ген, экспрессия которого вызывает заболевание. Короткие олигонуклеотиды используются также для диагностики заболеваний, поскольку с их помощью можно детектировать наличие в организме аномально функционирующих генов. Однако в клетках существуют эффективные системы защиты от чужеродных нуклеиновых кислот, которые клетки воспринимают как свидетельство заражения организма патогенными микроорганизмами или нарушения целостности клеток. Эффективным способом преодоления этого барьера стало использование *пептидных нуклеиновых кислот* (или пептидо-нуклеиновых кислот, ПНК, *Peptide nucleic acid*, PNA), известных также под названием "полиамидные миметики нуклеиновых кислот" (ПАНКМ)). ПНК были разработаны группой исследователей Нильсен, Эгхольм, Берг и Бучард (*P.E. Nielsen, M. Egholm, R.H. Berg, O. Buchardt*) из Института Панума Университета Копенгагена (Дания) [39].

Пептидно-нуклеиновые кислоты содержат стандартный набор азотистых оснований, соединённых пептидной (а не сахарофосфатной) связью (рисунок 222). ПНК более стабильны, чем ДНК, поскольку резкий скачок pH, который денатурирует ДНК, не действует на ПНК. Кроме того, ПНК не разрушаются нуклеазами, которые защищают клетку от ксенобиотиков. При этом однонитевые ПНК превосходно гибридизуются

с ДНК, формируя двойную спираль [51] (рисунок 222(а)), причём связь ПНК-ДНК прочнее, чем ДНК-ДНК, поскольку в этом случае отсутствует электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными сахарофосфатными остовами молекул ДНК.

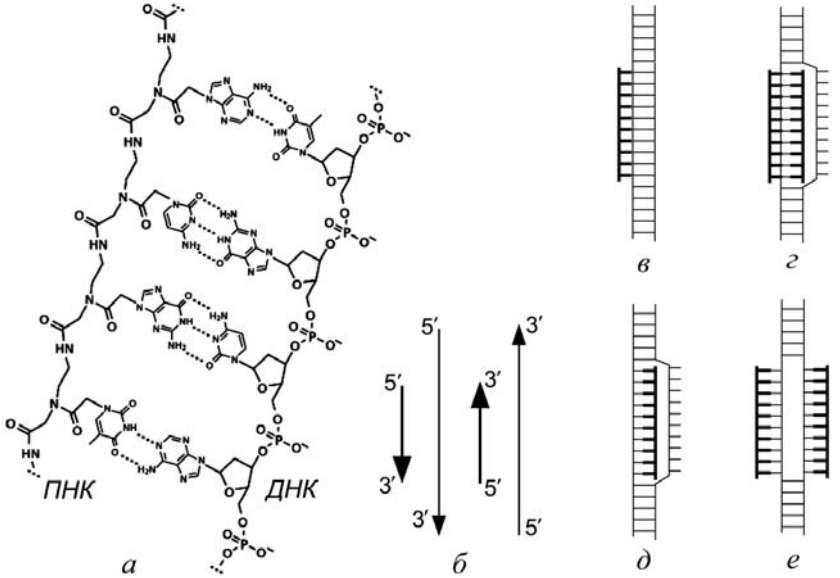


Рисунок 222 – ПНК-ДНК гибридизация: *а* – схема спаривания азотистых оснований; *б* – ориентация нитей; *в* – триплекс ПНК-ДНК; *г* – триплексная инвазия (внедрение); *д* – дуплексная инвазия; *е* – двойная дуплексная инвазия

Поскольку ПНК-цепь может связываться с ДНК-цепью как в параллельной (5′→3′; 5′→3′), так и в анипараллельной (5′→3′; 3′→5′) ориентации (рисунок 222(б)), то ПНК-ДНК гибриды могут образовывать множество необычных дуплексов и триплексов (рисунок 222(в-е)).

Хотя ПНК недостаточно эффективны в качестве заменителя ДНК для хранения генетической информации, но они чрезвычайно перспективны для наномедицины, поскольку короткие ПНК способны гибридизоваться с ДНК при её плавлении РНК-полимеразой в ходе транскрипции и тем самым заблокировать транскрипцию. А поскольку

ПНК гораздо более стабильны, чем олигонуклеотиды ДНК или РНК, то ПНК являются существенно лучшими ингибиторами транскрипции генов.

14.4. Нанотехнология белковых S-слоёв

В 1999 году Дайтмар Пум и Уве Слейтр (*Dietmar Pum* и *Uwe B. Sleytr*) из Венского Института молекулярной нанотехнологии Сельскохозяйственного университета показали, что белковые S-слои (см. п. 6.6) удобны для применения в нанолитографии.

In vitro (в растворе) очищенные строительные блоки S-слоёв спонтанно образуют высокоупорядоченные двухмерные кристаллы, что и было использовано для перекристаллизации субъединиц S-слоёв на различных нанотехнологических субстратах, таких как чипы из кремния или оксида кремния [60] (рисунок 223).

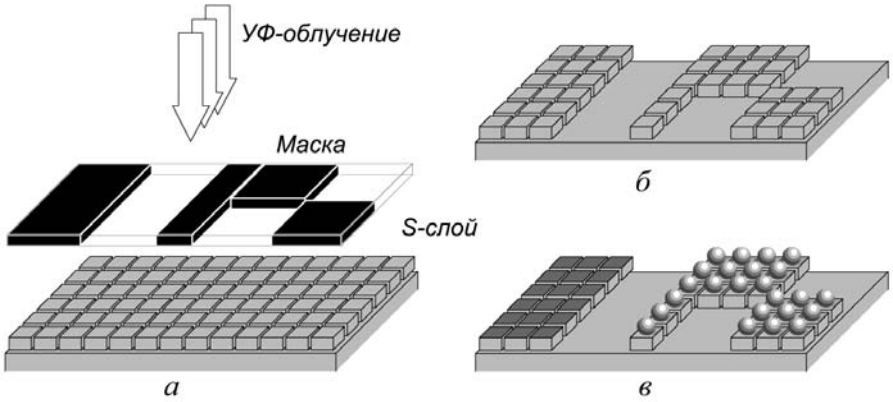


Рисунок 223 – Применение S-слоёв в нанолитографии: а – облучение ультрафиолетом (УФ); *б* – плёнка после облучения; *в* – функционализация оставшихся участков

Эти слои также могут формироваться на липидных мембранах и на поверхности раздела воздушной и водной сред. Такой тип самосборки и взаимодействия молекул позволяет применять кристаллические матрицы для нанесения рисунка в нанолитографии. Также было установлено, что с

помощью ультрафиолетового (УФ) облучения можно наносить рисунок на S-слои [59] (рисунок 224(а)).

На сформированный на поверхности кремниевого чипа S-слой накладывается фотомаска (рисунок 223), после чего он подвергается облучению.

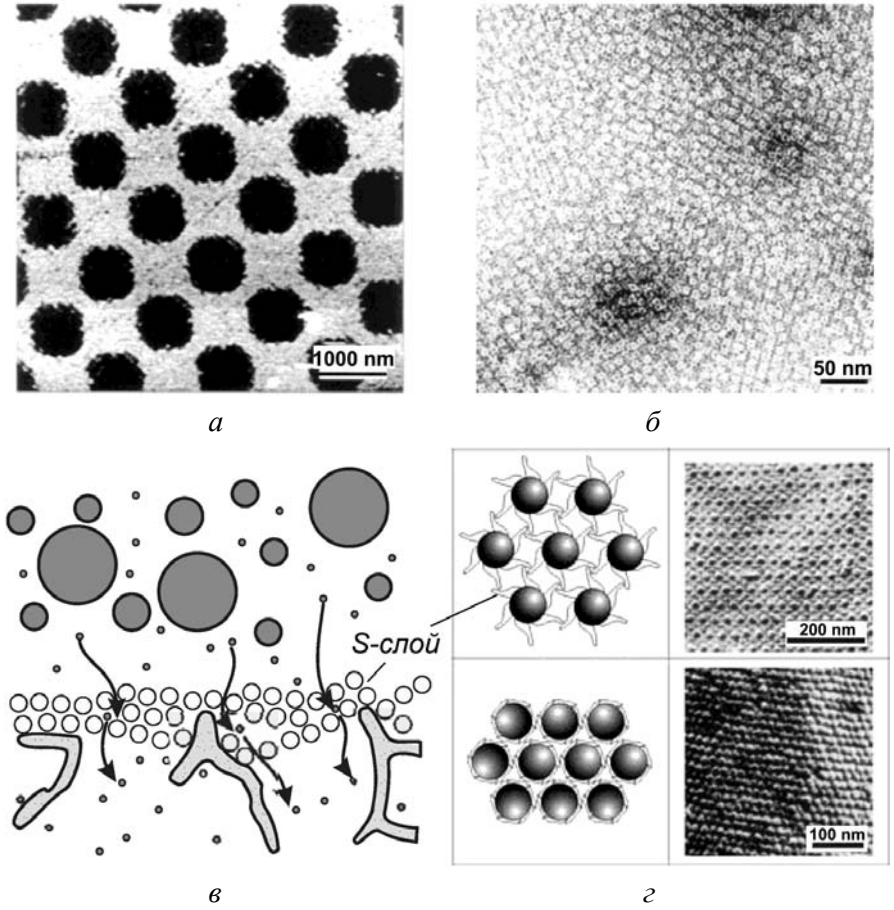


Рисунок 224 – Применение S-слоёв для: *а* – нанолитографии; *б* – формирования двумерной решётки белков ферритинов; *в* – ультрафильтрации; *г* – формирования различных нанорешёток

Литографию, основанную на применении таких слоёв вместе с биомолекулами и неорганическими соединениями, можно применять для производства так называемых лабораторий на чипе (*lab-on-a-chip*). S-слои также используются для иммобилизации и пространственного упорядочения биомакромолекул в слои с чётко определённой геометрией (рисунок 224(б)) и для создания ультрафильтрующих мембран, пропускающих соединения определённой молекулярной массы [65] (рисунок 224(в)). S-слои можно использовать и как матрицы для упорядочения и формирования наноструктур из полупроводниковых и металлических наночастиц (рисунок 224(г)), а также, функционализовав S-белки антителами, для создания биосенсорных матриц.

14.5. ДНК НАНОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОНИКИ

Производство нанопроводников с помощью ДНК. ДНК является удобным функциональным материалом для нанотехнологии (см. п. 3.1.2), а структуры, которые получают из ДНК, являются инертными. Как будет показано ниже (п. 15.1), особые свойства ДНК и ее способность к специфичному взаимодействию с различными белками находят прямое применение в нанотехнологии.

Авторами одной из первых и наиболее изящных демонстраций управляемой металлизации молекул ДНК являются исследователи *E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph* из Израильского Технического университета "Технион" [32] (рисунок 225). В этом исследовании частицы серебра осаждались на двухцепочечной молекуле ДНК и наращивались до образования металлического проводника равномерной толщины. Сначала была создана микроскопическая (0,5 мм × 0,5 мм) система золотых электродов (рисунок 225(а)) в которой были сформированы параллельные участки длиной 50 мкм. К этим участкам ковалентно присоединялись олигонуклеотидные линкеры (рисунок 225(б)). Затем эти электроды были соединены ДНК-сшивкой длиной 16 мкм с липкими концами длиной 12 азотистых оснований, каждый из которых был комплементарен одному из олигонуклеотидных линкеров на электродах (рисунок 225(в)).

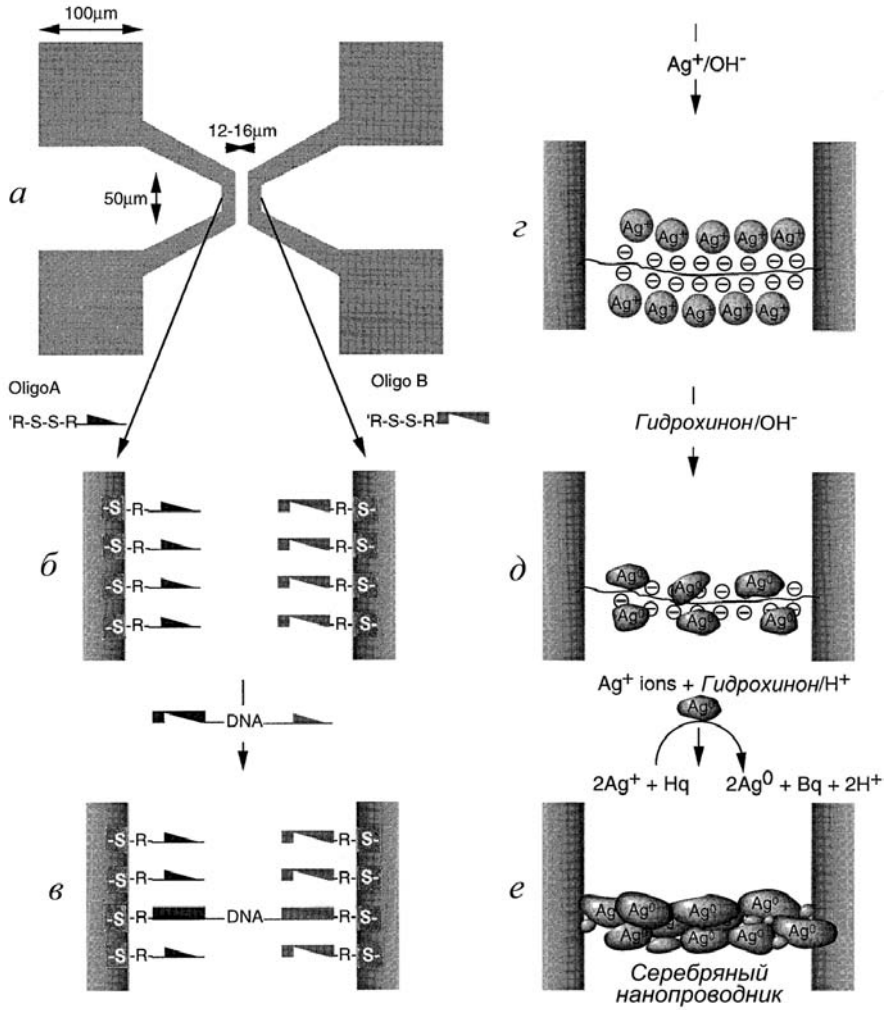


Рисунок 225 – Синтез нанопроводника методом металлизации ДНК

После этого на этот ДНК-мостик наносился слой катионов серебра (рисунок 225(г)), происходила агрегация атомов серебра в нанокластеры (рисунок 225(д)), в результате формировался нанопроводник (рисунок 225(е)). Так были получены проводники длиной до 100 нм, обладающие омической проводимостью.

Одно из важнейших преимуществ нанопроводников на основе ДНК состоит в возможности "записи" в молекулу ДНК информации, необходимой для её связывания с другими компонентами. Это позволяет создавать электрические цепи посредством самосборки.

Молекулярная литография. Затем эта же группа провела исследования молекулярной литографии на единственной молекуле ДНК. Для этого был использован белок RecA, специфически связывающийся с уникальными последовательностями в цепи ДНК [46] (рисунок 226).

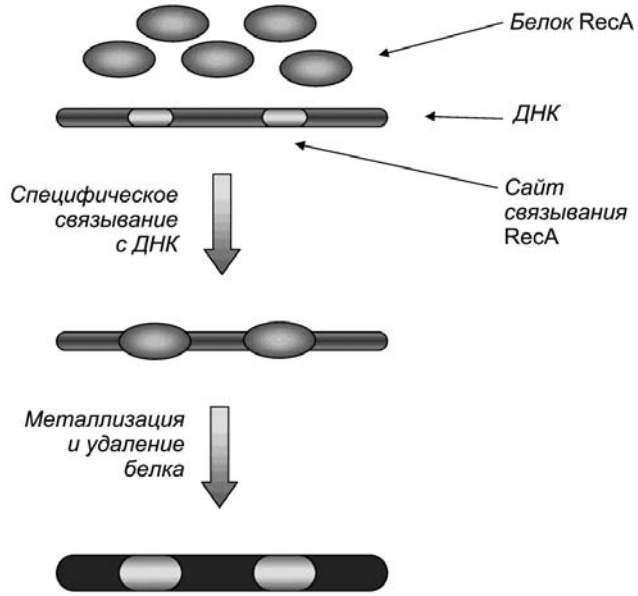


Рисунок 226 – Молекулярная литография на ДНК

Молекулы данного белка, связываясь с ДНК, закрывают определённые участки цепи от химической металлизации. Таким образом, этот метод обеспечивает осаждение металла на строго определённых участках ДНК, заданных её последовательностью. Авторы назвали метод *молекулярной литографией*. Если провести аналогию с традиционной литографией, то информация, закодированная в молекуле ДНК, играет

роль маски, а связывающийся с ДНК белок является эквивалентом защитного слоя.

Сами молекулы ДНК, а также те молекулярные конструкции, которые создают, используя ДНК (см. п. 15.1), также можно использовать в качестве литографической маски. Группа исследователей из Университета Питтсбурга (США) показала возможность такого применения ДНК-структур [69] (рисунок 227).

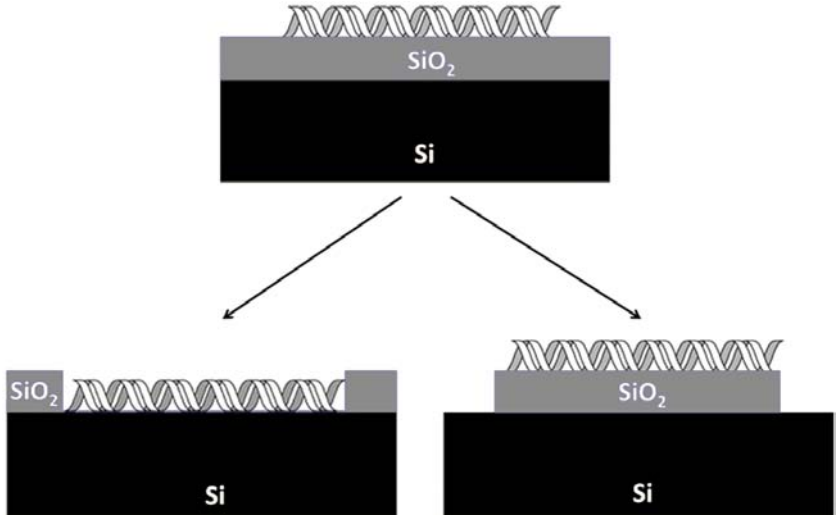


Рисунок 227 – Молекулярная литография с помощью ДНК: *а* – негатив (высокая влажность); *б* – позитив (низкая влажность)

Процесс травления SiO_2 с помощью HF происходит с участием молекул воды, адсорбированной на поверхности плёнки в два этапа

$$6HF + 3H_2O \rightarrow 3HF_2^- + 3H_3O^+,$$
$$3HF_2^- + 3H_3O^+ + SiO_2 \rightarrow 2HF + SiF_4 + 5H_2O.$$

При высокой влажности количество молекул воды, связанных с ДНК, больше, чем адсорбированных на поверхности плёнки SiO_2.

Поэтому травление плёнки SiO_2 осуществляется преимущественно под ДНК-маской и формируется негативное изображение маски (рисунок 227(а)). При высокой влажности ситуация обратная, вытравливаются участки не закрытые маской и формируется позитивное изображение (рисунок 227(б)).

14.6. Фибриллярная металлизация

Амилоидные фибриллы. Помимо ДНК существуют и другие материалы, весьма удобные для наноконструирования. Примерами могут служить белковые и полипептидные фибриллы.

Амилоидные фибриллы являются интересными структурами, обладающими при малом (7–10 нм) диаметре выдающейся механической прочностью и химической устойчивостью. Они легко образуются из очень простых строительных блоков – коротких пептидов из пяти-шести аминокислот.

Возможность использования амилоидных фибрилл в качестве матриц для производства наноматериалов была показана на примере прионных белков дрожжей [66] (рисунок 228).

Эти белки подвергаются самосборке *in vitro,* их легко синтезировать в больших количествах. Методами генной инженерии в прионный белок ввели дополнительный остаток цистеина, отсутствующий в исходной молекуле. Тиоловая группа цистеина является точкой начала осаждения металла на фибриллы. Сначала с тиоловыми группами связывается коллоидное золото (маркировка золотом, *gold-labeling*), затем эти наночастицы золота используются в качестве центров конденсации ионов серебра из раствора (*silver enhancement*), а потом, на полученные островки серебра осаждается золото (*gold enhancement*), замыкая проводящую оболочку вокруг фибриллы (рисунок 228(а)).

В результате фибрилла полностью покрывается металлом, что зарегистрировано атомной силовой микроскопией – AFM-изображение на рисунке 228(б) и просвечивающей электронной микроскопией – TEM-изображение на рисунке 228(в). На рисунке 228(г) показано влияние

режима роста плёнок серебра и золота на диаметр фибриллы – слева после 3 минут осаждения серебра и 5 минут осаждения золота получены фибриллы диаметром 50 нм; справа после 5 минут осаждения серебра, а затем 5 минут осаждения золота получены фибриллы диаметром 100 нм.

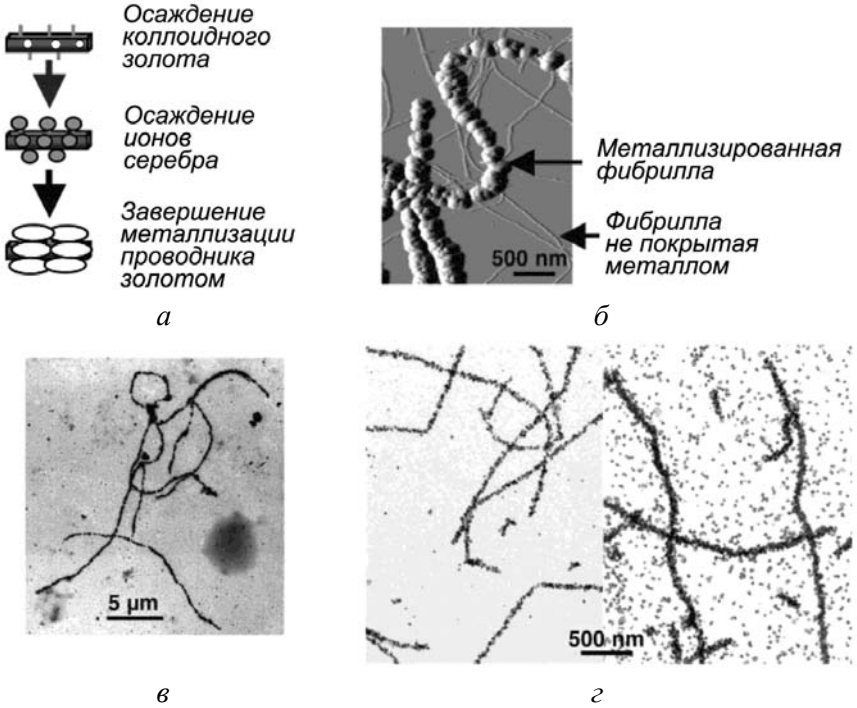


Рисунок 228 – Металлизация прионовых нанофибрилл: *а* – этапы металлизации; *б* – АСМ-изображение; *в* – ТЕМ-изображение; *г* – влияние режимов металлизации на диаметр нанопроводников

Подобно металлическим нанопроводникам на основе ДНК проводники на основе фибрилл обладают отличной проводимостью.

Использование амилоидных фибрилл в качестве матриц для производства металлических проводников удобно и тем, что даже очень короткие пептиды образуют длинные проводники, похожие на те, что получают из крупных белковых молекул и полипептидов.

Более того, типичные амилоидные фибриллы удалось получить даже из фенилаланиновых дипептидов и модифицированных дипептидов – фенилглицинов (рисунок 229) – так называемые ADPN [62] (*aromatic dipeptide nanotubes*, нанотрубки из дипептидов, содержащих ароматические аминокислоты).

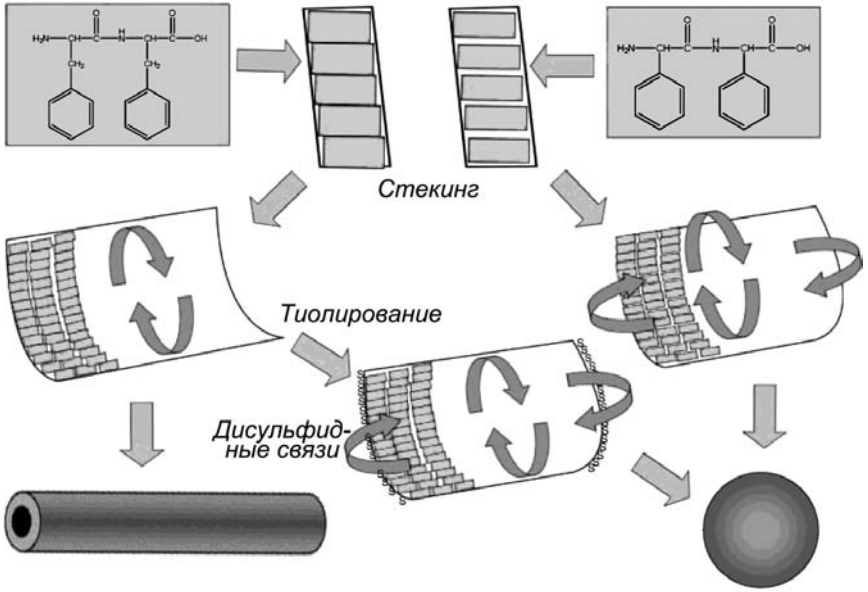


Рисунок 229 – Самосборка нанотрубок и наносфер из дипептидов фенилаланина и фенилглицина

Стекинговые взаимодействия формируют стопки дипептидов, которые затем самособираются в плоские листы. Наращивание такого листа вдоль одного направления может привести к формированию нанотрубки. Если же лист наращивать в двух направлениях, то он может свернуться в наносферу. Образование наносфер стимулируется также присоединением тиоловых групп по периметру листа, что приводит к формированию дисульфидных связей. Формирование наноструктур из дипептидов делает возможным массовое производство амилоидных матриц для металлизации, что может оказаться экономически рентабельным.

Металлизация химически модифицированных актиновых филаментов. Актиновые филаменты диаметром около 7 нм образуются путем самосборки и обладают высокоупорядоченной структурой (см. п. 11.1). Кристаллическая структура мономеров актина известна, что позволяет конструировать их модифицированные варианты, обладающие нужными функциями. Эти фибриллы также весьма интересны как платформа для конструирования наноматериалов. Одним из преимуществ актиновых филаментов является возможность их управляемой полимеризации и деполимеризации в присутствии АТФ.

Fernando Patolsky, *Yossi Weizmann* и *Itamar Willner* продемонстрировали реполимеризацию покрытых золотом актиновых филаментов, из которых после каталитического наращивания наночастиц были получены металлические нанопроводники [54] (рисунок 230).

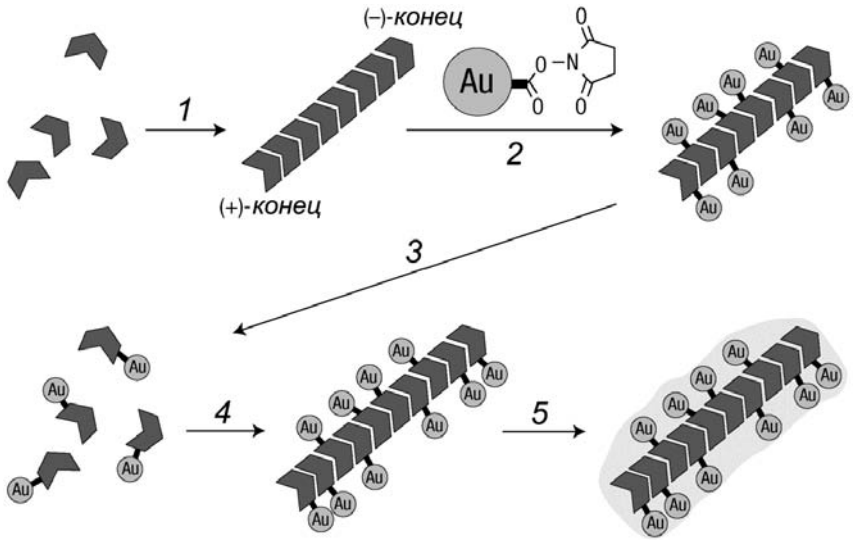


Рисунок 230 – Металлизация актиновых фибрилл

Актиновые нити, полученные в результате полимеризации (рисунок 230(1)), функционализировали 1,4-нм-наночастицами золота, содержащими N-гидроксисукцинимид-эфир (рисунок 230(2)) и диссоциировали

на мономеры (рисунок 230(3). Затем из таких функционализированных золотыми наночастицами мономеров актина собирали филаменты необходимой длины (рисунок 230(4)), которые затем помещались в специальный HEPES-буфер (содержащий 0,15 мМ $HAuCl_4$ и 0,15 мМ гидроксиламина) для каталитического наращивания слоя золота и получения сплошного нанопроводника (рисунок 230(5)). Те же авторы показали, что в присутствии АТФ проводники на базе актина способны перемещаться по поверхности миозина.

Таким образом, актиновые компоненты сочетают возможность металлизации с особыми механическими свойствами, что позволяет создавать из них настоящие биомолекулярные наноэлектромеханические устройства – так называемые системы BioMEMS (*biological microelectro-mechanical systems*).

Применение пептидных нанотрубок для создания нанопроводников. Следующая группа наноматериалов, спроектированных по образцу биомолекул и применявшихся для создания металлических проводников, – это упоминавшиеся выше ADPN-нанотрубки, которые представляют собой полые цилиндры, внутренний диаметр которых исчисляется десятками нанометров. В результате селективного входа ионов металлов в просвет нанотрубки образуются нанокабели с проводящим "сердечником", а не покрытием [61] (рисунок 231).

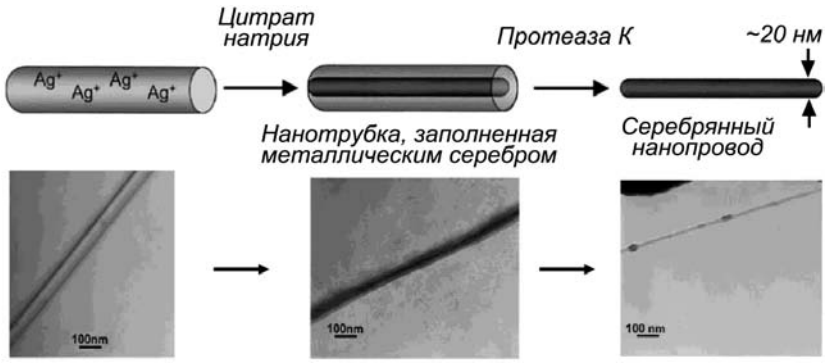


Рисунок 231 – Синтез серебряных нанопроводов с помощью ADPN

В полости нанотрубки ионы серебра восстанавливаются до металлического серебра. После обработки протеолитическими ферментами пептидное покрытие удаляется и остаётся серебряный проводник диаметром всего лишь 20 нм – это меньше, чем удаётся достичь с помощью традиционной литографии. Благодаря выдающейся жёсткости нанотрубок можно получать очень длинные проводники.

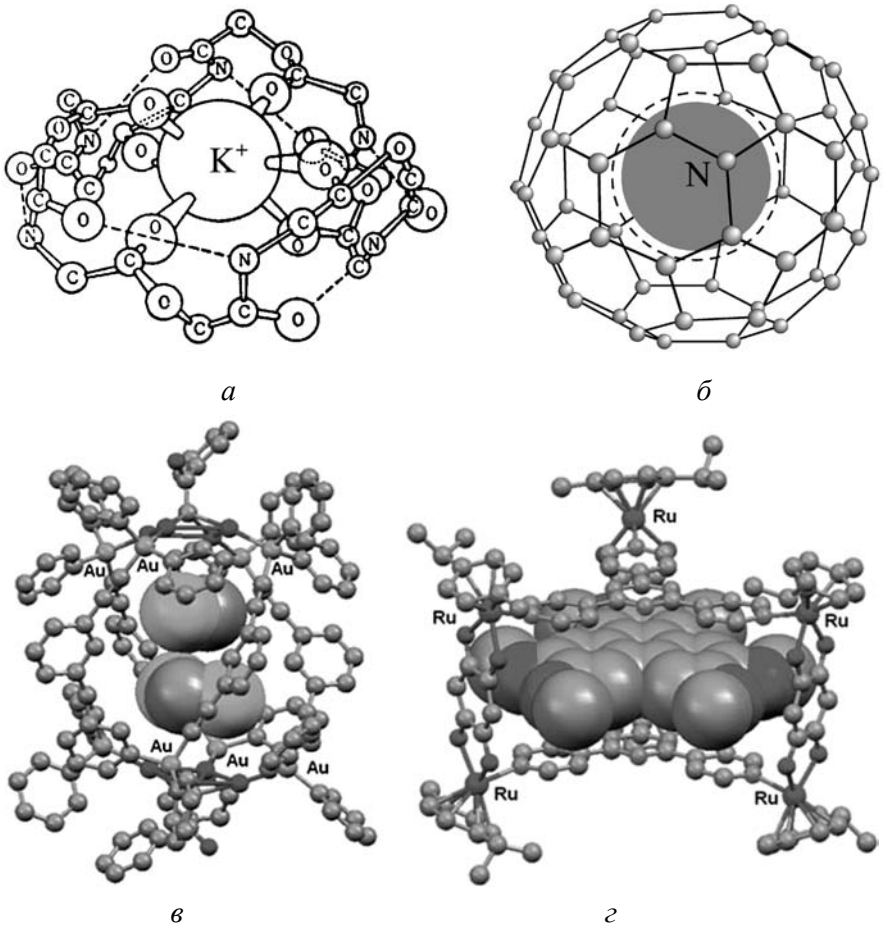
Как и другие описанные выше биоматериалы, пептидные нанотрубки можно покрывать металлом и снаружи. Комбинируя образование внутреннего проводящего стержня с наружным металлическим покрытием, удаётся получать из пептидных нанотрубок коаксиальные нанопроводники, которые найдут широкое применение в молекулярной электронике.

14.7. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНОКОНТЕЙНЕРЫ

Молекулярные наноконтейнеры представляют собой молекулярную оболочку, окружающую молекулу (или ион) транспортируемого вещества с целью предотвращения неспецифических взаимодействия с компонентами среды. Главным, но не единственным, направлением разработки наноконтейнеров является создание фармакологических векторов для доставки лекарственных веществ.

Наиболее известными наноконтейнерами являются липосомы, которые будут обсуждены ниже (см. п. 15.3), здесь же мы остановимся на собственно молекулярных структурах, способных заключать в себя и транспортировать молекулярные "грузы". Такого рода природные наношаттлы (или переносчики) уже рассматривались в предшествующих дисциплинах, например, пептидный антибиотик-ионофор валиномицин (см. [13], п. 6.5), (рисунок 232(а), который облегчает транспорт ионов калия через клеточные мембраны.

К молекулярным наноконтейнерам можно отнести также и эндоэдральные фуллерены (см. п. 3.5.4), (рисунок 232(б)). На рисунке 232(в,г) представлены органометаллические молекулярные наноконтейнеры содержащие $(CH_2Cl_2)_2$ и гексаметокситрифенилен, соответственно [17].



а *б* *в* *г*

Рисунок 232 – Молекулярные наноконтейнеры: *а* – валиномицин; *б* – эндоэдральный фуллерен $N@C_{60}$; *в* – $(CH_2Cl_2)_2@Au_8(CCOPh)_2(Ph_2PC_6H_4PPh_2)_4$; *г* – hexamethoxytriphenylene@$\{Ru_2(CO)_4\}_3(OOCC_6H_4COO)_3(PMe_3)_6$;

Принцип самосборки молекулярных конструкций, который является, возможно, одним из наиболее востребованных технологических принципов из тех, которые были "изобретены" и доведены до совершенства эволюцией, и которые в настоящее время интенсивно осваиваются и внедряются человечеством в небиологические отрасли

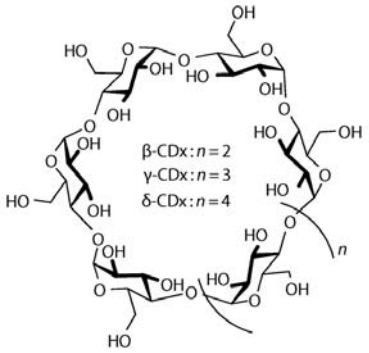
производства. Накопление опыта использования самособирающихся структур идёт по пути от простого к сложному, от простейших конструкций, содержащих две-три не слишком сложные молекулы к сложным системам (например, липосомальным конструкциям (см. п. 15.3)), включающим миллионы молекул. При этом одновременно используются как уже хорошо изученные природные молекулярные прототипы, так и синтезируются принципиально новые абиологические молекулярные компоненты.

Например, хорошо изученные циклические олигомеры глюкозы – циклодекстрины – также используются для "упаковывания" молекул в наноконтейнеры. Циклодекстрины различают по количеству остатков глюкозы, содержащихся в одной их молекуле. Так простейший представитель – α-циклодекстрин – состоит из 6 глюкопиранозных звеньев, β-циклодекстрин содержит 7, а γ-циклодекстрин – 8 звеньев [19] (рисунок 233(а), вверху).

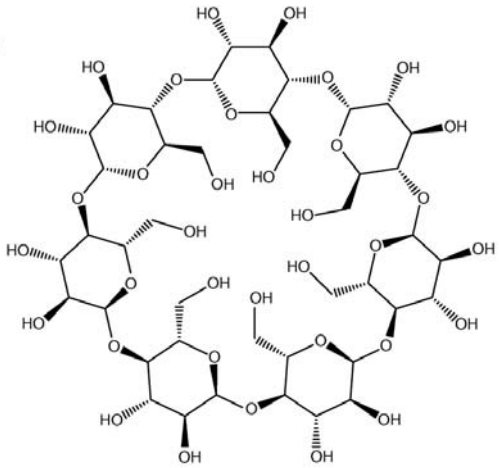
Форма молекул циклодекстринов представляет собой полый усечённый конус (рисунок 233(а), внизу). Данная форма стабилизирована водородными связями между ОН-группами, а также α-D-1,4-гликозидными связями. Все ОН-группы в циклодекстринах находятся на внешней поверхности молекулы. Поэтому внутренняя полость циклодекстринов является гидрофобной и способна образовывать в водных растворах комплексы включения с другими молекулами органической и неорганической природы.

В комплексах включения кольцо циклодекстрина является "молекулой хозяином", включённое вещество называют "гостем". Примеры таких комплексов, содержащих фуллерен и углеродную нанотрубку, приведены на рисунках 233(в,г).

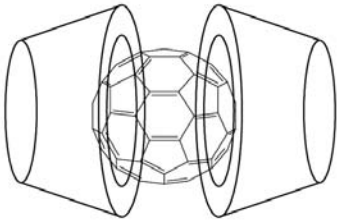
Макроциклические молекулы, такие, как гетерокаликсарены и каликснафталены (*heterocalixarenes* и *calixnaphthalenes*) также используются для создания наноконтейнеров (рисунок 234). Две молекулы гексагомотриоксакаликс[3]трет-бутил-нафталена в водной фазе самопроизвольно формируют молекулярную наносборку с молекулой фуллерена C_{60} (рисунок 234(б)).



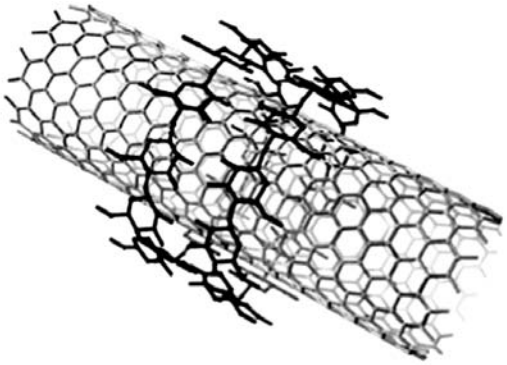
а



б

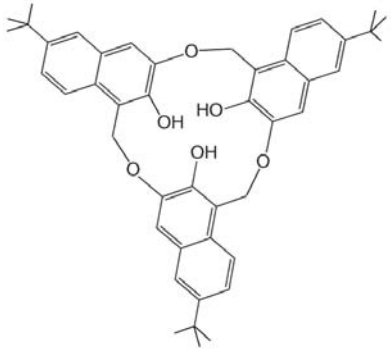


в

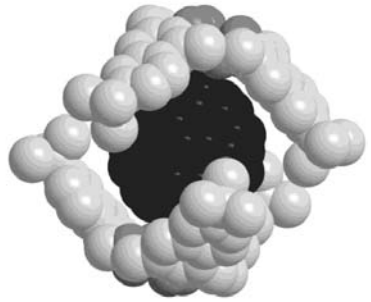


г

Рисунок 233 – Наноконтейнеры циклодекстринов: *а* – схема циклодекстринов (вверху) и пространственная форма β-циклодекстрина; *б* – β-циклодекстрин; *в* – циклодекстриновый наноконтейнер, содержащий фуллерен; *г* – циклодекстриновые 12-членные кольца на углеродной нанотрубке



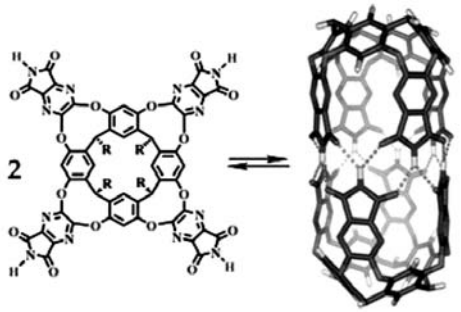
а



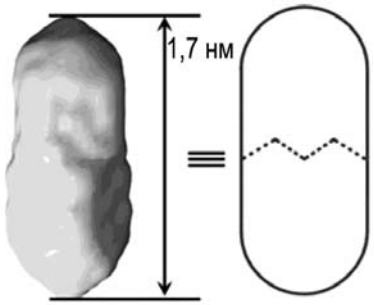
б

Рисунок 234 – Самосборка молекулярного наноконтейнера: *а* – схема гексагомотриоксакаликс[3]трет-бутил-нафталена; *б* – наноконтейнер, содержащий фуллерен

Дальнейшее развитие этой технологии формирования нанокапсул из двух молекулярных "оболочек" представлено на рисунке 235 [17].



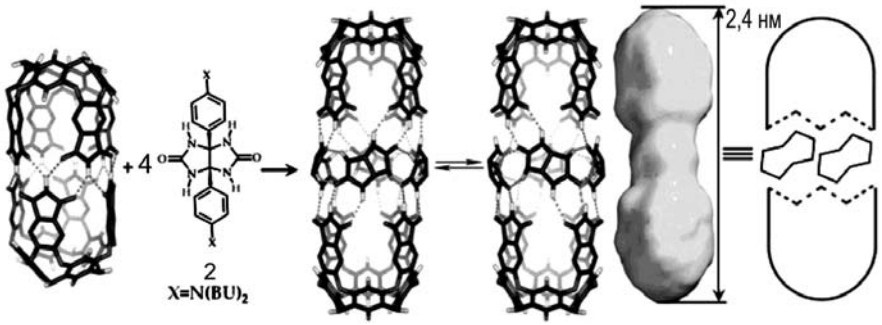
а



б

Рисунок 235 – Самосборка молекулярной нанокапсулы: *а* – схема сборки нанокапсулы из двух молекул тетрамид кавитант; *б* – размер и форма внутренней полости нанокапсулы

Такие капсулы способны увеличивать внутренний объём при добавлении в раствор молекул-спейсеров, которые формируют кольцевой "пояс" на "экваторе" нанокапсулы (рисунок 236).



а *б* *в*

Рисунок 236 – Расширение молекулярной нанокапсулы: *а* – добавление спейсерных молекул гюколурила; *б* – две возможные конформации расширенной нанокапсулы; *в* – размер и форма внутренней полости расширенной нанокапсулы

Примеры молекулярной инкапсуляции молекул циклопропана, 1-гексапдецена и анадамида приведены на рисунке 237. В последнем случае объём капсулы увеличен за счёт вставки дополнительного кольца спейсерных молекул.

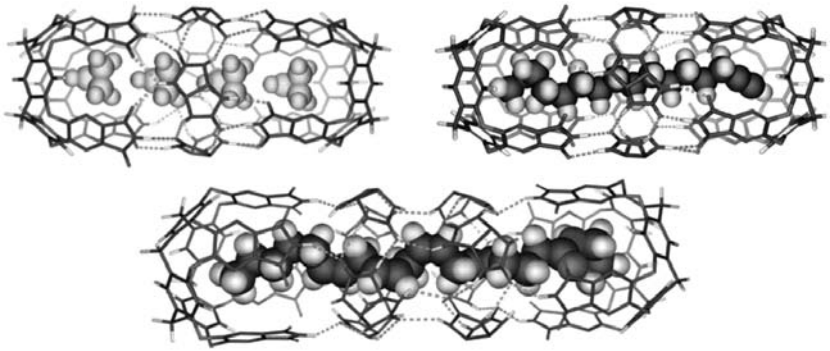
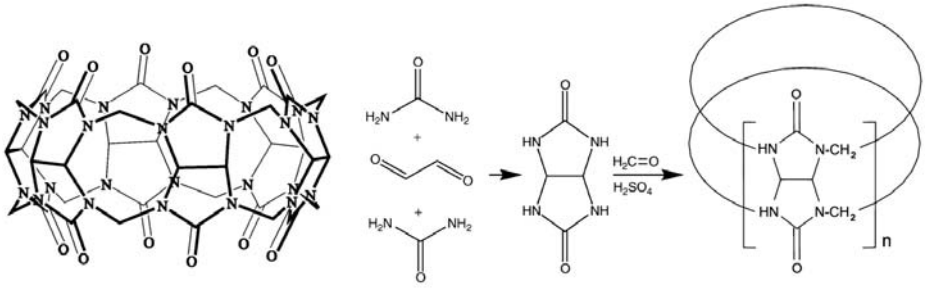


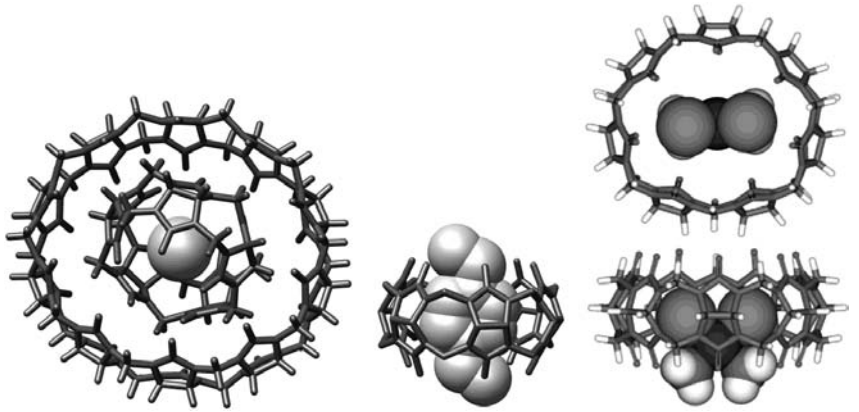
Рисунок 237 – Инкапсуляция четырёх молекул циклопропана (вверху слева), молекулы 1-гексадецена (вверху справа) и молекулы анадамида (внизу)

Органические макроциклические кавитанды состава $(C_6H_6N_4O_2)_n$ – *кукурбитурилы* (*cucurbiturils*, CB[n]), – построенные из n гликольуриль-ных фрагментов, соединённых через метиленовые мостики – ещё один

класс соединений, используемых для нанокапсулирования (рисунок 238). Кукурбитурилы представляют собой макроциклические кавитанды, имеющие форму полого бочонка, в плоскости дна и крышки которого находятся атомы кислорода карбонильных групп (порталы) [19]. Своё тривиальное название кукурбитурилы получили в связи с внешним сходством формы молекулы с тыквой (лат. *cucurbitus*).



а *б*



в *г* *д*

Рисунок 238 – Кукурбитурилы: *а* – схема кукурбит[6]урила; *б* – схема синтеза; *в* – комплекс CB[10]•CB[5]•Cl⁻; *г* – комплекс CB[6]•р-ксилиленедиаммониум-хлорид; *д* – комплекс CB[7]•цисплатин (*cisplatin*)

Кукурбитурилы способны самоассемблироваться в "матрёшечные" структуры (рисунок 238(в)), инкапсулировать молекулы (рисунок 238(г))

и могут быть использованы как наноконтейнеры для транспортировки лекарственных препаратов, как, например, антиракового препарата цисплатин [73] (рисунок 238(д)).

Контрольные вопросы и задания

1. Почему возникает необходимость модификации природных белков?
2. Что такое усечённый белковый алфавит и зачем его используют?
3. Какие принципы бионанотехнологии необходимо использовать при конструировании белка *de novo*?
4. Приведите примеры искусственных белков.
5. Каким образом при биосинтезе белков на рибосоме включают в их состав нестандартные аминокислоты?
6. В чём преимущество расширения генетического кода?
7. В чём преимущество использования пептидных нуклеиновых кислот по сравнению с обычными нуклеиновыми кислотами?
8. Как в нанотехнологии используют белковые S-слои?
9. Каким образом с помощью ДНК можно синтезировать металлический нанопроводник?
10. Как с помощью ДНК осуществляют молекулярную литографию?
11. Что такое амилоидные фибриллы и как их можно использовать для наноконструирования нанопроводников?
12. Как проводится металлизация актиновых нитей?
13. Каким образом с помощью пептидных нанотрубок можно изготовить нанокабель с проводящим сердечником?
14. Приведите примеры молекулярных наноконтейнеров.
15. Какие особенности пространственного строения молекул циклодекстринов позволяют использовать их в качестве молекулярных наноконтейнеров?
16. Какие особенности пространственного строения молекул кукурбитурилов позволяют использовать их в качестве молекулярных наноконтейнеров?

Глава 15
Наномедицина

15.1. Задачи наномедицины

Одной из наиболее привлекательных особенностей нанотехнологии является принципиальная возможность создать индивидуальную медицину, контролирующую состояние здоровья и, при необходимости, применяющую персональную терапию для каждого отдельно взятого человека.

Персонализация медицина очевидным образом возникает вследствие углубления и расширения знаний человечества о молекулярной природе заболеваний. Так же как в своё время достижения хирургии основывались на знаниях анатомии, а достижения гигиены и антисептики на микробиологических исследованиях, так и современная медицина, основанная на информации об атомно-молекулярном устройстве организма, становится наномедициной.

Поскольку человеческий организм в результате миллиардов лет эволюции является превосходной самосогласованной системой биологических молекул, то наноманипуляции такими молекулами, их направленная модификация и дизайн являются естественными областями применения бионанотехнологии.

От природы мы получили наследство в виде множества бионаномашин нашего организма, систем защиты организма (таких как иммунная система), репарационных систем (таких, как система свёртывания крови и заживления ран), используя которые бионанотехнология может не только восстанавливать нарушенные функции организма, но и создавать новые, не существующие в природе.

До сих пор в наномедицине использовался преимущественно подход, в котором главным было выбрать определённую "мишень" воздействия. Как правило, выбиралась единственная мишень, которая была причиной, или же вносила преимущественный вклад в заболевание. Для такой "мишени" разрабатывался "снаряд" – нанообъект, который

способен был найти "мишень" и скорректировать её функционирование в нужную сторону.

Типичный пример такого подхода – это использование аспирина (ацетилсалициловая кислота, *Acidum acetylsalicylicum*) (рисунок 239). Принимая аспирин мы заполняем наше тело молекулами, состоящими из 20 атомов (в воде карбоксильная группа имеет вид COO^-).

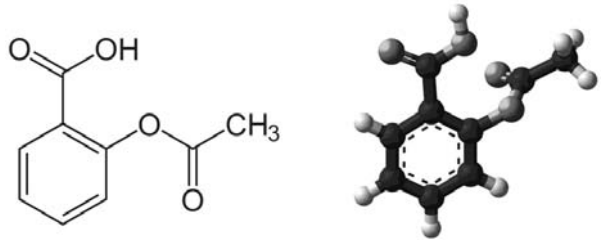


Рисунок 239 – Ацетилсалициловая кислота

Такой "снаряд" содержит распознающий элемент, который связывается с гиперактивным болевым рецептором, и "боеголовку", которая атакует этот белок и временно ингибирует его действие. Использование аспирина – это пример того, как мы контролируем (и управляем) функциями нашего организма на наноуровне.

В настоящее время медикаментозная терапия является наиболее эффективным методом воздействия на патогенные микроорганизмы или типы клеток, провоцирующие определённые заболевания.

Целью фармацевтических компаний является разработка и производство такого рода эффективных регуляторов метаболизма на молекулярном уровне. Большинство современных лекарств получены из природных продуктов. Растения и микроорганизмы для своей защиты синтезируют огромный спектр малых молекул (как правило, ядов и токсинов), которые были использованы фармацевтами в качестве лекарственных препаратов.

Конечно же, после открытия эффективного лекарства продолжается исследование механизма его действия и совершенствование методики его применения. Сегодняшние возможности нанотехнологии позволяют

проводить разработку и оптимизацию лекарств на новом технологическом (нано) уровне. Методы рационального дизайна, основанные на исследованиях молекулярно-атомной структуры "мишеней", используются для разработки совершенно новых соединений для медицинского применения.

Рациональный дизайн лекарств (*drug design* или *rational design*) является только первым шагом на пути к наномедицине. Молекулы лекарств, поскольку они являются малыми молекулами, воздействуют не только на целевой объект, но также и на другие молекулы в организме, что является причиной побочного действия лекарственных препаратов. Поэтому первой задачей нанотехнологии в медицине является повышение специфичности лекарств, а значит и снижение побочных эффектов при их применении.

Другим направлением исследований является ранняя диагностика и превентивная терапия, целью которых является обнаружение и устранение заболевания на возможно более ранних стадиях, когда ещё даже не оформилась традиционная симптоматика.

В арсенале современной медицины уже есть генетический анализ возможности возникновения генетических заболеваний и основанные на нём индивидуальные рекомендации, снижающие риск возникновения конкретного заболевания (см. [10], п. 5.3).

Разработанные нанотехнологами органические и неорганические наночастицы также могут использоваться, чтобы стимулировать врождённые механизмы регенерации. Основное внимание здесь сосредоточено на искусственной активации и управлении взрослыми стволовыми клетками.

Перечислим лишь некоторые из достижений нанотехнологии для медицины: разработаны амфифильные белки, которые поддерживают рост клеток для восстановления повреждённого спинного мозга; созданы покрытия областей опухоли головного мозга из магнитных наночастиц и чувствительных к ферментам частиц; синтезированы зонды из наночастиц для внутриклеточной доставки препарата и экспрессии генов и квантовые точки, которые обнаруживают и определяют количество биомаркеров рака молочной железы человека.

15.2. Иммунотоксины

При лечении многих заболеваний возникает необходимость уничтожить целую клетку. Например, онкологические заболевания являются следствием неконтролируемого деления необратимо трансформированных клеток, поэтому при антираковой терапии необходимо найти и уничтожить такие клетки, не затрагивая окружающие их нормальные клетки тканей.

Для этого проще всего использовать подходящие природные белки-токсины, синтезируемые растениями и микроорганизмами, которые характеризуются выраженной клеточной специфичностью. Как правило, такие токсины состоят как минимум из двух доменов – один обеспечивает специфичность связывания, а другой – токсичность воздействия.

Если отделить от такого белкового яда каталитическую субъединицу с активным токсичным центром и присоединить её к молекуле антитела, которая специфически связывается только с целевыми раковыми клетками, то в результате получится химерная белковая молекула – иммунотоксин (см. рисунок 34).

Иммунотоксины являются, образно говоря, "белками-камикадзе" – они, попадая в клетку, убивают её и погибают сами в результате этого.

Раковые клетки отличаются от нормальных набором адгезивных мембранных белков, обеспечивающих межклеточные контакты. Именно эти белки и являются мишенями для связывания иммунотоксинов.

На рисунке 240 представлен пример синтеза иммунотоксина BL22, его связывания с рецепторным белком CD22 (*cluster of differentiation*-22 – кластер дифференцировки-22 – трансмембранный белок, принадлежащий к SILEG-семейству лектинов (*sialic acid binding Ig-like lectins*)), эндоцитозного механизма попадания в цитозоль клетки и ингибирования трансляционного фактора элонгации EF2, что и приводит к гибели клетки [53].

Иммунотоксин BL22 состоит из вариабельного участка (*variable region*) Fv антитела anti-CD22 (включающего вариабельные участки лёгкой (V_L) и тяжёлой (V_H) цепей, соединённых дисульфидной связью, (см. [12], п. 10.4)), связанного пептидной связью с фрагментом PE38

экзотоксина *Pseudomonas*. Фрагмент PE38 представляет собой усечённый вариант экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* с удалёнными доменами Ia и Ib (рисунок 240). BL22 связывается с мембранным белком CD22 и в составе клатрин-окаймлённой везикулы проникает в клетку по механизму эндоцитоза (см. [13], п. 8.4).

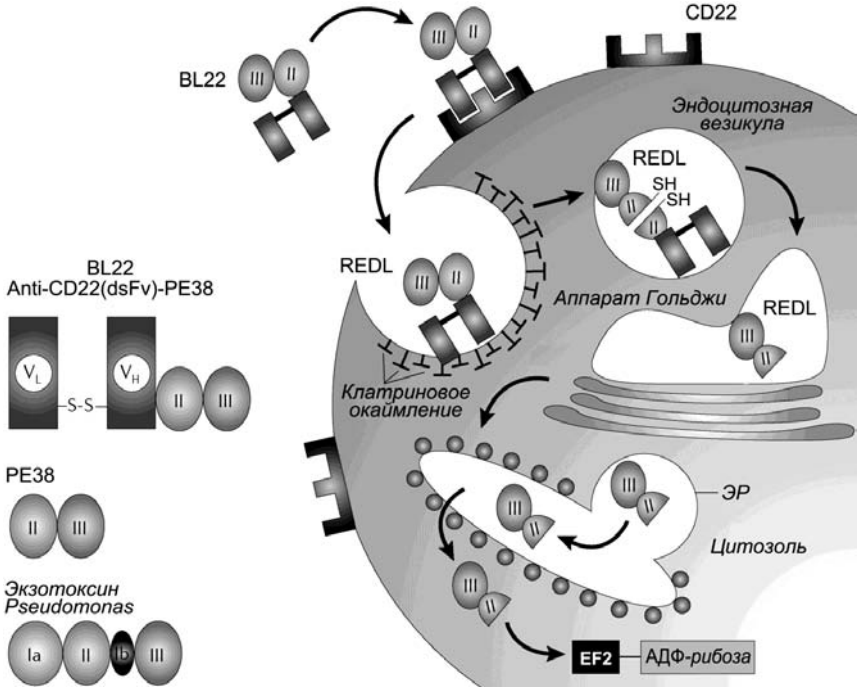


Рисунок 240 – Схема действия иммунотоксина BL22

В эндоцитозной везикуле фрагмент токсина PE38 разрезается на две части и С-концевой фрагмент, который состоит из домена III и фрагмента домена II, переносится через аппарат Гольджи в эндоплазматический ретикулум по механизму ретроградного везикулярного транспорта (см. [6], п. 3.4).

Предполагается, что нацеливающей аминокислотной последовательностью, направляющей этот фрагмент в эндоплазматический

ретикулум, является последовательность REDL (которая функционально аналогична KDEL-последовательности, удерживающей белки в эндоплазматическом ретикулуме (см. [13], п. 8.1)).

Из эндоплазматического ретикулума токсин транслоцируется в цитозоль и катализирует аденозин дифосфат (АДФ)-рибозилирование (рисунок 241) и инактивацию фактора элонгации EF2, что приводит к ингибированию синтеза белков и смерти клетки.

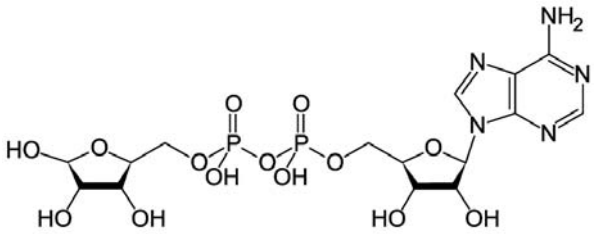


Рисунок 241 – АДФ-рибоза

15.3. Липосомы

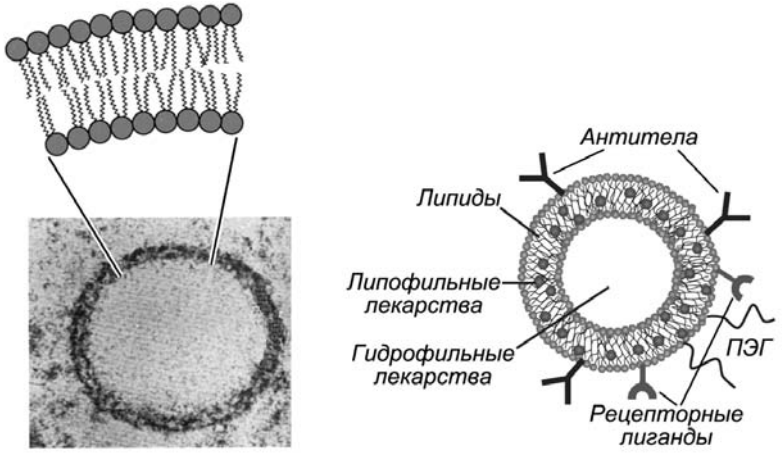
При обработке водных дисперсий фосфолипидов ультразвуком образуются моноламеллярные липосомы (см [12], п. 3.4) – искусственные везикулы, состоящие из липидного бислоя, окружающего водный объём диаметром порядка 100 нм (рисунки 139 и 242(а)).

Липосомы могут транспортировать как водорастворимые молекулы во внутреннем водном объёме, так и липофильные водонерастворимые молекулы в гидрофобной области липидного бислоя (рисунок 242(б)).

Если липосомы синтезированы из естественных липидов, то они *не токсичны*, *не иммуногенны* (не вызывают иммунологического отторжения организмом) и *биодеградабельны*.

Для защиты липосомы от неспецифической агрегации и, тем самым, увеличения нахождения липосом в кровотоке к липидам бислоя ковалентно присоединяют молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ). Для направленной доставки содержимого липосом к их поверхности ковалентно

пришивают адресные молекулы, например, антитела к поверхностным белкам клеток-мишеней. Этим способом, например, удобно доставлять лекарства к макрофагам в крови. Такие *иммунолипосломы* поглощаются из крови макрофагами и, разрушившись в клетке, доставляют лекарства в цитозоль макрофага.



а *б*

Рисунок 242 – Липосома: *а* – структура; *б* – схема функционализации

Такой способ эффективен при лечении *лейшманиоза* (*leishmaniasis*). Лейшмании (от имени Уильяма Лейшмана (*William Boog Leishman*)) – род паразитических простейших, которые поражают макрофаги и живут внутри клетки и, поэтому, иммунная система не может самостоятельно бороться с этой инфекцией, а лекарственные препараты из иммунолипосом доставляются непосредственно внутрь поражённой клетки.

Использование липосом для транспортировки лекарств снижает их нейротоксичность, поскольку молекулы лекарственных препаратов в этом случае уже не проникают в мозг с током крови, их вместе с липосомами задерживает гемато-энцефалический барьер (*blood–brain barrier* (BBB)).

Липосомы доставляют лекарственное вещество в клетки либо путем слияния с их мембраной, либо за счет эндоцитоза, либо за счёт

облегчённой диффузии из адсорбированной на плазматической мембране липосомы (рисунок 243).

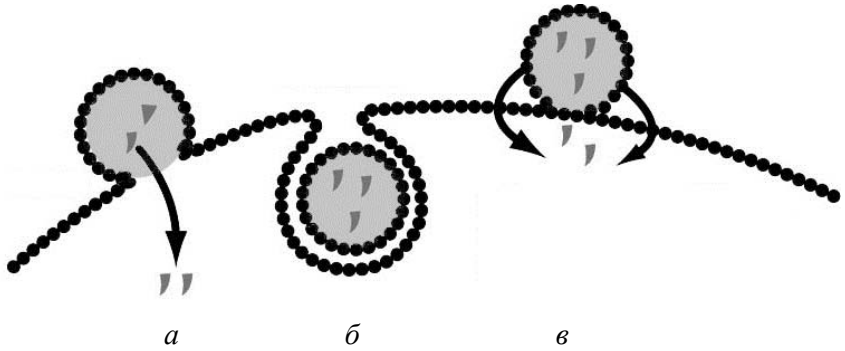


Рисунок 243 – Способы доставки лекарств в клетку липосомами: *а* – слияние с плазматической мембраной; *б* – эндоцитоз; *в* – облегчённая диффузия из адсорбированной липосомы

Липосомы эффективно преодолевают кожный эпителий перенося своё содержимое к подстилающим эпителий клеткам. Это качество липосом активно используется в косметической промышленности, где липосомы добавляют в кремы и лосьоны. Можно разработать липосомы для доставки в кожу специфических липидов, витаминов, дубильных веществ, солнцезащитных препаратов и пр.

Поскольку липидные везикулы отсутствуют в крови, то не защищённые липосомы быстро удаляются из кровотока. Для того чтобы увеличить время жизни липосом в кровотоке были разработаны так называемые "стэлс-липосомы" (*stealth liposomes*), которые способны "обмануть" клетки ретикуло-эндотелиальной системы. В мембраны таких липосом встраивают, например, длинные молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), что препятствует защитным молекулам крови вступать в контакт с молекулами мембраны липосомы (рисунок 244). Такие стэлс-липосомы способны несколько дней циркулировать в кровотоке, медленно высвобождая своё содержимое за счёт диффузии и выполняя, таким образом, функцию дозатора лекарств.

Липосомы могут применяться для доставки не только лекарств, но и других веществ, например молекул ДНК. Так, например, липосомы используют для генной терапии, основанной на доставке в клетки, несущие дефектный, мутантный ген копий нормального гена. Возможно, таким способом удастся излечивать различные генетические заболевания, например кистозный фиброз, развивающийся в результате определённой мутации.

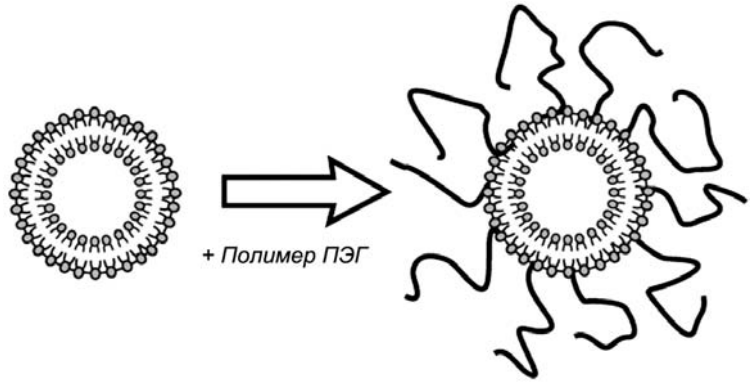


Рисунок 244 – Образование стэлс-липосомы

Тот же метод может помочь в борьбе с опухолями, возникающими вследствие соматической мутации генов-супрессоров опухолевого роста, вызванных действием канцерогенов.

Липосомы, содержащие молекулы-рецепторы, распознающие клетки-мишени, могут заменить вирусные векторы, которые применяются в настоящее время для доставки генов, что позволит избежать проблем, связанных с использованием вирусных векторов. Это, в частности, побочные эффекты, вызываемые встраиванием вирусных генов в геном пациента. В подобном случае биологически инертная липосомная система доставки обладает рядом преимуществ.

Для доставки генов применяются катионные липосомы (КЛ), собранные из катионных липидов вместо анионных природных липидов [64] (рисунок 245). Катионные липиды несут положительный заряд и

образуют везикулы совершенно так же, как природные фосфолипиды. Преимущество катионных липидов в том, что их положительный заряд позволяет им взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами ДНК.

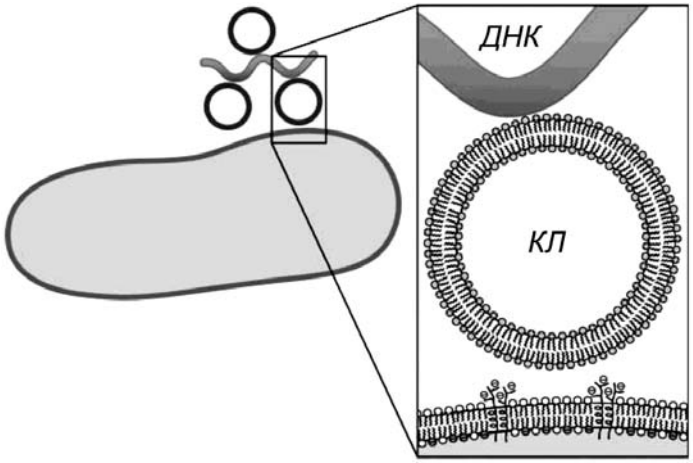


Рисунок 245 – Генная терапия с использованием катионных липосом (КЛ)

ДНК могут быть доставлены в ядро клетки двумя основными способами [71] (рисунок 246). Максимально эффективным является слияние липосомы с плазматической мембраной клетки (рисунок 246(а)). В этом случае содержимое липосомы диффундирует через цитозоль к ядру, минуя нуклеазы лизосом.

Эндоцитозный путь внесения ДНК в клетку менее продуктивный, поскольку эндосомы транспортируют своё содержимое в лизосомы, где бóльшая часть транспортируемой ДНК подвергается ферментативной деградации, а в ядро имеет шанс попасть только незначительная часть молекул ДНК из лизосомы.

До сих пор упоминались главным образом фосфолипидные липосомы, но существуют и другие биосовместимые наноконтейнеры, которые можно использовать в тех же целях, что и липосомы. К ним относятся структуры на основе биомолекул, такие как пептидные

наносферы и нановезикулы, и другие органические и даже неорганические материалы, образующие капсулу, которая освобождает полезные молекулы в строго определённом месте (см. п. 14.7).

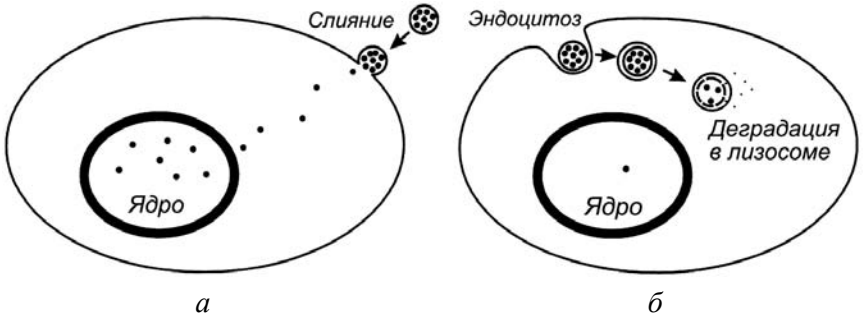


Рисунок 246 – Механизмы липосомального транспорта ДНК в клетку: *а* – слияние с наружной мембраной; *б* – эндоцитоз

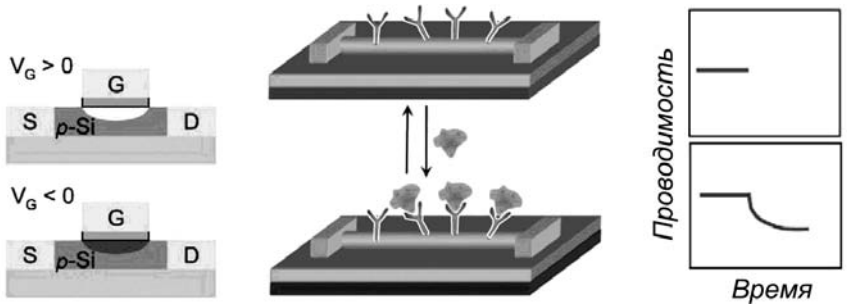
15.4. Применение нанонитей для биологической детекции

Обнаружение биологических и химических объектов является главным во многих областях здравоохранения и биологии – от выявления и диагностики болезней, до открытия и скрининга молекул новых лекарственных препаратов. Наноструктуры, такие как нанонити и нанокристаллы, предлагают новые, а иногда уникальные возможности для создания сверхчувствительных сенсоров. Диаметры этих наноструктур сопоставимы с размерами биологических и химических молекул распознаваемых объектов (аналитов), и, таким образом, представляют перспективные системы для регистрации и усиления сигналов, которые, в конечном счете, регистрируются электроникой.

Неорганические нанопровода и нанокристаллы проявляют уникальные электрические и оптические свойства, которые могут быть использованы для анализа. Существенное изменение электронных свойств полупроводниковых нанопроводников обеспечивает сверхвысокую

чувствительность к аналитам даже без использования селективных лигандов и, что самое перспективное, прямое преобразование детектируемого события в электрический сигнал без использования каких бы то ни было конверторов. Сигналы от таких электронных биосенсоров могут немедленно направляться в регистрирующие устройства, сами нанобиосенсоры легко интегрируются в миниатюрные датчики и, кроме того, прямое электрическое обнаружение обходится без затраты времени на химическую маркировку.

Основой нанопроводниковых сенсоров является полевой транзистор (*field-effect transistor*, FET). В стандартном полевом транзисторе (FET), полупроводник, такой как кремний *p*-типа (*p*-Si) связан с металлическими электродами: источником (*source*, S) и стоком (*drain*, D) носителей электрического тока [56] (рисунок 247(а)).



а *б* *в*

Рисунок 247 – Нанопроводной FET-сенсор: *а* – режимы работы полевого *p*-Si транзистора; *б* – схема Si-нанопроводникового FET-сенсора, сенсибилизированного антителами в качестве рецепторов аналитов; *в* – изменение проводимости сенсора при связывании с положительно заряженным белком

Электрическая проводимость полупроводника между источником и стоком включается и выключается третьим ёмкостным затворным электродом (*gate*, G), прижатым к *p*-Si-слою через тонкий диэлектрический слой. В случае кремниевого или другого полупроводника *p*-типа, приложение к затвору *положительного* потенциала ($V_G > 0$) электростатически выталкивает *p*-носители из полупроводника между

источником и стоком, *уменьшая* концентрацию носителей тока в полупроводнике и, следовательно, *уменьшая* проводимость (рисунок 247(а), вверху), в то время как приложение к затвору *отрицательного* потенциала ($V_G < 0$) приводит к *накоплению* носителей заряда и *увеличению* проводимости. Полупроводниковые нанонити, состоящие из кремния и других материалов, могут также функционировать как полевые транзисторы.

Проводимость нанопроводников *p*-типа, созданных из кремния с трёхвалентными примесями (такими как атомы бора и алюминия, у которых отсутствует электрон на внешней электронной оболочке), *снижается* при связывании *положительно* заряженных лигандов, а при связывании *отрицательно* заряженных молекул – *повышается*.

Для нанопроводников *n*-типа (сделанных из кремния с атомами примесей, обладающих неспаренными электронами, такими как мышьяк) связывание с заряженными лигандами будет демонстрировать обратную картину.

Схема нанобиосенсора на основе нанопроводникового кремниевого полевого транзистора показана на рисунке 247(б). Поверхность кремниевого нанопроводника сенсибилизирована антителами, которые могут селективно связывать положительно заряженные белковые молекулы. Присоединение такого белка эквивалентно увеличению потенциала на затворе транзистора, в результате чего электрическая проводимость нанопроводника скачком снижается (рисунок 247(б)). Такие сенсоры настолько чувствительны, что изменяют проводимость даже при связывании единственной вирусной частицы, что позволяет обнаруживать единичные вирусы (рисунок 248).

Подобный уровень чувствительности чрезвычайно важен для решения самых разных задач: ранней диагностики заболеваний, обеспечения безопасности окружающей среды и национальной безопасности, защиты от химического и биологического оружия, а также для управления различными наномашинами. Более того, индивидуальная регистрация событий связывания различного рода бионанообъектов с нанопроводными наносенсорами позволяет объединять их в единый

мультиплексный сенсор. Например, на рисунке 248 показана схема, регистрирующая наличие в системе разноимённо заряженных вирусов (например, аденовируса и вируса гриппа А) [56].

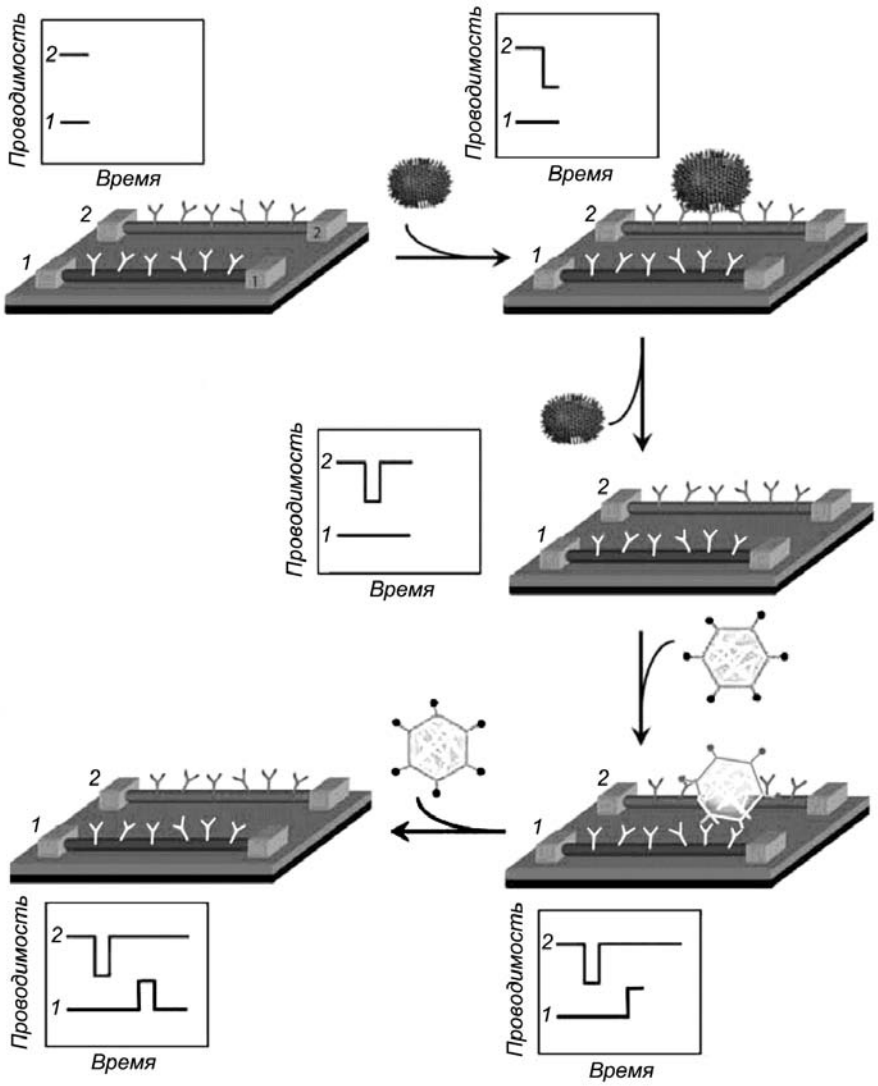


Рисунок 248 – Схема двойного FET-сенсора вирусов

Два нанонитевых полевых транзистора были сенсибилизированы рецепторами антител, специфичными для различных вирусов. Селективное мультиплексное детектирование вирусных частиц проявляется в виде перепадов тока при связывании/отсоединении различных вирусов с различными FET-датчиками. Поверхностные заряды двух типов вирусов, имеют противоположные знаки, что приводит к уменьшению и увеличению проводимости при связывании вирусов с определёнными рецепторами на соответствующих нанонитевых устройствах. Простота, чувствительность к единичной вирусной частице, и способность селективного мультиплексного обнаружения свидетельствуют в пользу того, что нанопроводниковые датчики могут служить основным элементом в мощных вирусных детекторах как в медицине, так и в системах раннего обнаружения биотеррористических атак.

Нанонитевые полевые транзисторы могут не только детектировать нанобиологические события, но нанобиологические молекулярные конструкции могут быть использованы для управлением работой таких нанотранзисторов. На рисунке 249 представлена схема управления работой FET-транзистора [44].

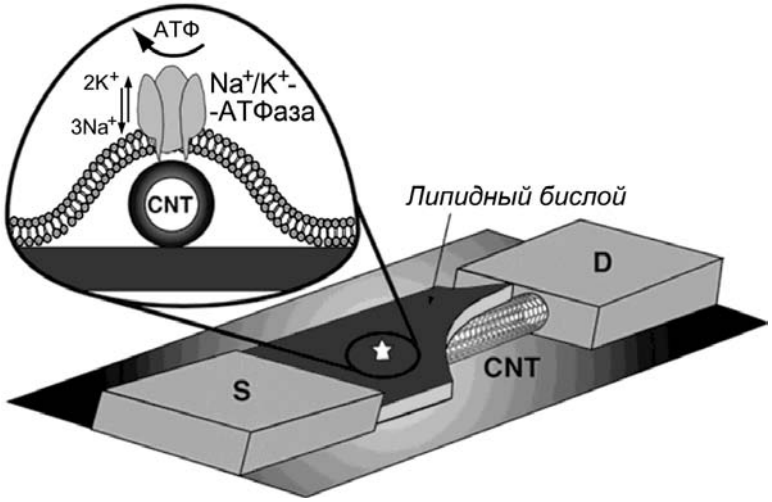


Рисунок 249 – Схема FET-CNT-транзистора

В качестве полупроводниковой нанонити в этом полевом транзисторе использована углеродная нанотрубка (*carbon nanotube*, CNT) соответствующей хиральности (см. п. 3.5.4), соединяющая *исток* (S) и *сток* (D) транзистора и изолированная с помощью биомембраны. В качестве *затвора* для варьирования управляющего электрического потенциала на углеродной нанотрубке был использован ионный мембранный насос – белок Na^+/K^+-АТФаза. Добавление во внешнюю среду молекул АТФ приводит к перекачиванию Na^+/K^+-АТФазой ионов через мембрану и увеличению положительного потенциала на нанотрубке, что приводит к росту тока через транзистор (рисунок 250).

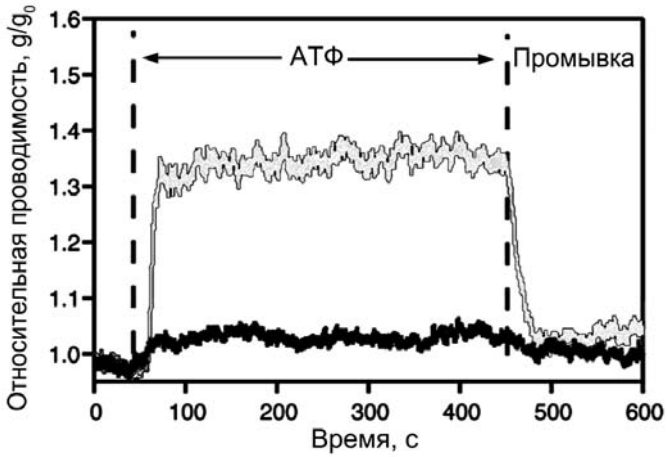


Рисунок 250 – Изменение проводимости FET-CNT-транзистора

Контрольные вопросы и задания

1. Как бионанотехнология позволяет современной медицине преодолеть ограничения методики "мишень-снаряд" медикаментозной терапии?
2. В чём преимущества нанотехнологии при рациональном дизайне лекарств?
3. Какие белки называются иммунотоксинами?

4. Как устроен иммунотоксин BL22?
5. Каким образом иммунотоксин BL22 проникает в цитозоль клетки?
6. В чём преимущество липосом, как наноконтейнеров доставки лекарств?
7. Для чего к мембранам липидных липосом присоединяют полиэтиленгликоль?
8. Каким образом липидные липосомы могут переносить и гидрофильные, и гидрофобные молекулы лекарств?
9. Как осуществляется направленная доставка лекарств с помощью липосом?
10. Перечислите три способа доставки лекарств в клетку липосомами.
11. Что такое стэлс-липосомы, в чём их специфика и для чего они используются?
12. В чём преимущество липосом по сравнению с вирусными векторами?
13. Что такое катионные липосомы и почему их используют для доставки генов в клетки?
14. Какие существуют два пути липосомальной доставки ДНК в клетку?
15. Опишите устройство полевого транзистора на основе кремниевой нанонити.
16. Как FET-транзистор на основе кремниевой нанонити регистрирует вирусные частицы?
17. Как устроен двойной FET-сенсор вирусов?
18. В чём состоит перспективность разработки нанонитевых FET-сенсоров?
19. Какие экологические, военные и нанотехнологические задачи можно решать с использованием нанонитевых сенсоров?
20. Как можно управлять работой полевого транзистора на основе углеродной нанотрубки с помощью Na^+/K^+-АТФазы?

Глава 16
Бионаноматериалы

Эволюция, создавая колоссальное разнообразие биоматериалов, разработала множество оригинальных инженерных решений, только малая часть которых уже использована человеком, а большинство ещё предстоит открыть, изучить и внедрить в производство. Пример уже использованных инноваций – это аэродинамический профиль крыльев самолётов, который в своё время был в точности скопирован с профиля крыльев птиц. Успехи молекулярной биологии открывают для инженерного использования новый класс молекулярных нано-концепций, которые успешно "апробированы" и "внедрены" эволюцией.

16.1. ДНК-материалы

Молекулы ДНК используются природой только для хранения генетической информации. Однако, используя выдающиеся свойства нуклеиновых кислот к самопроизвольной гибридизации комплементарных участков, можно применить специальным образом сконструированные ДНК-наноблоки для самосборки различных пространственных конструкций, что превращает ДНК в конструкционный биоматериал.

Простейшим "строительным блоком" является трёхлучевая Y-ДНК, ассемблированная из химически синтезированных олигонуклеотидов так, чтобы у неё были "липкие" концы [49] (рисунок 251(а)). Такие Y-ДНК самопроизвольно формируют дендримерные структуры, а использование фермента ДНК-лигаза ковалентно соединяет сахарофосфатные остовы ДНК в единую прочную структуру.

Следующим шагом была разработка крестообразного 4×4 ДНК-блока (мотива), из которого в водных растворах происходила самосборка плоских ДНК-сеток [34] (рисунок 251(б)). 4×4-блок состоял из девяти олигонуклеотидов и содержал четыре четырёхнитевых стыковочных ДНК-узла на четырёх концах креста.

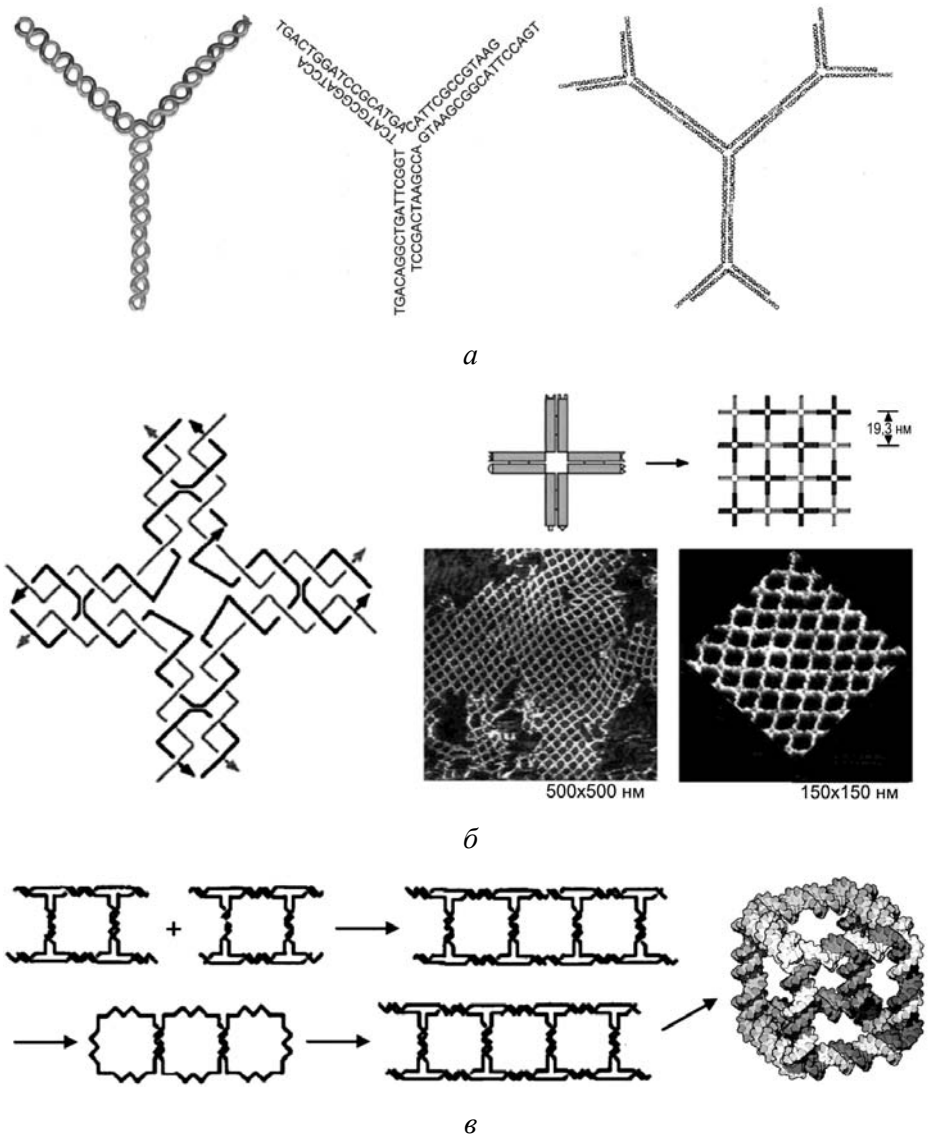


Рисунок 251 – Формирование ДНК-структур: *а* – схема элемента Y-ДНК и сборки дендримера из четырёх Y-ДНК; *б* – схема 4×4 ДНК-блока и сборки прямоугольных решёток из 4×4-блоков; *в* – ассемблирование ДНК-нанокуба

Далее были разработаны методы самосборки объёмных ДНК-наноструктур, первым из которых был ДНК-нанокуб (рисунок 251(в)). В последние годы многие исследователи разрабатывают ДНК-наноблоки, управляемое ассемблирование которых позволяет осуществлять дизайн разнообразных периодических наноструктур [28] (рисунок 252).

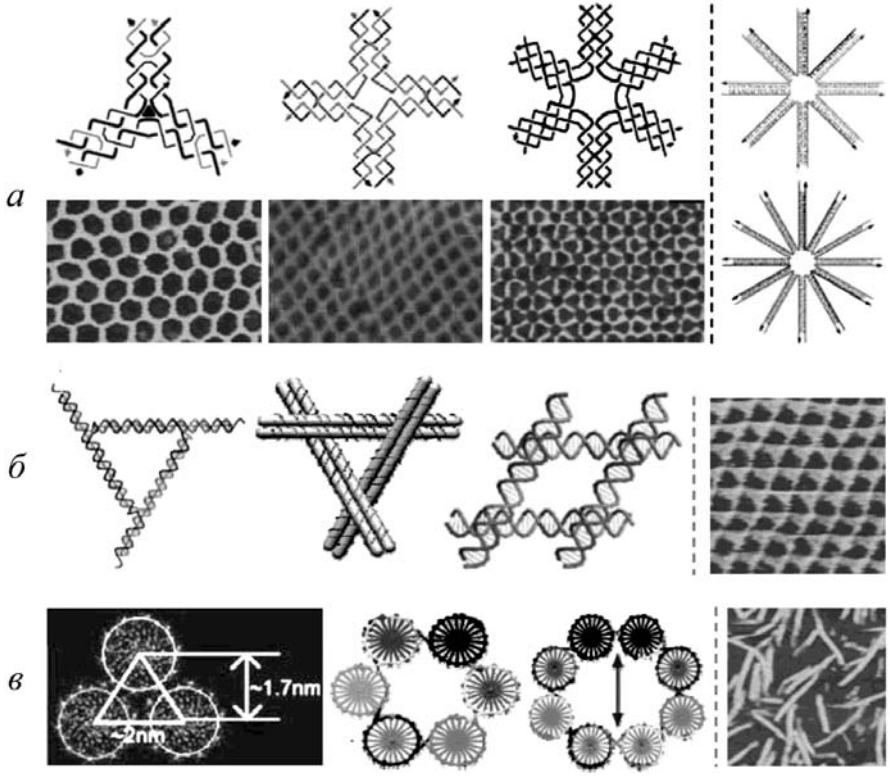


Рисунок 252 – ДНК-сборки: *а* – 3-, 4- и 6-лучевые ДНК-блоки и сборки из них; *б* – треугольные и ромбические ДНК-блоки и сборка из них; *в* – 3-, 6- и 8-ДНК-пучки

Ещё один оригинальный пример использования ДНК в качестве "нитки для вышивания" показан на рисунке 253. Такие ДНК-оригами являются примером своего рода "рукоделия", в ходе которого отрабатываются приёмы дизайна сложных структур и матриц на основе ДНК.

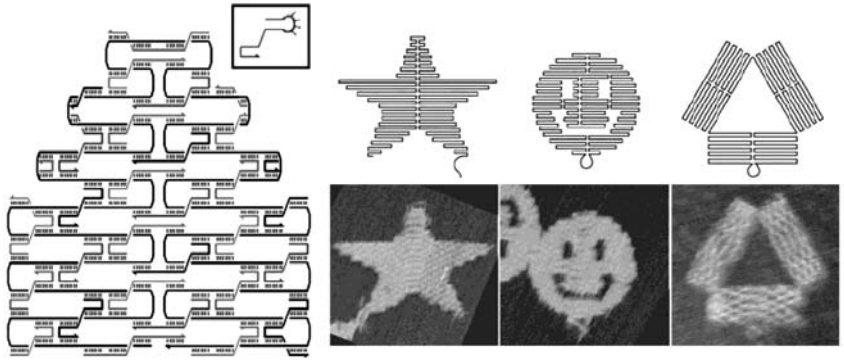
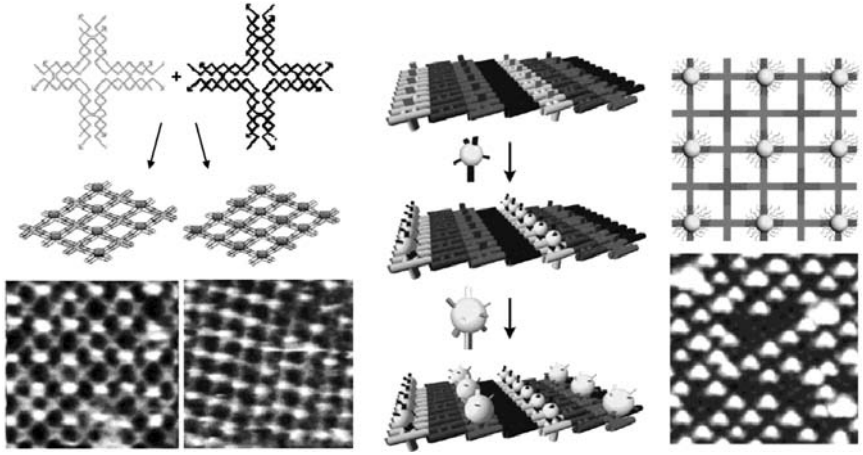


Рисунок 253 – ДНК-оригами: схема укладки элементов (слева) и синтезированные ДНК-изображения (справа)

Эти примеры разработки способов пространственного ассемблирования, управляемого свойствами ДНК, были использованы для формирования пространственных решёток из прикреплённых к ДНК-блокам белков и наночастиц (рисунок 254).



а *б*

Рисунок 254 – ДНК-наноассемблирование: *а* – биотинилирование ДНК-блоков позволяет ассемблировать стрептавидиновую решётку; *б* – конъюгаты наночастиц золота с ДНК ассемблируются в плоские периодические решётки наночастиц

После дизайна в 1991 году первой объёмной конструкции – ДНК-куба (рисунок 251(в)) – были разработаны ещё множество ДНК-полиэдров, поскольку такие структуры являются потенциальными контейнерами для лекарств, регуляторами белкового фолдинга и белковой активности, ассемблирования трёхмерных каркасов для катализа и биомолекулярной кристаллизации.

Поскольку простейшие фигуры (так называемые платоновские тела) имеют ограниченный набор треугольных, квадратных и шестиугольных граней, то был разработан ассортимент ДНК-блоков, пользуясь которым и малыми жёсткими органическими молекулами в качестве угловых блоков, были синтезированы множество супрамолекулярных ДНК-полиэдров [28] (рисунок 255).

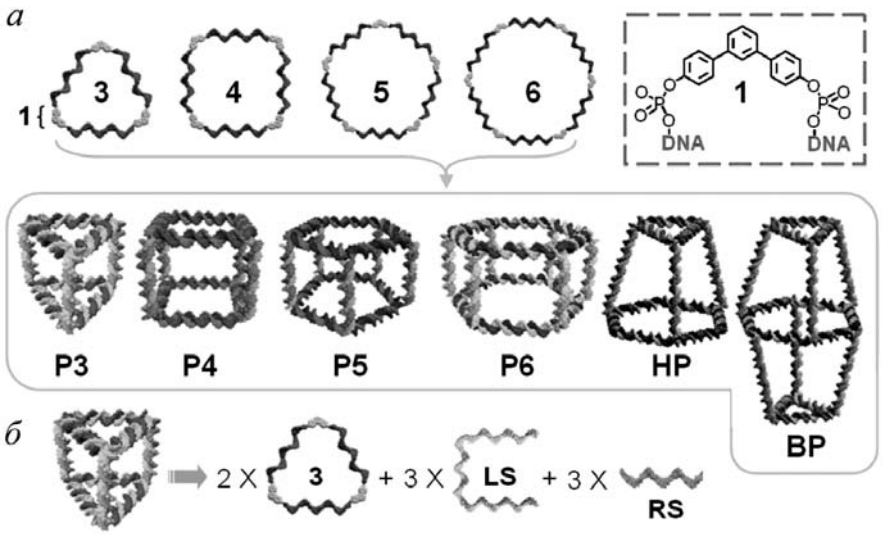


Рисунок 255 – Супрамолекулярные ДНК-полиэдры: *а* – синтез из треугольных (3), квадратных (4), пятиугольных (5) и шестиугольных (6) граней, соединённых угловыми вставками (1), треугольной призмы (P3), куба (P4), пятиугольной (P5), шестиугольной (P6) и гетеропризмы (HP), и бипризмы (BP); *б* – схема сборки треугольной призмы с использованием линкеров (*linking strands*, LS) и угловых вставок (*rigidifying strands*, RS)

Отметим, что природным аналогом четырёхлучевого наноблока ДНК (рисунок 251(б)) в природных ДНК является структура Холлидея (*Holliday junction*), обеспечивающая процесс гомологической рекомбинации.

16.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОТОРЫ

Белковые моторы являются самыми эффективными преобразователями химической энергии в механическую работу (см. [6], п. 6.7). Поэтому сегодня интенсивно разрабатываются методики использования бионаномоторов для осуществления пространственных перемещений в наномире.

Наиболее наглядной демонстрацией использования бионаномотора для реализации механического вращения было создание нановентилятора на основе АТФ-синтазы [43] (рисунки 204 и 256).

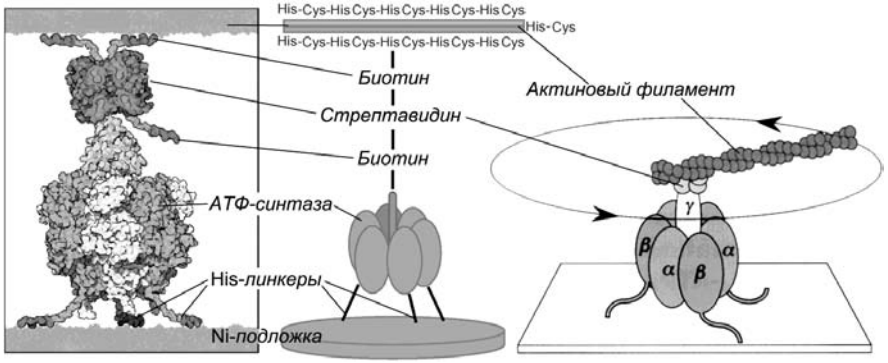


Рисунок 256 – Нановентиллятор: *а* – молекулярная схема; *б* – схема компоновки узлов; *в* – схема работы

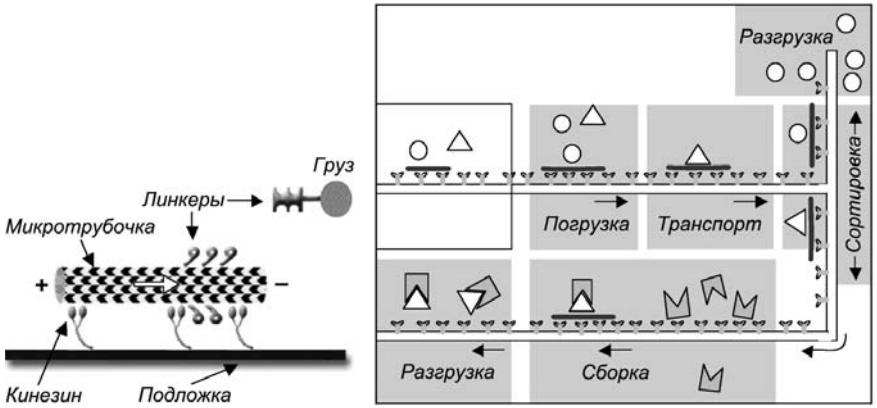
В состав β-субъединиц компонента F_1 АТФ-синтазы предварительно включили концевые гистидиновые линкеры. Компонент F_1 перевернули и закрепили на никелевой подложке. Актиновый "пропеллер"

соединили с γ-субъединицей АТФ-синтазного "мотора" биотин-стрептавидиновым линкером [52] (рисунок 256(б)). Добавление в систему АТФ привело к вращению актинового филамента (рисунок 256(в)).

В дальнейшем были разработаны варианты нановентиляторов с неорганическими пропеллерами вместо актиновой нити.

Линейные белковые моторы – динеин и кинезин (*microtubule associated proteins*, MAP) – транспортируют грузы – органеллы и везикулы – вдоль микротрубочек в клетке (см. п. 12.1).

Были разработаны демонстрационные системы, в которых кинезины иммобилизировались на подложке, а по ним перемещались микротрубочки, с которыми были ковалентно связаны грузы (рисунок 257(а)).



а *б*

Рисунок 257 – Молекулярный шаттл: *а* – схема транспортного шаттла; *б* – схема нанотранспорта молекулярными шаттлами

Использование таких молекулярных шаттлов на основе микротрубочек позволяет организовать наносистему доставки, сортировки, ассемблирования и разгрузки молекулярных грузов (рисунок 257(б)).

Подобные транспортные системы, основанные на векторном перемещении микротрубочек вдоль иммобилизованных на подложке моторных белков, могут быть использованы для разворачивания скрученных полимерных молекул, таких, как, например, ДНК. Линеаризация нити

нуклеиновой кислоты необходима для оптического секвенирования или для управляемого ассемблирования компонентов наноэлектроники [38]. Схема такой системы представлена на рисунке 258.

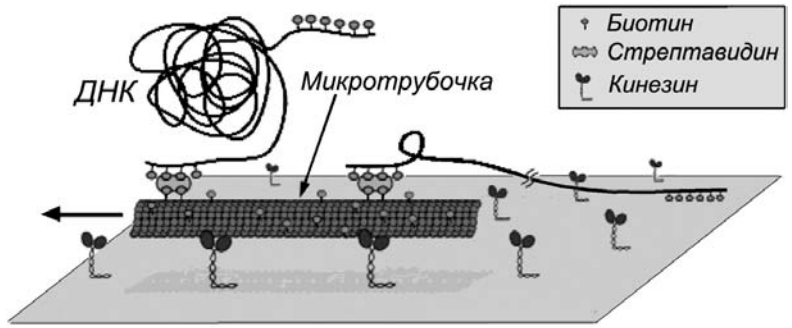
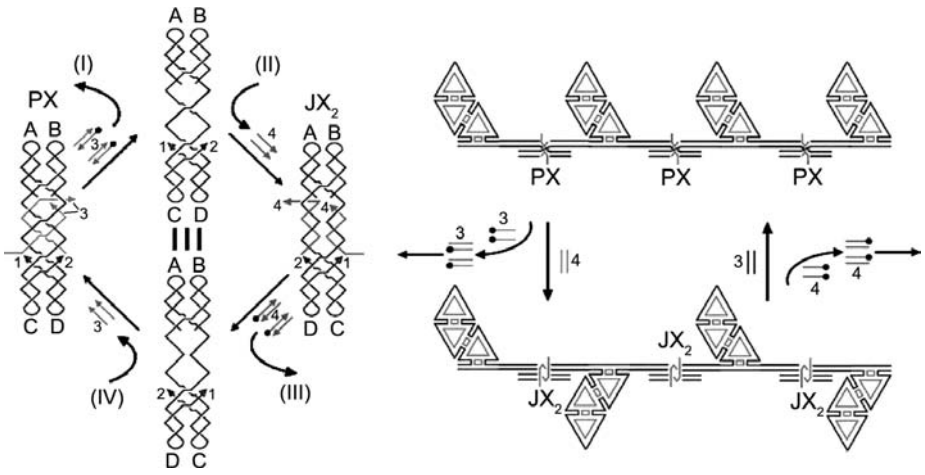


Рисунок 258 – Манипулирование ДНК с помощью молекулярных моторов

Совершенно неожиданно оказалось, что и саму молекулу ДНК также можно использовать в качестве своеобразного мотора, который будет совершать механическую работу [75] (рисунок 259).



а *б*

Рисунок 259 – ДНК-мотор: *а* – схема ДНК-реле; *б* – переключение ДНК-структуры

На рисунке 259(а) представлена схема ДНК-переключателя, основанной на ДНК-мотиве PX, состоящем из двух длинных нитей ДНК (1) и (2), стабилизированных двумя короткими олигонуклеотидами (3). Топология укладки мотива PX определяется взаимным расположением четырёх концевых петель $\begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix}$.

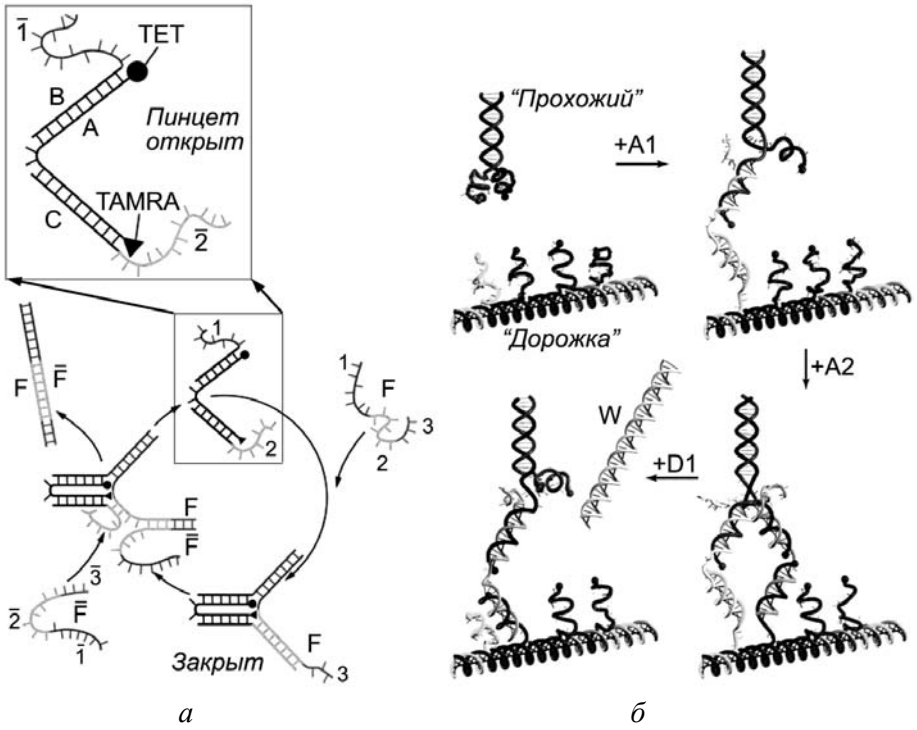
Цикл работы переключателя состоит из четырёх этапов (I) – (IV). На первом этапе добавление в систему олигонуклеотидов, комплементарных коротким вставкам (3), удаляет эти вставки из мотива PX, и в мотиве остаются только две основные нити ДНК (1) и (2).

На этапе (II) в систему добавляют другие короткие олигонуклеотидные вставки (4), которые связываются с мотивом PX и разворачивают на 180° его нижнюю половину относительно верхней. Такой новый мотив обозначен JX_2 и его топология имеет вид $\begin{pmatrix} A & B \\ D & C \end{pmatrix}$. Таким образом, переключение между мотивами инициируется заменой вставок (3) на (4) и приводит к механическому "вращению" домена (CD) относительно домена (AB).

Обратное переключение мотива JX_2 в мотив PX происходит на этапах (III) (добавление комплементарных вставкам 4 олигонуклеотидов и удаление вставок из JX_2) и (IV) – добавление в систему коротких вставок (3), связывание с которыми возвращает конформацию PX мотива и нижний домен (DC) ещё раз механически поворачивается обратно на 180°, возвращая систему в исходное состояние и завершая цикл.

Группа исследователей (*H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N.C. Seeman*) университета Нью-Йорка вставила такие ДНК-переключатели между большими ДНК-модулями так, чтобы обеспечить наглядность работы этих переключателей [75] (рисунок 259(б)). Электронные микрофотографии зарегистрировали механический разворот одних модулей относительно других, стимулированный $PX \rightleftarrows JX_2$ переходом, который в свою очередь индуцировался связыванием с ДНК-переключающим мотивом коротких олигонуклеотидных вставок (3) и (4).

Аналогичный подход был использован при разработке "нанопинцета" [76] (рисунок 260(а)).



а *б*

Рисунок 260 – ДНК-механизмы: *а* – схема ДНК-пинцета; *б* – шагающая ДНК

Сам ДНК-"нанопинцет" состоит из трёх нитей ДНК, обозначенных (A), (B) и (C) на рисунке 260(а). Нити (B) и (C) на концах имеют свободные участки ($\bar{1}$) и ($\bar{2}$). Управляющая нить ДНК (F) состоит из комплементарных участков (1) и (2) и дополнительного участка (3). Добавление молекул F в систему приводит к связыванию комплементарных участков: (1) и ($\bar{1}$); (2) и ($\bar{2}$), в результате чего "пинцет" закрывается. Чтобы открыть нанопинцет в систему добавляют молекулы ДНК ($\bar{F}$), полностью комплементарные молекулам (F). Гибридизация ($F \bullet \bar{F}$) освобождает пинцет, и он снова открывается.

Для контроля этих перемещений к концам цепи (A) ковалентно присоединили молекулы флуоресцентного красителя TET (*5′-tetrachloro-fluorescein phosphoramidite*), который излучает на длине волны 536 нм при возбуждении излучением аргонового лазера на длине волны 514,5 нм, и молекулы тушителя этой флуоресценции TAMRA (*carboxytetramethyl-rhodamine*). В открытых пинцетах красители излучали, а в закрытых пинцетах флуоресценция эффективно тушилась.

Ещё один пример ДНК-механизма представлен ан рисунке 260(б) – вдоль специальным образом сконструированной из шести нитей ДНК молекулярной "дорожки" "прогуливается" молекула ДНК-"прохожий", состоящая из двух ДНК нитей [67]. Добавление в систему коротких олигонуклеотидов A1, которые гибридизуются как с одной из ДНК нитей молекулы "прохожего", так и с одной из нитей ДНК, формирующих "дорожку", приводит к связыванию одной из "ног" "прохожего" с "дорожкой" – прохожий "ставит" одну ногу на дорожку. Добавление в систему другого короткого олигонуклеотида A2 аналогичным образом "ставит" вторую ногу прохожего на дорожку.

Затем в систему добавляется олигонуклеотид D1, полностью комплементарный A1, происходит их гибридизация, первая "нога" освобождается, а образовавшийся дуплекс W (*waste*) удаляется. Используя такое поочерёдное присоединение "прохожего" к "дорожке" молекулами A и отсоединение молекулами D, можно реализовать перемещение груза, присоединённого к ДНК-молекуле транспортёра, вдоль ДНК-молекулы "дорожки".

16.3. Перспективы бионанотехнологий

Агронанобиотехнология. Большинство перечисленных выше примеров применения нанотехнологий связано с медициной, однако в последнее время всё больше внимания уделяется применению достижений бионанотехнологии в сельском хозяйстве. Сельское хозяйство является как поставщиком пищи и некоторых строительных материалов, так и возобновляемых энергоресурсов, в перспективе способных удовлетворить

всё возрастающие потребности человечества в энергоносителях. Многие нанотехнологические методы диагностики и лечения, первоначально разработанные для применения в медицине, пригодны и для использования в сельском хозяйстве. Простейшим примером служит ветеринария: многие лечебные и диагностические средства, разработанные для людей, применяют и для лечения домашних животных. Как и в случае с вакцинами и антибиотиками, внедрение достижений нанотехнологий должно в корне изменить ветеринарную практику. Значительный прогресс благодаря внедрению нанотехнологий ожидается и в растениеводстве. Нанотехнологии могут применяться, например, для создания наноконтейнеров для удобрений, дозирующих высвобождение заключённых в них питательных веществ (см. п. 14.7). Возможно, эти контейнеры будут не только высвобождать удобрения, но и учитывать при этом состояние растения и окружающей среды, обеспечивая максимально эффективное применение химикатов для роста растений.

WaTech. Технологии использования водных ресурсов, или водные технологии (*water technologies*, WaTech), совершенно необходимы для обеспечения жизнедеятельности человечества в XXI веке. К этой категории относятся различные методы опреснения и очистки воды, а также мониторинг её качества.

В более совершенных водных технологиях нуждаются жители не только пустынных территорий, но и мегаполисов, в которых остро стоит проблема очистки все возрастающего количества сточных вод. Крупные компании, такие как General Electric, прилагают много усилий для завоевания лидерства в этой быстро развивающейся отрасли (см. https://knowledgecentral.gewater.com/kcpguest/loginPortal.do).

Нанотехнологии способны значительно повысить эффективность водных технологий. Для очистки воды чаще всего применяются фильтры с нанопорами, пропускающими воду и задерживающие соли и другие примеси (см. рисунок 224(в)). Разработка новых мембранных фильтров должна повысить качество и снизить стоимость очистки воды.

Бионанотехнологиям отводится особая роль в этом процессе. Поскольку материалы для мембранных фильтров должны быть

гидрофильными, нетоксичными и биосовместимыми, их можно изготавливать из биомолекулярных сборок, таких как нанотрубки.

Бионанотехнологии также помогают бороться с обрастанием фильтрующих мембран микроорганизмами (бактериями и плесневыми грибами). Для этого в фильтры внедряют биоматериалы, препятствующие росту нежелательной микрофлоры. Такой эффект достигается благодаря особой наноструктуре материала, включающего физические, химические и биохимические соединения, ингибирующие рост бактерий. Для этой цели также могут использоваться определённые вещества, медленно освобождающиеся из нанокапсул, в которые они заключены (см. п. 14.7).

Другая важная область применения био- и нанотехнологий в водных технологиях – мониторинг качества воды. Необходимо иметь возможность обнаружить вредоносные биологические и химические примеси, которые могут попасть в воду в результате действий злоумышленников либо в процессе опреснения (см. п. 15.4) (например, в опреснённой воде из некоторых источников зарегистрирован повышенный уровень бора и солей радиоактивных металлов).

Нанокосметика. – это ещё одна из областей применения нанотехнологий с огромным рынком сбыта. Косметические компании добавляют в кремы и лосьоны вещества, улучшающие внешний вид и физиологические показатели кожи. К ним относятся питательные вещества, такие как витамины (пример – витамин Е, липофильный антиоксидант, который невозможно принимать перорально в больших количествах), кофакторы (Q10) и даже белки (например, фибриллы коллагена). Наноконтейнеры – это очень удобное средство доставки таких веществ в кожу человека. Для этого в косметической индустрии давно используются липосомы – еще в 1986 г. фирма Диор включила липосомы в состав своей линии Capture®. Здесь, как и при доставке лекарств (см. п. 15.3), липосомы играют роль контейнеров, переносящих препарат к месту применения.

Однако в липосомы можно заключать только гидрофильные (водорастворимые) вещества, поскольку гидрофобные соединения нарушают целостность липосом, самосборка которых идет за счёт гидрофобных взаимодействий. Более вероятными кандидатами на роль

наноконтейнеров для доставки в кожу гидрофобных соединений являются везикулы из пептидов, самосборка которых основана на электростатических взаимодействиях.

Ассемблирование наноструктур. Сегодня в бионанотехнологии используются главным образом природные молекулы, в основном ДНК, белки и небольшие пептиды. Новое направление, возникшее на стыке молекулярной биологии, генной инженерии и дисциплин, изучающих строительные блоки, из которых путем самосборки образуются компоненты живых систем, ещё только начинает формироваться.

Технологии рекомбинантных ДНК позволяют управлять различными биологическими функциями белков, обладающих свойством самосборки. Такие компоненты, запрограммированные на выполнение определённых функций в живых системах, можно затем встраивать в различные наноструктуры. Предполагается, что в будущем это направление станет одним из центральных.

В принципе такой подход позволит получать не просто *упорядоченные* наноструктуры, а *функциональные* наноструктуры, из которых можно будет собирать наноконвейеры для обработки отдельных молекул. Вполне вероятно, что в скором будущем инженеры-бионанотехнологи смогут проектировать технологические линии для производства наноустройств.

Значительный прогресс в области бионанотехнологии ожидается на стыке физики и молекулярной биологии. Множество методов, исходно разработанных для небиологического применения, могут принести огромную пользу в биологических исследованиях. И наоборот, множество рутинных методик, применяемых в молекулярной биологии, можно значительно усовершенствовать благодаря внедрению в них достижений нанотехнологии.

Так, требующие грандиозных затрат труда методы модификации и амплификации ДНК радикально изменятся благодаря использованию микроканальных дозаторов и "лабораторий на чипе", и будет реализована полностью автоматизированная обработка образцов ДНК с использованием наночипов-конвейеров.

Инженерия тканей (*tissue engineering*) – это ещё одно из интереснейших направлений современной биотехнологии. Термин *Tissue Engineering* был предложен Робертом Лангером (*Robert S. Langer*) из Массачусетского технологического института (MIT).

Под инженерией тканей понимают совокупность методов, обеспечивающих конструирование и выращивание *in vitro* тканей человеческого тела. Методами тканевой инженерии из клеток пациента или других доноров выращивают ткани, которые в дальнейшем пересаживают этому пациенту. Этот подход должен радикально изменить многие медицинские методы и искоренить ряд тяжелых болезней, например, диабет I типа, который можно будет полностью излечивать путем пересадки искусственно выращенной поджелудочной железы.

Более того, этот метод позволит лечить даже рак поджелудочной железы – одну из самых тяжелых форм рака с неблагоприятным прогнозом (время жизни пациентов после постановки диагноза обычно не превышает нескольких месяцев). Другие примеры возможного применения тканевой инженерии включают выращивание тканей печени, сердца и почек.

В настоящее время единственным способом замены отказавшего органа является трансплантация донорского, хотя при этом добыть его вовремя не всегда возможно, и, вдобавок, возникают проблемы из-за осложнений, вызванных несовместимостью тканей донора и реципиента.

Бионанотехнология в перспективе позволит выращивать "резервные" органы из собственных клеток пациента либо из клеток его родителей. Организм реципиента не сможет отличить такие ткани и органы от собственных, что минимизирует проблему биосовместимости.

Нанотехнология должна создать умные (*smart*) матрицы с определённой наноструктурой и сигнальными свойствами, обеспечивающие управляемую пролиферацию и дифференциацию клеток. Такие матрицы будут играть роль каркасов (*scaffolds*), фиксирующих положение стволовых клеток (либо эмбриональных, либо от взрослых доноров), и обеспечивать подходящие условия для развития искусственных органов. По данным некоторых исследований, процессом дифференцировки стволовых клеток можно управлять с помощью внешних электрических

сигналов, обеспечивая таким образом нужное направление развития искусственных органов.

Применение полимерных каркасов для манипуляций с тканями уже продемонстрировано на примере хрящевой ткани. Так, в старости нередко наблюдается дегенерация хрящевой ткани. Добавление в пищу глюкозамина и хондроитина обеспечивает лишь некоторое улучшение, далёкое от полного излечения. Впрочем, хрящевая ткань довольно проста по строению и её рост не требует сложного процесса клеточной дифференцировки. Соответственно получение искусственной хрящевой ткани может быть одной из первых задач тканевой инженерии. Из клеток хрящевой ткани пациента выращиваются фрагменты хряща, которые затем пересаживаются ему же. Так удастся предотвратить отторжение из-за иммунологической несовместимости и максимально быстро восстановить функциональность пересаженной ткани. Более сложной для современной биотехнологии является проблема воспроизведения таких органов, как сердце или печень, для которых критически важна дифференцировка клеток согласно определённому, весьма сложному и до конца не изученному плану.

В других случаях наноматериалы могут стимулировать регенеративную функцию, заложенную в человеческом организме. Это особенно важно для восстановления нервной системы после повреждений. Предполагается, что механическая опора, правильная пространственная организация сигналов пролиферации и биодеградабельность вспомогательных биоинженерных материалов позволят восстанавливать спинной мозг и зрительный нерв при условии, конечно, что лечение начато вскоре после травмы.

Гибридные материалы. Помимо искусственных тканей важной биологической задачей является создание композитных (гибридных) материалы на основе биологических и неорганических компонентов. Очевидными примерами такого рода материалов служат искусственные кости и зубы. Как упоминалось выше, биоминерализация является важным процессом и в живых, и в искусственных бионанотехнологических системах (см. п. 11.3). Результаты исследования этих процессов *in vitro*

могут быть использованы для конструирования данных тканей и органов. Впрочем, возможны и другие направления, не связанные с имитацией биоминерализации соединениями кальция, например, создание наносистем на основе металлов, таких как платина и гитан, которые в настоящее время используются при конструировании макроскопических протезов. Методы нанотехнологии позволяют создавать упорядоченные наноструктуры из неорганических веществ, например из соединений кальция, внедрять в них биологические сигнальные молекулы и получать в итоге материалы с исключительной механической прочностью, химической стойкостью и биосовместимостью.

Контрольные вопросы и задания

1. Почему ДНК является перспективным строительным бионаноматериалом?
2. Как ДНК-блоки позволяют реализовать пространственное ассемблирование белков и наночастиц?
3. Для чего могут быть использованы ДНК-полиэдры?
4. Как был сделан нановентиллятор на основе АТФ-синтазы?
5. Что такое кинезин-тубулиновый молекулярный шаттл?
6. Как используя молекулярные шаттлы можно организовать нанотранспортную схему?
7. Опишите принцип действия ДНК-мотора?
8. Опишите принцип действия ДНК-пинцета?
9. Опишите принцип действия транспортной системы по схеме "ДНК-дорожка"-"ДНК-прохожий"?
10. Какие перспективы использования бионанотехнологии в сельском хозяйстве?
11. Как бионанотехнологии могут быть использованы в водных технологиях WaTech?
12. Как бионанотехнологии используются в нанокосметике?
13. Какие перспективы использования бионанотехнологии в инженерии биологических тканей и в разработке технологий производства гибридных материалов?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Основная

1. Огурцов А.Н. Введение в бионанотехнологию / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2010. – 136 с.
2. Огурцов А.Н. Структурные принципы бионанотехнологии / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 140 с.
3. Огурцов А.Н. Функциональные принципы бионанотехнологии / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2009. – 146 с.
4. Огурцов А.Н. Нанобиотехнология. Основы молекулярной биотехнологии / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2010. – 384 с.
5. Огурцов А.Н. Введение в биофизику. Физические основы биотехнологии / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 320 с.
6. Огурцов А.Н. Основы молекулярной биологии : в 2-х ч. – Ч. 1. Молекулярная биология клетки / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 304 с.
7. Огурцов А.Н. Основы молекулярной биологии : в 2-х ч. – Ч. 2. Молекулярные генетические механизмы / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 240 с.
8. Огурцов А.Н. Молекулярная биофизика и ферментативный катализ / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 400 с.
9. Огурцов А.Н. Физико-химические основы биотехнологии. Биотермодинамика / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 256 с.
10. Огурцов А.Н. Введение в биоинформатику / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 208 с.
11. Огурцов А.Н. Научные исследования и научная информация / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 400 с.

12. Огурцов А.Н. Молекулярная биотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2012. – 432 с.
13. Огурцов А.Н. Биологические мембраны / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2012. – 368 с.
14. Огурцов А.Н. Информационная биотехнология и фармакоинформатика / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2012. – 160 с.
15. Berg J.M. Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, N.D. Clarke. – New York : W.H. Freeman and Company, 2002. – 572 p.
16. Biosensing using nanomaterials / Ed. by A. Merkoci. – Hoboken : Wiley, 2009. – 505 p.
17. Chemistry of nanocontainers / Ed. by V. Albrecht, F.E. Hahn. – Berlin : Springer, 2012. – 173 p.
18. Dass C. Fundamentals of contemporary mass spectrometry / C. Dass. – Hoboken : Wiley, 2007. – 585 p.
19. Davis F. Macrocycles. Construction, chemistry and nanotechnology applications / F. Davis, S. Higson. – Chichester : Wiley, 2011. – 596 p.
20. Gazit E. Plenty of room for biology at the bottom: Introduction to bionanotechnology / E. Gazit. – Singapore : World Scientific, 2007. – 220 p.
21. Goodsell D.S. Bionanotechnology: Lessons from nature / D.S. Goodsell. – New Jersey : Wiley, 2004. – 337 p.
22. Handbook of biomineralization. Biological aspects and structure formation / Ed. by E. Bauerlein. – Weinheim : Wiley, 2007. – 440 p.
23. Molecular cell biology / H. Lodish, A. Berk, L.S. Zipursky et al. – New York : Freeman, 2003. – 572 p.
24. Nölting B. Methods in modern biophysics / B. Nölting. – Berlin : Springer-Verlag, 2005. – 257 p.
25. Principles of mass spectrometry applied to biomolecules / Ed. by J. Laskin, C. Lifshitz. – Hoboken : Wiley, 2006. – 687 p.
26. Worldwide Protein Data Bank. – Всемирная база данных белков. – Интернет-ресурс. – http://www.wwpdb.org/.
27. Protein nanotechnology. Protocols, instrumentation, and applications / Ed. by T. Vo-Dinh. – Totowa : Humana Press, 2005. – 452 p.

Дополнительная

28. Aldaye F.A. Supramolecular DNA nanotechnology / F.A. Aldaye, H.F. Sleiman // Pure and Applied Chemistry. – 2009. – V. 81. – P. 2157–2181.
29. Bassett D.S. Efficient physical embedding of topologically complex information processing networks in brains and computer circuits / D.S. Bassett, D.L. Greenfield, A. Meyer-Lindenberg et al. // PLoS Computational Biology. – 2010. – V. 6. – P. 1–14.
30. Biomineralization // Reviews in Mineralogy and Geochemistry. – 2003. – V. 54. – P. 1–381.
31. Boggon T.J. Structure and regulation of Src family kinases / T.J. Boggon, M.J. Eck // Oncogene. – 2004. – V. 23. – P. 7918–7927.
32. Braun E. DNA-templated assembly and electrode attachment of a conducting silver wire / E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph // Nature. – 1998 – V. 391. – P. 775–778.
33. Chen R.J. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization / R.J. Chen, Y.G. Zhang, D.W. Wang et al. //. J. Am. Chem. Soc. – 2001. – V. 123. – P. 3838–3839.
34. Chow D.C. Nanofabrication with biomolecules / D.C. Chow, M.S. Johannes, W. Lee et al. // Nano Today. – 2005. – P. 30–39.
35. Crane H.R. Principles and problems of biological growth / H.R. Crane // The Scientific Monthly. – 1950. – V. 70. – P. 376–389.
36. Dahiyat B.I. De novo protein design: Fully automated sequence selection / B.I. Dahiyat, S.L. Mayo // Science. – 1997. – V. 278. – P. 82–87.
37. DeGrado W.F. De novo design and structural characterization of proteins and metalloproteins / W.F. DeGrado, C.M. Summa, V. Pavone et al. // Annual Review of Biochemictry. – 1999. – V. 68. – P. 779–819.
38. Diez S. Stretching and transporting DNA molecules using motor proteins / S. Diez, C. Reuther, C. Dinu et al. // Nano Letters. – 2003. – V. 3. – P. 1251–1254.
39. Egholm M. Peptide nucleic acids (PNA). Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone / M. Egholm, O. Buchardt, P.E. Nielsen, R.H. Berg // J. Amer. Chem. Soc. – 1992. – V. 114. – P. 1895–1897.

40. Ehrlich H. Biological materials of marine origin. Invertebrates / H. Ehrlich. – Dordrecht : Springer, 2010. – 569 p.
41. Gutte B. The synthesis of ribonuclease A / B. Gutte, R.B. Merrifield // The Journal of Biological Chemistry. – 1971. – V. 246. – P. 1922–1441.
42. Heller D.A. Optical detection of DNA conformational polymorphism on single-walled carbon nanotubes / D.A. Heller, E.S. Jeng, T.K. Yeung et al. // Science. – 2006. – V.311. – P. 508–511.
43. Hess H. Biomolecular motors / H. Hess, C.D. Bachand // Materials Today. – 2005. – V. 8. – P. 22–29.
44. Huang S.-C. Carbon nanotube transistor controlled by a biological ion pump gate / S.-C. Huang, A.B. Artyukhin, N. Misra et al. // Nano Letters. – 2010. – V. 10. – P. 1812–1816.
45. Kada G. Atomic force microscopy in bionanotechnology / G. Kada, F. Kienberger, P. Hinterdorfer // Nano Today. – 2008. – V. 3. – P. 12–19.
46. Keren K. Sequence-specific molecular lithography on single DNA molecules / K. Keren, M. Krueger, R. Gilad, G. Ben-Yoseph, U. Sivan, E. Braun // Science. – 2002. – V. 297. – P. 72–75.
47. Königsberger E. Biomineralization – Medical aspects of solubility / E. Königsberger, LanChi Konigsberger. – Chichester : Wiley, 2006. – 284 p.
48. Lang H.P. Cantilever array sensors / H.P. Lang, M. Hegner, C. Gerber // Materials Today. – 2005. – V. 8. – P. 30–36.
49. Luo D. The road from biology to materials / D. Luo // Materials Today. – 2003. – V. 6. – P. 38– 43.
50. Nanda V. Designing artificial enzymes by intuition and computaton / V. Nanda, R.L. Koder // Nature Chemistry. – 2010. – V. 2. – P. 15–24.
51. Nielsen P.E. An introduction to peptide nucleic acid / P.E. Nielsen, M. Egholm // Current Issues Molec. Biol. – 1999. – V. 1. – P. 89–104.
52. Noji N. Direct observation of the rotation of F_1-ATPase / H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida et al. // Nature. – 1997. – V. 386. – P. 299–302.
53. Pastan I. Immunotoxin therapy of cancer / I. Pastan, R. Hassan, D.J. FitzGerald, R.J. Kreitman // Nature Reviews Cancer. – 2006. – V. 6. – P. 559–565.

54. Patolsky F. Actin-based metallic nanowires as bio-nanotransporters / F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner // Nature Materials. – 2004. – V. 3 – P. 692–695.
55. Patolsky F. Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors / F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner // Angew. Chem. Int. Ed. – 2004. – V. 43. – P. 2113–2117.
56. Patolsky F. Nanowire nanosensors / F. Patolsky, C.M. Lieber // Materials Today. – 2005. – V. 8. – P. 20–28.
57. Petka W.A. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins / W.A. Petka, J.L. Harden, K.P. McGrath, D. Wirtz, D.A. Tirell // Science. – 1998. – V. 281. – P. 389–392.
58. Principles of Tissue Engineering / Ed. by R. Lanza, R. Langer, J. Vacanti. – Amsterdam : Elsevier Academic Press, 2007. – 1307 p.
59. Pum D. S-layer proteins as basic building blocks in a biomolecular construction kit / D. Pum, A. Neubauer, E. Györvary, U.B. Sleytr // Nanotechnology. – 2000. – V. 11. – P. 100–107.
60. Pum D. The application of bacterial S-layers in molecular nanotechnology / D. Pum, U.B. Sleytr // TIBTECH. – 1999. – V. 17. – P. 8–12.
61. Reches M. Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes / M. Reches, E. Gazit // Science. – 2003. – V. 300. – P. 625–627.
62. Reches M. Molecular self-assembly of peptide nanostructures: Mechanism of association and potential uses / M. Reches, E. Gazit // Current Nanoscience. – 2006. – V. 2. – V. 105–111.
63. Richardson J.S. Looking at proteins: representations, folding, packing, and design / J.S. Richardson, D.C. Richardson, N.B. Tweedy et al. // Biophysical Journal. – 1992. – V. 63. – P. 1186–1209.
64. Safinya C.R. Cationic liposome-DNA complexes: from liquid crystal science to gene delivery applications / C.R. Safinya, K. Ewert, A. Ahmad et al. // Phil. Trans. of Royal Society A. – 2006. – V. 364. – P. 2573–2596.
65. Sara M. Production and characteristics of ultrafiltration membranes with uniform pores from two-dimensional arrays of proteins / M. Sara, U.B. Sleytr // Journal of Membrane Science. – 1987. – V. 33. – P. 27–49.

66. Scheibel T. Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition / T. Scheibel, R. Parthasarathy, G. Sawicki, X.-M. Lin, H. Jaeger, S.L. Lindquist // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2003. – V. 100. – P. 4527–4532.
67. Shin J.-S. A Synthetic DNA walker for molecular transport / J.-S. Shin, N.A. Pierce // J. Amer. Chem. Soc. – 2004. – V. 126. – P. 10834–10835.
68. Staii C. DNA-decorated carbon nanotubes for chemical sensing / C. Staii, A.T. Johnson, M. Chen, A. Gelperin // Nano Lett. – 2005. – V. 5. – P. 1774–1778.
69. Surwade S.P. Molecular lithography through DNA-mediated etching and masking of SiO_2 / S.P. Surwade, S. Zhao, H. Liu // J. Amer. Chem. Soc. – 2011. – V. 133. – P. 11868–11871.
70. Taniguchi N. On the Basic Concept of "Nano-Technology" / N. Taniguchi // Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo. Part II. – Japan Society of Precision Engineering, 1974.
71. Templeton N.S. Cationic liposome-mediated gene delivery in vivo / N.S. Templeton // Bioscience Reports. – 2002 – V. 22. – P. 283–295.
72. Van Vliet K.J. Probing drug-cell interactions/ K.J. Van Vliet, P. Hinterdorfer // Nano Today. – 2006. – V. 1. – P. 18–25.
73. Walker S. The potential of cucurbit[*n*]urils in drug delivery / S. Walker, R. Oun, F.J. McInnes, N.J. Wheate // Isr. J. Chem. – 2011 – V. 51. – P. 616–624.
74. Xie J. Adding amino acids to the genetic repertoire / J. Xie., P.G. Schultz // Current Opinion in Chem. Biology. – 2005. – V. 9. – P. 548–554.
75. Yan H. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology / H. Yan, X. Zhang, Z. Shen, N.C. Seeman // Nature. – 2002. – V. 415. – P. 62–65.
76. Yurke B. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA / B. Yurke, A.J. Turbefield, A.P. Mills, F.C. Simmel, J.L. Numann // Nature. – 2000. – V. 406. – P. 605–608.
77. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Основные молекулярные генетические механизмы / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2007. – 120 с.

78. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Молекулярные основы генных технологий / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 104 с.
79. Огурцов А.Н. Механизмы ферментативных реакций / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2004. – 75 с.
80. Огурцов А.Н. Механизмы мембранных процессов / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2006. – 139 с.
81. Огурцов А.Н. Молекулярная биология клетки. Основы клеточной организации / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2006. – 169 с.
82. Огурцов А.Н. Основы научных исследований / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 178 с.
83. Огурцов А.Н. Введение в молекулярную биофизику / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 160 с.
84. Огурцов А.Н. Введение в молекулярную биотехнологию / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2008. – 152 с.
85. Огурцов А.Н. Молекулярная биоэнергетика клетки / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2009. – 112 с.
86. Огурцов А.Н. Молекулярная биотехнология клетки / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2009. – 120 с.
87. Огурцов А.Н. Структура, функции и аналитические методы исследования биомембран / А.Н. Огурцов, Н.Ю. Масалитина. – Х. : НТУ "ХПИ", 2010. – 240 с.
88. Огурцов А.Н. Электрогенез биомембран и механизмы мембранной сигнализации / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Х. : НТУ "ХПИ", 2010. – 224 с.
89. Огурцов А.Н. Ферментативный катализ / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2010. – 304 с.
90. Огурцов А.Н. Методы биоинформационного анализа / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2011. – 114 с.
91. Огурцов А.Н. Молекулярная биотехнология микробиологических систем / А.Н. Огурцов. – Х. : НТУ "ХПИ", 2012. – 142 с.
92. Бионанотехнология – Prof. A.N. Ogurtsov. – Интернет-ресурс. – http://sites.google.com/site/anogurtsov/lectures/bnt/.

Содержание

Вступление 3

Раздел 1. Основания бионанотехнологии 5

Глава 1. Нанотехнология и бионанотехнология 5
1.1. Основные концепции 5
1.2. Основные направления развития бионанотехнологии 13
1.3. Бионаномашины 19

Глава 2. Специфика бионаномашин 27
2.1. Особенности строения биогенных макромолекул 27
2.2. Эволюционная специфика строения природных бионаномашин 46
2.3. Эволюционный и инженерный подходы к созданию бионаномашин 49
2.4. Примеры природных бионаномашин 52

Глава 3. Аналитические методы в бионанотехнологии 64
3.1. Методы молекулярной биологии и биотехнологии 64
3.1.1. Технология рекомбинантных ДНК 64
3.1.2. Конструирование ДНК 66
3.1.3. Методы синтеза белков 72
3.1.4. Точечный мутагенез 75
3.1.5. Технология слияния белков 77
3.1.6. Моноклональные антитела 79
3.2. Структурный анализ 82
3.2.1. Рентгеновская кристаллография 82
3.2.2. Электронный парамагнитный резонанс 92
3.2.3. Ядерный магнитный резонанс 98

3.3. Микроскопия 102
3.3.1. Электронная микроскопия 102
3.3.2. Атомно-силовая микроскопия 107
3.3.3. Туннельная микроскопия 113
3.4. Масс-спектрометрия 116
3.4.1. Ионизация образцов 117
3.4.2. ESI и MALDI 119
3.4.3. Анализаторы масс 121
3.4.4. Детектирование сигнала 129
3.5. Биофизические нанотехнологии 132
3.5.1. Матрицы кантилеверов 132
3.5.2. Измерение внутримолекулярных сил в белках 134
3.5.3. Детектирование молекулярного узнавания 136
3.5.4. Использование фуллеренов и нанотрубок 139
3.6. Моделирование бионаноструктур 150
3.6.1. Моделирование макромолекул 150
3.6.2. Предсказание структуры и функций макромолекул 152
3.6.3. Предсказание белкового фолдинга 153
3.6.4. Моделирование докинга молекул 156
3.6.5. Моделирование новых функций молекул 159

Раздел 2. Структурные принципы бионанотехнологии 163

Глава 4. Структура и стабильность биомолекул 163
4.1. Роль среды в формировании биомолекул 163
4.2. Принцип иерархичности в создании бионаномашин 166
4.3. Структурные особенности ковалентных связей в биомолекулах 169
4.4. Структурные особенности нековалентных взаимодействий 175
4.5. Роль гидрофобного эффекта в формировании структуры биомолекул 188
4.6. Комбинаторный характер молекулярного разнообразия 191

Глава 5. Фолдинг белков 194
5.1. Принцип формирования стабильных структур в результате белкового фолдинга 194
5.2. Принцип иерархичности при белковом фолдинге 196
5.3. Принципы позитивного и негативного дизайна 200
5.4. Механизмы регуляции фолдинга 203
Глава 6. Самоассемблирование и самоорганизация 208
6.1. Принцип локального упрочнения биоструктур 208
6.2. Принцип контролируемого разупорядочения структуры 210
6.3. Принципы самоассемблирования биообъектов 213
6.4. Использование симметрии при самоассемблировании 217
6.5. Использование точечных групп симметрии при формировании биоструктур 222
6.6. Использование пространственной симметрии при формировании биоструктур 225
6.7. Использование квазисимметрии при формировании биоструктур 231
Глава 7. Формирование молекулярных комплексов 235
7.1. Использование молекулярной толчеи при ассемблировании биомолекул 235
7.2. Самоорганизация и биомембраны 238
7.3. Принцип молекулярного узнавания при формировании структуры биообъектов 244
7.4. Примеры реализации молекулярного узнавания при формировании биоструктур 248
7.5. Роль атомной дискретности в структуре биомолекул 253
7.6. Использование структурной гибкости биомолекул 257
Раздел 3. Функциональные принципы бионанотехнологии 266
Глава 8. Информационно-управляемое наноассемблирование 266
8.1. Информационно-управляемое ассемблирование бионаномашин 266
8.2. Информационная функция нуклеиновых кислот в ассемблировании бионаномашин 269

8.3. Рибосома как информационно-управляемый наноассемблер 274
8.4. Компактность хранения информации в ДНК 278
Глава 9. Бионаноэнергетика 280
9.1. Энергопитание бионаномашин 280
9.2. Функциональная роль топливных молекул в биосистемах 282
9.3. Поглощение света специализированными малыми молекулами в биосистемах 286
9.4. Бионаноэлектрические цепи переноса электронов 289
9.5. Электропроводность и перенос заряда в ДНК 294
9.6. Электрохимический градиент на биомембранах как источник энергопитания бионаносистем 296
Глава 10. Бионанотрансформации и регулирование 299
10.1. Особенности химических нанотрансформаций 299
10.2. Принципы химических нанотрансформаций в биосистемах 306
10.3. Функциональные особенности регуляции бионаносистем 312
10.4. Функциональные особенности аллостерической регуляции 313
10.5. Функциональные особенности регуляции бионаносистем ковалентными модификациями 317
Глава 11. Биоматериалы 321
11.1. Спиральное ассемблирование биоматериалов 322
11.2. Функциональные особенности формирования фибриллярных микроструктур 330
11.3. Биоминерализация тканей 336
11.4. Функциональные особенности формирования эластичных биоматериалов 345
11.5. Функциональные особенности формирования адгезивных биоматериалов 348

Глава 12. Бионанотранспорт 353
12.1. Функциональные особенности строения линейных АТФ-моторов 353
12.2. Функциональные особенности строения вращательных моторов 361
12.3. Применение броуновского решета для использования энергии теплового движения 370
12.4. Функциональные принципы трансмембранного транспорта 373
12.5. Функциональные принципы действия мембранных ABC-транспортёров 376
12.6. Функциональные принципы действия протонной помпы бактериородопсина 379
Глава 13. Биомолекулярная сенсорика и саморепликация 383
13.1. Функциональные принципы биомолекулярной сенсорики 383
13.2. Функциональные особенности светосенсорики 385
13.3. Функциональные особенности механочувствительности 386
13.4. Бактериальный механизм детектирования химического градиента 388
13.5. Принцип саморепликации в бионанотехнологии 389
13.6. Бионанотехнология машинной фазы вещества 393
Раздел 4. Использование бионанотехнологии 401
Глава 14. Нанотехнологии 401
14.1. Белковая инженерия 401
14.2. Нестандартные аминокислоты 408
14.3. Пептидные нуклеиновые кислоты 412
14.4. Нанотехнология белковых S-слоёв 414
14.5. ДНК нанотехнологии для электроники 416
14.6. Фибриллярная металлизация 420
14.7. Молекулярные наноконтейнеры 425

Глава 15. Наномедицина 433
15.1. Задачи наномедицины 433
15.2. Иммунотоксины 436
15.3. Липосомы 438
15.4. Применение нанонитей для биологической детекции 443
Глава 16. Бионаноматериалы 450
16.1. ДНК-материалы 450
16.2. Молекулярные моторы 455
16.3. Перспективы бионанотехнологий 460
Список литературы 467

Навчальне видання

ОГУРЦОВ Олександр Миколайович

БІОНАНОТЕХНОЛОГІЯ
ПРИНЦИПИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ

Навчальний посібник
з курсів «Молекулярна біофізика» та «Біонанотехнологія»

для студентів напряму підготовки «Біотехнологія»,
в тому числі для іноземних студентів

Російською мовою

Відповідальний за випуск *М.Ф. Клещев*
Роботу до видання рекомендувала *М.Г. Зінченко*
В авторській редакції

План 2012 р., поз. 136/94-12.

Підп. до друку 27.06.2012 р. Формат 60×84 1/16. Папір офісний. Riso-друк.
Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 27,9. Наклад 300 прим.
Зам. № 173. Ціна договірна

Видавець і виготовлювач
Видавничий центр НТУ «ХПІ»,
вул. Фрунзе, 21, м. Харків-2, 61002

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3657 від 24.12.2009 р.

Пособие включает необходимые при изучении молекулярной биофизики и бионанотехнологии сведения о специфических особенностях строения и принципах функционирования, разработки и применения нано- и бионаномашин в соответствии с программой подготовки студентов направления «Биотехнология».

Предназначено для студентов специальностей биотехнологического профиля всех форм обучения.

ISBN 978-617-05-0005-2