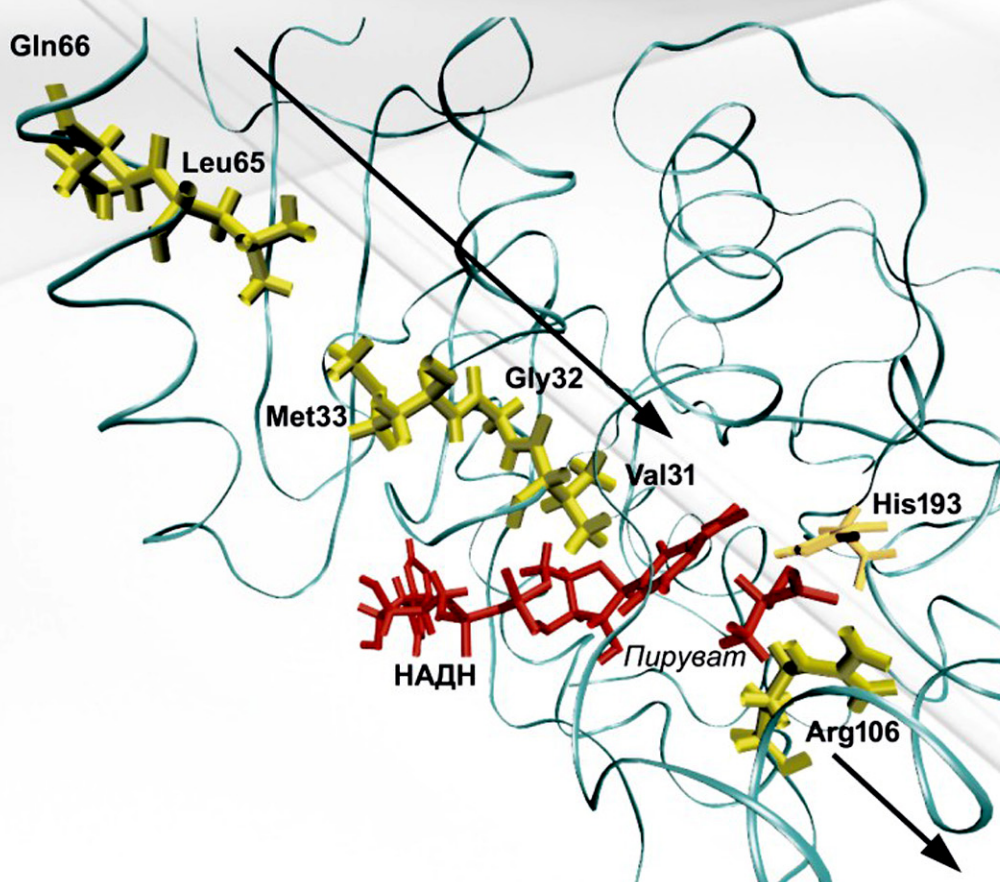


А. Н. Огурцов, О. Н. Близнюк, Н. Ю. Масалитина

БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ и НАНОБИОФИЗИКА

2 часть Функционирование бионаносистем



Учебное пособие

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
«Харьковский политехнический институт»

А. Н. Огурцов, О. Н. Близнюк, Н. Ю. Масалитина

БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯ И НАНОБИОФИЗИКА

Учебное пособие по курсам
«Бионанотехнология и нанобиофизика», «Нанобиотехнология»,
«Бионанотехнология, нанобиофизика и нанофармация», «Современные
проблемы нанофармации» и «ДНК-нанотехнологии»
для студентов специальности «Биотехнологии и биоинженерия»,
в том числе для иностранных студентов

В двух частях

Часть 2

Функционирование бионаносистем

Утверждено
редакционно-издательским
советом университета,
протокол № 2 от 17.06.2019 г.

Харьков
НТУ «ХПИ»
2019

Рецензенты:

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

В. В. Россихин, д-р мед. наук, профессор кафедры общей, детской и
онкологической урологии, Харьковская медицинская академия
последипломного образования МОЗ Украины

Посібник включає необхідні при вивченні біонанотехнології, нанобіофізики, нанофармації та ДНК-нанотехнологій відомості про принципи функціонування, розробки, моделювання, застосування та методи дослідження біонаносистем відповідно до програми підготовки студентів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія».

Призначено для студентів спеціальностей біотехнологічного профілю всіх форм навчання.

Огурцов А. Н.

О 39 Бионанотехнология и нанобиофизика: учеб. пособие : в 2-х ч. – Ч. 2. : Функционирование бионаносистем / А. Н. Огурцов, О. Н. Близнюк, Н. Ю. Масалитина. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2019. – 288 с. – На рус. яз.

ISBN 978-617-7602-67-4

Пособие включает необходимые при изучении бионанотехнологии, нанобиофизики, нанофармации и ДНК-нанотехнологий сведения о принципах функционирования, разработки, моделирования, применения и методах исследования бионаносистем в соответствии с программой подготовки студентов специальности «Биотехнологии и биоинженерия».

Предназначено для студентов специальностей биотехнологического профиля всех форм обучения.

Ил. 176. Библиогр.: 111 назв.

УДК 577

© Огурцов А. Н., Близнюк О. Н.,
Масалитина Н. Ю., 2019

ISBN 978-617-7602-67-4

ВСТУПЛЕНИЕ

Бионанотехнология – это раздел нанотехнологии, в котором необходимые атомные перестройки осуществляются с использованием принципов, методов и способов, подсказанных биологией. Предметом нанобиофизики являются физические взаимодействия в биологических системах на наноуровне. Именно нанобиофизика определяет специфику разработки технологий манипулирования отдельными биомолекулами и разработки интерфейсных поверхностей между биомолекулами и наночастицами, детерминирует методологию создания новых бионаноструктур и изучения их свойств, определяет спектр потенциально возможных биоподобных наноустройств и специфику их использования как в инженерии, так и в медицине и фармации.

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.

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 наномашин, 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 нано-биоустройств – 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 нанобиофизические принципы, на которых построены биологические наномашин, и внедрять эти принципы в нанoeлектронику, наномедицину, нанофармацию, в пищевые, сельскохозяйственные и экологические технологии.

Вторая часть учебного пособия посвящена знакомству как с основными принципами функционирования, разработки и моделирования бионаносистем, так и с механизмами создания структур и функциональных комплексов на атомно-молекулярном уровне с использованием биологических прототипов. Приведены концептуально значимые примеры конструирования искусственных бионаносистем, описаны основные принципы наиболее существенных методов исследования бионаносистем. Научную основу бионанотехнологии составляют биофизика, биохимия, биофизическая химия, молекулярная биология, биоинформатика и молекулярная биотехнология.

Настоящее пособие подготовлено на основе исправленного и дополненного пособия [1] и работ [2–111], послуживших также источником иллюстраций, адаптированных таким образом, чтобы максимально облегчить усвоение принципов бионанотехнологии при изучении курсов «Бионанотехнология и нанобиофизика», «Нанобиотехнология», «Бионанотехнология, нанобиофизика и нанофармация», «Современные проблемы нанофармации» и «ДНК-нанотехнологии» студентам специальности «Биотехнологии и биоинженерия» всех форм и уровней подготовки.

РАЗДЕЛ 3

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПРИНЦИПЫ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ

Глава 11

Информационно-управляемое наноассемблирование

11.1. 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 бионаномашин. 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 бионаномашин, 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 природные бионаномашин 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 решётку (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 (*информационно-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. Ноутбуки, смартфоны 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. В то же время, 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 (дублирования) и восстановления повреждённых «чертежей», и молекулярные устройства для использования (чтения) этой информации для синтеза белков. Вся эта система работы с генетической информацией настолько надёжна, 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 бионаномашин.

11.2. ИНФОРМАЦИОННАЯ ФУНКЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В АССЕМБЛИРОВАНИИ БИОНАНОМАШИН

«Технологические инструкции» для процесса биосинтеза белков хранятся в молекулах ДНК. Информация закодирована последовательно-

стью *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 А и В, соединённый дисульфидными мостиками (см. рисунок 6.11). Фрагмент генома человека, в котором закодирован инсулин, показан на рисунке 11.1. Он содержит два участка (2) и (5), кодирующих две полипептидные цепи, входящие в молекулу инсулина, разделённые некодирующим сегментом.

```

саагсaggtc tgttccaagg gcctttgcgt cagggtgggt cagggttcca ggggtggctgg
acccagggcc ccagctctgc agcagggagg acgtggctgg gctcgtgaag catgtggggg
tgagccagg ggccccaagg cagggcacct ggccttcagc ctgcctcagc cctgcctgtc
tcccagatca ctgtccttct gccATGGCCC TGTGGATGCG CCTCCTGCC CTGCTGGCGC
TGTGGCCCT CTGGGACCT GACCCAGCCG CAGCCTTTGT GAACCAACAC CTGTGGGGCT
CAGACCTGGT GGAAGCTCTC TACCTAGTGT GCGGGGAACG AGGCTTCTTC TACACACCCA
AGACC CGCG GAGGCGAGAG GACCTGCAGG gtgagccaac cgccattgc tgccctggc
cgcccccagc caccctctgc tcctggcgt cccaccagc atgggcagaa gggggcagga
ggctgccacc cagcaggggg tcagggtcac ttttttaaaa agaagttctc ttggtcacgt
cctaaaagtg accagctccc tgtggccag tcagaatctc agcctgagga cgggtgtggc
ttcggcagcc ccgagatata tcagaggggt ggacagctcc tccctccact cgccctcaaa
acaaatgccc cgcagcccat ttctccacc tcatttgatg accgcagatt caagtgtttt
gttaagtaaa gtctgtgggt acctgggtgc acaggggtgc ccacgctgcc tgccctctgg
cgaacacccc atcacgccc gaggaggcgt tggctgcctg cctgagtggt ccagaccctc
gtcgccagcc tcacggcagc tccatagtca ggagatgggt aagatgctgg ggacaggccc
tggggagaag tactgggatc acctgttcag gctccactg tgacgctgcc cggggcgggg
ggaaggaggt gggacatgtg ggcgttgggt cctgtaggtc cacaccagc gtgggtgacc
ctccctctaa cctgggtcca gcccggtgg agatgggtgg gagtgcgacc tagggctggc
gggcaggcgg gcaactgtgc tccctgactg tgtcctcctg gtgcctcctg cctcgccgct
gttcgggaac ctgctctgcg cggcacgtcc tggcagTGGG GCAGGTGGAG CTGGGCGGGG
GCCCCGCTGC AGGCAAGCCTG CAGCCTTTGG CCCTGGAAGG GTCCCTGCAG AAGCGTGGA
TTGTGGAACA ATGCTGTACC AGCATCTGCT CCCTTACCA GCTGGAGAAC TACTGCAACT
AGacgcagcc tgacggcagc cccacaccgg ccgcctcctg caccgagaga gatggaataa
agcccttgaa ccagccctgc tgtgccgtct gtgtgtcttg ggggcccctg gccaagcccc
acttcccggc actgttgtga gccctcccca gctctctcca cgctctctgg gtgcccacag
gtgccaacgc cggccaggcc cagcatgcag tggctctccc caaagcggcc atgcctgttg
gctgctgct gcccccaccc tgtggctcag ggtccagtat gggagcttcg ggggtctctg

```

Рисунок 11.1 – 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. п. 15.5). Средний фрагмент, образующийся из участков (3) и (4) необходим для

правильного самоасSEMBЛИРОВАНИЯ инсулина. Этот участок вырезается после завершения фолдинга. Финальный TAG-кодон участка (5) является стоп-кодоном. Схема молекулы инсулина, содержащего две полипептидные цепи, показана на рисунке 6.10.

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 тиминном (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 4.2). *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 полимеразы были эффективными, 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 *пруффридинга* (см. п. 7.3). Работа полимеразы значительно улучшается, если на время синтеза она дополнительно фиксируется на молекуле ДНК специальным белковым «захватом», например, белком PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (рисунок 11.2), который фиксирует на ДНК полимеразу Polδ в репликационной вилке вируса SV40 (см. [7], п. 6.2).

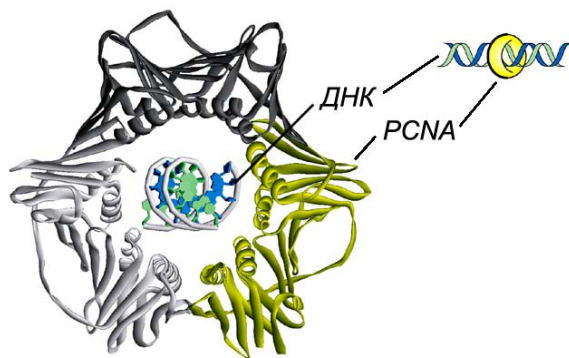


Рисунок 11.2 – Схема белка PCNA, выполняющего функцию захвата ДНК

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 «прочитать» 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 *технология 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 процессинга РНК, 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.

11.3. РИБОСОМА КАК ИНФОРМАЦИОННО-УПРАВЛЯЕМЫЙ НАНОАССЕМБЛЕР

Информационно-управляемым молекулярным наноассемблером, осуществляющим синтез белка, является рибосома (рисунок 11.3). Она осуществляет синтез белка согласно информации, записанной в мРНК. Этот процесс является достаточно сложным, поскольку информационный генокод не сводится к химическому коду.

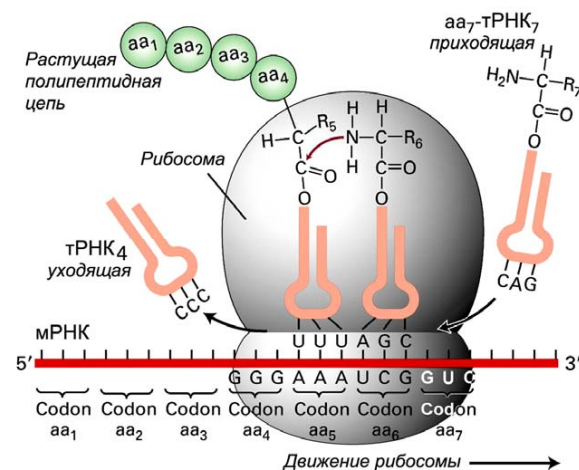


Рисунок 11.3 – Трансляция на рибосоме: aa – аминокислоты (amino acids); R – аминокислотные остатки

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 словарём являются транспортные РНК (тРНК).

L-образные молекулы тРНК (рисунок 11.4) 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).

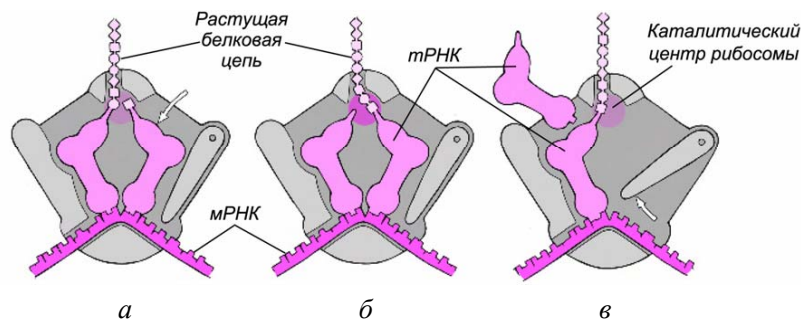


Рисунок 11.4 – Схема работы рибосомы: а – связывание тРНК с кодоном мРНК, б – присоединение аминокислоты к растущей белковой цепи, в – транслкация рибосомы на один кодон, сброс «пустой» тРНК и экспонирование следующего кодона.

В природных системах генетический код является *последовательным, непрерывным и триплетным* (см. [7], п. 4.2). 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 (см. п. 17.2), модификация генетического кода уже сейчас используется для нанотехнологических нужд.

Рибосома является очень сложной бионамашиной 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 11.3). 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 11.4. Процесс биосинтеза «обслуживается» десятками белков, которые *инициируют* её начало, *стимулируют* элонгацию, и *терминируют* трансляцию в конце гена. Атомная схема строения рибосомы (см. рисунок 4.3) демонстрирует, как приблизительно должен выглядеть такой молекулярный ассемблер, предназначенный для создания молекул с атомной точностью в соответствии с заданной программой.

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. Используемые тРНК *удаляются* из рибосомы факторами элонгации G, которые механически (используя энергию гидролиза АТФ) выталкивают тРНК, сдвигая рибосому на один кодон (рисунок 11.4(в)).

Для каждой аминокислоты имеется специфический фермент *аминоацил-тРНК-синтетаза*, который присоединяет эту аминокислоту к соответствующей тРНК (рисунок 11.5).

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 terminаций 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.

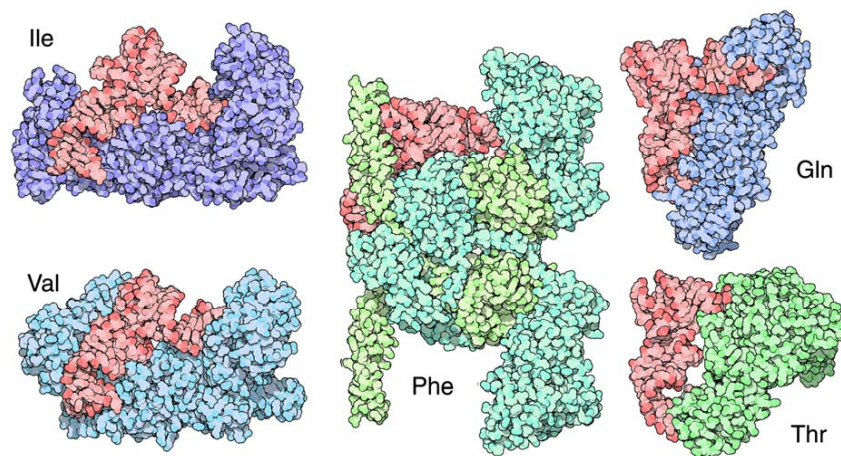


Рисунок 11.5 – Пять из двадцати аминокислотных тРНК-синтетаз, используемых в процессе биосинтеза белков – для изолейцина, валина, фенилаланина, глутамина и треонина. Розовые субъединицы – это соответствующие тРНК

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.

11.4. 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 несёт 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 12

Бионаноэнергетика

12.1. 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 разделённых 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 бионаномшины 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 сопряжённой 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.

12.2. 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 всё же остаётся 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 запасаания энергии.

Например, *ацетилен* ($\text{H}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$) 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 12.1(а)) и *нитроглицерин* (рисунок 12.1(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. Молекулы тринитротолуола и нитроглицерина сложно синтезировать, но легко разрушить.

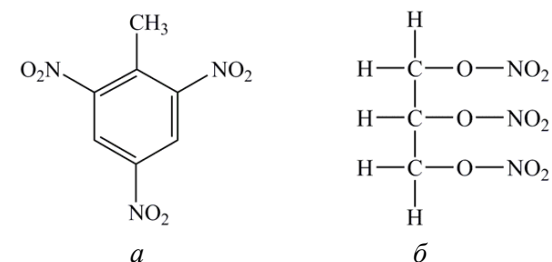


Рисунок 12.1 – Топливные молекулы: а – 2,4,6-тринитротолуол (ТНТ, тротил); б – нитроглицерин (тринитрат глицерина)

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 бионаномашинны, которые используют топливные молекулы. Молекулы ацетилена или ТНТ *не имеют* таких кронштейнов, поэтому они годятся только для высвобождения энергии изотропно *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 распространённой биологической топливной молекулой (рисунок 12.2).

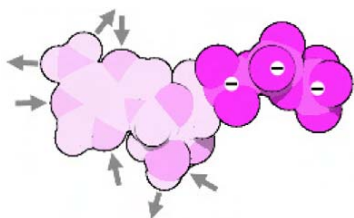


Рисунок 12.2 – Схема молекулы АТФ. Стрелками указаны положение и направление водородных связей, которые могут быть образованы для распознавания аденинового кольца

Существует несколько способов получения АТФ, например, при гликолизе, в процессах субстратного и окислительного фосфорилирования или при фотосинтезе за счёт энергии поглощённого света. 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. Адениновое 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. 7.3.

Другой пример, фермент аспартил-тРНК-синтаза использует АТФ для активации реакции присоединения аминокислоты (аспарагиновая

кислота) к тРНК (рисунок 12.3). Фермент начинает присоединять к себе тРНК, АТФ и аминокислоту. Затем, как показано на рисунке 12.3, фермент соединяет аминокислоту с АТФ, при этом высвобождаются две фосфатные группы в виде пиррофосфата. И, наконец, фермент переносит аминокислоту на тРНК. Гидролиз АТФ и даёт ту энергию, которой не хватает для протекания этой реакции.

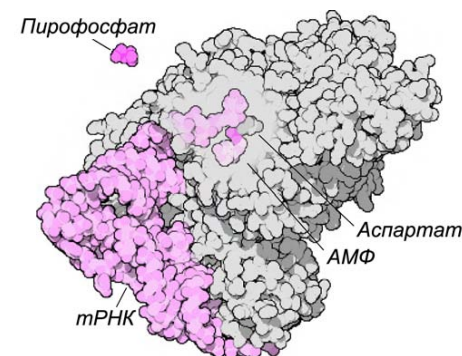


Рисунок 12.3 – Фермент аспартил-тРНК-синтаза

АТФ также используется для *генерации механического импульса* молекулами *миозина* в клетках мышц (рисунок 12.4).



Рисунок 12.4 – Схема молекулы миозина с молекулой АТФ внутри

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).

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.

12.3. 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 *высокоэнергетических* электронов, которые затем и используются в качестве источника энергии. Реакционные центры содержат *наборы кофакторов* – хлорофиллы, филлохиноны, и кластеры атомов железа и серы – которые и выполняют работу по генерации электронов.

Фотосинтетический центр, который показан на рисунке 12.5, расположен в мембране *цианобактерии*. Он использует *специальную пару молекул хлорофилла* (показаны сиреневым цветом в центре молекулы) для генерации высокоэнергетического 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 возбуждённый электрон *уводится* от хлорофилла *по эстафете* вдоль цепи *электронных акцепторов* – кофакторов *филлохинонов* и трёх *железо-серных кластеров* (путь показан стрелками).

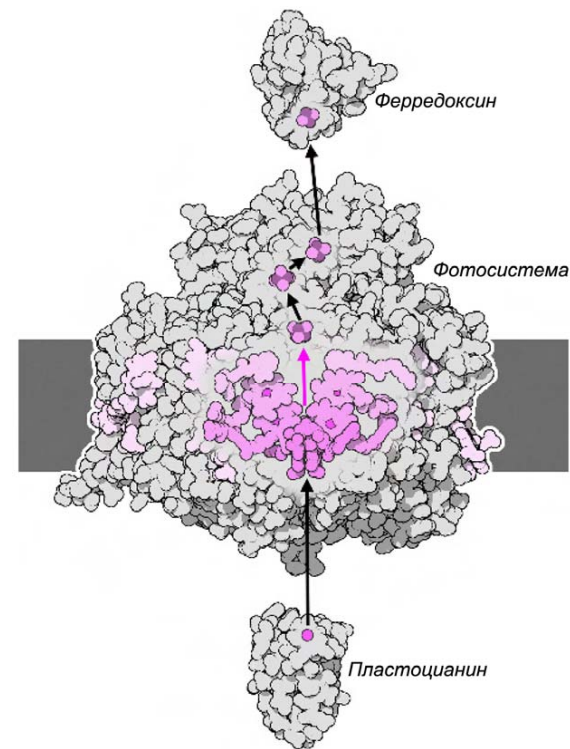


Рисунок 12.5 – Фотосинтетический реакционный центр цианобактерии

В конце концов, электрон помещается на водорастворимый белок-переносчик такой, как металлопротеин *ferredоксин*, с тем, чтобы быть отнесённым к месту использования. Затем белок *пластоцианин*, показанный внизу рисунка 12.5, передаёт свой низкоэнергетичный электрон реакционному центру (см. [15], п. 11.3). В итоге мы имеем перенос электрона от низкоэнергетического источника (пластоцианина) к высокоэнергетич-

ному переносчику (ферредоксину). В большинстве фотосинтетических организмов источником электрона является молекула *воды*, которая окисляется до молекулярного кислорода (см. [15], п. 11.4). Электрон возбуждается в фотосинтетическом центре, затем помещается на металлопротеин для перемещения его в необходимое место системы.

Фотосинтетические центры также содержат эффективные молекулы, которые поглощают свет и доставляют его к реакционному центру. На рисунке 12.6 изображён светособирающий антенный комплекс цианобактерии, в который встроены три реакционных центра (те же, что и на рисунке 12.5, только вид сверху).

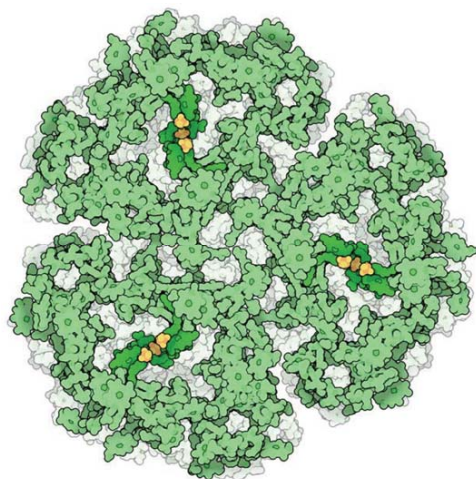


Рисунок 12.6 – Светособирающий антенный комплекс цианобактерии (вид сверху)

Фотосистема состоит из трёх идентичных субъединиц, каждая из которых имеет собственный фотосинтетический центр и собственную цепь отвода высокоэнергетических электронов (показаны тёмно-зелёным цветом). Окружающие их десятки молекул *хлорофилла* и *каротиноидов* работают как *светособирающая антенна*, поглощая свет разных длин волн и передавая энергию от молекулы к молекуле (резонансным переносом энергии) к реакционным центрам субъединиц.

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. 15.4) изменяет форму глобулы, когда поглощает свет.

12.4. 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 счёт 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 бионанoeлектрических цепей (*bionanocircuits*).

Такой процесс называется *перенос заряда* (*charge transfer*) или *передача заряда*. Перенос одиночных электронов вдоль сложных цепей переноса широко распространён в биологических системах, поэтому мы

имеем много эффективно функционирующих и наглядных примеров, которые и следует использовать в качестве прототипов при разработке наших собственных (искусственных) бионанoeлектрических цепей.

Некоторые примеры компонентов бионанoeлектрических цепей представлены на рисунке 12.7. Прежде всего, это малые органические молекулы, которые переносят электрон от точки к точке, от узла к узлу бионанoeлектрической 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.

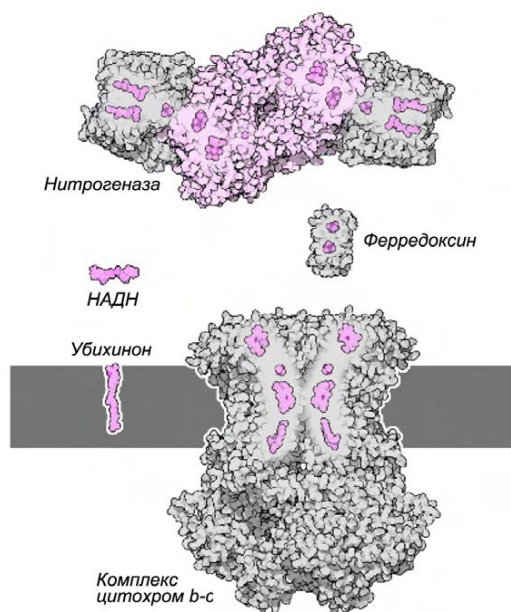


Рисунок 12.7 – Примеры компонентов бионанoeлектрических цепей

Примерами таких больших бионаномашин, «питающихся» электронами, являются *цитохромный комплекс b-c₁* и фермент *нитрогеназа*

(см. [20], с. 7–20), которые катализируют окислительные реакции. Эти белки используют разнообразные простетические группы для осуществления переноса электронов. На рисунке 12.8 изображена схема электронно-транспортной цепочки, которая представляет собой бионанoeлектрическую цепь, которая сопрягает перенос электронов с процессом формирования градиента протонов.

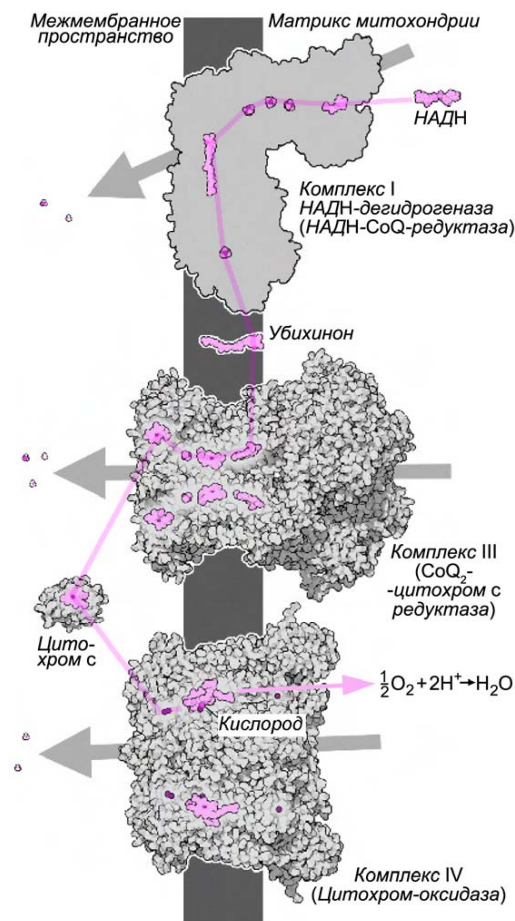


Рисунок 12.8 – Бионанoeлектрическая цепь сопряжения электронного транспорта с созданием протонного градиента (дыхательная цепь)

Высокоэнергетичные электроны, которые получаются в процессе окисления глюкозы, доставляются в бионанозлектрическую цепь молекулами НАДН. Затем поток электронов проходит через три больших мембранных *насоса*. Электроны переносятся между насосами малыми мобильными переносчиками: *убихиноном* (CoQ) и *цитохромом* с. 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 12.8 серыми стрелками. В конце этой бионанозлектрической цепи электроны связываются молекулами кислорода с последующей конверсией их в молекулы воды.

Эти примеры демонстрируют общие свойства бионанозлектрических 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 бионанозлектрической цепи. Каждый акцептор электрона имеет характерный *восстановительный потенциал*, который количественно описывает его сродство к электрону. Белковое окружение простетических групп в бионанозлектрических цепях может в сотни и тысячи раз *изменять* величину восстановительного 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 (см. [15] п. 6.3). Если необходимо перенести электрон *на большие расстояния*, то используется набор 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*.

12.5. 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 всё ещё активно изучаются. В ходе исследований 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.

12.6. 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 *компарменты*, 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 распростра-

нённным 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 12.9 представлена схема *циклического фосфорилирования*, при котором поглощённый свет используется для синтеза АТФ, и на примере которого можно рассмотреть типичные энергетические технологии, используемые природой.

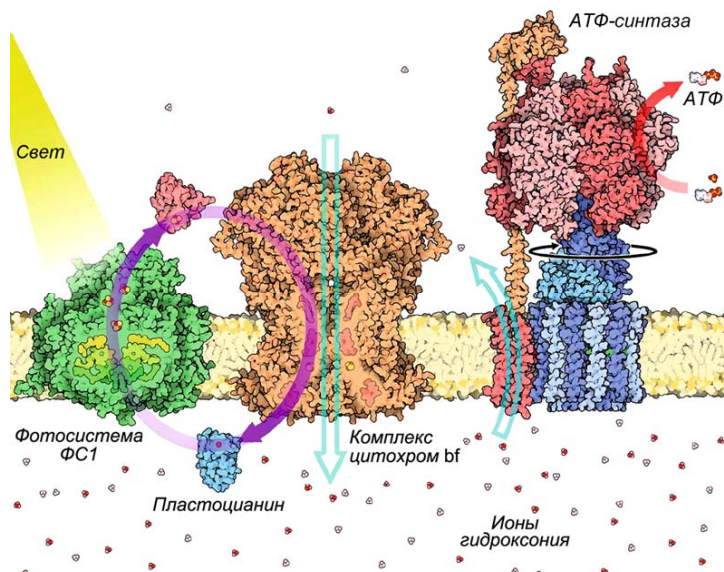


Рисунок 12.9 – Схема процесса циклического фосфорилирования

Свет поглощается фотосистемой и используется для генерации высокоэнергетических электронов. Эти электроны переносятся белком *ферредоксин* на протонную помпу (комплекс *цитохром bf*), которая и создаёт электрохимический градиент протонов. Таким образом, протонный градиент создаётся за счёт энергии потока высокоэнергетических 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 изменяет 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, решаемые транспортом 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 аккумуляции электрической энергии на конденсаторах и в биосистемах?

Глава 13

Бионанотрансформации и регулирование

13.1. 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 удаётся избежать образования побочных продуктов реакции, конкурирующих с необходимыми продуктами. 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 промышленные 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.

Для примера рассмотрим примера функционирование фермента *триозофосфатизомеразы*, который представляет собой димер, состоящий из двух идентичных субъединиц, каждая из которых имеет свой активный центр, в котором связывается молекула субстрата (рисунок 13.1).

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.

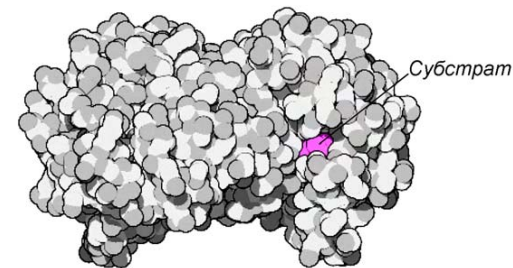


Рисунок 13.1 – Фермент триозофосфатизомеразы

Триозофосфатизомеразы катализируют реакцию *изомеризации*, удаляя два атома водорода от *дигидроксиацетон-фосфата*, а затем добавляя такие же два атома водорода в другие позиции в молекуле, образуя *глицеральдегид-3-фосфат* (рисунок 13.2).

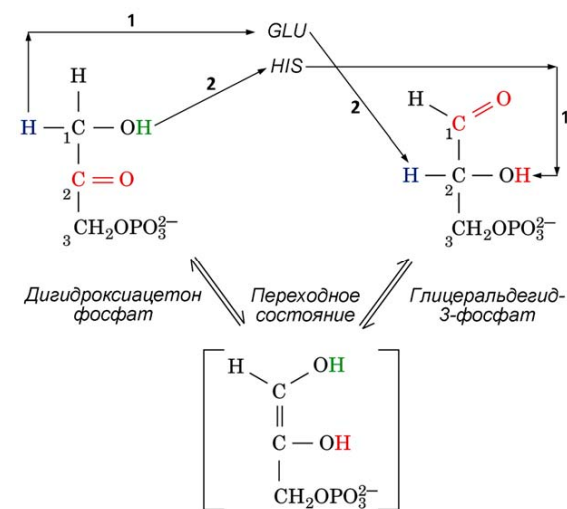


Рисунок 13.2 – Схема реакции изомеризации, катализируемая ферментом триозофосфатизомеразой

Реакция осуществляется в два этапа. На первом этапе, изображённом в верхней части рисунка 13.3, глутаминовая кислота *принимает* на себя один из атомов водорода от субстрата, а гистидин *добавляет* к молекуле субстрата другой атом водорода.

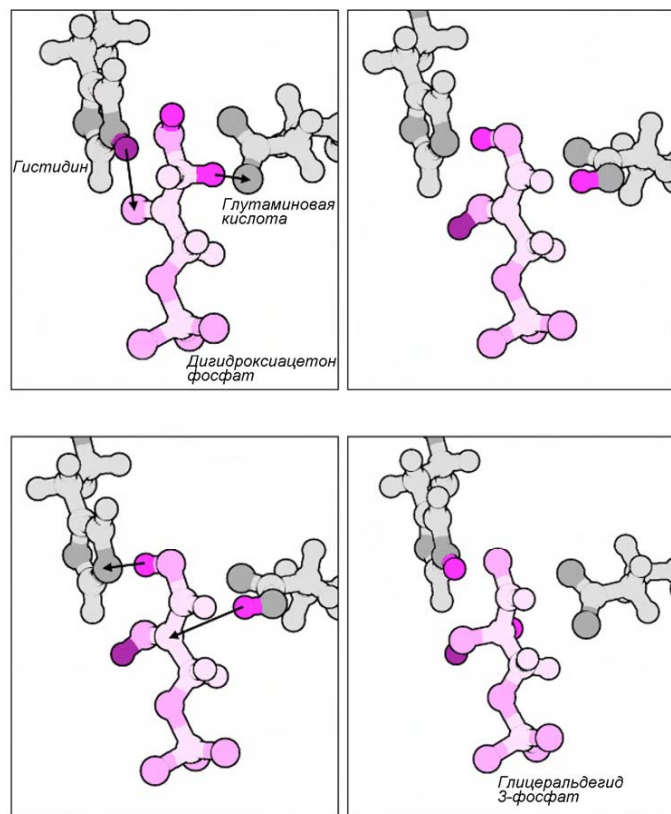


Рисунок 13.3 – Схема реакции изомеризации, катализируемая ферментом триозофосфатизомеразой

На втором этапе, изображённом в нижней части рисунка 13.3, 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. 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 13.4(а)).

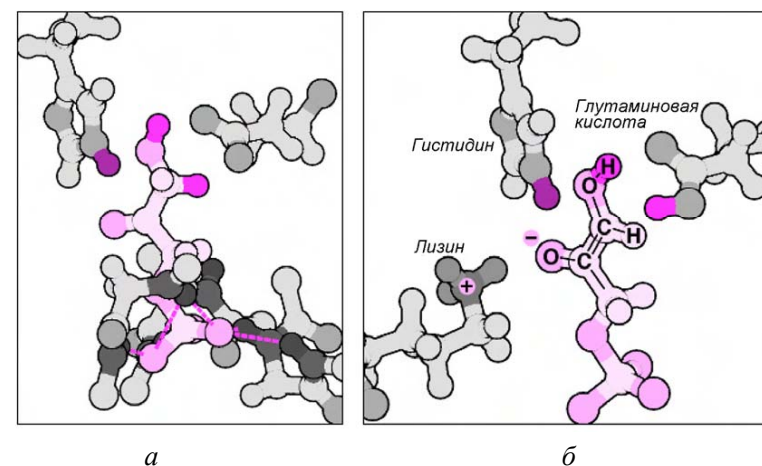


Рисунок 13.4 – Схемы: а – ориентации субстрата в ферменте; б – стабилизации переходного состояния

Фосфатная группа молекулы субстрата *точно позиционируется* в этом кармане благодаря системе водородных связей с окружающими аминокислотами (показаны пунктиром на рисунке 13.4), 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 13.4(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 13.5 показана схема синтеза пенициллина из исходного пирувата, который реализуется во многих бактериях. Две молекулы пирувата превращаются в аминокислоту валин за четыре этапа.

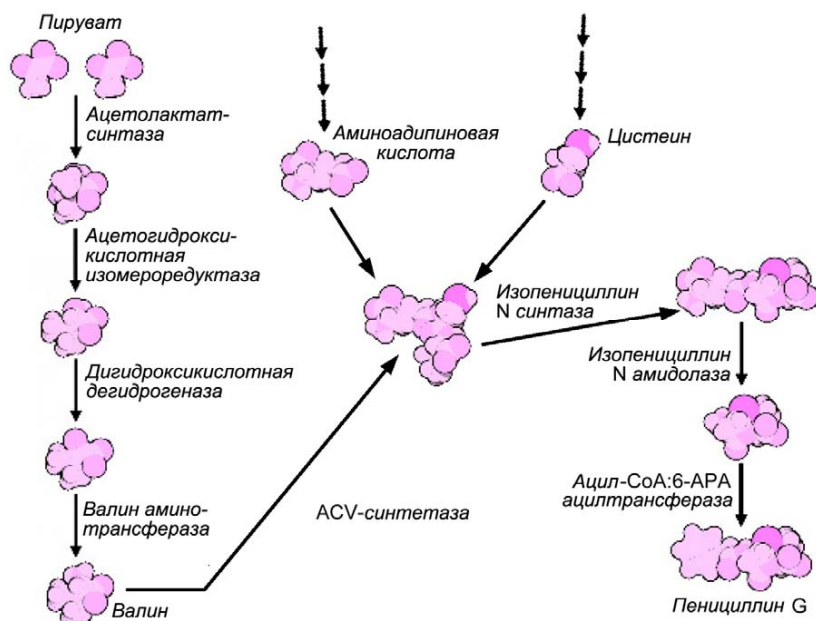


Рисунок 13.5 – Схема бактериального синтеза пенициллина

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.

Бионаномшины 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 отсчёта, 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 твёрдый. 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 счёт двух факторов:

- 1) облегчая его формирование из исходного состояния субстрата;
- 2) облегчая преобразование субстрата именно в необходимые продукты.

Так в примере с карандашом, если ногтем 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» ногтем 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.

13.2. 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 химических реакций;
- 2) химическая стабилизация переходного состояния;
- 3) использование специализированных химических инструментов.

Трёхмерные структуры тысяч ферментов, расшифрованных на сегодняшний день, хранятся в Базе Данных Белков [63]. 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 большей 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 своём 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 на 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 рвётся, и фермент возвращается в исходное состояние (см. [15] п. 4.2).

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 идём 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 13.6 приведены примеры таких молекул.

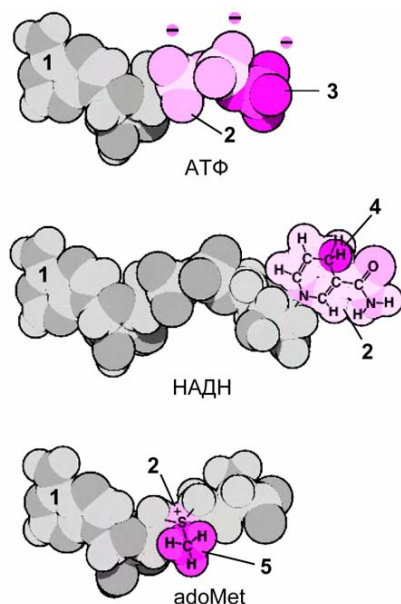


Рисунок 13.6 – Некоторые малые молекулы – переносчики химических групп. На рисунке показаны: 1 – аденин; 2 – участки молекул, которые легко отдают химические группы 3–5; 3 – фосфат-ион; 4 – гидрид-ион H^- ; 5 – метильная группа

Серым цветом показаны «носители» на основе аденина (1), которые служат для распознавания этих молекул и фиксированного связывания их с ферментами. Розовым цветом показаны те участки молекул (2), которые

легко отдают химические группы (3,4,5), а сами эти группы (3,4,5) показаны сиреневым цветом. АТФ (АТР) легко отдаёт *фосфат* (3), поскольку существует электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными фосфатными группами. *Никотинамидадениндинуклеотид*, НАД (NAD), переносит *гидридион* (H^- , атом водорода с дополнительным электроном). Уход гидрид-иона с НАД (реакция $НАДН \rightarrow НАД^+$) 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, присоединённые 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* (см. [20], с. 7–20).

13.3. МОДЕЛИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ НАНОТРАНСФОРМАЦИЙ

Современная молекулярная биофизика, используя эмпирические результаты исследований процессов ферментативного катализа, предлагает

целый спектр моделей, позволяющих как объяснять, так и прогнозировать механизмы ферментативных реакций.

Наиболее простыми для моделирования являются ферментативные реакции с переносом протона. Оказалось, что для расшифровки специфических механизмов конкретных биохимических реакций необходимо использовать такой физический процесс, как квантовое туннелирование протона. Именно процесс туннелирования зачастую способен объяснить связь между пространственным перемещением протона и ферментативной активностью [82]. В то же время, трудно представить, как процессы туннелирования можно учесть в классических моделях стерической комплементарности или индуцированного соответствия ([16], п. 7.4).

Тепловое движение аминокислотных остатков в полипептидной цепи фермента, с одной стороны, должно снижать активность фермента, поскольку единственное каталитически-активное расположение компонентов активного центра флуктуационно нарушается (разупорядочивается), но, с другой стороны, именно тепловые флуктуации «помогают» подобрать наиболее «результативную» (упорядоченную) комбинацию из огромного числа возможных пространственных расположений всего массива аминокислотных остатков белковой глобулы, что должно повышать активность фермента. Очевидно, что в случае квазиклассического представления о термической активации химической реакции эти два фактора (упорядочивающий и разупорядочивающий) компенсируют друг друга.

Иная картина будет с учётом эффекта квантового туннелирования (см. [2], с. 412). Протон, входящий в состав некоторой функциональной группы фермента при физиологической температуре можно представить как гармонический осциллятор (энергия колебаний которого определяется тепловой энергией), находящийся в потенциальной яме этой функциональной группы. При этом волновая функция протона распространяется за пределы такой потенциальной ямы, и существует ненулевая вероятность туннелирования протона с донорной функциональной группы на акцепторную функциональную группу.

Для описания туннельного эффекта используют понятие *коэффициента прозрачности* Π потенциального барьера, определяемого как

отношение квадратов модулей прошедшей и падающей волны. Для частицы с массой m коэффициент прозрачности *прямоугольного* потенциального барьера высотой U и шириной l (см. [2], п. 30.9)

$$\Pi = \Pi_0 \exp\left(-\frac{2l}{\hbar} \sqrt{2m(U-E)}\right).$$

Если в результате теплового движения функциональные группы (например, аминокислотные остатки или субстрат и кофермент) сближаются (уменьшается «ширина» l потенциального барьера в формуле), то вероятность туннелирования протона от донора (D) к акцептору (A) увеличится («толстая» стрелка на рисунке 13.7(a)) пропорционально степени перекрытия волновых функций состояний протона на доноре и на акцепторе.

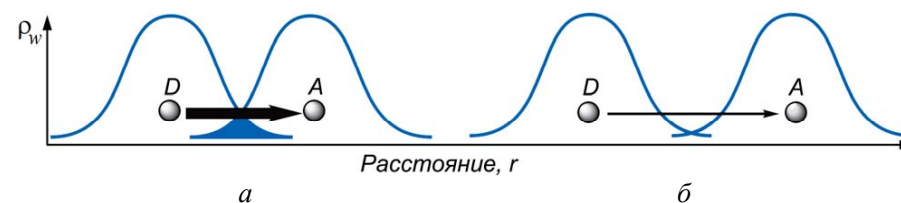


Рисунок 13.7 – Туннелирование протона между донорной (D) и акцепторной (A) функциональными группами и изменение степени перекрытия волновых функций: a – при сближении групп; b – при удалении групп друг от друга

Если же донор и акцептор удаляются друг от друга, то вероятность туннелирования так же экспоненциально снижается (тонкая стрелка на рисунке 13.7(б)), поскольку степень перекрытия волновых функций уменьшается. На рисунке 13.7 показано изменение степени перекрытия волновых функций (точнее, перекрытия распределений плотности вероятности (см. [2], п. 30.4)) состояний протона в доноре и акцепторе при сближении и удалении донора и акцептора.

Традиционную схему протекания химической реакции (рисунк 13.8(a)) для иллюстрации специфики процесса туннелирования мы изобразим в виде, представленном на рисунке 13.8(б).

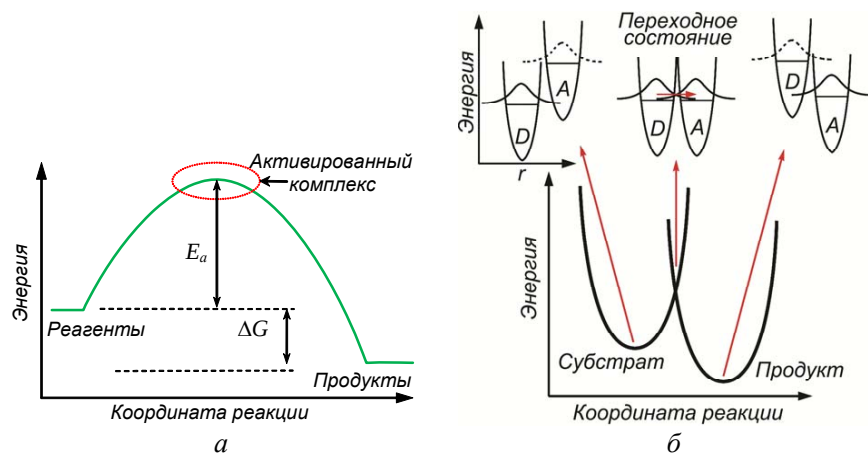


Рисунок 13.8 – Энергетическая схема химической реакции: *а* – традиционная; *б* – с туннелированием протона

На рисунке 13.8(б) схематически изображены потенциалы протона в донорной (D) функциональной группе в молекуле субстрата и в акцепторной (A) функциональной группе в молекуле продукта, на которую будет туннелирован протон. Относительное расположение энергетических уровней протона в группах донора и акцептора в начале, в переходном состоянии и в конце реакции изображены в верхней части рисунка 13.8(б). Туннелирование становится возможным в переходном состоянии при *изоэнергетическом* расположении уровней в доноре и акцепторе. Следует подчеркнуть, что *координата реакции* включает в себя *все* процессы реорганизации системы межатомных связей в ходе реакции, а энергетические схемы в верхней части рисунка 13.8(б) изображены относительно *пространственной* координаты *r* (например, расстояние между донорным и акцепторным сайтами).

Выражение для константы скорости в модели туннельного переноса протона (*full tunneling model of hydrogen transfer*) будет иметь вид [82]:

$$k_{\text{тун}} = \xi \cdot \exp\left(-\frac{[\Delta G + E_r]^2}{4E_r RT}\right) \cdot \int_0^{r_0} \exp\left(-\frac{mvr^2}{2h}\right) \cdot \exp\left(-\frac{U(r)}{k_B T}\right) dr,$$

где ξ – нормировочная константа; ΔG – изменение свободной энергии в ходе реакции (см. рисунок 13.8(а)); E_r – энергия предварительной реорганизации системы связей в фермент-субстратном комплексе; R – универсальная газовая постоянная; T – температура; m и v – масса и частота колебаний туннелирующего протона; r – расстояние туннельного переноса (рисунок 13.7); h – постоянная Планка; $U(r)$ – потенциальная энергия системы как функция донор-акцепторного расстояния r (рисунок 13.9);

k_B – постоянная Больцмана. Первая экспонента $\exp\left(-\frac{[\Delta G + E_r]^2}{4E_r RT}\right)$ в выражении для $k_{\text{тун}}$ учитывает необходимость предварительной активации (реорганизации) системы для достижения *изоэнергетичности* уровней донора и акцептора, при котором возможно туннелирование (рисунок 13.8(б)).

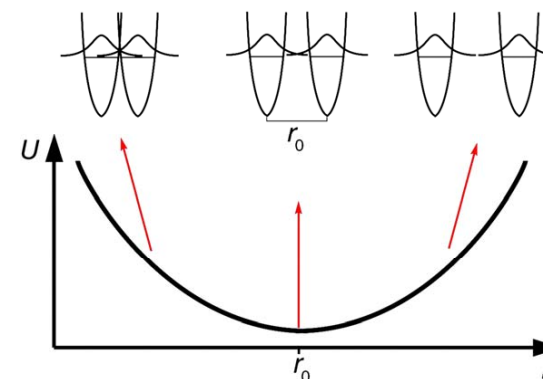


Рисунок 13.9 – Влияние относительного теплового движения донора и акцептора на потенциальную энергию системы; r_0 – равновесное расстояние между донором и акцептором

Вторая экспонента $\exp\left(-\frac{mvr^2}{2h}\right)$ учитывает влияние частоты v колебаний протона массой m на степень перекрытия волновых функций начального и конечного состояния при туннелировании. Третья экспонента

$\exp\left(-\frac{U(r)}{k_B T}\right)$ учитывает влияние относительного теплового движения донора и акцептора (рисунки 13.7 и 13.9).

Таким образом, даже в простейшем случае ферментативной реакции с переносом протона учёт эффекта квантового туннелирования радикальным образом меняет вид выражения для константы скорости.

Квазиклассическое выражение (см. [15], п. 6.1):

$$k = \chi \frac{k_B T}{h} \exp\left(-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R}\right)$$

эффективно соответствует *первой экспоненте* в выражении для константы скорости в модели туннельного переноса протона (классическая активация химической реакции):

$$k_{\text{тун}} = \xi \cdot \exp\left(-\frac{[\Delta G + E_r]^2}{4E_r RT}\right) \cdot \int_0^{r_0} \exp\left(-\frac{mvr^2}{2h}\right) \cdot \exp\left(-\frac{U(r)}{k_B T}\right) dr.$$

Вторая и третья экспоненты в выражении для $k_{\text{тун}}$ наглядно демонстрируют необходимость учёта при моделировании механизмов ферментативных процессов *двух классов* событий:

- 1) собственную динамику переносимой функциональной группы (например, протона в рассматриваемом случае);
- 2) динамику (реорганизацию) движения как непосредственно каталитически активных функциональных групп (аминокислот, кофакторов и др.), так и, опосредовано, всех остальных компонентов белковой глобулы фермента (тепловое движение аминокислотных остатков, динамика белковых петель и доменов, взаимные смещения элементов вторичной структуры и др.).

Такую «подготовку» фермента к результативному преобразованию субстрата в продукт называют *пре-организацией* (предварительной

организацией) белковой глобулы. В ходе пре-организации состояние субстрата теряет устойчивость. А сам процесс статистического перебора возможных вариантов пре-организации называют *отбором* наиболее эффективной «траектории» достижения переходного состояния вдоль координаты реакции – отбор результативной траектории (*transition-path sampling*, TPS) [65].

Зададим в общем виде электронно-конформационное состояние исследуемой системы (фермента в нашем случае) в каждый момент времени t в виде вектора состояния системы:

$$\vec{q}(\vec{r}, \vec{p}, \psi, t) = (q_1(\vec{r}, \vec{p}, \psi, t), q_2(\vec{r}, \vec{p}, \psi, t), \dots, q_n(\vec{r}, \vec{p}, \psi, t))$$

с помощью набора переменных $q_n(\vec{r}, \vec{p}, \psi, t)$, характеризующих пространственное расположение $\vec{r}$, импульс $\vec{p}$ и электронное состояние ψ элементов системы в этот момент времени.

Эволюцию во времени нашей системы можно задать в виде набора функций

$$F_i = F_i(\vec{q}_i, \nabla, \vec{r}, t),$$

зависящих от начальной (стартовой) фазовой точки $\vec{q}_i$, от пространственных производных $\left(\nabla = \frac{\partial}{\partial x} \vec{i} + \frac{\partial}{\partial y} \vec{j} + \frac{\partial}{\partial z} \vec{k}\right)$, от пространственных координат $\vec{r}$ и от времени t .

Эволюция системы во времени в n -мерном фазовом пространстве $q_1, \dots, q_n$ отображается в виде кривой в фазовом пространстве, которую называют *фазовой траекторией*.

Прослеживая непрерывную последовательность точек от $t \rightarrow -\infty$ до $t \rightarrow +\infty$, мы получаем одну траекторию. Выбрав другую начальную точку, мы окажемся, вообще говоря, на другой траектории.

Среди всех возможных фазовых траекторий, начинающихся в «области субстрата» только одна, результативная, заканчивается в «области продукта» ферментативной реакции, а остальные возвращаются в область «непреобразованного» субстрата (рисунок 13.10).

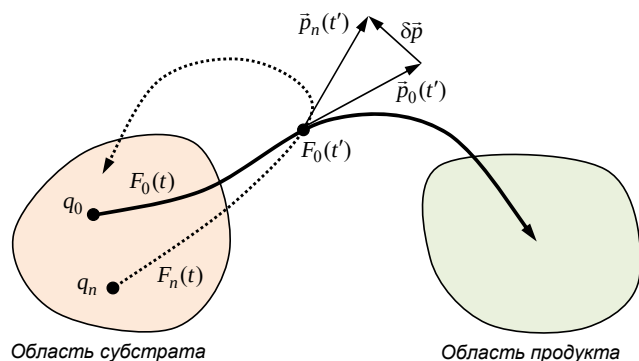


Рисунок 13.10 – Фазовые траектории при ферментативном преобразовании

Вычислительные мощности современных компьютеров позволяют моделировать ферментативные процессы методом отбора результирующих траекторий (*transition-path sampling, TPS*) [65] (рисунок 13.11).

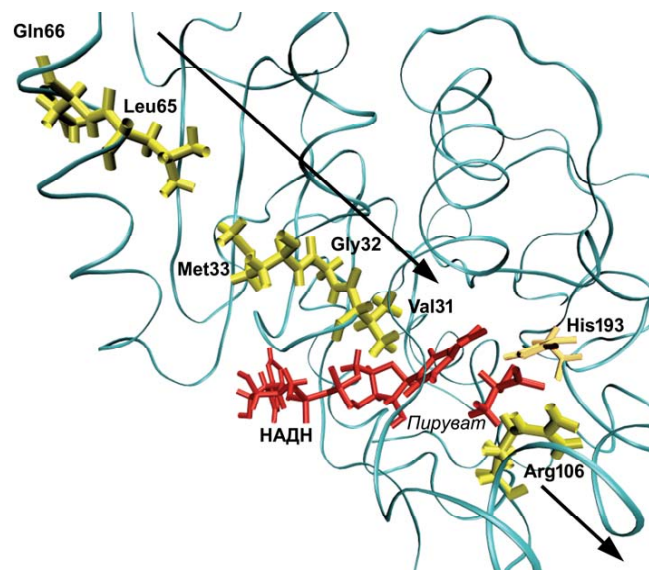


Рисунок 13.11 – Кооперативное смещение аминокислот для отбора результирующей траектории реакции превращения пирувата в лактат ферментом лактатдегидрогеназа

Моделирование методом TPS каталитического цикла *лактатдегидрогеназы* показало, что для активации переноса протонов с кофермента НАД и гистидина на пируват необходимо дождаться, пока будет выбрана определённая результирующая траектория. В этом случае аминокислоты Gln66, Leu65, Met33, Gly32, Val31 (рассредоточенные по всей субъединице лактатдегидрогеназы) синхронно сдвинутся в сторону активного центра (длинная стрелка на рисунке 13.11) и сместят кофермент НАДН в направлении субстрата (пируват), и одновременно с этим аминокислота Arg106 отодвинется от субстрата (короткая стрелка на рисунке 13.11). Очевидно, что предсказать, что именно такое «событие» является «спусковым крючком» биохимического преобразования невозможно в рамках классических методов биофизики и энзимологии.

TPS-моделирование позволило развернуть во времени ферментативную реакцию и оценить промежутки времени, на протяжении которых длятся различные её этапы (рисунок 13.12).

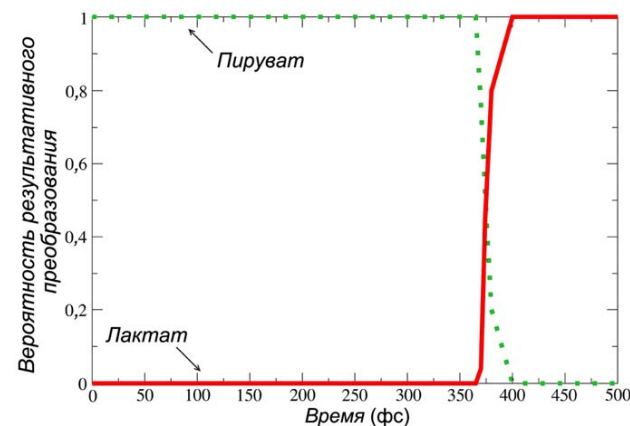


Рисунок 13.12 – Зависимость вероятности результирующей ферментативной реакции от времени для лактатдегидрогеназы: сплошная кривая – преобразование лактата в пируват; точки – преобразование пирувата в лактат

Оказалось, что лактатдегидрогеназа несколько миллисекунд после связывания субстрата перебирает возможные фазовые траектории.

И только выбрав результирующую траекторию, происходит переход из области пирувата в область лактата в фазовом пространстве реакции (см. рисунок 13.10) за время порядка долей фемтосекунды (рисунок 13.12).

Ещё одним примером успешности применения TPS-метода для установления механизма протонного переноса является анализ реакции восстановления дигидрофолата (*dihydrofolate*, DHF) в тетрагидрофолат (*tetrahydrofolate*, THF) ферментом *дигидрофолатредуктаза* (*dihydrofolate reductase*, DHFR) [65] (рисунок 13.13). В качестве источника протона в реакции используется кофермент НАДФН (NADPH).

Дигидрофолатредуктаза – это один из ключевых ферментов во внутриклеточном метаболизме фолатов, необходимый для восстановления дигидрофолиевой кислоты до активной коферментной формы витамина – тетрагидрофолиевой кислоты. Дигидрофолат образуется в процессе каталитического превращения дУМФ (урацил-монофосфат) в дТМФ (тимидил-монофосфат), осуществляемого при участии фермента тимидилатсинтазы, коферментом которого и является тетрагидрофолиевая кислота.

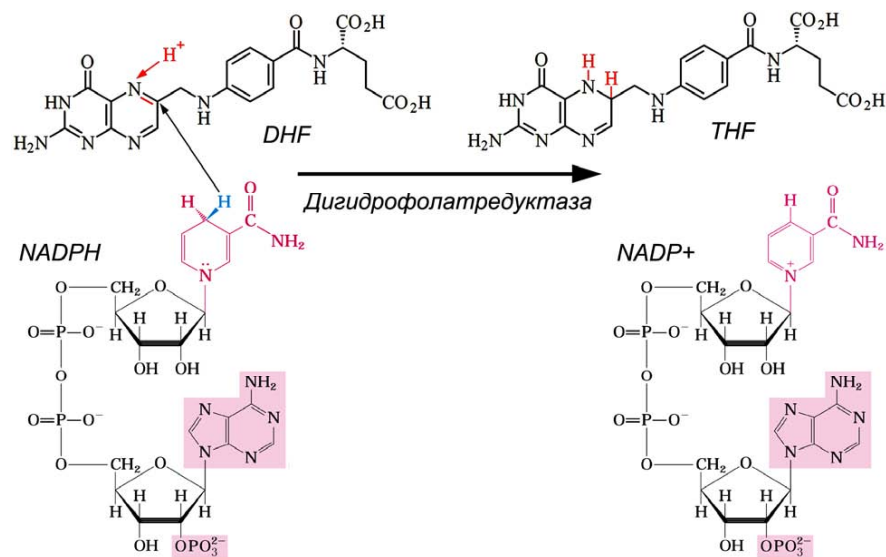


Рисунок 13.13 – Схема реакции восстановления дигидрофолата (DHF) в тетрагидрофолат (THF) ферментом дигидрофолатредуктаза

Кофермент НАДФН и субстрат DHF связываются с активным центром дигидрофолатредуктазы по принципу «ключ-замок» Фишера (см. [15], п. 4.4). Часто в учебниках биохимии именно этот фермент-субстратный комплекс предъявляют в качестве образца, иллюстрируя механизм Фишера. Для каждого из субстратов в теле фермента есть свой комплементарный «карман» (рисунок 13.14).

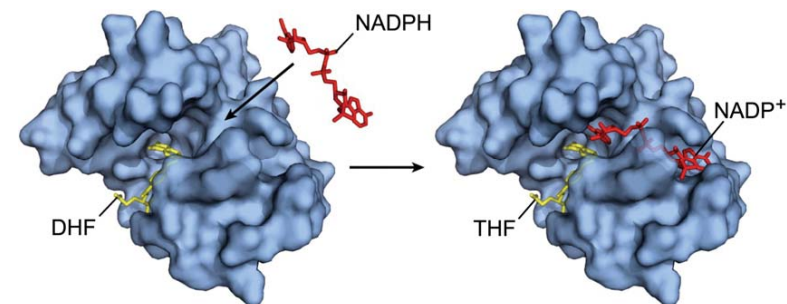


Рисунок 13.14 – Связывание субстратов с ферментом дигидрофолатредуктаза

Моделирование методом TPS (*transition-path sampling*) показало, что так же, как и в случае лактатдегидрогеназной реакции, фермент дигидрофолатредуктаза «перебирает» фазовые траектории, пока не окажется на результирующей, а пре-организация фермента заключается в кооперативном смещении четырёх аминокислот в направлении, показанном на рисунке 13.15 стрелками [65].

Вследствие этого положение кофермента НАДФН в активном центре фермента изменяется, и никотинамидная донорная (D) группа перемещается в оптимальное положение для переноса протона на акцепторную (A) группу в молекуле субстрата (DHF), чем и достигается активация переходного состояния. В результате гидрид-ион H^- переносится с кофермента на субстрат. Ещё один протон из цитозоля протонирует атом азота субстрата.

Таким образом, традиционную схему активации ферментативной реакции (рисунок 13.8(а)) необходимо снабжать комментариями о том, что «медленные» (миллисекундные) этапы конформационной релаксации

белковой глобулы, при которой происходит выбор результирующей траектории движения в фазовом пространстве реакции, чередуются с очень быстрыми (фемтосекундными) этапами переформатирования межатомных связей в молекуле субстрата (рисунок 13.16).

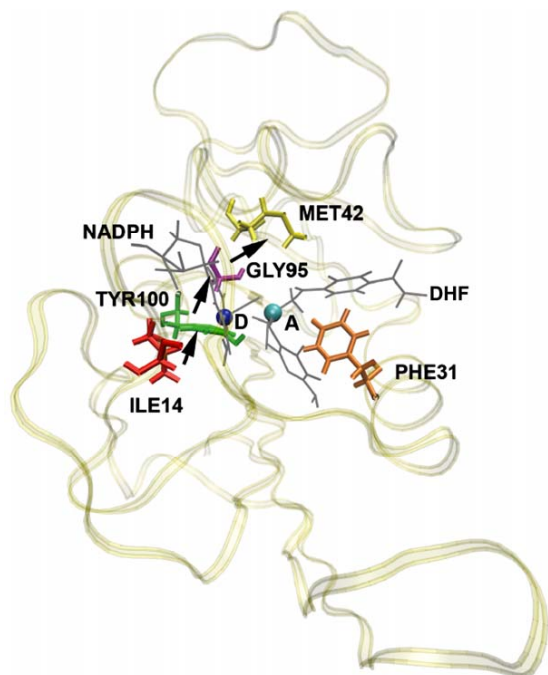


Рисунок 13.15 – Схема пре-организации фермента дигидрофолатредуктаза

Очевидно, что за время жизни переходного состояния порядка долей фемтосекунды невозможно установление термодинамического равновесия, а, следовательно, и элементарные модели Михаэлиса–Ментен (см. [16], п. 8.1), Фишера и Кошланда (см. [3], п. 15.2), и более продвинутые модели Эйринга (см. [15], п. 6.1) не способны адекватно описать ферментативное преобразование субстрата на ферменте.

Для моделирования процессов, происходящих во время ферментативной реакции, необходимо учитывать как быстрые, электронные, процессы, так и медленные, конформационные, стадии. При таком электронно-

конформационном подходе *последовательность событий* представляется следующим образом.

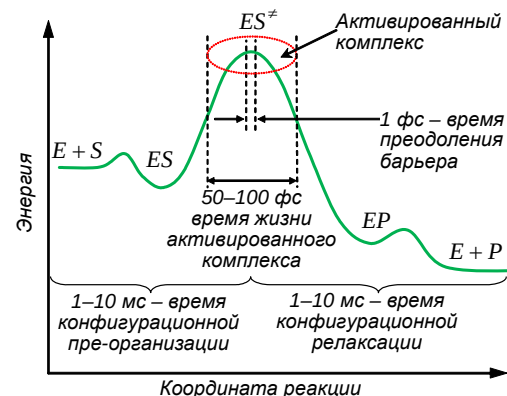
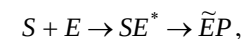


Рисунок 13.16 – Характерные времена стадий ферментативной реакции

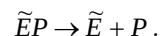
(1) Изменение электронного состояния и локальные изменения геометрии активного центра и субстрата после *связывания* субстрата S с ферментом E происходят *быстро* за времена (10^{-12} – 10^{-13} с) колебательной релаксации. Они затрагивают только часть молекулы – выделенные химические связи субстрата и функциональных групп активного центра, но не остальную большую часть белковой глобулы. Следовательно, в целом на этом этапе макромолекулярный фермент-субстратный комплекс находится в *конформационно-неравновесном* состоянии.

(2) *Затем* происходит *медленная релаксация* комплекса к *новому равновесию*, потеря устойчивости молекулы субстрата и превращение субстрата в продукт:



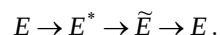
где E^* – неравновесное, а $\tilde{E}$ – новое равновесное конформационное состояние белковой глобулы фермента. *Химическое изменение* субстрата, включающее перегруппировку атомов вслед за разрывом химических связей, реализуется именно на этом этапе как часть конформационного изменения фермент-субстратного комплекса.

(3) На следующей стадии происходит распад комплекса фермент–продукт



Эта стадия также сопровождается *быстрыми локальными изменениями* в активном центре и сольватационными изменениями продуктов реакции, переходящих в объём. Фермент остаётся в конформационном состоянии $\tilde{E}$, которое *после* отрыва продукта становится *неравновесным и напряжённым*.

(4) Наконец, на *заключительном этапе* происходит *медленная конформационная релаксация* свободной молекулы фермента к *исходному* равновесному состоянию: $\tilde{E} \rightarrow E$. Таким образом, конформационное изменение происходит в условиях существенной *конформационной неравновесности*. Координата реакции совпадает с координатой конформационной релаксации, которая протекает по определённым стадиям и носит направленный характер



Именно *наличие* выделенных механических степеней свободы позволяет рассматривать смещения, происходящие в разных областях макромолекулы, как изменения, совершающиеся в один акт. Энергия, сосредоточенная на этих медленно релаксирующих степенях свободы, *не диссипирует* быстро в теплоту за счёт размена по другим обычным степеням свободы, а *используется* фактически для обеспечения направленного характера релаксационных процессов в ферментативном катализе.

С такой нетрадиционной точки зрения, *теряет непосредственный смысл* использование понятий *энергии* и *энтропии* активации, как это делают в теории активированного комплекса.

Зависимость скорости ферментативной реакции от *температуры* определяется не числом активных молекул с энергией, достаточной для преодоления барьера, а *влиянием температуры на конформацию* макромолекулы и, следовательно, на *путь и скорость* её последующей релаксации. Все молекулы субстрата, образовавшие «правильный» комплекс с

ферментом, претерпевают химическое превращение в результате самопроизвольной релаксации фермента к новому конформационному состоянию. Конечно, с термодинамической точки зрения, общей движущей силой процесса является разность химических потенциалов субстрата и продукта. Однако она определяет лишь *число встреч* молекул фермента и субстрата, но не сам активационный механизм превращения фермент-субстратного комплекса.

Понимание механизмов конкретных каталитических процессов требует *детального* изучения электронных взаимодействий в активном центре между функциональными группами. Эти взаимодействия осуществляются в целом на гораздо более коротких расстояниях по сравнению с нековалентными атом-атомными взаимодействиями, определяющими характер внутримолекулярной динамики белковой глобулы фермента. Кроме того, нековалентные фермент-субстратные взаимодействия реализуются в системах, состоящих из многих сотен атомов, в то время как электронные, чисто химические взаимодействия происходят в активном центре между ограниченным числом атомов, принадлежащих функциональным группам. Нековалентные взаимодействия приводят к конформационным изменениям, характерные времена которых намного больше, чем времена колебательной релаксации, сопровождающие чисто электронные переходы.

На *первом этапе* катализа определяющее значение приобретает *характер структурно-динамического взаимодействия* фермент-субстрат.

На *втором этапе*, после образования активного комплекса, основную роль уже играют *квантовомеханические электронные процессы* взаимодействия между ограниченным числом атомных групп в активном центре. Следовательно, конформационно-динамические аспекты ферментативного катализа, связанные с формированием химически активной конфигурации, можно рассматривать независимо от квантовомеханической природы элементарного акта разрыва связей субстрата в активном центре. Это обстоятельство отражает природу ферментативного акта как следствие электронно-конформационных взаимодействий в молекуле фермента.

Многостадийные реакции. Молекулярное моделирование даёт возможность исследовать протекание сложных ферментативных превращений [96].

Ключевым ферментом катаболизма пуриновых нуклеотидов является *пури́ннуклеозидфосфо́рилаза* (*purine nucleoside phosphorylase*, PNP). В реакции, катализируемой PNP, происходит фосфоролитическое расщепление гликозидной связи в инозине, ксантозине или гуанозине и удаление рибозо-1-фосфата (Ribose-1-P). В результате образуются гипоксантин, ксантин и гуанин, соответственно (рисунок 13.17).

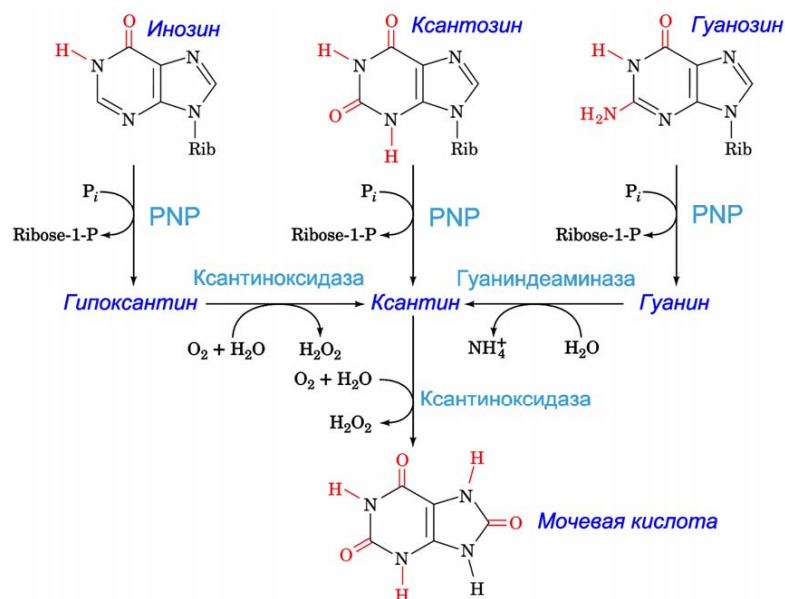


Рисунок 13.17 – Катаболизм нуклеотидов с участием фермента пури́ннуклеозидфосфо́рилаза (*purine nucleoside phosphorylase*, PNP)

Моделирование выявило два этапа в работе PNP, разделённых «паузой» для дополнительной пре-организации фермента, что увеличило время жизни переходного состояния до 10 фемтосекунд (рисунок 13.18(a)).

Кинетика переходного состояния (вероятность $\sim 0,5$) показана на вставке на рисунке 13.18(a) справа в увеличенном масштабе.

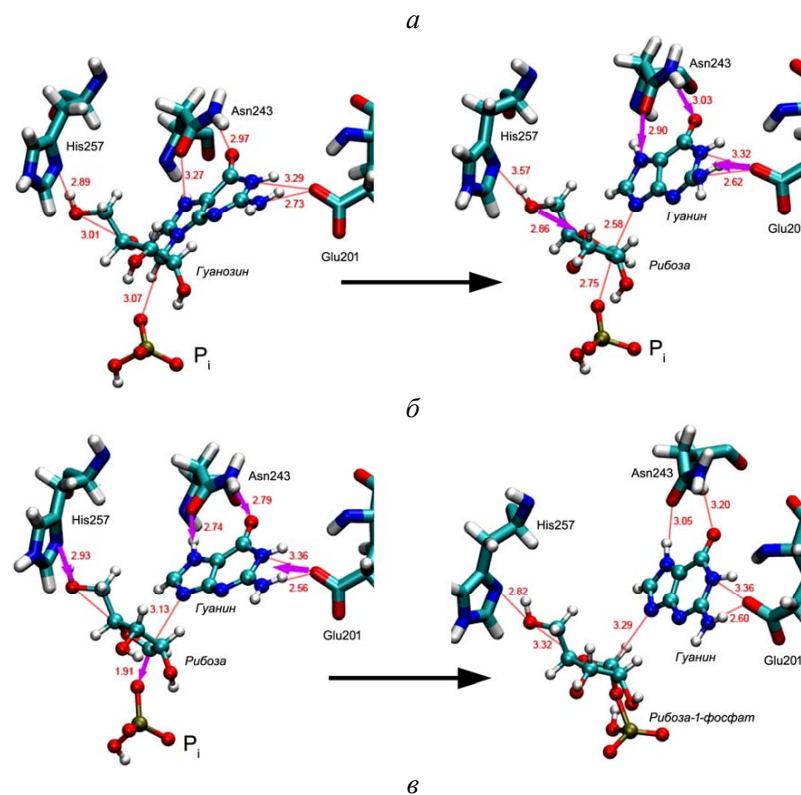
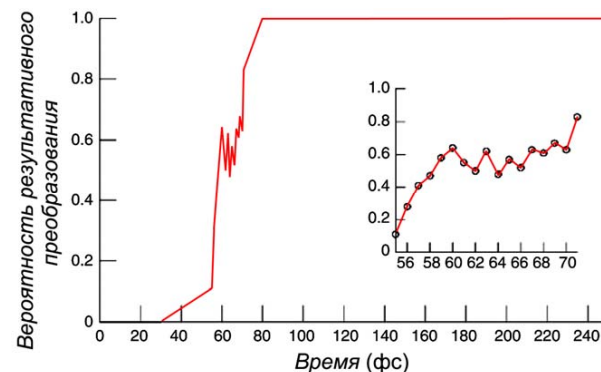


Рисунок 13.18 – Моделирование работы пури́ннуклеозидфосфо́рилазы: *a* – ход процесса; *б* – первый этап – отщепление гуанина; *в* – второй этап – фосфорилирование рибозы

На вставке к рисунку 13.18(а) видно как система «нащупывает» результирующую фазовую траекторию, чтобы завершить ферментативную реакцию – это второй этап пре-организации. Первый этап пре-организации, во время которого теряется устойчивость пурипнуклеотидов, происходит за первые 57 фс. А сами процессы переформатирования меж-атомных связей происходят за доли фемтосекунд (так же, как и на рисунке 13.12). На первом этапе гуанозин диссоциирует на гуанин и рибозу (рисунок 13.18(б)). На втором этапе активируется реакция фосфорилирования рибозы (рисунок 13.18(в)).

13.4. НАНОБИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ 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 бионаномашинны *используют все эти способы* контроля и управления.

Как говорилось выше (гл. 12), 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 двумя 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 *макром мире*, эти системы управления могут комбинироваться таким образом, что получаются *сверхвысокочувствительные* системы тонкой регуляции слаженности биологических процессов.

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 (греч. ἄλλος – другой и στερῆς – пространственный) был сформулирован Жаком Монодом (*Jacques Monod*) с соавторами в 1965 году [81], 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, *напряжённом* (*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 содержит в своём составе четыре белковых домена, 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 *упрощённая*, и что домены гемоглобина переключаются из Т в R форму поочерёдно.

Чаше 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. 9.3 гемоглобин, в котором связывание кислорода одним из четырёх гемов приводит к смещению всего на 0,5 Å соответствующего атома железа из плоскости гема (рисунок 13.19). Это смещение чувствует соседний *гистидин* и передаёт его всему остальному четырёхсубъединичному белковому комплексу гемоглобина, превращая небольшое смещение одного атома в конформа-

ционный переход всей белковой макромолекулы. Пример гемоглобина демонстрирует, как *малое смещение* ключевой аминокислоты *индуцирует переключение* всей белковой глобулы между двумя конформациями.

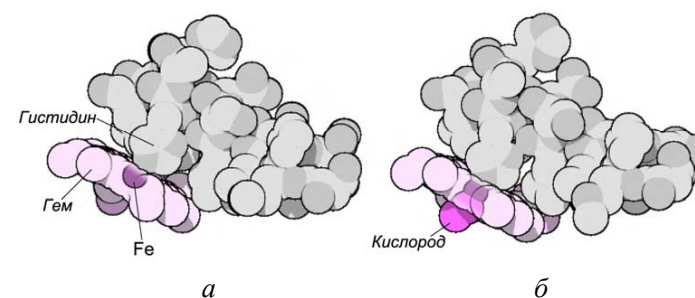


Рисунок 13.19 – Смещение атома железа в геме гемоглобина: *а* – гем без кислорода, *б* – гем с присоединённой молекулой кислорода

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-бисфосфатазы* (рисунок 13.20, 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.

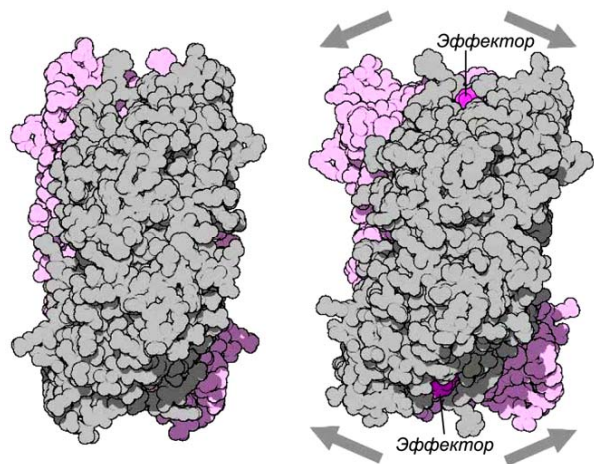


Рисунок 13.20 – Аллостерическое изменение фермента фруктозо-1,6-бисфосфата в результате связывания молекул-эффекторов. Стрелками показаны направления смещения субъединиц фермента

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 13.21, слева).

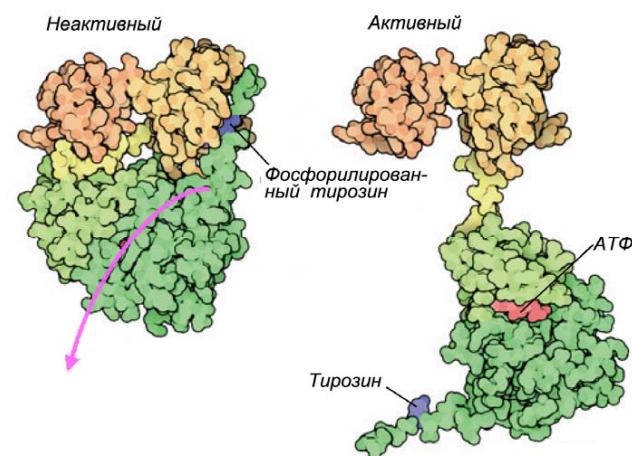


Рисунок 13.21 – Регулирование активности белка SRC-тирозин-киназа фосфорилированием

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 13.21, справа).

Фосфорилирование широко используется для внутриклеточной сигнализации, когда сигнал с рецептора плазматической мембраны передаётся 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 13.22) активизируется вырезанием регуляторного пептида, который блокирует каталитический центр, находящийся внутри глубокой впадины на поверхности фермента.

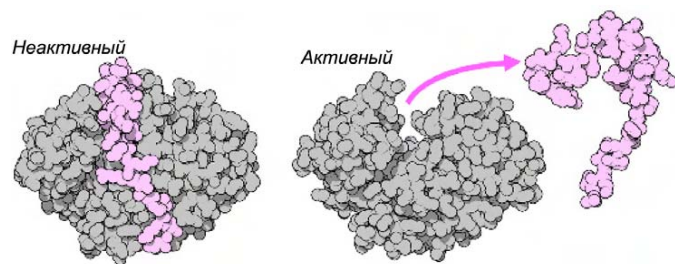


Рисунок 13.22 – Активизация трипсина протеолитическим вырезанием регуляторного пептида

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 выдёргивание чеки из гранаты – активизация фермента происходит вследствие удаления блокирующего белкового сегмента.

Контрольные вопросы и задания

1. За счёт каких двух факторов ферменты снижают величину энергетического барьера в переходном состоянии преобразования субстрата в продукт?
2. Какие три общих принципа используются в конструкции активного центра большинства ферментов?
3. Каким образом энтропия препятствует протеканию химических реакций?
4. Какие две функциональные области содержат в себе активные центры большинства ферментов?
5. Каким требованиям должно удовлетворять область специфического связывания субстрата в активном центре фермента?
6. Какими способами фермент может стабилизировать переходное состояние реакции?
7. Каким образом заряженные аминокислоты фермента могут способствовать стабилизации переходного состояния реакции?
8. Какие структурные особенности гистидина используются для активации биохимических реакций в активных центрах ферментов?
9. Как образование ковалентной связи с субстратом сериновой протеазы стимулирует разрыв пептидной связи?
10. Какие молекулы являются носителями функциональных групп в ферментативном катализе?
11. Каким образом ионы металлов используются в составе активных центров ферментов?
12. Какую роль играет квантовое туннелирование в ферментативных реакциях с переносом протонов?
13. Что такое пре-организация белковой глобулы фермента?

14. Какие кооперативные движения аминокислотных остатков в глобуле лактатдегидрогеназы характерны для результирующей фазовой траектории в реакции превращения пирувата в лактат?
15. Какие кооперативные движения аминокислотных остатков в глобуле дигидрофолатредуктазы характерны для результирующей фазовой траектории в реакции восстановления дигидрофолата в тетрагидрофолат?
16. Перечислите и охарактеризуйте четыре электронно-конформационных этапа протекания ферментативной реакции.
17. Какие три основных метода используются для контроля и управления машин?
18. Молекулярными аналогами каких макропроцессов являются аллостерическая регуляция и ковалентная модификация, или ингибирование?
19. Какие преимущества даёт расположение центров связывания 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 14

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 макромиру 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 дисасемблируются. 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 раковины моллюсков, шерсть, кости скелета 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.

14.1. СПИРАЛЬНОЕ АССЕМБЛИРОВАНИЕ БИОМАТЕРИАЛОВ

Ассемблирование биологических филаментов программируется соответствующим *дизайном интерфейсных областей* на поверхности белков-мономеров (рисунок 14.1) (см. п. 7.4).

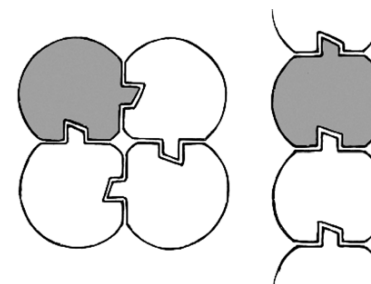


Рисунок 14.1 – Пространственное расположение интерфейсных поверхностей

Использование самоассоциирующихся глобулярных белков для образования филаментов имеет *несколько преимуществ*. Поскольку

филаменты собираются из множества модульных 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 области на поверхности, то можно *управлять* процессом сборки 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 14.2).

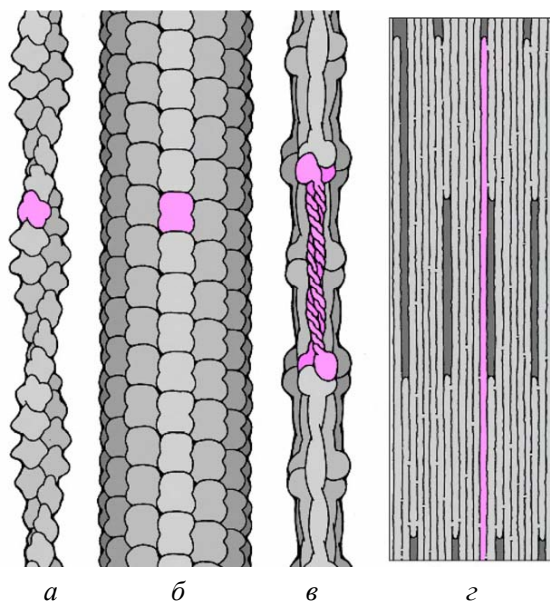


Рисунок 14.2 – Модульные филаменты: *a* – актиновая нить, *b* – микротрубочка, *в* – промежуточный филамент, *г* – коллаген

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.

Актиновые нити являются примером тонкого филамента (рисунок 14.2(a)). Актин – наиболее распространённый филаментообразующий белок в клетке – может существовать в виде мономера (*G-актин*, глобулярный актин) или полимера (*F-актин*, фибриллярный актин) (рисунок 14.3).

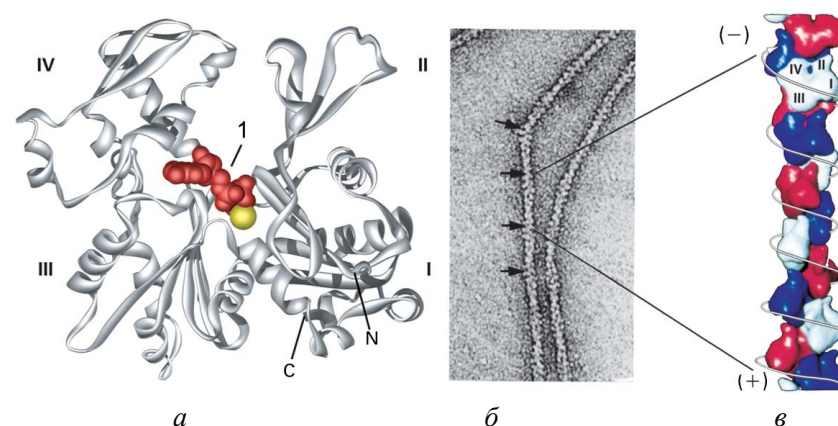


Рисунок 14.3 – Структура глобулярного и фибриллярного актина: *a* – модель мономера G-актина; 1 – складка, в которой связывается АТФ, C- и N- концы находятся в субдомене I; *б* – спираль F-актина в электронном микроскопе; *в* – модель полимера актина

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* – асиммет-

ричный 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 гидролизует до АДФ, т. е. F-актин проявляет свойства *АТФазы*.

Количество мономеров и полимеров различным образом зависит от концентрации актина в клетке (рисунок 14.4). С увеличением концентрации актина в клетке, начиная с некоторого *критического значения* $C_c \approx 0,1 \mu\text{M}$, начинается полимеризация F-актина.

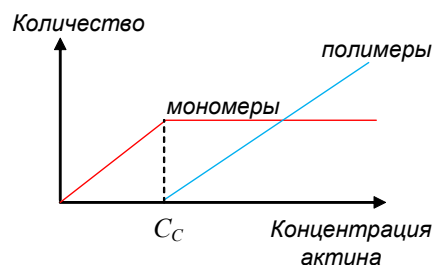


Рисунок 14.4 – Зависимость количества мономеров и полимеров от концентрации актина

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: $C_c^+ \approx 0,1 \mu\text{M}$, $C_c^- \approx 0,6 \mu\text{M}$. Поэтому при полимеризации (+)-конец растёт со скоростью в 5–10 раз большей, чем (–)-конец, что приводит к *векторному* росту филамента (рисунок 14.5).

Актиновые филаменты чрезвычайно *динамичны* в живой клетке, они постоянно асSEMBлируются и дисасSEMBлируются в зависимости от потребностей клетки. Рост каждого филамента регулируется связыванием АТФ, который стимулирует рост, и набором обслуживающих белков, которые стабилизируют или разъединяют филаменты.

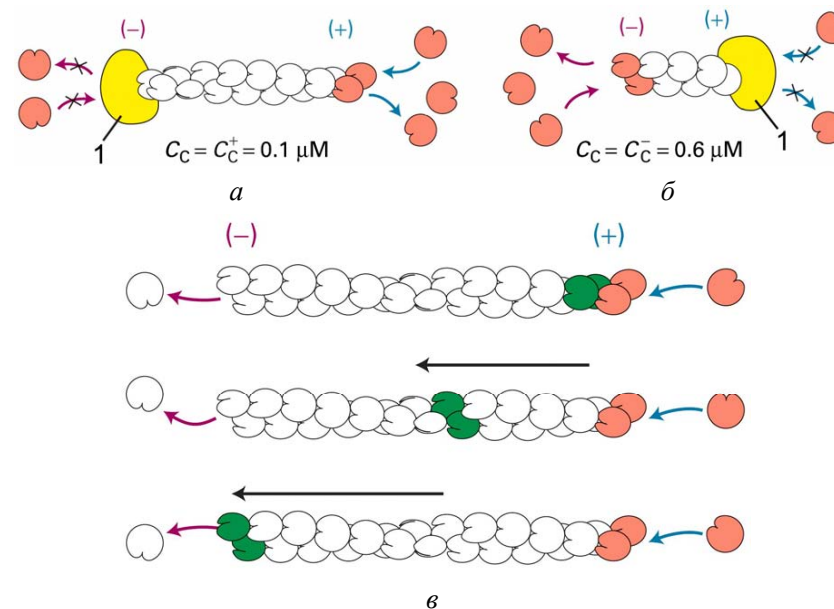


Рисунок 14.5 – Полимеризация актина: а – рост (+)-конца; б – рост (–)-конца; в – течение филамента; 1 – копирующий белок

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 *бегающей дорожки*).

Эффект течения филаментов состоит в том, что субъединицы постоянно *диссоциируют* с запаздывающего конца (*lagging end*) филамента и присоединяются (*реасSEMBлируют*) 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 14.6(а)).

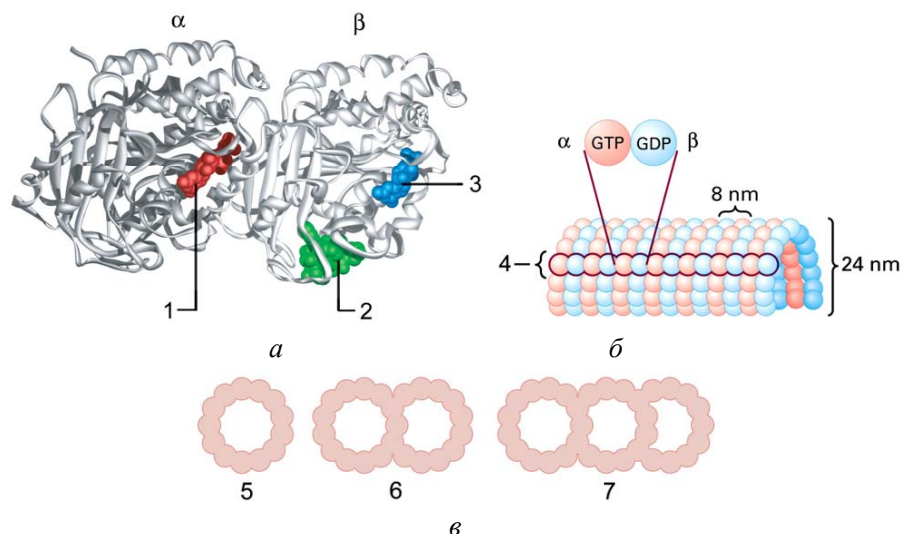


Рисунок 14.6 – Строение микротрубочек: *а* – гетеродимер тубулина; *б* – цилиндрический полимер; *в* – «упаковка» протофиламентов; 1 – ГТФ (GTP); 2 – молекула таксола (*taxol*); 3 – ГДФ (GDP); 4 – протофиламент; 5–7 – одинарные, двойные и тройные микротрубочки

α, β -Гетеродимеры тубулинов образуют линейные цепочки, называемые *протофиламентами*. Тринадцать протофиламентов образуют *циклический* комплекс (рисунок 14.6(5)). Затем кольца полимеризуются в длинную трубку. Микротрубочки ресничек и жгутиков имеют дублетную структуру (рисунок 14.6(6)), а базального тела и *центриолей* – триплетную (рисунок 14.6(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 счёт 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 сво-

бодной, так и входящей в состав микротрубочки, контролируется состоянием связанной с ней молекулы ГТФ. Тубулиновые мономеры являются ГТФазами – они связывают гуанозинтрифосфат (ГТФ), который медленно гидролизуются 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 (см. п. 15.1). 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 дисассемблирование. 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 *перекрёстных линков между субфибриллами* и *способа соединения модулей «внахлёстку»* формирует структуры, которые устойчивы к дисассемблированию. 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 внахлест друг другу вдоль филамента, что обеспечивает сильное взаимодействие вдоль всей длины мономеров (рисунок 14.2(в)).

Тело мономера белка образуется двумя белковыми цепями, которые свёрнуты в α -спирали, которые затем закручены друг относительно друга, образуя так называемый мотив «скрученная спираль» (*coiled coil*) (рисунок 14.7(а)). Такие димеры ассоциируют антипараллельно, образуя тетрамер (рисунок 14.7(б)). Глобулярные домены на концах белковых модулей формируют видимые узлы на промежуточных филаментах. Агрегация тетрамеров по принципу «голова к голове» даёт *протофиламент*.

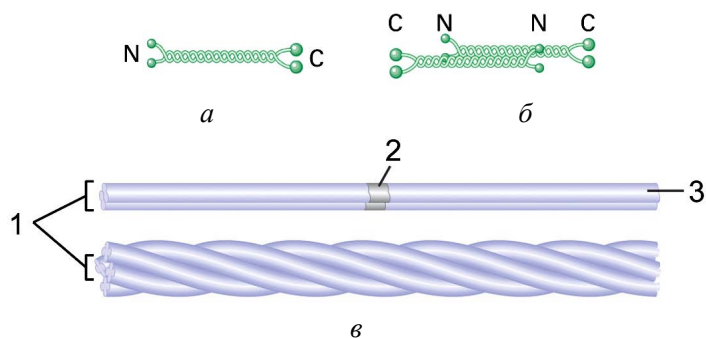


Рисунок 14.7 – Промежуточные волокна: а – скрученная спираль; б – тетрамер; в – промежуточное волокно: 1 – протофибрилы, 2 – тетрамер, 3 – протофиламент

Жгут протофиламентов образует промежуточное волокно (рисунок 14.7(в)). В отличие от микрофиламентов и микротрубочек свободные мономеры промежуточных волокон не встречаются в цитоплазме. Их полимеризация ведёт к образованию *устойчивых* неполярных полимерных молекул. Промежуточные филаменты используются для связывания ключевых структур в клетке, формируя нежесткую 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 распространённым белком в теле человека (рисунок 14.2(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. *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 (гидроксильрованы), 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-лизинные кросс-линки для увеличения прочности.

14.2. 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 *сетевидного прочного каркаса*, в котором наномодули надёжно 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, соединённых *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 *эффективный 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 двухнитевых белков *спектринов* располагается под плазматической мембраной, соединяя актиновые нити. Одним из наиболее простых примеров, иллюстрирующих образование такой *спектриновой подболочки*, 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 14.8 показан участок мембраны эритроцита, двойные нити спектринов изображены голубым цветом.

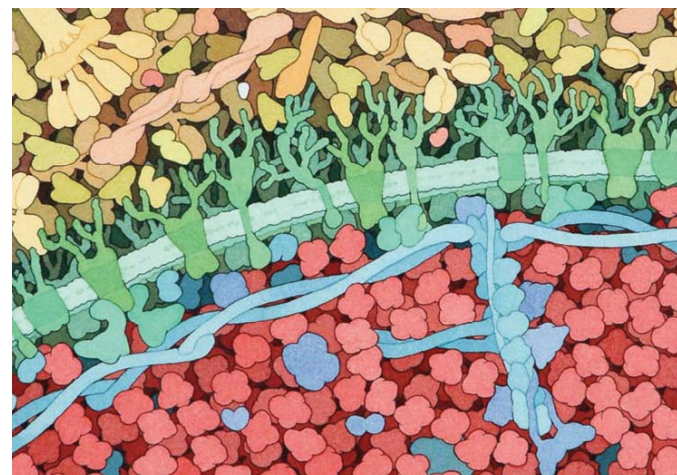


Рисунок 14.8 – Участок мембраны клетки эритроцита

Эритроциты являются чрезвычайно гибкими клетками и могут сворачиваться так, что способны проходить в капилляры, диаметр которых вдвое меньше диаметра эритроцита. Но спектриновая подболочка поддерживает постоянную площадь поверхности эритроцита при его движении по капиллярам кровеносной системы.

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 14.9 показаны примеры связывания актиновых нитей в плотный пучок малыми белками *фимбринами*, и образование более рыхлой структуры с помощью

шарнироподобных белков *филаминов*. *Филамины*, имеющие вид шарниров, формируют беспорядочную актиновую сеть.

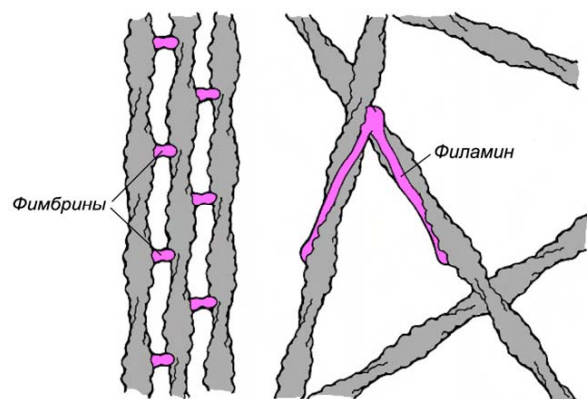


Рисунок 14.9 – Связывание актиновых нитей в различные инфраструктуры с помощью актин-связывающих белков, изображённых сиреневым цветом

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 (рисунок 14.10).

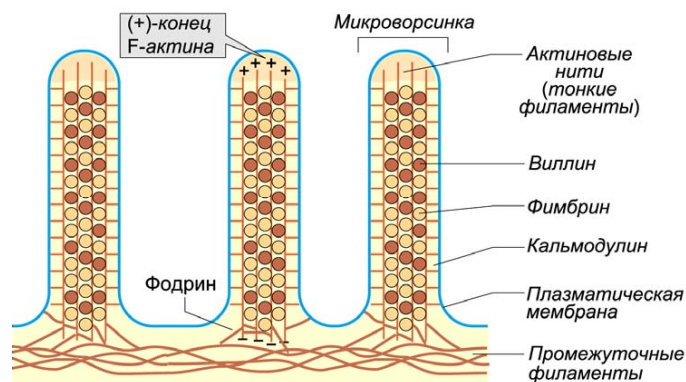


Рисунок 14.10 – Схема микроворсинок клетки кишечного эпителия

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 цементного раствора). 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 14.11 показана такая структура, состоящая из длинных тонких *коллагеновых волокон*, крестообразных молекул *ламнина* и *матрицы-наполнителя* из трёхлучевых молекул *протеогликанов*.

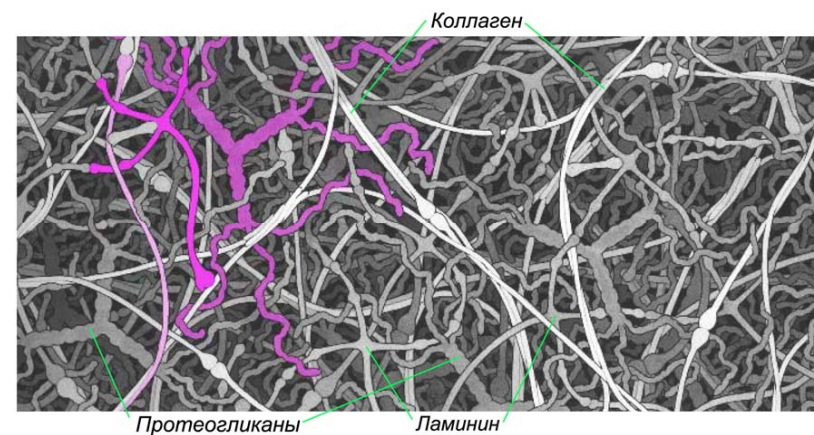


Рисунок 14.11 – Структура базальной мембраны

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 подрешёток *коллагена* и *ламинины*.

Коллаген 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.

14.3. 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 14.12. На рисунке 14.12(а) представлена микрофотография иглы морского ежа, состоящего из сросшихся монокристаллов магнийсодержащего *кальцита* (линейный масштаб (*scale bar*) на рисунке равен 100 мкм) [45].

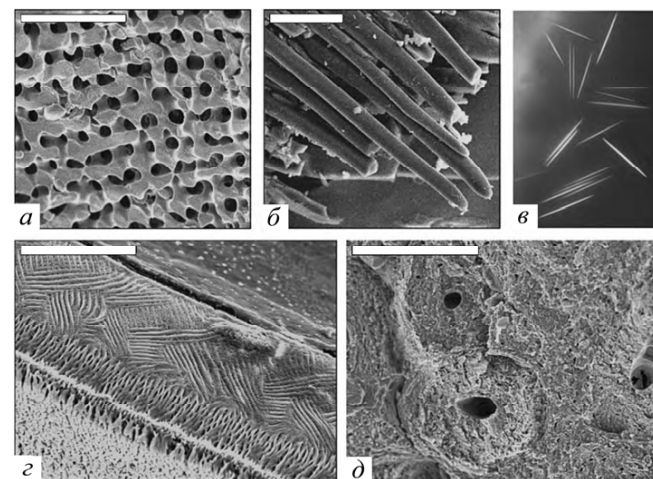


Рисунок 14.12 – Примеры кальциевой биоминерализации

Зуб морского ежа имеет аморфную кальций-карбонатную основу, минерализованную палочкообразными кристаллами *кальцита* (рисунок

14.12(б), скэйл-бар на рисунке равен 20 мкм). Иголообразные кристаллы оксола кальция (CaOx) рафиды, которые растут в везикулярных компартментах листьев растений показаны на поляризационной микрофотографии на рисунке 14.12(в).

Позвоночные также имеют волокнистые минералы, например, эмаль зубов крысы сформирована «палочками» гидроксиапатита, уложенными внахлёт (рисунок 14.12(г), скэйл-бар на рисунке равен 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 14.12(д), скэйл-бар на рисунке равен 200 мкм).

Разнообразие минеральных кремнезёмных панцирей диатомей (*Diatomeae*) показано на рисунке 14.13 [41].

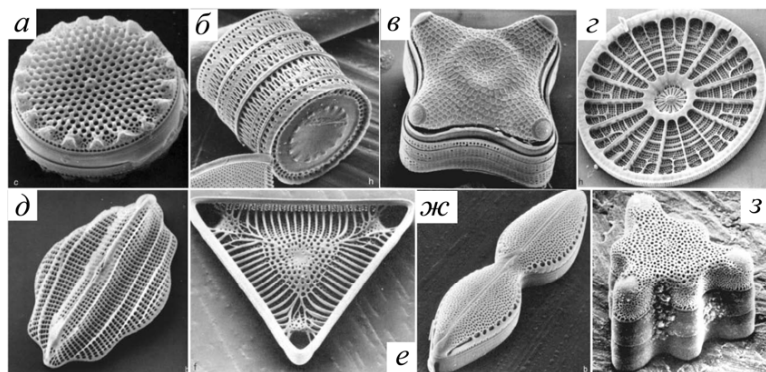


Рисунок 14.13 – Примеры кремниевых панцирей диатомей: а – *Thalassiosira* sp.; б – *Paralia sulcata*; в – *Amphitetras* sp.; г – *Arachnoidiscus* sp.; д – *Cymatoneis* sp.; е – *Sheshukovia* sp.; ж – *Dictyoneis* sp.; з – *Hydrosera* sp.

На рисунке 14.14 представлены примеры кремнистых структур (шестилучевые кремнистые иглы), формирующих скелет стеклянных губок *F. ossa* (glass sponges или *Hexactinellid sponges*, рисунок 14.14(а,б)) и каменных губок *Neopelta* sp. (*Lithistidae* или *lithistid sponges*, рисунок 14.14(в,г)) [36].

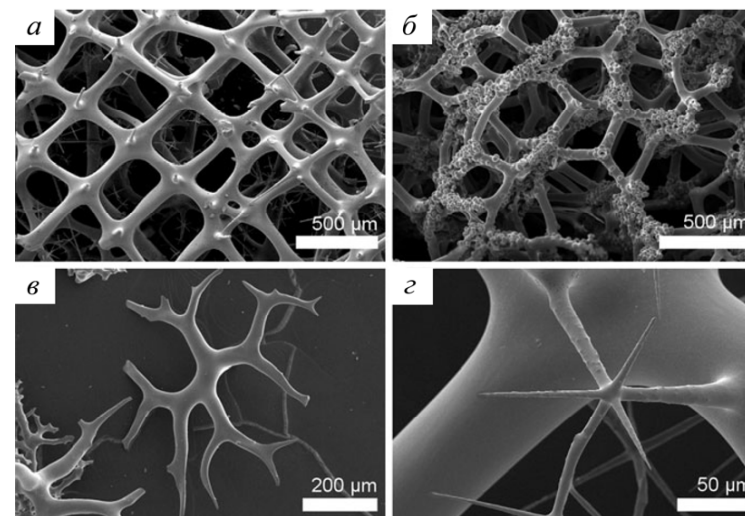


Рисунок 14.14 – Примеры кремнистых скелетов губок

Ещё один пример изящных биоминеральных структур – это иглы плоского морского ежа необыкновенного (*Scaphechinus mirabilis* или *Sand dollar*) (рисунок 14.15) [36].

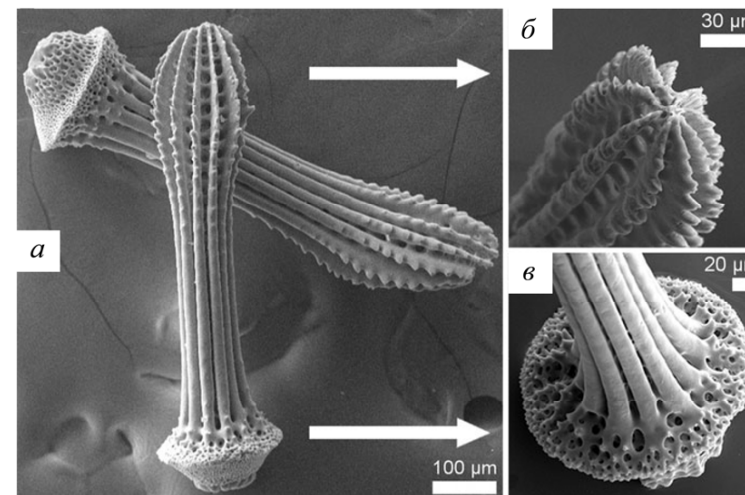


Рисунок 14.15 – Микрофотографии иглоков *S. mirabilis*

Эти иглы в процессе эволюции утратили свою первоначальную защитную функцию и используются для закапывания в песчаный грунт и фильтрации и перемещения питательных веществ к ротовому отверстию. На рисунках 14.15(б) и (в) представлены увеличенные изображения вершины и основания (*tubercle*) иглы. Огромное разнообразие строения таких иглоек, однозначно связанного с выполняемыми ими функциями, может быть использовано бионанотехнологиями для разработки пористых, иерархически структурированных искусственных биоматериалов.

Другой пример ажурных биоминеральных структур – это *кальцитные кокколиторы* (*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 (рисунок 14.16) [67].

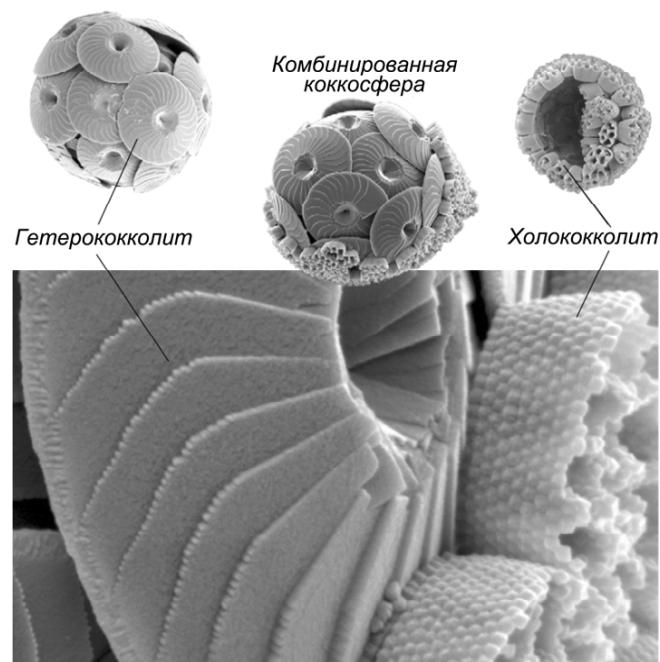


Рисунок 14.16 – Кокколиторы *Calcidiscus leptoporus* ssp. *quadriperforatus*

Несмотря на их малый размер (1–10 мкм), *кокколиторы* представляют собой детально проработанные биоминеральные конструкции, характеризующиеся точным контролем как образования кристаллического зародыша, так и роста кальцитовых кристаллов, контролируемых биологической системой.

Кокколиторы широко используются в геологии как маркерные окаменелости, чтобы определить возрасты осадков, особенно при бурении пород. Диплоидные и гаплоидные формы кокколитофоридов формируют *гетерококколиторы* (*heterococcoliths*) и *холококколиторы* (*holococcoliths*), соответственно (рисунок 14.16).

Представленная на рисунке 14.16 комбинированная коккосфера *Calcidiscus leptoporus* ssp. *quadriperforatus* с кокколитофорами двух типов встречается очень редко.

Более экстремальный (и эффектный) пример бионанодизайна кокколитофов демонстрирует *Rhabdosphaera clavigera* (рисунок 14.17, скэйл-бар на рисунке равен 1 мкм) [67].

Коккосфера *Rhabdosphaera clavigera* выложена овальными элементами с чётко выраженным ободком и центральной областью, покрытой индивидуально кристаллизованными чешуйчатыми элементами с ромбическими гранями (рисунок 14.17(б)).

На поверхности коккосферы располагаются ажурные спиральные шипы, сформированные пятью стопками смещённых друг относительно друга ромбических монокристаллов (рисунок 14.17(в)).

Ещё примеры биоминерализации представлены на рисунке 14.18. Кристаллы *кальция оксоата моногидрата* ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) [67] синтезируются в клетках растений (рисунок 14.18(а), скэйл-бар на рисунке равен 10 мкм).

Кристаллы *кальция оксоата дигидрата* ($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, рисунок 14.18(б), скэйл-бар на рисунке равен 200 мкм) и *брушиита* (фосфат кальция, $\text{Ca}(\text{PO}_3\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, рисунок 14.18(в), скэйл-бар на рисунке равен 100 мкм) входят в состав *мочевых конкрементов* (камни, плотные образования, встречающиеся в полостных органах и выводных протоках желёз человека), образующихся при мочекаменной болезни [45].

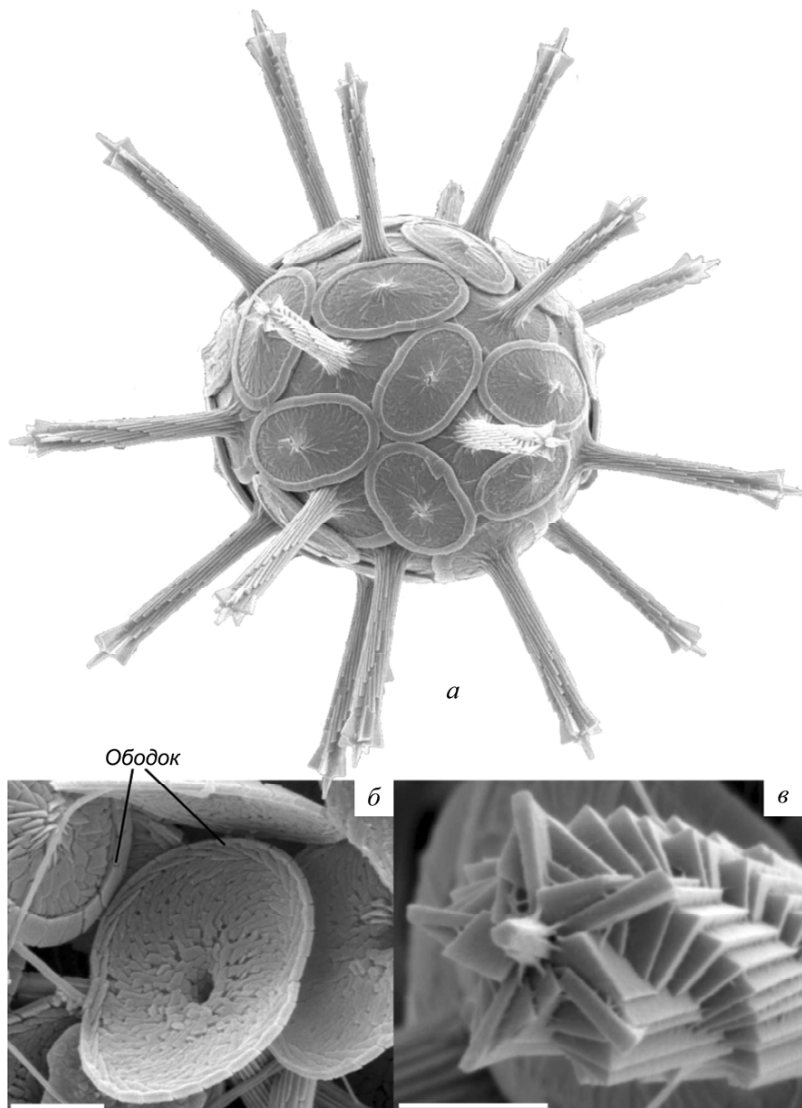


Рисунок 14.17 – Кокколит *Rhabdosphaera clavigera*

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*.

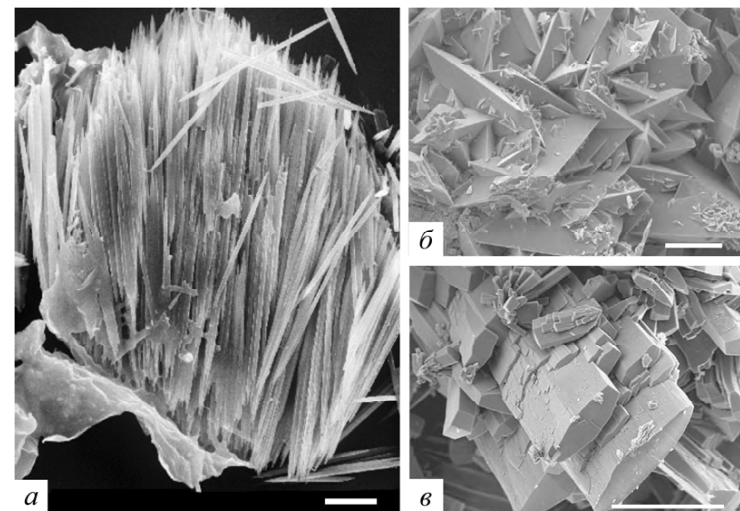


Рисунок 14.18 – Примеры биоминерализации

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 распространённых 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 *сульфатированные 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 *монокристалла кальцита*. Сначала, вследствие слияния нескольких малых везикул, 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 филигранный гибридный материал, синтезированный природой. Он состоит из *чередующихся слоёв* биомолекул и минералов. Биомолекулярные слои, в свою очередь, состоят из отдельных слоёв: 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 *зубках* и *диатомках* (кремниевых водорослях) формируются при помощи белков с избытком аминокислот *серина* или *цистеина*. Эти аминокислоты катализируют объединение многих кремниевых частиц в *аморфное стекло*. Другой пример, минералы на основе *кальциевых* ионов формируются пептидами из *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.

14.4. 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*) изобрёл способ предотвращения таких смещений, названный *вулканизацией*. Резина нагревается вместе с серой, которая образует множество *дисульфидных мостиков* между изопреновыми цепями. Образующаяся *сеть* с 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 14.19). Эластин состоит из *секций*, которые богаты *пролином*, и имеют ту самую спиральную структуру, которая и растягивается при растяжении кожи.

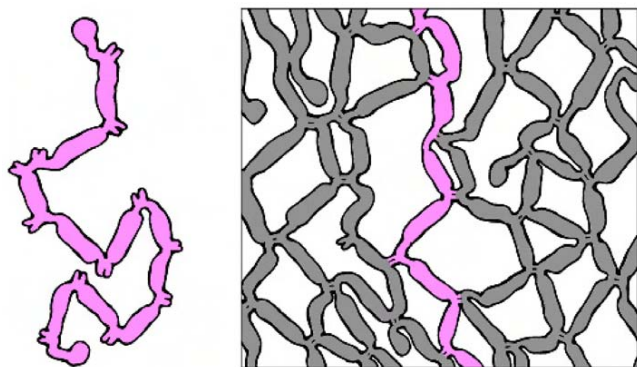


Рисунок 14.19 – Структура эластина

Между этими спиралями находятся *короткие сегменты*, богатые *лизином* (показаны в виде парных выступов на рисунке 14.19). 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 свёрнутых *доменов*, упорядоченных наподобие *цепочки бус* (рисунок 14.20).

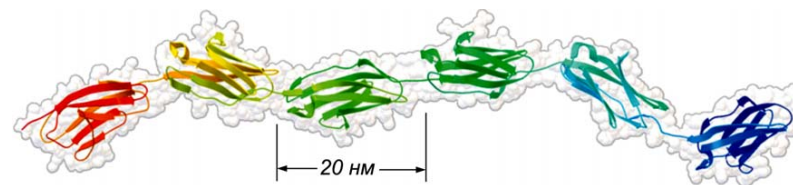


Рисунок 14.20 – Схема цепочки доменов титина

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. 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 [90] разработал *искусственную белковую систему* для тестирования такой методики при проектировании гидрогелей. Разработанные ими 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 таким 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.

14.5. 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 14.21(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).

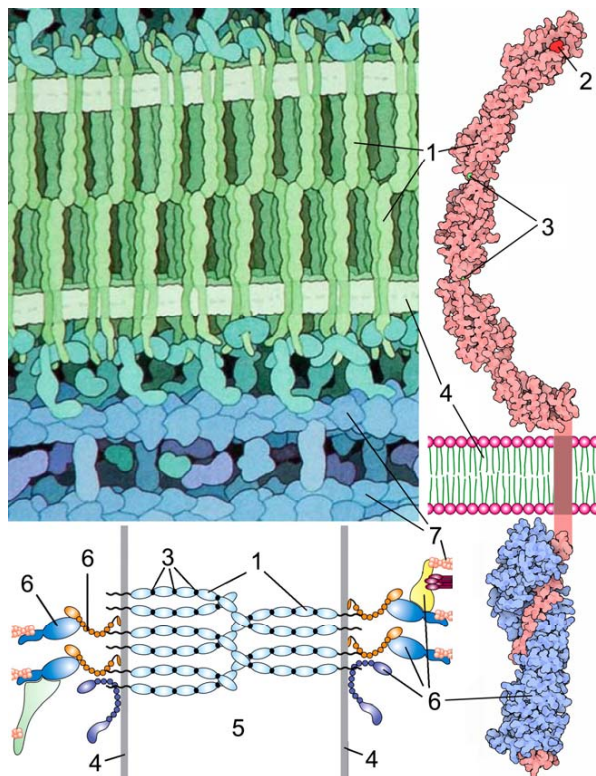


Рисунок 14.21 – Межклеточное соединение с помощью белков кадхеринов

Кальций связывается в кальций-связывающих сайтах между доменами кадгерина (3), обеспечивая необходимую жёсткость. Белки *интегрины* (*integrin proteins*) выступают над поверхностью клетки и присоединяются к инфраструктуре в межклеточном (экстраплазматическом) 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 партнёра 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 *общиадгезивные 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 прилива во время шторма. Такие адгезивы образуются с использованием *специальных белков*, содержащих множество аминокислот, которые имеют дополнительные гидроксильные группы (химически модифицированные, *гидроксильрованные* 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 прикреплён 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. Каковы функциональные особенности молекулярной организации прочных эластичных композиционных биоматериалов?
8. В каких случаях происходит биоминерализация тканей?
9. Какие четыре условия должны быть выполнены для того, чтобы происходил рост кристаллов в ходе биоминерализации?
10. Приведите примеры молекулярных механизмов кристаллообразования и роста минералов в биоструктурах.
11. Каковы функциональные особенности строения эластичных белков?
12. Каковы функциональные особенности строения молекул гелеобразующих белков?
13. Какими двумя свойствами должны обладать адгезивные материалы?
14. В чем функциональное различие специфической и неспецифической адгезии?
15. Каким образом можно управлять адгезивными свойствами биополимеров?

Глава 15

Бионанотранспорт

15.1. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЛИНЕЙНЫХ АТФ-МОТОРОВ

В макромире машины представляют собой набор движущихся частей, приводимых в движение некоторыми *моторами*. Поначалу наномашин представлялись как просто соответственным образом уменьшенные копии, также состоящие из вращающихся колёс, зубчатых передач,

подшипников и наномоторов, сообщающих им движение. Работа машины за счёт энергии специализированного мотора удобна для непосредственного *контроля* за действием машины. В бионаномашинном мире моторы встречаются *редко*. Большая часть работы по наномасштабному перемещению и движению осуществляется за счёт *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 идёт 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* вариантов направленного перемещения вдоль фиксированной траектории. Два наиболее изученных моторных белка, это *кинезин* (*kinesin*), который перемещается вдоль микротрубочек (рисунок 15.1), и *миозин* (*myozin*), который перемещается вдоль актиновых нитей (рисунок 15.2).

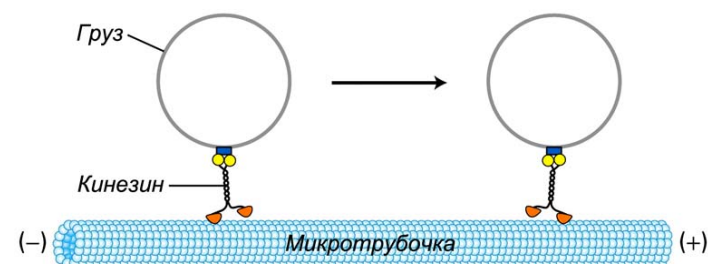


Рисунок 15.1 – Транспорт груза кинезином вдоль микротрубочки

Эти два моторных 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.

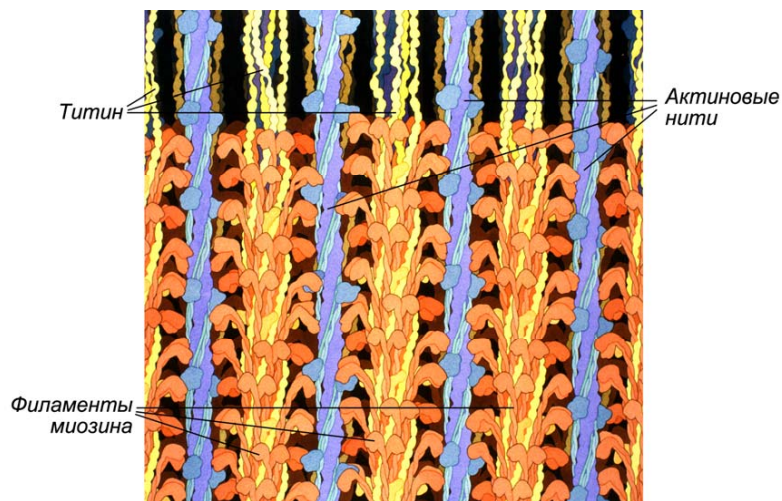


Рисунок 15.2 – Миозиновые филаменты и актиновые нити в саркомере

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. *Кинезин* работает более автономно. Он используется в качестве «грузовика» для перевозки груза вдоль микротрубочки. Он должен соединиться с трубкой 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 сайт связывания АТФ находится вблизи его центра (рисунки 15.3–15.5). В релаксированном состоянии миозин *изогнут*, а конформационный переход, индуциро-

ванный связыванием с АТФ, переводит миозин в *распряmlённое* состояние. Моторный домен миозина состоит из нескольких функциональных частей. Большой *каталитический* домен связывается с АТФ и с актином.

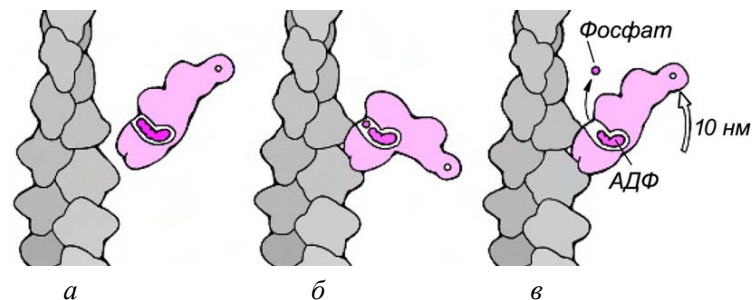


Рисунок 15.3 – Три стадии рабочего цикла миозина

Изменение конформации каталитического домена, которое индуцировано связыванием с АТФ, 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 15.3). На *первом* этапе (в *исходном* состоянии) миозин связан с АТФ и не связан с актином (рисунок 15.3(а)).

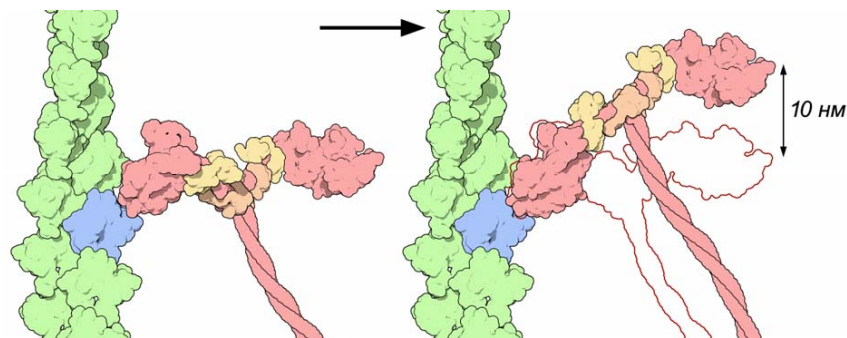


Рисунок 15.4 – Рабочий ход миозина

На *втором* этапе АТФ гидролизуются на АДФ и фосфат, что вызывает такую конформацию актин-связывающего интерфейса, которая позволяет связывание с актином, а миозин принимает изогнутую форму (рисунок 15.5(б)). На *третьем* этапе фосфат диссоциирует, вызывая выпрямление миозина, что и позволяет совершить «рабочий ход» (рисунки 15.3(в) и 15.4)). Замена АДФ на АТФ приводит к диссоциации миозина от актиновой нити и переводит миозин в *исходное* состояние. На рисунке 15.5 представлены результаты кристаллографического исследования моторного домена миозина.

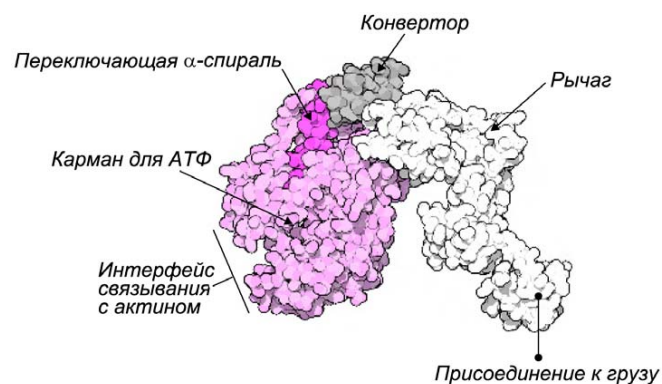


Рисунок 15.5 – Схема моторного домена миозина

АТФ связывается в глубоком кармане (*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. *Поршень* переключающей α-спирали толкает *конвертор*, смещение которого и вызывает движение с большим размахом *домена-рычага* (*lever arm*) (рисунок 15.6).

В *изогнутой* конформации моторного домена миозина, показанной на рисунке 15.6 слева, переключающая α-спираль сдвинута *вверх* в домен-конвертор. В конце «рабочего хода» рычага, когда моторный домен *распрямлён*, переключающая α-спираль сдвинута *вниз* (рисунок 15.6, справа).

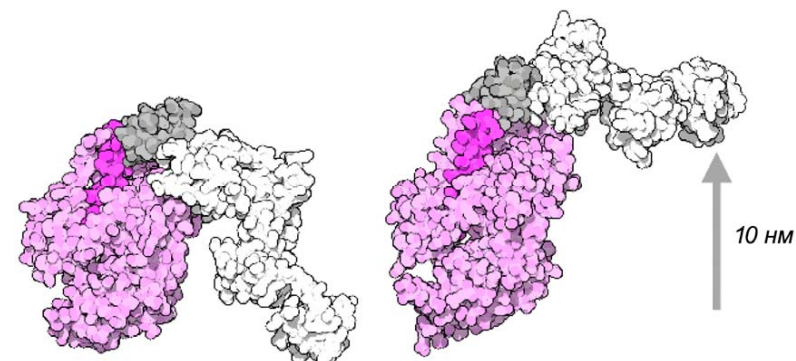


Рисунок 15.6 – Работа рычажного белкового механизма миозина

Кинезин использует принципиально другой подход для движения (рисунок 15.7). В кинезине реализуется необычное *чередование* переходов порядок-беспорядок (упорядочение-разупорядочение) в коротком участке белковой цепи между глобулярным моторным доменом и фибриллярным хвостом, который называется *шейка* (или *шейка-линкер*, *neck linker*).

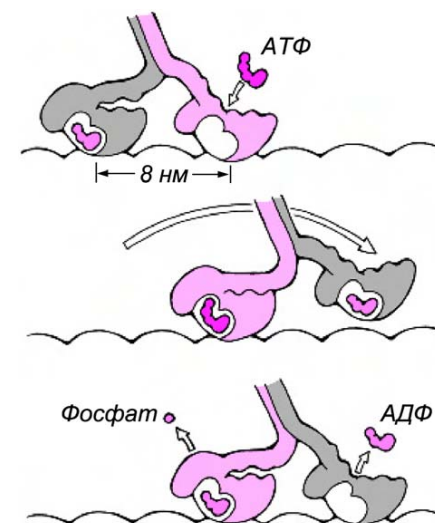


Рисунок 15.7 – Этапы рабочего цикла кинезина

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 *обратно* 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 розовым цветом) субъединица пуста, а с другой (серой) связана АДФ (рисунок 15.7, вверху). АТФ *связывается* с пустой субъединицей, что вызывает *конформационный переход* в «розовую» субъединицу, шейка упорядочивается, «укладывается» в жёлоб и прочно связывается с глобулярной головкой. При этом «розовая» субъединица *отрывает* «серую» субъединицу от микротрубочки, *перемещает* её «*вперёд по ходу движения*» (средняя часть рисунка 15.7), где «серая» субъединица *снова связывается* с микротрубочкой. В результате связывания «серой» субъединицы с микротрубочкой АДФ *диссоциирует*. Диссоциация АДФ от «серой» субъединицы и высвобождение фосфата из «розовой» субъединицы приводят к *обратному переходу* шейки «розовой» 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 15.8 представлена схема моторного домена кинезина.

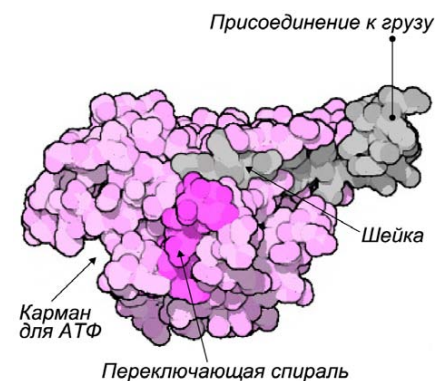


Рисунок 15.8 – Структура моторной головки кинезина

Сайт связывания с микротрубочкой расположен в *нижней* части молекулы на рисунке 15.8. 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 жёлобом, как это и показано на рисунке 15.8. Конформационный переход сенсорных переключающих петель *передаётся* 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 *глицино-вых* аминокислот. Это вращение передаётся рычагу, который жёстко связан с конвертором.

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 (см. п. 18.5).

15.2. НАНОБИОФИЗИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ 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 (рисунок 15.9), которые ещё называют *мембранным* и *цитозольным моторами* и которые используют различные источники энергии для генерации механического вращения. *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 **a**₁**b**₂**c**₁₀.

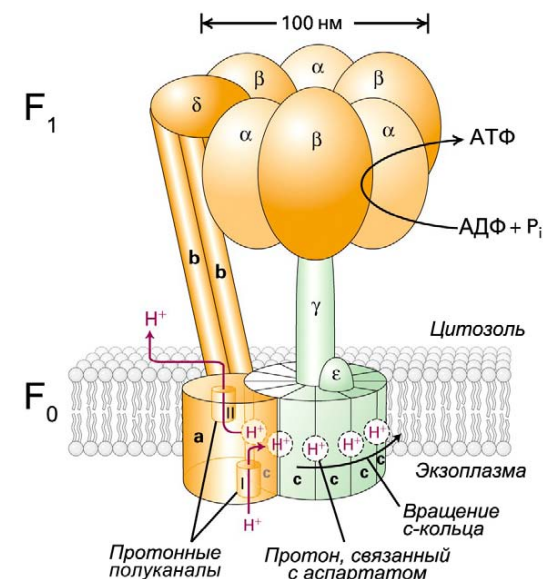


Рисунок 15.9 – Схема АТФ-синтазы в плазматической мембране бактерий

Компонент F_0 митохондрий клеток *животных* содержит 12 субъединиц **с**, а хлоропластов растений – 14 субъединиц **с**. Субъединицы **с** образуют кольцо в плоскости мембраны. Субъединицы **а** и **б** прочно связаны между собой, но не связаны с кольцом субъединиц **с**.

Цитозольный компонент F_1 является водорастворимым комплексом пяти различных полипептидов и имеет структуру $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. В нижней части F_1 находится субъединица ϵ , которая прочно присоединена как к субъединице γ , так и к нескольким субъединицам $\mathbf{c}$ 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 поочерёдно *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 счёт 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 счёт 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, реализующий *процесс вращательной диффузии*, показан на рисунке 15.10.

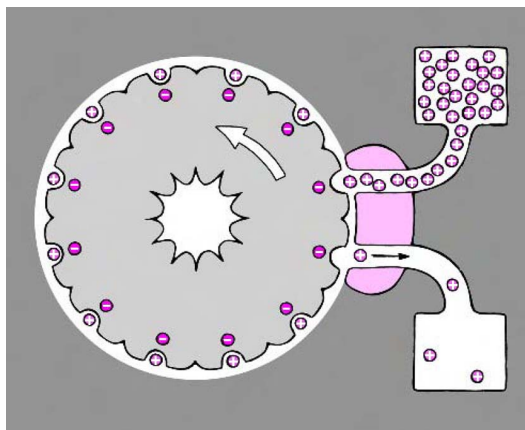


Рисунок 15.10 – Принцип работы ротора АТФ-синтазы

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. Протоны достигают ротора через один *полуканал* в статоре (на рисунке 15.10 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 15.10) 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). 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 15.10 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 15.11).

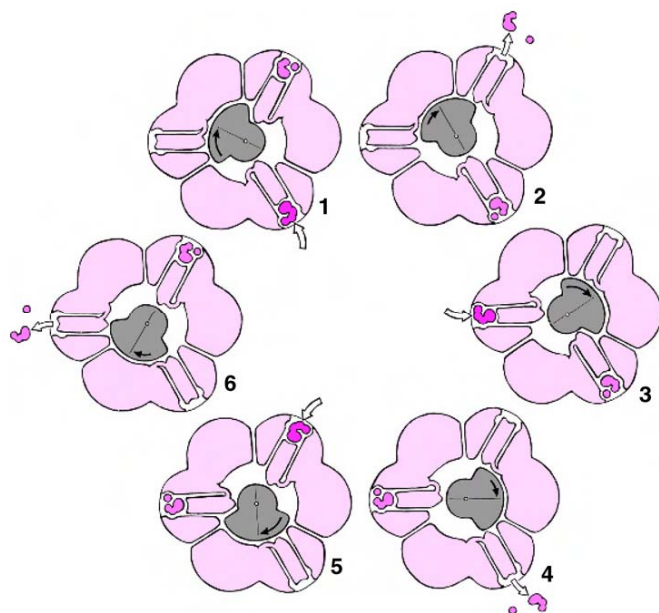


Рисунок 15.11 – Рабочий цикл F_1 мотора

Различные конформации β -субъединиц имеют *различное сродство* к АТФ. Условно выделяют *три* состояния: сжатое, свободное и открытое. На рисунке 15.11 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 прикреплённой 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 [86]. 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 15.12) (см. также п. 18.5).

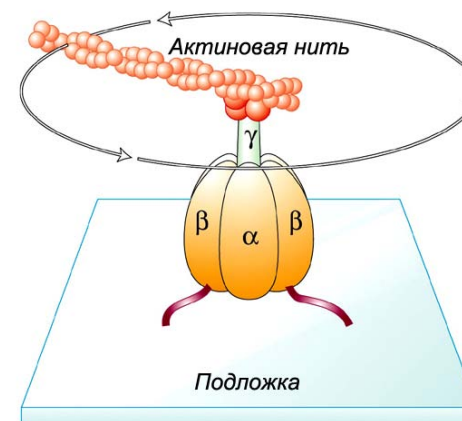


Рисунок 15.12 – Вращение γ -субъединицы АТФ-синтазы

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 15.11). В этом случае АТФ-синтаза работает как *генератор* АТФ.

На рисунке 15.13 показаны конформационные изменения в моторе F_1 при вращении ротора. Изображена только одна каталитическая субъединица, а остальная часть мотора F_1 показана контуром.

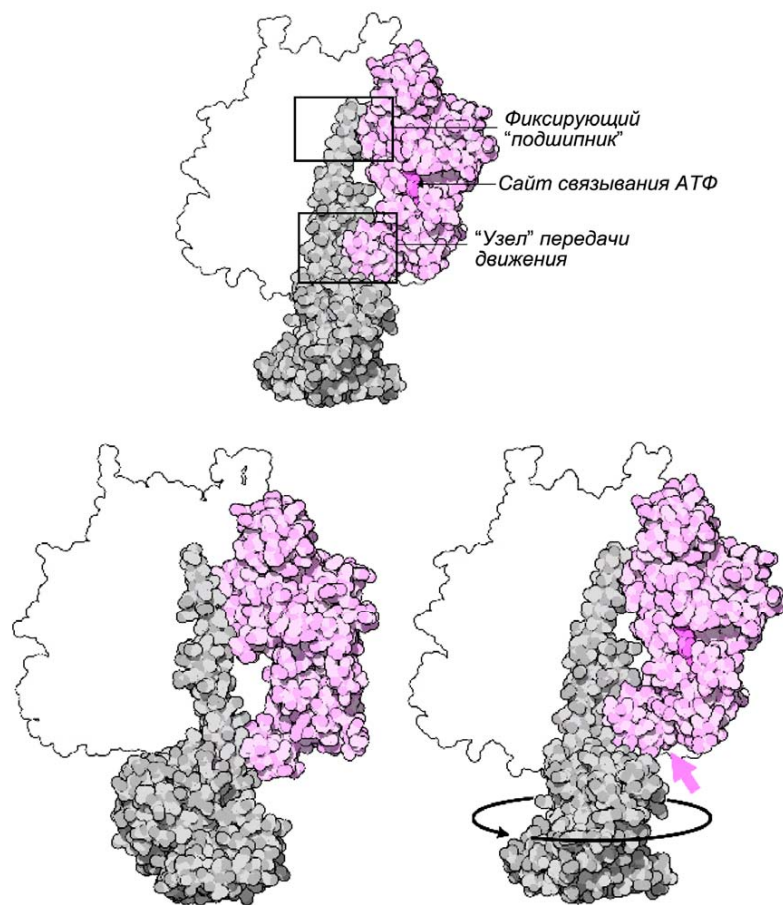


Рисунок 15.13 – Конформационные изменения в F_1 моторе АТФ-синтазы.

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 15.13 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 молекула 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, молекулы АТФ легко связаться с каталитическими субъединицами, но сложно высвободиться, а АДФ, наоборот, сложно связаться, но легко высвободиться. АТФ, легко связавшись с АТФ-синтазой, гидролизует 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 15.14 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. 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.

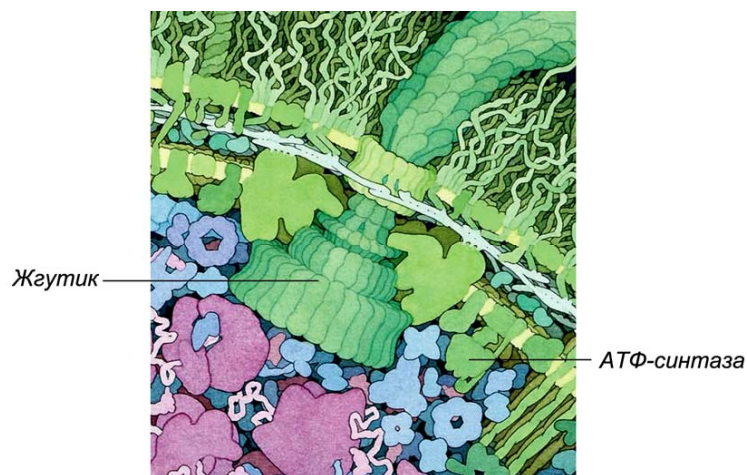


Рисунок 15.14 – Жгутиковый мотор в клеточной стенке бактерии

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.

15.3. ПРИМЕНЕНИЕ БРОУНОВСКОГО ХРАПОВИКА 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.

В механике такие устройства, состоящие из зубчатого колеса и собачки-упора, в которых зубчатое колесо может вращаться только в одном направлении, называют храповиками (рисунок 15.15).

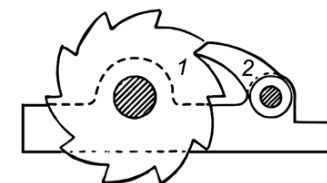


Рисунок 15.15 – Храповой механизм: 1 – зубчатое колесо; 2 – собачка

По аналогии с механикой, молекулярные структуры, способные селектировать движения молекул в нужном направлении, называют *броуновскими храповиками (Brownian ratchet)*. Один из примеров такого рода устройств был рассмотрен ранее – F_0 мотор в АТФ-синтазе (см. п. 15.2). 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 храповика представляет собой актин, который используется в процессе «ползания» клеток. На рисунке 15.16 показан принцип работы такого броуновского храповика. Мономеры актина полимеризуются в тонкие филаменты. На рисунке

изображено, как *мембрана позволяет* нарастить актиновую нить вследствие случайных *тепловых флуктуаций*, которые временно отодвигают мембрану вверх и приоткрывают щель между мембраной и актиновым волокном настолько, что становится возможным добавление очередного актинового мономера к актиновому филаменту.

Гидролиз АТФ в этом мономере, который только что был присоединён к нити, *закрепляет* его на конце нити, и мембрана, продолжая совершать тепловые флуктуации, теперь находится в новом положении. Процесс может повторяться вновь и вновь. Броуновский храповик создаётся *комбинацией* случайных флуктуаций мембраны и необратимым присоединением мономеров актина, что и создаёт 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.

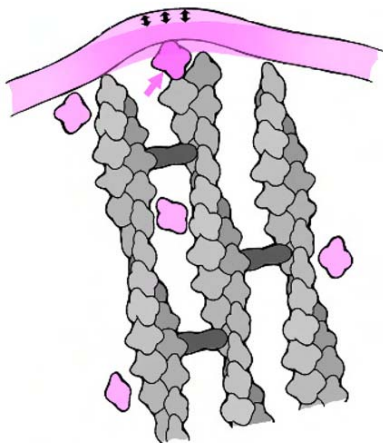


Рисунок 15.16 – Схема работы актинового броуновского храповика для растяжения мембраны

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 растёт с одного («нужного») конца и диссоциирует на другом конце (рисунок 14.5). 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 перемещается 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 *профиллин* 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 *экспортировать* растущие концы большинства этих нитей *специальными белками* (рисунок 14.5). Тогда все мономеры актина, диссоциировавшие со всех хвостов нитей, будут использованы для наращивания только тех нитей, которые остались *не экспортированными*. Так можно сформировать определённые выступы на поверхности клетки.

15.4. НАНОБИОФИЗИЧЕСКИЕ 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. Только немногие

вещества могут диффундировать через липидный бислой самостоятельно. Для реализации трансмембранного транспорта в мембранах существует *широкий набор активных и пассивных транспортных систем* для перемещения молекул веществ через мембрану. Перенос молекул большинства веществ через мембрану осуществляется специализированными транспортными мембранными белками. Водорастворимые метаболиты переносятся через мембрану внутри трансмембранных доменов этих белков, которые изолируют метаболиты от контакта с гидрофобной частью биомембраны. Формально разделяют:

- АТФ-насосы (рисунок 15.17(а));
- ионные каналы (рисунок 15.17(б));
- транспортёры или переносчики (рисунок 15.18).

АТФ-насосы, или просто *насосы*, являются АТФазами, в которых энергия гидролиза АТФ используется для переноса ионов или малых молекул через мембрану (рисунок 15.17(а)).

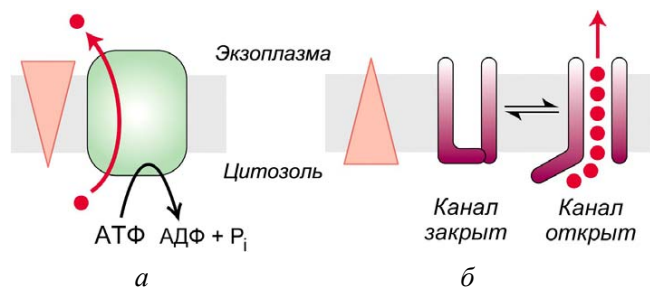


Рисунок 15.17 – Транспорт веществ через мембрану: а – АТФ-насос, б – ионный канал. Треугольниками обозначены градиенты концентрации

Направление переноса определяется структурой АТФ-насоса и *не связано* с направлением градиента концентрации метаболита по обе стороны мембраны. Поэтому насосы являются активными транспортёрами и используются клетками для *создания концентрационного градиента*, перенося ионы из клеточного компартмента с низкой концентрацией в компартмент с высокой концентрацией данного иона. Транспорт такого

типа называется *активным транспортом*, а образующийся градиент концентрации ионов (электрохимический градиент) формирует электрический *мембранный потенциал* биомембраны.

Хорошо изучены три типа *ионных насосов*:

- 1) Ca^{2+} -АТФаза;
- 2) Na^+/K^+ -АТФаза;
- 3) протонная помпа.

Канальные белки (рисунок 15.17(б)) обеспечивают пассивный транспорт молекул и ионов через биомембрану за счёт трансмембранного градиента концентрации. Иногда такой процесс диффузии вещества через мембрану, обеспечиваемый канальными белками, называют *облегчённой диффузией с фиксированным переносчиком*. Некоторые каналы всегда открыты, другие имеют так называемые белковые «ворота» – подвижные домены, которые в ответ на внешнее воздействие закрывают канал.

Трансмембранный транспорт с помощью *переносчиков* или *транспортёров* подразделяют на схемы *унипорта*, *симпорта* и *антипорта* (рисунок 15.18).

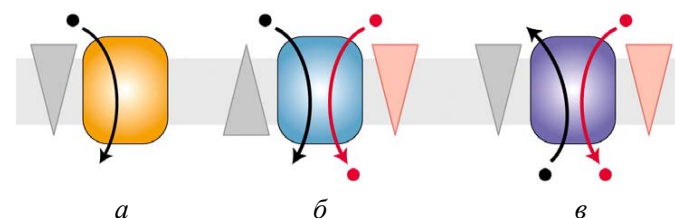


Рисунок 15.18 – Схемы вторичного трансмембранного транспорта: а – унипорт, б – симпорт, в – антипорт. Треугольниками обозначены градиенты концентрации или электрического потенциала на биомембране

Унипорты переносят единственный тип молекул по направлению градиента за счёт облегчённой диффузии. Глюкоза и аминокислоты транспортируются через плазматическую мембрану клетки через такие унипорты. Поэтому перенос веществ унипортами относят к *облегчённой диффузии* при пассивном транспорте через мембрану. В *антипортах* или

симпортах, в отличие от унипортов, эндергоническое перемещение молекулы или иона данного типа против градиента концентрации энергетически сопряжено с экзергоническим перемещением одной или нескольких молекул или ионов других типов по их электрохимическому градиенту концентрации. Оба этих типа транспортёров иногда называют общим названием *котранспортёры* (или *копереносчики*), подчёркивая их особенность переносить два вида молекул одновременно.

В отличие от АТФ-насосов, в которых источником энергии для транспорта вещества является гидролиз АТФ, котранспортёры используют энергию, *предварительно запасённую в электрохимическом градиенте*. В этом смысле такой вид транспорта тоже носит название *активный*, но, поскольку необходимый электрохимический потенциал должен быть *предварительно* создан (чаще всего работой именно ионных насосов), то такой вид транспорта носит название *вторичный активный* транспорт.

Канальные белки. 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*. Каналы в порине формируются в виде полых цилиндров, образованных β -структурами (рисунок 15.19).

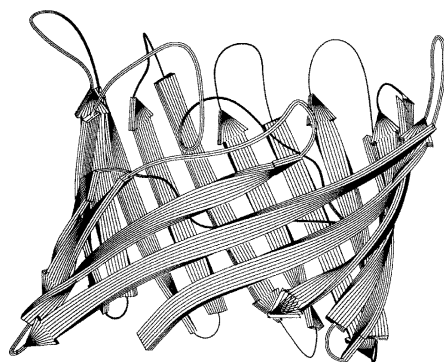


Рисунок 15.19 – Схема пространственного расположения β -структур белковой цепи в субъединице порина *R. blastica*

Порины в наружной мембране бактерии имеют тримерную структуру (рисунок 15.20). 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.

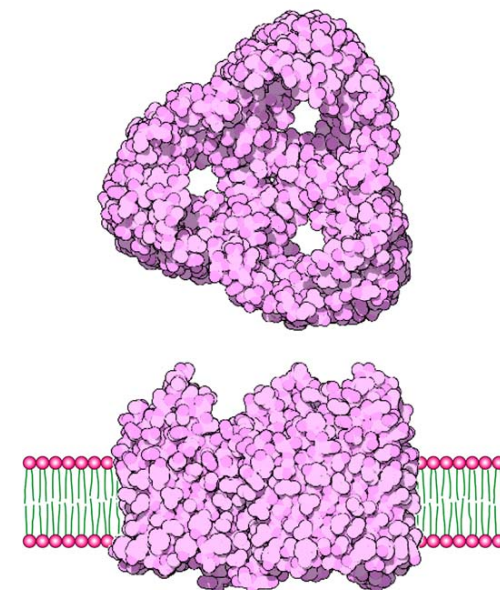


Рисунок 15.20 – Бактериальный порин

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. 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 каналному 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 15.21).

Калиевые каналы пропускают ионы *калия*, но не пропускают ионы *натрия* и *хлора*, которых всегда много в водной среде.

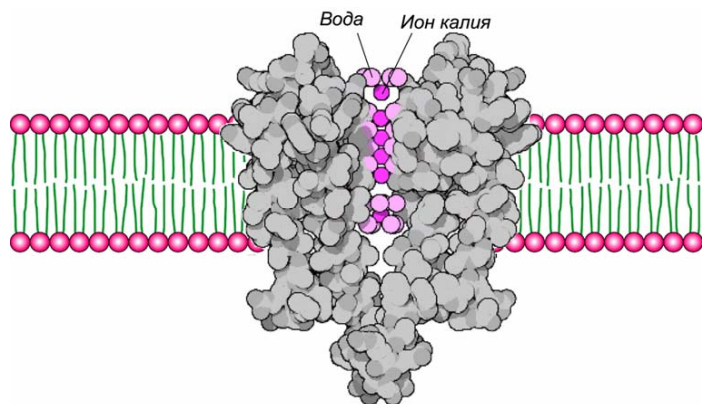


Рисунок 15.21 – Схема калиевого канала биомембраны

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. 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 (рисунки 15.22, 15.13).

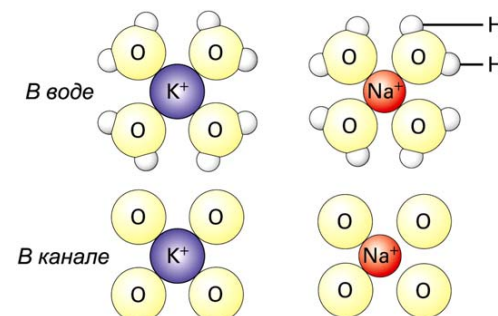


Рисунок 15.22 – Схемы координирования ионов молекулами воды и карбонильными кислородами глицинов в калиевом канале

Для ионов калия геометрия канала оптимальна, а для ионов натрия нет. Поэтому натрию энергетически невыгодно «заменить» гидратную оболочку на положение в центре кислородного кольца (рисунок 15.22). Ионные радиусы кислорода, калия и натрия составляют 1,4; 1,33 и 0,95 Å, соответственно (1 нм = 10 Å).

Кольцо кислородных атомов расположено так, что K^+O -расстояние (1,4+1,33=2,73 Å) – оптимально для взаимодействия кислорода с *калием*.

Для *натрия* Na^+O -связь короче (0,95+1,4=2,35 Å). Поэтому для *натрия* величина проигрыша в энергии при дегидратации превышает энергетический выигрыш при связывании иона Na^+ в канале, и процесс диффузии ионов Na^+ через *калиевый* канал не может идти самопроизвольно (рисунок 15.23(б)).

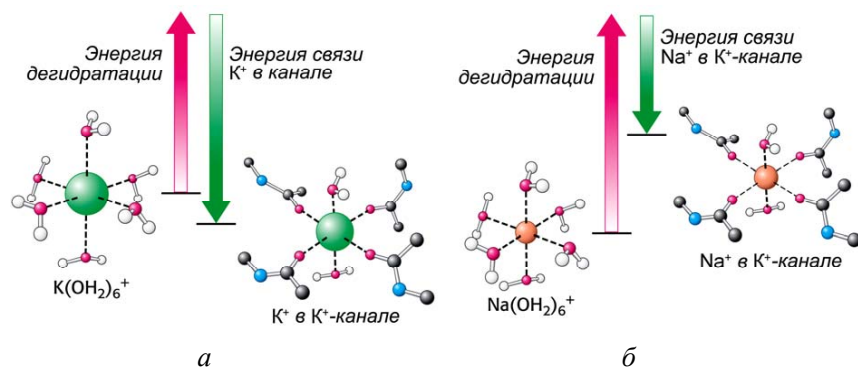


Рисунок 15.23 – Энергетика селективности K^+ -канала: а – для K^+ , б – для Na^+

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.

АВС-транспортёры. Самыми распространёнными транспортными белками в клетках являются *АВС-транспортёры*, где аббревиатура АВС означает АТФ-связывающая кассета (*ATP-binding cassette*), которая обнаружена во всех АВС-транспортёрах (рисунок 15.24(а)).

Все белки большого семейства АВС-транспортёров состоят из двух трансмембранных доменов (Т) и двух цитозольных АТФ-связывающих доменов (А), которые сопрягают гидролиз АТФ с переносом метаболитов через мембрану. В одних АВС-транспортёрах (преимущественно в бактериях) эти четыре домена являются независимыми субъединицами, в других – они объединены в единую полипептидную цепь. АВС-транспортёры 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 (рисунок 15.24(в)).

Считается, что АВС-транспортёр работает по *флип-флоп* механизму, при котором зажим «прищепки» попеременно открывается и закрывается. 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 АВС-транспортёры, которые переносят множество различных молекул таких, как аминокислоты, ионы, сахара, витамины, токсины и т. д.

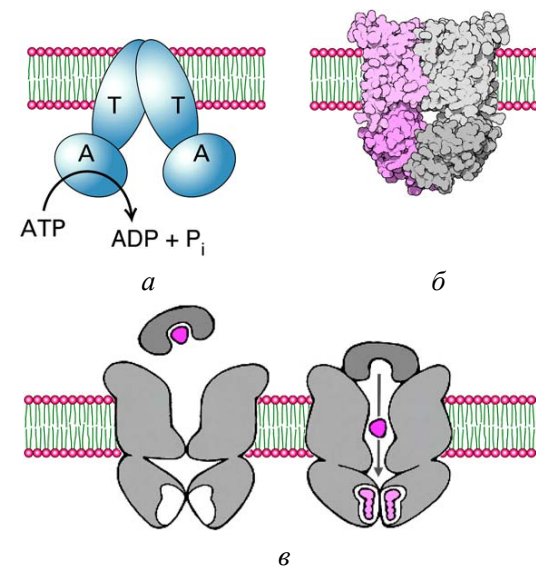


Рисунок 15.24 – Принцип действия АВС-транспортёров: а – схема; б – бактериальный BtuCD-транспортёр; в – схема работы BtuCD-транспортёра

На рисунке 15.24(б) изображён *бактериальный* BtuCD-транспортёр, который переносит витамин B_{12} через мембрану. Транспортёр имеет большой карман, который обычно открыт *наружу* клетки. 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.

Принцип 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 12.8). 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 поочерёдно 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 15.25). 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.

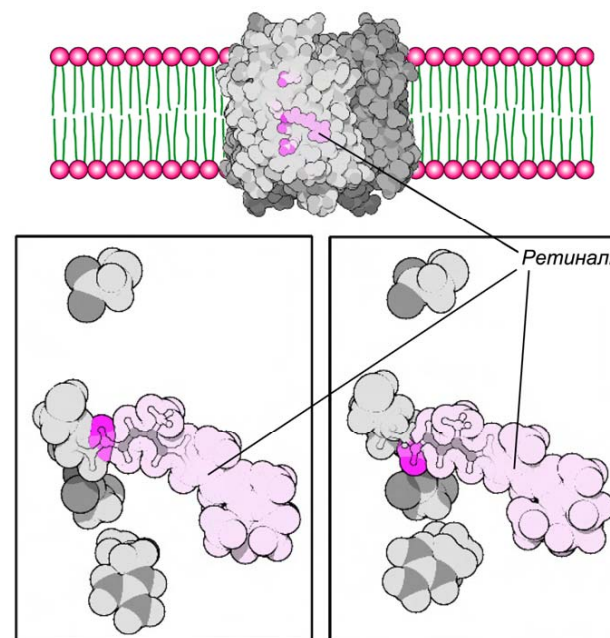


Рисунок 15.25 – Два состояния компонентов бактериородопсина до и после поглощения света

Цикл реализуется только в *одном* направлении, перекачивая протоны в одном направлении через мембрану, поскольку он зависит от поглощения фотона для возбуждения белка из низкоэнергетического в высокоэнергетическое состояние. В основе функционирования бактериородопсина лежит изменение конформации малой молекулы-кофактора *ретиная*. 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 *изогнутой цис-формы* в *линейную транс-форму* (рисунок 15.26). Ретиналь связан с окружающим белком, поэтому эти изменения в форме молекулы передаются белку, изменяя конформацию и способствуя высвобождению протона.

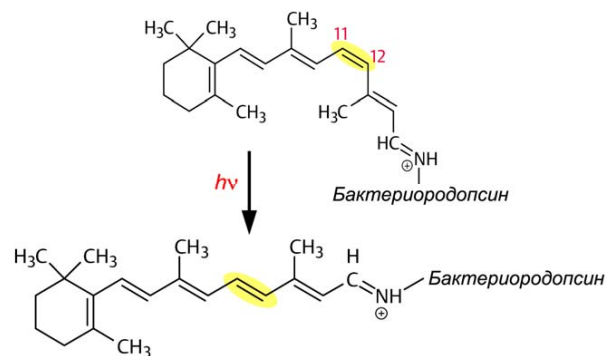


Рисунок 15.26 – Изменение конформации ретиналя при поглощении света

На рисунке 15.25 показаны изменения во взаимном расположении компонентов бактериородопсина в результате поглощения света. Молекула ретиналя показана розовым цветом. *Цис-транс переход* при поглощении света изображён в шаростержневом представлении. Значительное пространственное смещение аминогруппы на конце ретиналя изменяет *положение* нескольких *аминокислот* в цепи переноса протона (показанной серым цветом на рисунке).

15.5. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА

Мембранные структуры клетки активно участвуют во внутриклеточном транспорте метаболитов. Так, например, белки, после синтеза на рибосомах в цитозоле, должны быть доставлены в необходимые органеллы

(или за пределы клетки). Существует *три основных механизма*, с помощью которых клетка решает эту задачу (рисунок 15.27).

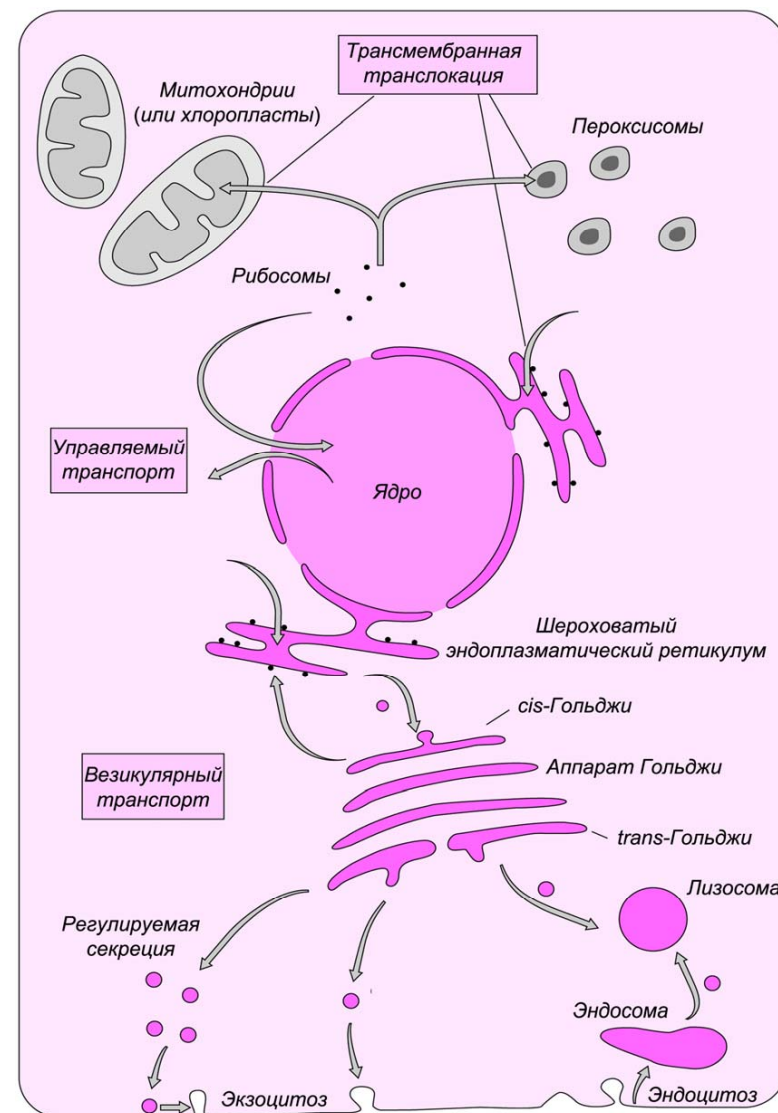


Рисунок 15.27– Механизмы внутриклеточного транспорта белков

1. Белок после синтеза и фолдинга в неизменном виде доставляется в нужную органеллу через специализированные поры в мембранах. Такой вид доставки называется *управляемый транспорт (gated transport)*.
2. *Трансмембранная транслокация (transmembrane translocation)* белков, в ходе которой полипептид сначала денатурируется, затем полипептидная цепочка протягивается через одну или несколько мембран, а затем снова происходит фолдинг функционального белка.
3. *Везикулярный транспорт (vesicular trafficking)* белков, в ходе которого от мембраны отпочковывается везикула, в состав которой входят транспортируемые белки.

С помощью *управляемого транспорта*, например, в ядро клетки через ядерные поры доставляются все белки. *Трансмембранная транслокация* обеспечивает доставку синтезированных в цитозоле белков в пероксисомы, митохондрии и хлоропласты. *Везикулярный транспорт* обеспечивает доставку белков в лизосомы и секрецию белков из клетки.

Адресация белков обеспечивается наличием в их структуре специальных *сортировочных сигналов (sorting signals)*. Сразу после окончания синтеза белка рибосомой в цитозоле, когда он является просто полипептидом, сортировочными сигналами являются последовательности аминокислот на концах белковой цепи, которые называют *нацеливающими последовательностями (targeting sequences или localization sequences)*.

Для белков, которые синтезируются на мембранах шероховатого эндоплазматического ретикула, *дополнительные* сортировочные сигналы (*sorting signals*) (такие, как сахара или фосфатные группы) могут быть добавлены с помощью специализированных ферментов в цистернах аппарата Гольджи в ходе посттрансляционной модификации белков. Такие сигналы обычно представляют собой *специфические лиганды*, которые распознаются рецепторными белками, а эти рецепторные белки с присоединёнными к ним транспортируемыми белками, в свою очередь, присоединяются к мембранным транслокационным комплексам соответствующего компартмента. Нацеливающие последовательности белка, которые представляют собой цепочку из 3–80 аминокислот, тоже распознаются

специализированными рецепторами, которые доставляют данный белок к соответствующим транслокационным комплексам. После доставки в нужный компартмент нацеливающие последовательности обычно *отрезаются* от белковой цепи специализированными ферментами.

Одними из наиболее изученных нацеливающих последовательностей являются *сигнальные пептиды (или сигнальные последовательности, signal sequences)* – цепочки из 5–15 преимущественно гидрофобных аминокислот. Наличие такой сигнальной последовательности в синтезируемом белке вынуждает рибосому присоединиться к эндоплазматическому ретикулуму, и синтезируемая белковая цепь направляется не в цитозоль, а в люмен ретикула. Другой пример нацеливающей последовательности – *сигнал импортирования (import signal)* для белков, которые должны быть перемещены из цитозоля в *матрикс митохондрии*. Этот сигнал представляет собой цепочку из 20–80 аминокислот, формирующих *амфипатическую* полярную α -спираль, у которой положительно заряженные аминокислоты выстроены с одной стороны спирали, а гидрофобные аминокислоты – с другой. Для нацеливания белков в ядро клетки определена последовательность из *пяти* положительно заряженных аминокислот. Для переноса белков в пероксисому служит *пероксимальная нацеливающая последовательность* Ser-Lys-Lys-COOH – С-конечный трипептид. Существуют также сортировочные сигналы, которые не способствуют перемещению белка, а наоборот, служат сигналом о том, что белок уже доставлен к месту назначения и никуда далее его *не следует перемещать*. Например, белки с так называемой KDEL-последовательностью Lys-Asp-Glu-Leu-COOH на С-конце остаются в эндоплазматическом ретикулуме и не должны удаляться из него везикулярным транспортом. Иллюстрацией вышесказанного может быть кальций-связывающий белок гладкого эндоплазматического ретикула *калретикулин (calcium-binding protein of the endoplasmatic reticulum – calreticulin)*, чья первичная структура изображена на рисунке 15.28.

Первые *семнадцать* аминокислот на N-конце калретикулина являются сигнальной последовательностью, которая инициирует *транслокацию* белка в люмен эндоплазматического ретикула, а последние *четыре*

аминокислоты – последовательность KDEL – не позволяет белку уйти из ретикулума. Между этими сортировочными сигналами располагается первичная структура белка.

17 аминокислот

(NH₂)MLLSVPLLLGLLGLAVAEPAVYFKEQFLDGDGWTSRWIESKHKSDFGKFLSSSGKF
 YGDEEKDKGLQTSQDARFYALSASFEPFSNKGQTLVVQFTVKHEQNIDCGGGYVKLFP
 NSLDQTDHMGDSEYNIMFGPDICPGTKKVHVIFNYKGKVNLINKDIRCKDDEFTHLYT
 LIVRPDNTYEVKIDNSQVESGSLEDDWDFLPPKKIKDPDASKPEDWDERAKIDDPDTSKP
 EDWDKPEHIPDPDAKKPEDWDEEMDGEWEPPIQNPPEYKGEWKPRQIDNPDKGTWIH
 PEIDNPESPDPSIYA YDNFGVLGLDLWQVKSGETFDNFLTND EAYAEFGNETWGVTK
 AA EKQMKDKQDEEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDKEDDEDKDEDEEEDKEEDEEED
 VPGQA KDEL(COOH)

4 аминокислоты

Рисунок 15.28 – Аминокислотная последовательность калретикулина

Везикулярный транспорт. Гликопротеины, переносимые из шероховатого эндоплазматического ретикулума в другие места, «упаковываются» в мелкие *транспортные пузырьки* (везикулы), которые отщепляются от промежуточной части эндоплазматического ретикулума. Стенка этих пузырьков состоит из липидов и белков мембраны ретикулума, а сами пузырьки содержат растворимые гликопротеины, захваченные из полости эндоплазматического ретикулума. Большинство из этих пузырьков сливается, образуя плоские цистерны на ближней к ядру стороне аппарата Гольджи, с так называемой *формирующейся*, или *цис*-стороны (*формирующий полюс*). В цистернах аппарата Гольджи происходит дальнейшее «созревание» синтезированных в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и перешедших в аппарат Гольджи белков.

«Созревание» белков включает различные ковалентные модификации, в результате которых белки *приобретают свою функционально-активную структуру*. Кроме того, очень сильно модифицируются олигосахариды, присоединившиеся ранее к белкам в эндоплазматическом ретикулуме – некоторые остатки сахаров избирательно отщепляются, а некоторые новые добавляются. *Процессинг* олигосахаридов осуществляется с помощью нескольких различных чрезвычайно сложных и точно «запрограммированных» ферментных механизмов. Выбор «программы»

модификации определяется каким-то (пока неизвестным) свойством каждой индивидуальной полипептидной цепи. Ферменты, осуществляющие модификацию белков, как и сами модифицирующиеся белки, тоже, вероятно, попадают в аппарат Гольджи из эндоплазматического ретикулума. В настоящее время считается, что после процессинга присоединённый к белку олигосахарид становится «адресом», указывающим, куда должен быть доставлен данный белок. «Созревшие» белки снова «упаковываются» в транспортные пузырьки, но уже на *зрелой*, или *транс*-стороне (*секретирующий полюс*).

Обобщённая схема везикулярного транспорта представлена на рисунке 15.29. Белки, которые синтезированы в шероховатом ЭР (1) упаковываются в транспортные везикулы (2), которые отсоединяются от ШЭР и сливаются вместе, образуя новую цистерну цис-Гольджи сети (*cis-Golgi network*, CGN). Ферменты и белки эндоплазматического ретикулума, которые попали в такой пузырёк, а также мембранные белки, которые обеспечивают формирование везикул, *возвращаются* в шероховатый эндоплазматический ретикулум для «повторного» использования (3) в пузырьках, которые отъединяются от цис-стороны аппарата Гольджи и сливаются с мембраной ШЭР. Каждая цистерна Гольджи из цис-области физически *перемещается* через промежуточную область в транс-область аппарата Гольджи посредством невезикулярного процесса, который называется *цистернальная прогрессия* (*cisternal progression*) (4). «Возврат» специфических для каждой области аппарата Гольджи белков осуществляется везикулярным механизмом (5). Во всех клетках определённые белки постоянно перемещаются к поверхности в везикулах, отъединившихся от транс-стороны аппарата Гольджи, обеспечивая постоянную секрецию белков за пределы клетки (*конститутивная секреция*) (6). В некоторых типах клеток определённые белки «запасаются» в секреторных везикулах (7) и секретируются только после получения клеткой внешнего нейро- или гормонального сигнала (*регуляторная секреция*). Белки и липиды, которые предназначены для лизосом (8), отсоединяются от транс-стороны аппарата Гольджи и присоединяются к *вторичным эндосомам*, которые затем сливаются с лизосомой.

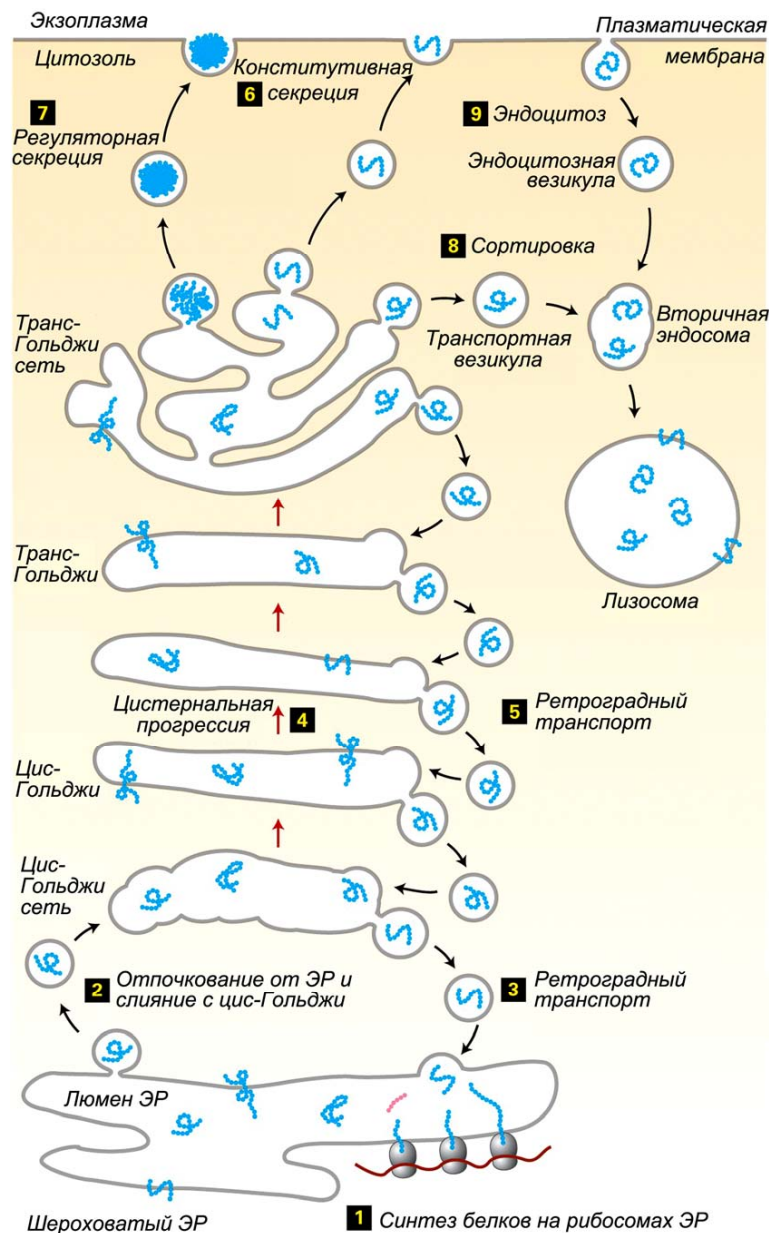


Рисунок 15.29 – Обобщённая схема везикулярного транспорта

Белки из внеклеточного пространства и мембранные белки плазматической мембраны клетки, которые в процессе эндоцитоза (рисунок 15.29(9)) формируют эндоцитозные везикулы (отъединяющиеся от плазматической мембраны внутрь клетки), также перемещаются внутрь лизосом через эндосомы.

Большинство транспортных пузырьков–везикул представляют особый класс внутриклеточных пузырьков, которые на микрофотографиях выглядят окружёнными со стороны цитоплазмы *щетинобразной каймой*, и потому называются *окаймлёнными пузырьками (coated vesicles)*. Диаметр окаймлённых пузырьков варьирует от 50 до 250 нм. Окаймление образуют *три типа белков*:

- 1) COPII-белок (*COat Protein II*) покрывает везикулы, транспортирующие белки из шероховатого эндоплазматического ретикула в аппарат Гольджи;
- 2) COPI-белок (*COat Protein I*) покрывает везикулы, осуществляющие «возвратный» транспорт белков между цистернами Гольджи и в шероховатый эндоплазматический ретикулум;
- 3) *клатрин* окаймляет везикулы, которые транспортируют белки от плазматической мембраны и от транс-Гольджи сети к вторичным эндосомам (рисунок 15.30).

Клатрин (180 кДа) вместе с меньшим полипептидом (35 кДа) образует характерный многогранный чехол на поверхности окаймлённых пузырьков. Основным структурным элементом чехла служит белковый комплекс *трискелион*, состоящий из трёх полипептидных цепей клатрина и трёх малых (35 кДа) полипептидов (рисунок 15.30(а)). Трискелионы образуют на поверхности окаймлённых пузырьков *корзиноподобные сетки* из шестиугольников и пятиугольников. Обособленные трискелионы при соответствующих условиях способны к спонтанной агрегации (рисунок 15.30(б)). При этом даже в отсутствие пузырьков формируются типичные многогранные корзинки (рисунок 15.30(в)). В мембраны везикул интегрировано множество *вспомогательных белков*. Эти белки, *во-первых*, в процессе формирования пузырька «вылавливают» из цистерн

аппарата Гольджи белки с одинаковыми олигосахаридными «адресами», и, во-вторых, узнают компоненты мембраны, с которой должен слиться данный пузырёк (рисунок 15.31).

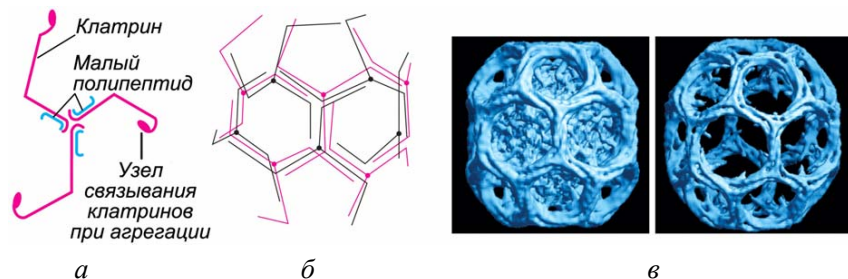


Рисунок 15.30 – Структура клатринового покрытия: а – трискелион; б – упаковка трискелионов в клатриновую оболочку; в – клатриновые корзинки, образованные спонтанной агрегацией трискелионов *in vitro*

Содержимое каждого транспортного пузырька доставляется точно по правильному «адресу» к определённой внутриклеточной мембране.

Существуют различные субпопуляции транспортных пузырьков, имеющих на своей поверхности уникальные вспомогательные белки, так называемые *маркеры стыковки* (v-SNARE белки) (рисунки 15.31 и 15.32), которые опознаются *комплементарными акцепторами* (t-SNARE белки) на мембранах мишеней и формируют SNARE-комплекс.

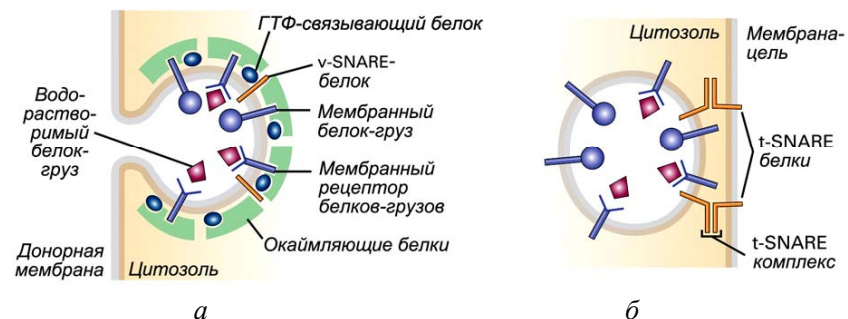


Рисунок 15.31 – Схема везикулярных процессов: а – формирование окаймлённого пузырька из донорной мембраны; б – слияние везикулы с мембраной-целью

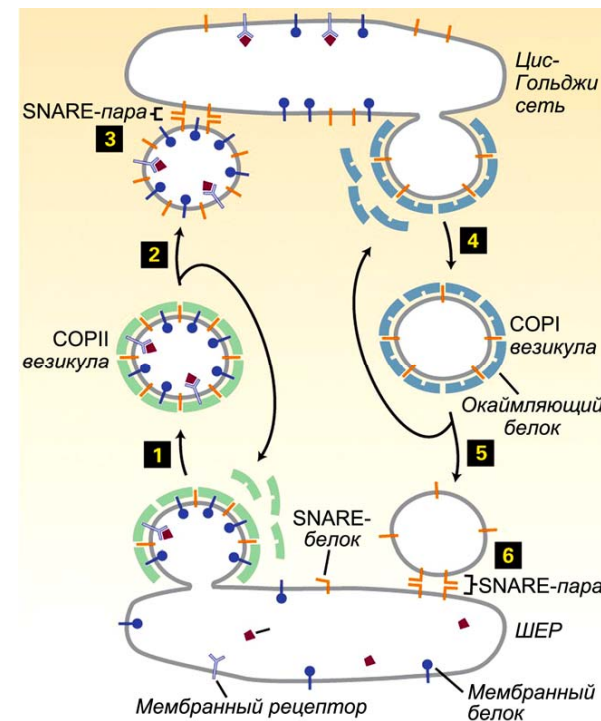


Рисунок 15.32 – Везикулярный транспорт белков между эндоплазматическим ретикуломом и цис-Гольджи-областью

Окаймление играет ключевую роль в формировании везикулы, но вскоре после отделения везикулы, окаймляющие белки диссоциируют с её поверхности (потеря каймы), и отсутствие окаймления позволяет везикуле слиться с мембраной в конце транспортировки.

Схема везикулярного транспорта между ШЭР и цис-Гольджи представлена на рисунке 15.32. *Прямой (антероградный) транспорт* обеспечивается COPII-окаймлёнными везикулами (рисунок 15.32(1,2,3)), которые образуются полимеризацией COPII-белков на поверхности мембраны эндоплазматического ретикула. *Диссоциация* COPII-белков с поверхности везикулы *освобождает* v-SNARE-белки. Спаривание v-SNARE с t-SNARE-белками на поверхности цис-Гольджи сети образует SNARE-комплексы, в результате чего становится возможным слияние мембран.

Обратный (энтероградный) транспорт (рисунок 15.32(4,5,6)), осуществляемый с помощью окаймления везикул COPI-белками, обеспечивает возврат (*рециклирование*) мембранных липидов, специфических белков (например, v-SNARE) и ошибочно захваченных белков эндоплазматического ретикула из цис-Гольджи сети обратно в ШЭР. Транспортные пузырьки, сливающиеся с плазматической мембраной и высвобождающие своё содержимое в межклеточное пространство, называются *секреторными*, или *экзоцитозными* пузырьками. Наряду с окаймлёнными пузырьками в клетке образуются и *окаймлённые ямки*, т. е. эндоцитозные пузырьки, отпочковывающиеся внутрь клетки от окаймлённых участков плазматической мембраны.

Когда клетке нужно «выловить» из межклеточной жидкости какое-либо вещество, она, как правило, использует механизм *опосредуемого рецепторами эндоцитоза*, или *адсорбционный эндоцитоз*, при котором клетка экспрессирует *белки-рецепторы* для этого вещества, которые затем встраиваются в состав окаймлённых участков плазматической мембраны. Все молекулы, связавшиеся с рецепторами, быстро проникают внутрь клетки, поскольку окаймлённые ямки постоянно отщепляются внутрь, образуя окаймлённые пузырьки. Эти пузырьки быстро *теряют свою кайму* и сливаются с другими пузырьками, образуя более крупные пузырьки, называемые *эндосомами*. Содержимое эндосом может использоваться клеткой. Хорошо изученный пример использования адсорбционного эндоцитоза – это поглощение животными клетками холестерина из внеклеточной среды.

Некоторые транспортные пузырьки, которые отпочковываются от самой крайней цистерны транс-стороны аппарата Гольджи, становятся *первичными лизосомами*. Гликопротеины, которыми загружены эти пузырьки, имеют олигосахарид с фосфорилированным остатком *маннозы*. *Маннозо-6-фосфатный маркер* и определяет адресацию данных гликопротеинов в лизосомы. После отщепления маннозо-6-фосфатного маркера гликопротеины первичных лизосом становятся активными *гидролитическими ферментами* (т. е. расщепляющими ферментами, осуществляющими перенос функциональных групп на молекулу воды). Лизосомы расщепляют до мономерных компонентов макромолекулы, захваченные

клеткой в процессе эндоцитоза, или отдельные участки цитоплазмы и органоиды, утратившие своё значение в результате старения или использующиеся как материал для поддержания жизнедеятельности клетки в неблагоприятных экстремальных условиях. В первом случае первичная лизосома сливается с эндоцитозным пузырьком. Во втором случае подлежащий «перевариванию» участок цитоплазмы или органоид сначала окружается мембраной, а затем получившийся пузырёк сливается с первичной лизосомой. Первичная лизосома, слившаяся с пузырьком, содержащим субстрат для расщепления, называется уже *вторичной лизосомой*. Мономерные продукты расщепления транспортируются из лизосомы в цитоплазму и могут использоваться клеткой.

Сейчас известно более 60 гидролитических ферментов, содержащихся в лизосомах, которые способны разрушать практически все природные полимерные органические соединения. Все они обладают наибольшей активностью при $\text{pH} \approx 5$. Именно такое значение pH поддерживается внутри лизосомы встроенными в их мембрану *АТФазами V-типа* (протонными помпами), использующими энергию АТФ для накачивания ионов H^+ в полость этих органелл. Хотя в нормальных условиях мембрана лизосомы непроницаема для гидролитических ферментов, необходимость *кислой среды* для их активной работы *защищает* цитоплазму клетки от разрушения при возможной «утечке» ферментов.

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 броуновский храповик?
10. Приведите примеры реализации броуновского храповика в биосистемах.
11. Реализация какого функционального решения позволяет клетке совершать необходимые перестроения структуры, используя ограниченный пул мономеров актина?
12. Какие трансмембранные структуры формируют мембранные каналы?
13. Как функционирует фильтр селективности калиевого канала?
14. Какова биологическая функция транспортных мембранных белков?
15. Как работают АВС-транспортёры?
16. Какой из двух механизмов трансмембранного переноса протонов используется в случае бактериородопсина?
17. Какую роль выполняет молекула-кофактор ретиналь в функционировании бактериородопсина как протонной помпы?
18. Охарактеризуйте три основных механизма внутриклеточного транспорта белков.
19. Что собой представляют сортировочные сигналы?
20. Какие последовательности называются нацеливающими?
21. Что такое сигнальный пептид, и какой клеточный мембранный процесс инициирует сигнальный пептид?
22. Какой клеточный процесс блокируется, если на С-конце белка присутствует KDEL-последовательность?
23. Охарактеризуйте этапы синтеза белков в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме.
24. Какую функцию в везикулярном транспорте выполняют окаймляющие белки?
25. Перечислите три типа окаймляющих белков.
26. Для чего нужны SNARE-белковые комплексы?

Глава 16

Биомолекулярная сенсорика и саморепликация

16.1. НАНОБИОФИЗИЧЕСКИЕ 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.

Чаше 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. Бионаномашин, 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.

Хемосенсоры. *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.

Когда молекула пахучего вещества связывается с рецептором запаха (рисунок 16.1), то этот рецептор, активируясь, становится фактором замены нуклеотидов (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF-белок) для тримерной ГТФазы G_s и стимулирует замену ГДФ на ГТФ в субъединице α этого белка. Замена ГДФ на ГТФ активизирует ГТФазу G_s и стимулирует диссоциацию субъединицы α от субъединиц β и γ . Связанная с ГТФ субъединица α белка G_s , в свою очередь, активизирует мембранный фермент *аденилат циклаза*, который превращает АТФ в цАМФ. Затем цАМФ диффундирует в цитозоле нейрона к *цАМФ-управляемым каналам* в мембране аксона нейрона. Связывание с молекулой цАМФ открывает этот канал, что позволяет ионам *калия* и *натрия* перемещаться через мембрану.

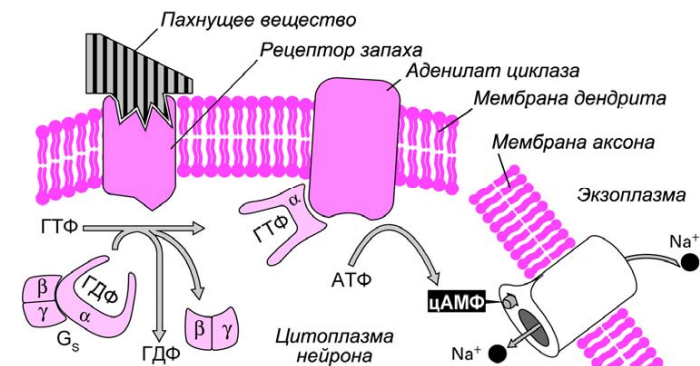


Рисунок 16.1 – Схема молекулярного механизма обоняния

Электрохимический градиент стимулирует значительный поток ионов натрия внутрь клетки, что приводит к *деполяризации* мембраны, потенциалочувствительные натриевые каналы открываются, и развивается *потенциал действия* (нервный импульс), который распространяется по аксону в головной мозг и сигнализирует о наличии пахнущего вещества. После того, когда внешний химический сигнал *исчезает*, концентрация цАМФ снижается до исходного уровня. Фермент *цАМФ-фосфодиэстераза* гидролизует цАМФ до АМФ, что инактивирует цАМФ-управляемые каналы.

Вкус включает в себя детектирование большого числа различных молекул – сладких, горьких, солёных, 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 (*протонов*) для кислого), то в сенсорике этих вкусов *задействованы мембранные каналы*.

белки, управляемые соответствующим типом ионов. Такие каналы открываются в ответ на повышение концентрации ионов, что позволяет ионам проходить через мембрану. В результате этого мембрана деполяризуется, что и вызывает нервный импульс.

Фотосенсоры. Биологическая светосенсорика связана с *ретиналем*, малой молекулой, которая изменяет конформацию при поглощении фотона (рисунок 15.26). Ретиналь содержит цепочку двойных связей, что делает его прекрасным *хромофором*. Он имеет широкую полосу поглощения в видимом диапазоне спектра с максимумом в зелёной 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). Ретиналь связывается со светочувствительными белками-рецепторами *опсинами* (рисунок 16.2).

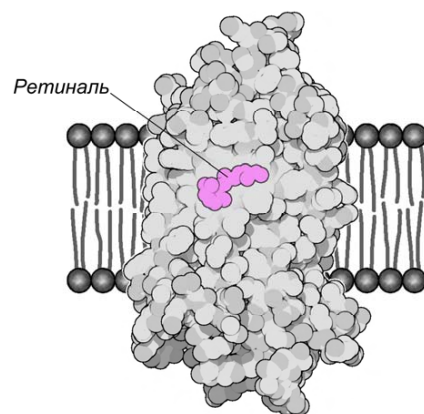


Рисунок 16.2 – Схема опсина

В сетчатке глаза ретиналь ассоциирован с белком родопсином, который в больших концентрациях находится в специальных мембранах внутри светочувствительных клеток (палочек) сетчатки. В состав белковой цепи опсина входят *семь* α -спиралей, которые формируют цилиндри-

ческий *жгут*, проходящий через мембрану. Ретиналь присоединён к лизину в середине этого жгута по центру мембраны. Так же, как и в случае бактериородопсина (рисунок 15.25), изменение формы молекулы ретиналя индуцирует изменение конформации всего опсина. В *родопсине* глаза человека ретиналь находится в форме 11-*цис*-ретиналь. После поглощения фотона за время порядка пикосекунды ретиналь *переходит* в форму полностью *транс*-ретиналь (рисунок 15.26), вследствие чего весь белок изменяет конформацию, переходя в активную форму *родопсин*(*), которая функционирует в качестве фактора замены нуклеотидов (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF-белок) для G-белка (ГТФазы). Стимуляция родопсином(*) G-белка запускает *каскад передачи* сигнала, который, в конце концов, возбуждает нервный импульс, передаваемый в мозг. А сам родопсин *распадается* на опсин и полностью *транс*-ретиналь. В цитоплазме полностью-*транс*-ретиналь *изомеризуется* в *цис*-ретиналь ферментом *ретинальизомеразы*, после чего может вновь быть *собрана* молекула *родопсина* в исходном состоянии.

Механосенсоры. 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 прикреплён к внеклеточному матриксу, а внутри клетки – к цитоскелету. Смещения внеклеточного матрикса растягивают внеклеточную связь и изменяют структуру канала, приводя к его временному открытию. 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 16.3). 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 привёл 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.

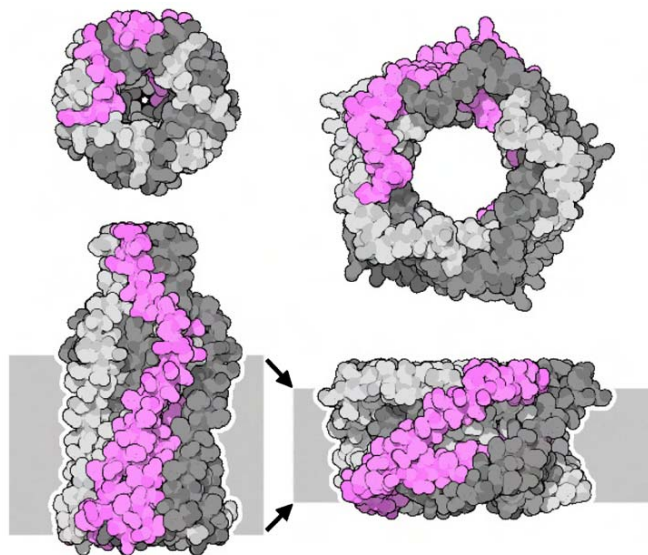


Рисунок 16.3 – Схема функционирования механосенсорного MscL-канала

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. 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 бионанотехнологии.

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.

16.2. САМОРЕПЛИКАЦИЯ 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 ($\sim \text{нм}^3$) отличается от объёма макрообъекта ($\sim \text{м}^3$) в 10^{27} раз, – слишком уж много атомов (каждый из которых, предполагается, индивидуально присоединён 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 самосамблирования. Современные клетки в качестве хранилища генетических инструкций используют *молекулы ДНК*.
3. *Дупликатор.* Эта наномашина дублирует генетическую информацию. В клетках таким дупликатором является *ДНК-полимераза*.
4. *Химические процессоры.* Эти наномшины синтезируют те узлы, которые используют ассемблер и дупликатор, из простых исходных веществ. В современных клетках такую работу выполняют тысячи различных *ферментов*.
5. *Инфраструктура.* Эти наномшины 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.

Геном простейшего организма *Mycoplasma genitalium* был секвенирован в 1995 году при сотрудничестве групп Университета Джонса Хопкинса и Университета Северной Каролины. Геном *M. genitalium* представляет из себя одну молекулу ДНК длиной 580 070 bp., содержащую ~550 генов. Это наименьший из известных сегодня геномов. *M. genitalium* живёт 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 транспортёров для снабжения себя необходимыми веществами, белков адгезинов, участвующих в связывании с инфицированной клеткой, других белков для защиты от иммунной системы хозяина. 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 размещён внутри живой, функционирующей, клетки. В случае простейших клеток используется единственная биомембрана, которая ограничивает клетку, и, следовательно, клетка состоит из двух существенно различных частей – внутриклеточного водного раствора и клеточной мембраны 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 асемблирование;
- 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 задаёт степень совершенства компонентов системы.

Возможно, будущие самореплицирующиеся искусственные бионаносистемы будут представлять собой не набор нанороботов, а систему бионаномашин, которые, работая вместе, выполняют поставленную задачу, после чего дизассемблируются.

16.3. МАШИННАЯ ФАЗА ВЕЩЕСТВА

Одна из новых концепций, предложенных для молекулярной нанотехнологии – это введение новой фазы, в которой может существовать вещество (в дополнение к традиционным жидкой, твёрдой, 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 наномашинки, 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 наномашинки 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 16.4). В мышцах координируется действие громадного количества молекул миозина (рисунок 15.2) для создания макроскопического движения.

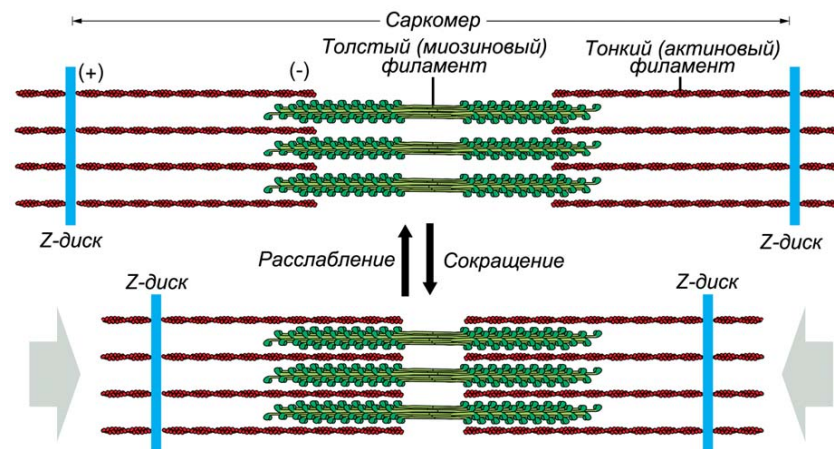


Рисунок 16.4 – Схема сокращения саркомера

Например, мышца бицепс человека состоит из $\sim 5 \times 10^{19}$ 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 всём пути сокращения создаётся тянущая сила. Каждый саркомер создаёт 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 идёт медленно, но в результате связывания первых миозинов с актинами тропомиозин сдвигается, открывая всё 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 протяжённостью 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 ней 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 «детальями», с помощью которых возможно осуществлять все известные компьютерные операции (рисунок 16.5). Хорошо изученный кольчатый червь *Caenorhabditis elegans* содержит всего 308 нейронов, в то время как в человеческом организме более 10^{11} (~ 150 миллиардов) 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.

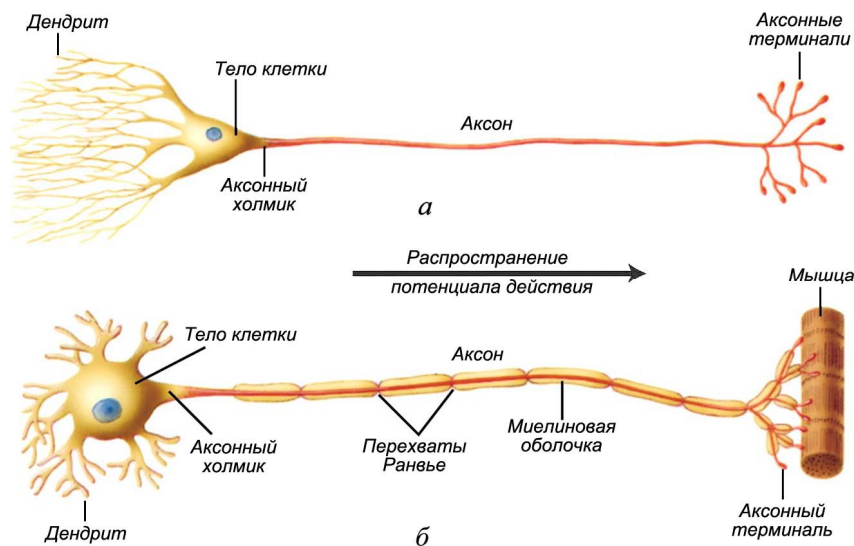


Рисунок 16.5 – Схема основных морфологических компонентов нейронов млекопитающих: *а* – мультиполярный интернейрон; *б* – моторный нейрон

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 необходимый уровень сложности вычислительной системы. Сегодня исследователи, используя накопленный опыт по росту нейронов в искусственных конфигурациях, разрабатывают *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 [66]. Мозг часто сравнивают с компьютером, но, кроме того факта, что оба они обрабатывают информацию с помощью сложной системы соединений в физическом пространстве, остаётся 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 нематод 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 (фрактальный объект) (см. [21], п. 8.1). *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 достижений в области нейронной передачи сигналов для применения в бионанотехнологии. Например, механизмы распространения сигналов с использованием малых молекул-мессенджеров 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 наномашинны 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 наномашинны 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. Как функционирует механочувствительный бактериальный MscL-канал?
4. Почему нанотехнология макроскопических объектов невозможна без использования саморепликации?
5. Какие пять функциональных подсистем должны иметь самореплицирующиеся системы?
6. Какие принципы построения клеток обусловлены необходимостью обеспечения эволюционного отбора?
7. Что такое машинная фаза вещества? Приведите примеры.

РАЗДЕЛ 4 БИОНАНОСИСТЕМЫ И МЕТОДЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 17 Нанотехнологии

17.1. БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Эволюция разработала для инженеров большой набор разнообразных методов дизайна функциональных бионаноструктур. Используя 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 бионаномашинны, 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 [75]. На рисунке 17.1(а) представлена схема синтезированной ими рибонуклеазы, состоящей из 124 аминокислот, с протекторными группами у химически нестойких аминокислот.

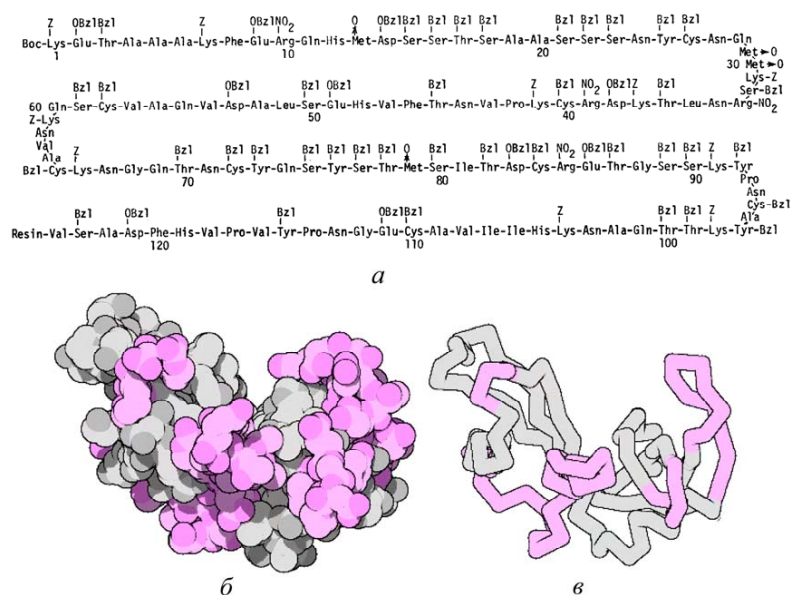


Рисунок 17.1 – Рибонуклеаза: а – схема первичной структуры с протекторными группами; б – функциональная глобула; в – трассировка полипептидной цепи

Анализируя активный центр рибонуклеазы, они определили те боковые петли, которые не влияют на структуру активного центра (показаны сиреневым цветом на рисунке 17.1(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 [68] (рисунок 17.2).

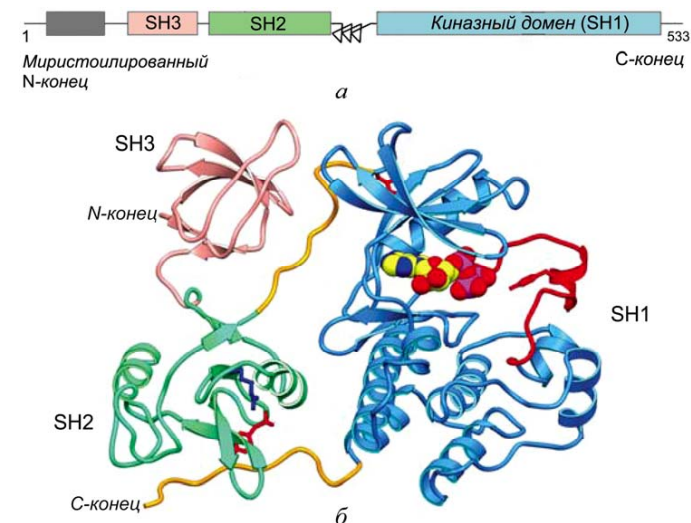


Рисунок 17.2 – Src-киназа: а – модульная структура; б – схема укладки глобулы

Src-киназы имеют типичную модульную структуру сигнальных белков. За миристоилированным N-терминальным сегментом следуют домены SH3, SH2, домен тирозинкиназы SH1 и короткая C-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. п. 3.1). Для искусственных белков было бы намного технологичнее использовать минимальный набор из 5–6 аминокислот для синтеза полипептидной цепи, используя 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 17.2) 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. 6.4). Аминокислотная цепь должна быть спроектирована так, чтобы энергетически выгодной была только одна, целевая конформация.

Одной из первых успешных попыток разработки искусственного белка был белок «Felix», состоящий из 79 аминокислот, формирующих «сноп» (*bundle*) из четырёх α -спиралей [76] (рисунок 17.3(a)). При этом были использованы 19 из 20 протеиногенных аминокислот. Однако оказалось, что «Felix» имел неудовлетворительную стабильность, и ЯМР-анализ показал значительную степень разупорядоченности в его укладке.

Ещё один пример *de novo* дизайна белков *from scratch* – белок *бета-белин* (*betabellin*), в структуре которого моделировались те белковые модули, которые содержали $\beta \times \beta$ -сэндвич-структуру (рисунок 17.3(б)) [80]. 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 [72] (рисунок 17.4). Сначала они проанализировали природные белки, имеющие трёхспиральные укладки полипептидной цепи.

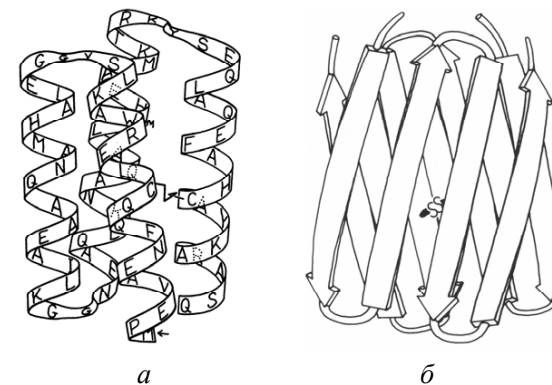


Рисунок 17.3 – *De novo* дизайн белков *from scratch*: а – «Felix»; б – betabellin

Затем они синтезировали белковую цепь, состоящую из трёх α -спиралей, соединённых бесструктурными петлями. На С- и N- концах полипептидной цепи они расположили кэпирующие аминокислоты для стабилизации конструкции.

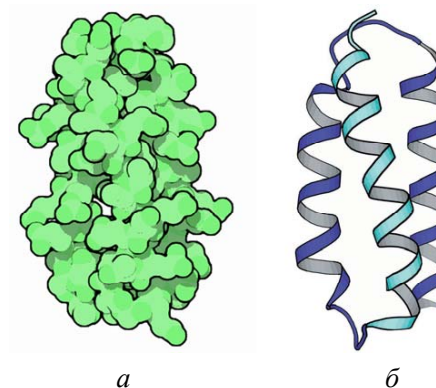


Рисунок 17.4 – Белок $\alpha 3D$: а – объёмная модель; б – схема укладки α -спиралей

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 « $\alpha 3D$ », состоящий из 73 аминокислот, который, как показал ЯМР-анализ, был достаточно стабилен.

Бассил Дахият (*Bassil I. Dahiyat*) и Стефен Майо (*Stephen L. Mayo*) разработали автоматизированную систему компьютерного дизайна стабильных белков [71]. 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 ($\beta\alpha$ -мотив). Компьютерный алгоритм «перебрал» $1,9 \times 10^{27}$ вариантов аминокислотной последовательности и выбрал наиболее устойчивую конструкцию, которую назвали белком FSD-1 (*full sequence design*) (рисунок 17.5(а)).

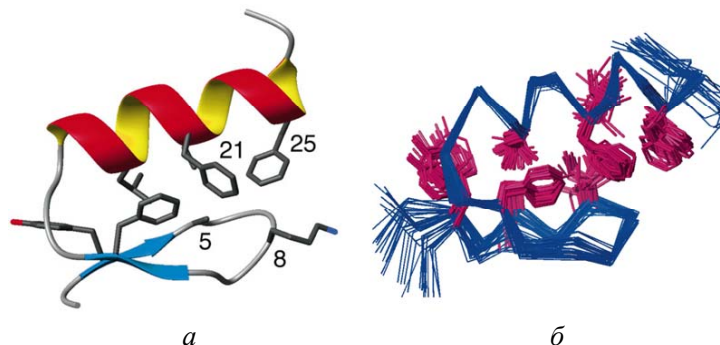


Рисунок 17.5 – Белок FSD-1: *a* – схема укладки; *б* – наложение 41 структуры по результатам ЯМР-анализа

Множественное выравнивание с использованием алгоритма BLAST (см. [10], п. 4.3) 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 $\beta\alpha$ -мотиву (рисунок 17.5(б)).

Разумеется, искусственные белки разрабатываются не только для исследования возможностей фолдинга, но и для выполнения нанотехнологических операций. В том же Университете Пенсильвании на основе опыта разработки белков, подобных $\alpha 3D$, 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) (рисунок 17.6) [84].

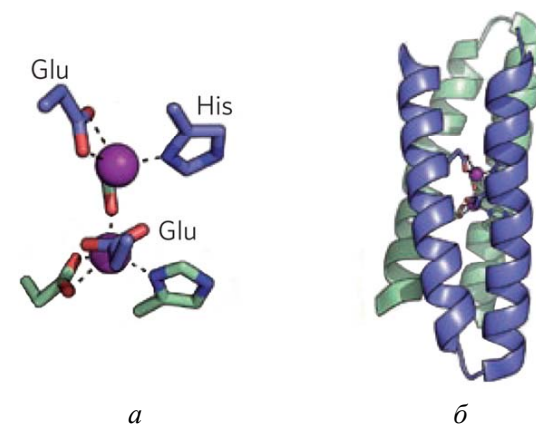


Рисунок 17.6 – Белок DF1: *a* – схема металлсвязывающего центра; *б* – схема упаковки полипептидной цепи белка DF1

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.

17.2. 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 большее 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 малоэффективным, требует синтеза специфических молекул мРНК, и в итоге 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 превышающими 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*.

И всё же метод включения нестандартных аминокислот 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, катализирующий реакцию, сопровождающуюся испусканием света – биolumинесценцией), что привело к изменению цвета свечения [83].

Петер Шульц (*Peter G. Schultz*) из Scripps Research Institute (США) с коллегами использовали альтернативную методику для внедрения в белковую цепь нестандартных аминокислот [100] (рисунок 17.7).

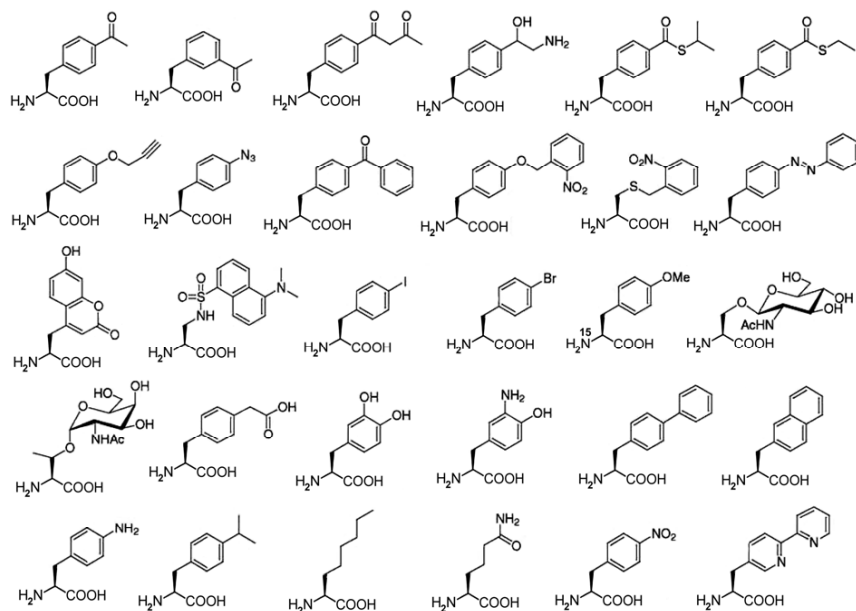


Рисунок 17.7 – Нестандартные аминокислоты

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 $4^5 = 1024$.

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 (7AI) в ДНК спаривается с таким же основанием (рисунок 17.8) [70], причём ДНК-полимераза корректно проводит репликацию молекулы ДНК с «добавленными» 7-азаиндольными парами.

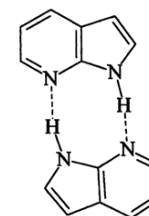


Рисунок 17.8 – Димер нуклеинового основания 7-азаиндол (7AI)

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.

17.3. 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 разработанных в конце XX века *пептидных нуклеиновых кислот* (или пептидо-нуклеиновых кислот, ПНК, *Peptide nucleic acid*, PNA), известных также под названием «полиамидные миметики нуклеиновых кислот» (ПАНКМ)) [74].

Пептидно-нуклеиновые кислоты содержат стандартный набор азотистых оснований, соединённых пептидной (а не сахарофосфатной) связью (рисунок 17.9).

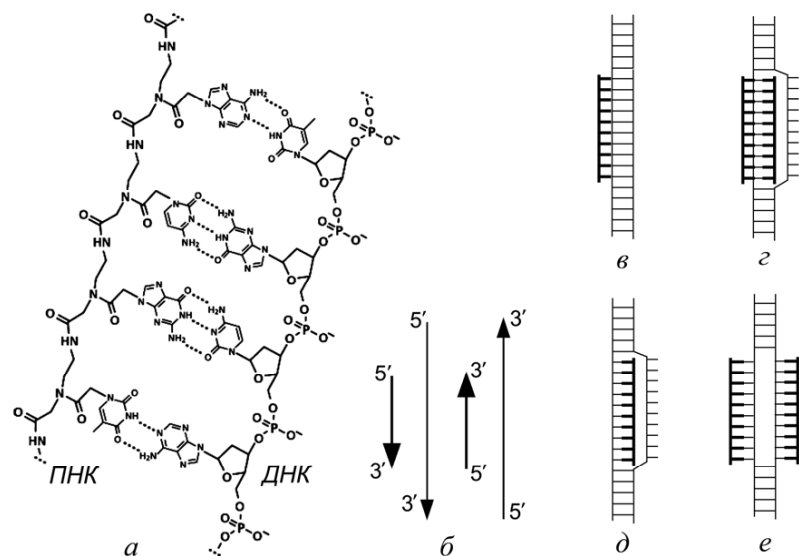


Рисунок 17.9 – ПНК-ДНК гибридикация: а – схема спаривания азотистых оснований; б – ориентация нитей; в – триплекс ПНК-ДНК; г – триплексная инвазия (внедрение); д – дуплексная инвазия; е – двойная дуплексная инвазия

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 одонитевые ПНК превосходно гибридизуются с ДНК, формируя двойную спираль [85] (рисунок 17.9(а)), причём связь ПНК-ДНК прочнее, чем ДНК-ДНК, поскольку в этом случае отсутствует электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными сахарофосфатными остовами молекул ДНК. Поскольку ПНК-цепь может связываться с ДНК-цепью как в параллельной ($5' \rightarrow 3'$; $5' \rightarrow 3'$), так и в антипараллельной ($5' \rightarrow 3'$; $3' \rightarrow 5'$) ориентации (рисунок 17.9(б)), то ПНК-ДНК гибриды могут образовывать множество необычных дуплексов и триплексов (рисунок 17.9(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.

17.4. ДНК НАНОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ЭЛЕКТРОНИКИ

Формирование нанопроводников с помощью ДНК. ДНК является удобным функциональным материалом для нанотехнологии, а структуры, которые получают из ДНК, являются инертными. Как было показано выше (см. п. 8.5), особые свойства ДНК и её способность к специфичному взаимодействию с различными белками находят прямое применение в нанотехнологии.

В исследовании управляемой металлизации молекул ДНК частицы серебра осаждались на двухцепочечной молекуле ДНК и наращивались до образования металлического проводника равномерной толщины [69] (рисунок 17.10). Сначала была создана микроскопическая ($0,5 \text{ мм} \times 0,5 \text{ мм}$) система золотых электродов (рисунок 17.10(а)), в которой были сформированы параллельные участки длиной 50 мкм. К этим участкам ковалентно присоединялись олигонуклеотидные линкеры (рисунок 17.10 (б)).

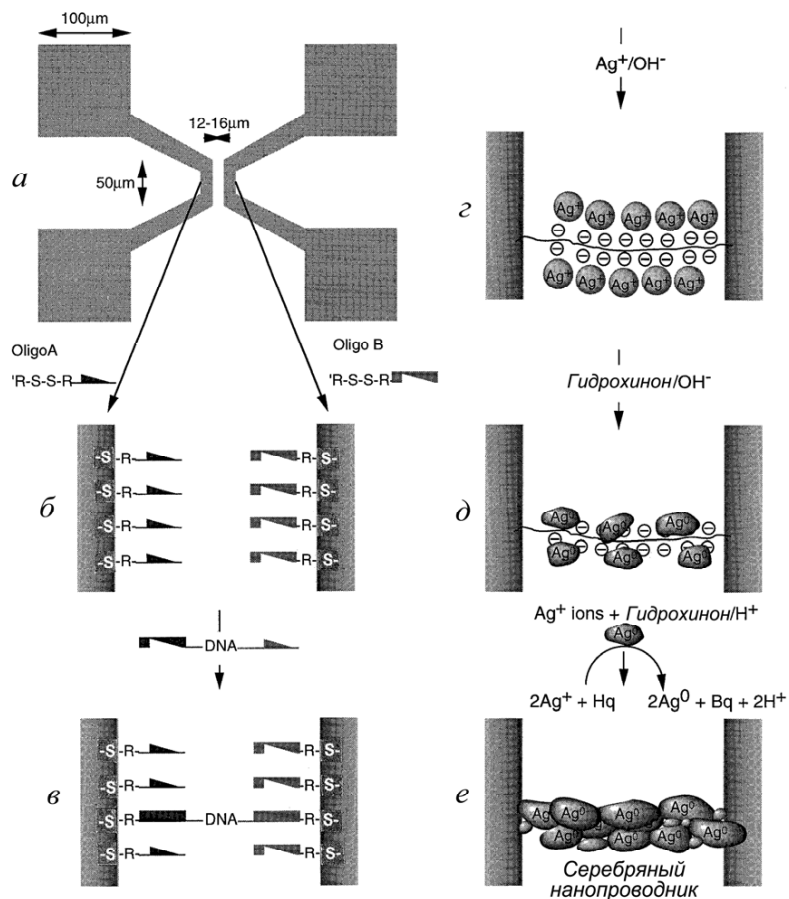


Рисунок 17.10 – Синтез нанопроводника методом металлизации ДНК

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 17.10(в)). После этого на этот ДНК-мостик наносился слой катионов серебра (рисунок 17.10(г)), происходила агрегация атомов серебра в нанокластеры (рисунок 17.10(д)), в результате формировался нанопроводник (рисунок 17.10(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 ResA, специфически связывающийся с уникальными последовательностями в цепи ДНК [79] (рисунок 17.11).

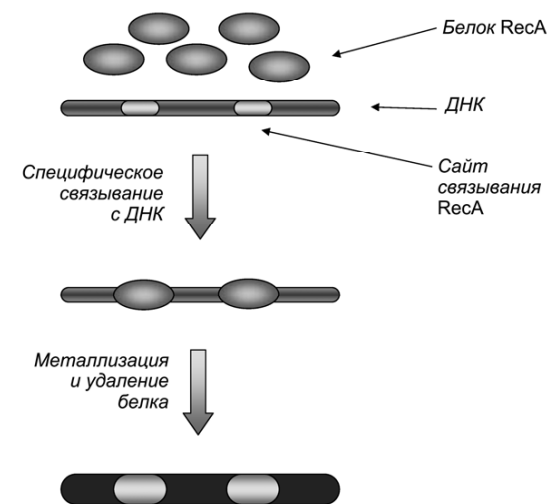


Рисунок 17.11 – Молекулярная литография на ДНК

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. 8.5), также можно использовать в качестве литографической маски. Группа исследователей из Университета Питтсбурга (США) показала возможность такого применения ДНК-структур [98] (рисунок 17.12).

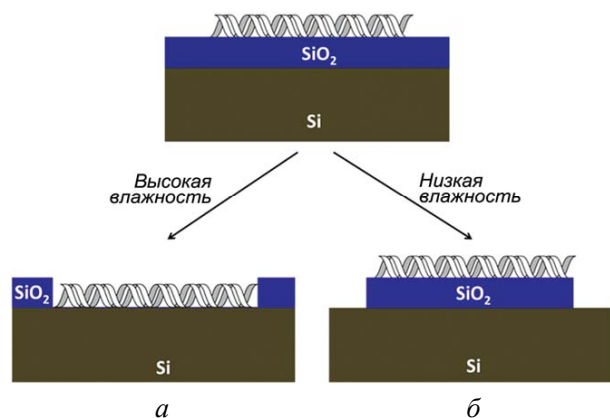
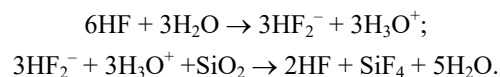


Рисунок 17.12 – Молекулярная литография с помощью ДНК: а – негатив (высокая влажность); б – позитив (низкая влажность)

Процесс травления SiO₂ с помощью HF (*hydrofluoric acid*, плавиковая кислота) происходит с участием молекул воды, адсорбированной на поверхности плёнки в два этапа



При высокой влажности количество молекул воды, связанных с ДНК, больше, чем адсорбированных на поверхности плёнки SiO₂. Поэтому травление плёнки SiO₂ осуществляется преимущественно под ДНК-маской и формируется негативное изображение маски (рисунок 17.12(а)). При низкой влажности ситуация обратная, вытравливаются участки, не закрытые маской, и формируется позитивное изображение (рисунок 17.12(б)).

17.5. 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 [95] (рисунок 17.13). Эти белки подвергаются самосборке *in vitro*, их легко синтезировать в больших количествах. Методами генной инженерии в прионный белок добавили ещё один цистеин.

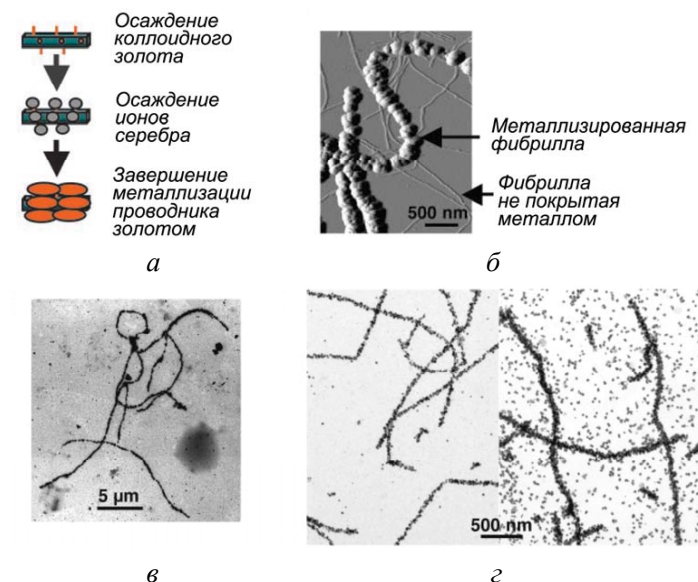


Рисунок 17.13 – Металлизация прионовых нанофибрилл: а – этапы металлизации; б – АСМ-изображение; в – ТЕМ-изображение; г – влияние режимов металлизации на диаметр нанопроводников

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 17.13(а)). В результате фибрилла полностью покрывается металлом, что зарегистрировано атомной силовой микроскопией – AFM-изображение на рисунке 17.13(б) и просвечивающей электронной микроскопией – TEM-изображение на рисунке 17.13(в). На рисунке 17.13(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.

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 (Phe-Phe) и модифицированных дипептидов – *фенилглицинов* (Phg-Phg) (рисунок 17.14) – так называемые ADPN-нанотрубки (*aromatic dipeptide nanotubes*, нанотрубки из дипептидов ароматических аминокислот) [92].

Стекинг-взаимодействия формируют стопки дипептидов, которые затем самособираются в плоские листы. Нарастивание такого листа вдоль одного направления может привести к формированию нанотрубки. Если же лист нарастить 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.

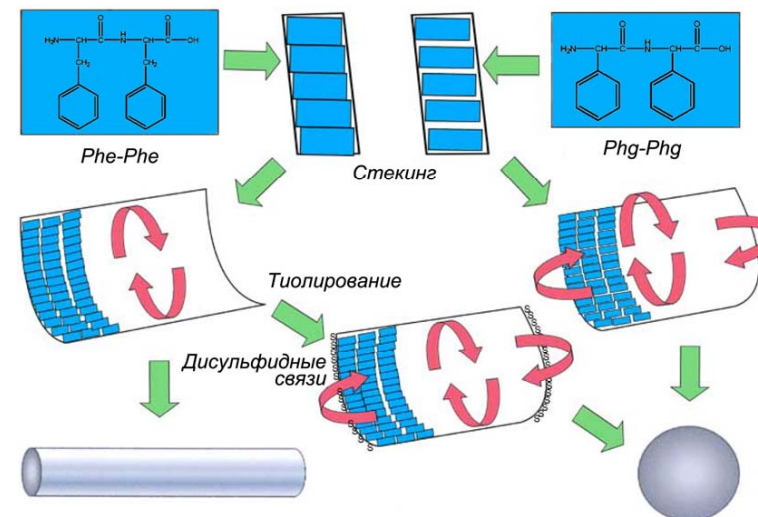


Рисунок 17.14 – Самосборка нанотрубок и наносфер из дипептидов фенилаланина и фенилглицина

Металлизация химически модифицированных актиновых филаментов. Актиновые филаменты диаметром около 7 нм образуются путём самосборки и обладают высокоупорядоченной структурой (см. п. 14.1). 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 с соавторами продемонстрировал реполимеризацию покрытых золотом актиновых филаментов, из которых после каталитического наращивания наночастиц были получены металлические нанопроводники [88]. Актиновые нити, полученные в результате полимеризации (рисунок 17.15(1)), функционализировали 1,4-нм-наночастицами золота, содержащими N-гидроксисукцинимид-эфир (рисунок 17.15(2)), и диссоциировали на мономеры (рисунок 17.15(3)).

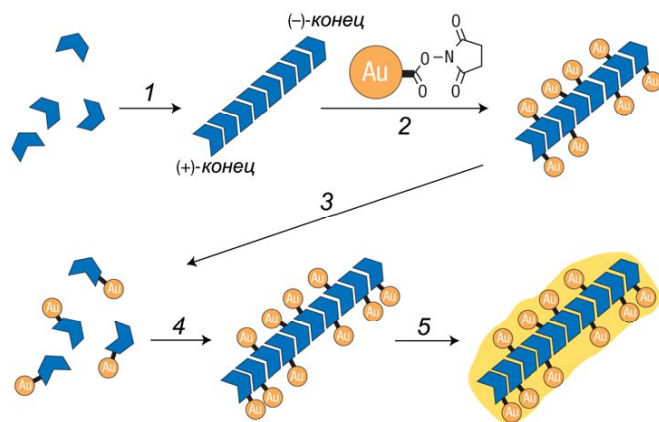


Рисунок 17.15 – Металлизация актиновых фибрилл

Затем из таких функционализированных золотыми наночастицами мономеров актина собирали филаменты необходимой длины (рисунок 17.15(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 17.15(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 нанoeлектро-механические устройства – так называемые системы BioMEMS (*biological microelectromechanical 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 (рисунок 17.14). В результате селективного входа ионов металлов в просвет нанотрубки образуются нанокабели с проводящим «сердечником», а не покрытием [91] (рисунок 17.16).

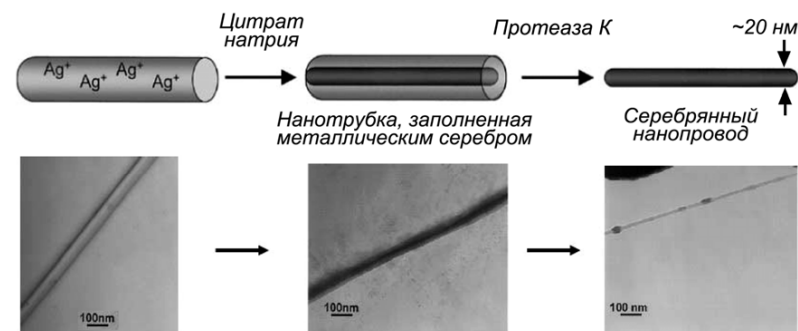


Рисунок 17.16 – Синтез серебряных нанопроводов с помощью ADPN

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 проводники, которые найдут широкое применение в молекулярной электронике.

17.6. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ НАНОКОНТЕЙНЕРЫ

Молекулярные наноконтейнеры представляют собой молекулярную оболочку, окружающую молекулу (или ион) транспортируемого вещества с целью предотвращения неспецифических взаимодействий с компонентами среды. Главным, но не единственным, направлением разработки наноконтейнеров является создание фармакологических векторов для доставки лекарственных веществ. Такого рода молекулярные структуры, способные заключать в себя и транспортировать молекулярные «грузы» (наношаттлы или переносчики) уже рассматривались в предшествующих

дисциплинах, например, пептидный антибиотик-ионофор *валиномицин* (см. [13], п. 6.5), (рисунок 17.17(а)), который облегчает транспорт ионов калия через клеточные мембраны. К молекулярным наноконтейнерам относят также и *эндоэдральные фуллерены* (см. п. 10.1) (рисунок 17.17(б)).

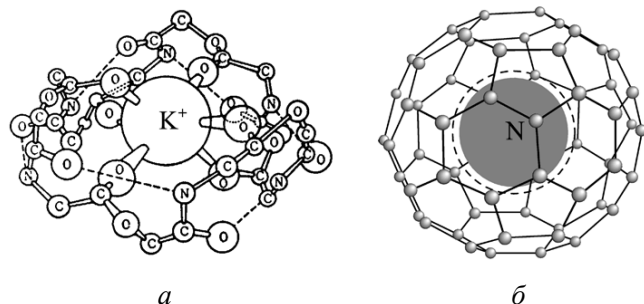


Рисунок 17.17 – Молекулярные наноконтейнеры: *a* – валиномицин; *б* – эндоэдральный фуллерен N@C₆₀

На рисунке 17.18 представлены органометаллические молекулярные *наноконтейнеры*, транспортирующие (CH₂Cl₂)₂ и гексаметокситрифенилен, соответственно [33].

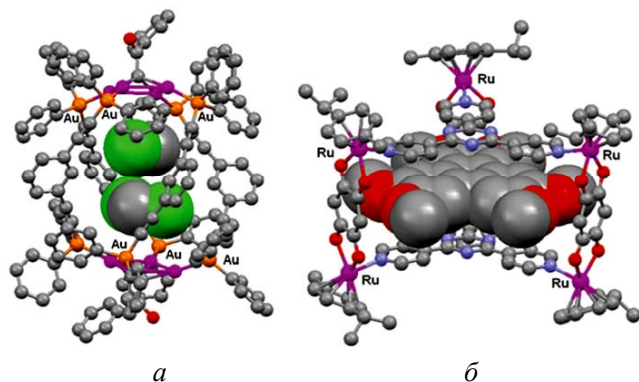


Рисунок 17.18 – Молекулярные наноконтейнеры:
a – (CH₂Cl₂)₂@Au₈(CCOPh)₂(Ph₂PC₆H₄PPh₂)₄;
б – hexamethoxytriphenylene@[Ru₂(CO)₄]₃(OOCC₆H₄COO)₃(PMe₃)₆

Хорошо изученные циклические олигомеры глюкозы – *циклодекстрины* – также используются для «упаковки» молекул в наноконтейнеры (рисунок 17.19).

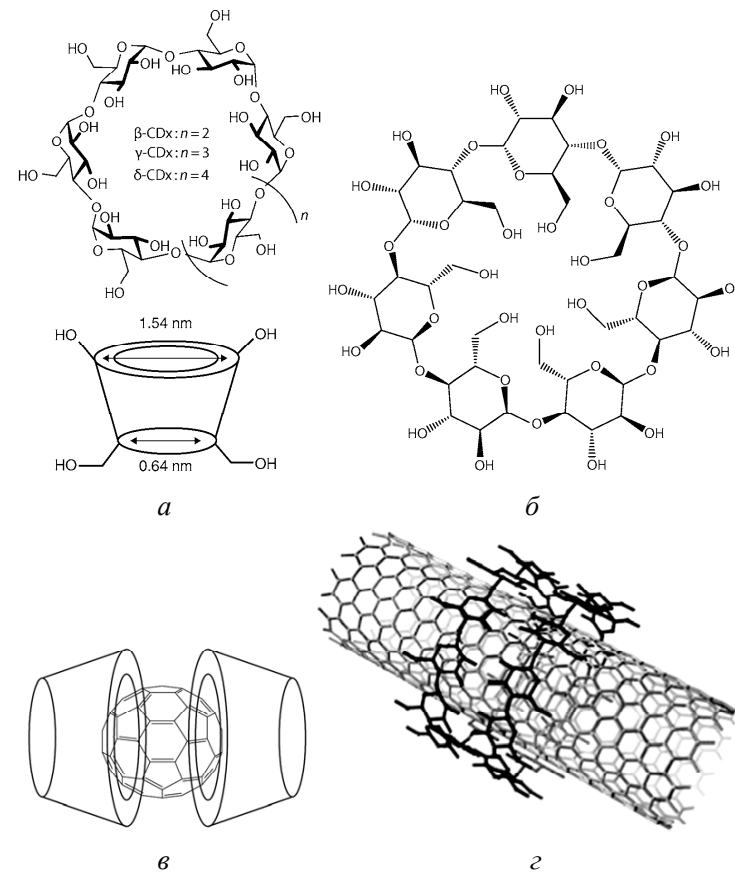


Рисунок 17.19 – Наноконтейнеры циклодекстринов: *a* – схема циклодекстринов (вверху) и пространственная форма β-циклодекстрина; *б* – β-циклодекстрин; *в* – циклодекстриновый наноконтейнер, содержащий фуллерен; *г* – циклодекстриновые 12-членные кольца на углеродной нанотрубке

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 (рисунок 17.19) [35]. Форма молекул циклодекстринов представляет собой полый усечённый конус (рисунок 17.19(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 17.19(в,г).

Макроциклические молекулы, такие как *гетерокаликсарены* и *каликснафталены* (*heterocalixarenes* и *calixnaphthalenes*), также используются для создания наноконтейнеров (рисунок 17.20). Две молекулы гексагомотриоксакаликс[3]трет-бутил-нафталена в водной фазе самопроизвольно формируют молекулярную наносборку с молекулой фуллера C_{60} (рисунок 17.20(б)).

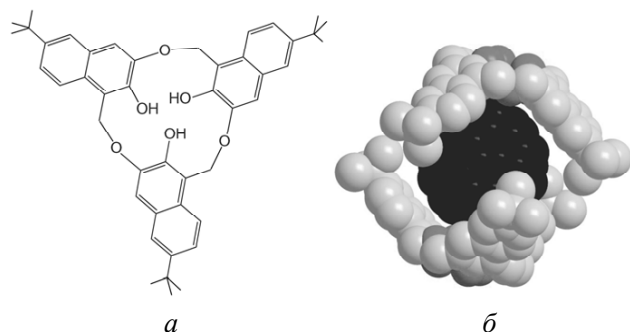


Рисунок 17.20 – Самосборка молекулярного наноконтейнера: *а* – схема гексагомотриоксакаликс[3]трет-бутил-нафталена; *б* – наноконтейнер, содержащий фуллерен

Дальнейшее развитие этой технологии формирования нанокапсул из двух молекулярных «оболочек» представлено на рисунке 17.21 [33].

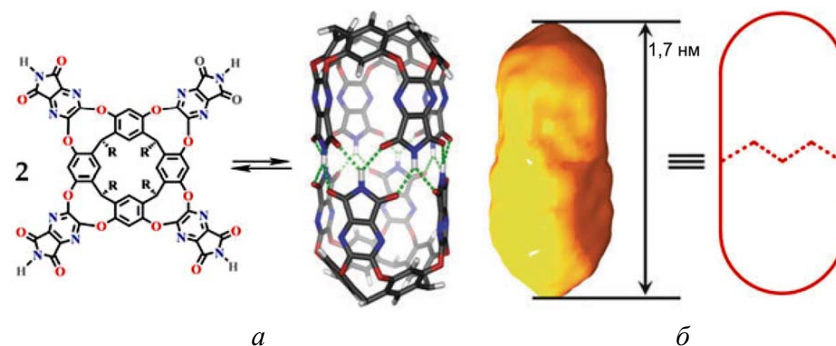


Рисунок 17.21 – Самосборка молекулярной нанокапсулы: *а* – схема сборки капсулы из двух молекул тетраамид кавитант; *б* – размер и форма внутренней полости капсулы

Такие капсулы способны увеличивать внутренний объём при добавлении в раствор молекул-спейсеров, которые формируют кольцевой «пояс» на «экваторе» нанокапсулы (рисунок 17.22).

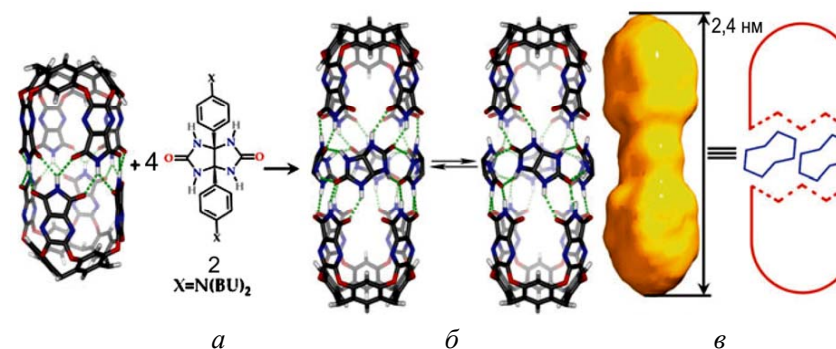


Рисунок 17.22 – Расширение молекулярной нанокапсулы: *а* – добавление спейсерных молекул гюколурила; *б* – две возможные конформации расширенной нанокапсулы; *в* – размер и форма внутренней полости расширенной нанокапсулы

Примеры молекулярной инкапсуляции молекул *циклопропана*, *1-гексапдецена* и *анадамида* приведены на рисунке 17.23. В последнем случае объём капсулы увеличен за счёт вставки дополнительного кольца спейсерных молекул.

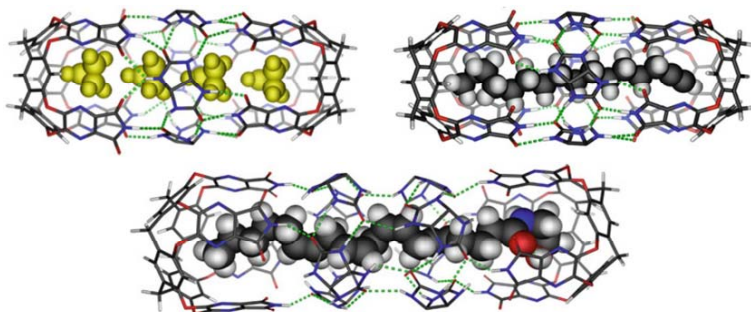


Рисунок 17.23 – Инкапсуляция четырёх молекул циклопропана (вверху слева), молекулы 1-гексадецена (вверху справа) и молекулы анадимида (внизу)

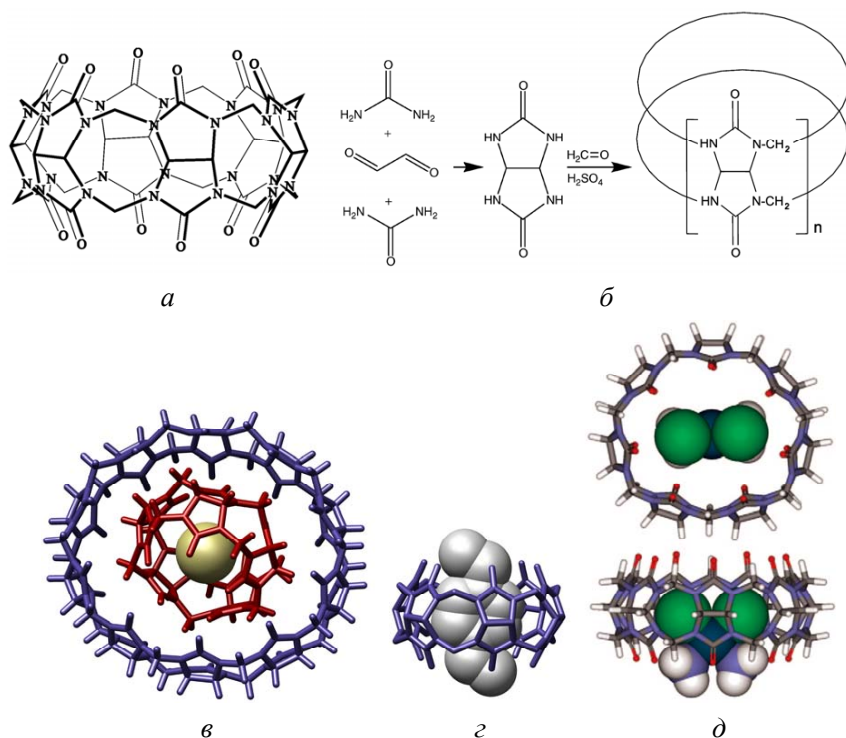


Рисунок 17.24 – Кукурбитурилы: а – схема кукурбит[6]урилы; б – схема синтеза; в – комплекс СВ[10]•СВ[5]•СІ; з – комплекс СВ[6]•р-ксилилендиаммоний-хлорид; д – комплекс СВ[7]•цисплатин (cisplatin)

Органические макроциклические кавитанды состава $(\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_2)_n$ – кукурбитурилы (cucurbiturils, СВ[n]), – построенные из n гликольурильных фрагментов, соединённых через метиленовые мостики – ещё один класс соединений, используемых для нанокапсулирования (рисунок 17.24).

Кукурбитурилы представляют собой макроциклические кавитанды, имеющие форму полого бочонка, в плоскости дна и крышки которого находятся атомы кислорода карбонильных групп (порталы) [35]. Своё тривиальное название кукурбитурилы получили в связи с внешним сходством формы молекулы с тыквой (лат. *cucurbitus*).

Кукурбитурилы способны самоасSEMBЛИРОВАТЬСЯ в многослойные «матрешечные» структуры (рисунок 17.24(в)), инкапсулировать молекулы (рисунок 14.24(г)) и могут быть использованы как наноконтейнеры для транспортировки лекарственных препаратов, как, например, антиракового препарата цисплатин [99] (рисунок 17.24(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 18

Бионаносистемы

18.1. НАНОМЕДИЦИНА

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 медицины 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» (*target*) 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 18.1). Принимая аспирин, мы заполняем наше тело молекулами, состоящими из 20 атомов (в воде карбоксильная группа имеет вид COO^-).

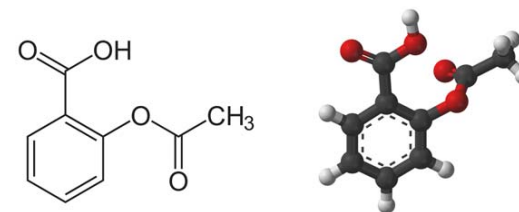


Рисунок 18.1 – Ацетилсалициловая кислота

Такой «снаряд» содержит распознающий элемент, который связывается с гиперактивным болевым рецептором, и «боеголовку», которая атакует этот белок и временно ингибирует его действие (см. [20], с. 6–43). 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 традиционных лекарств были 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. 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. 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.

18.2. 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 антителу, которое специфически связывается только с целевыми раковыми клетками, то в результате получится химерная белковая молекула – иммунотоксин. Раковые клетки отличаются от нормальных набором адгезивных мембранных белков, обеспечивающих межклеточные контакты. Именно эти белки и являются мишенями для связывания иммунотоксинов.

На рисунке 18.2 представлен пример синтеза иммунотоксина BL22, его связывания с рецепторным белком CD22, эндоцитозного механизма попадания в цитозоль клетки и ингибирования трансляционного фактора элонгации EF2, что и приводит к гибели клетки [87] (*cluster of differentiation-22* – кластер дифференцировки-22 – трансмембранный белок, принадлежащий к SILEG-семейству лектинов (*sialic acid binding Ig-like lectins*)). Иммунотоксин BL22 состоит из варибельного участка (*variable region*) Fv антитела anti-CD22 (включающего варибельные участки лёгкой (V_L) и тяжёлой (V_H) цепей, соединённых дисульфидной связью,

(см. п. 6.7)), связанного пептидной связью с фрагментом PE38 экзотоксина *Pseudomonas*.

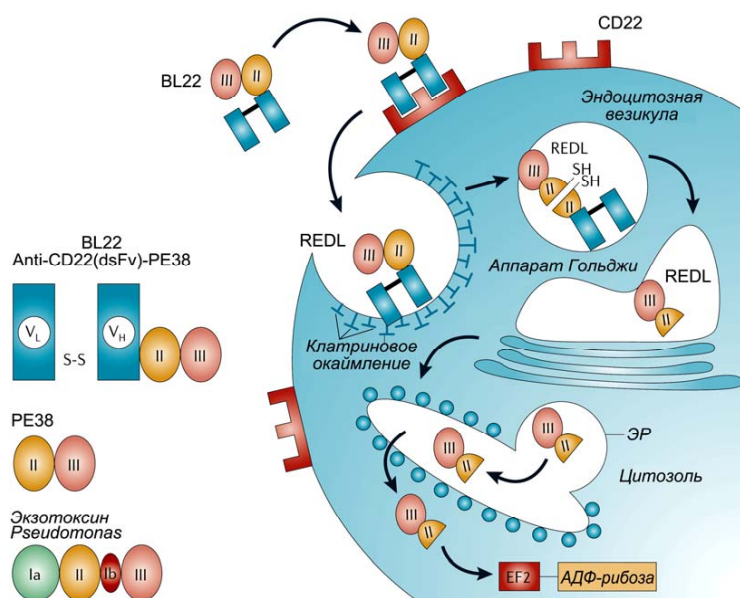


Рисунок 18.2 – Схема действия иммунотоксина BL22

Фрагмент PE38 представляет собой усечённый вариант экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa* с удалёнными доменами Ia и Ib (рисунок 18.2). BL22 связывается с мембранным белком CD22 и в составе клаптрин-окаймлённой везикулы проникает в клетку по механизму эндоцитоза (см. п. 15.5). 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 (рисунок 15.29). Предполагается, что нацеливающей аминокислотной последовательностью, направляющей этот фрагмент в эндоплазматический ретикулум, является последовательность REDL (которая функционально аналогична KDEL-последовательности, удерживающей белки в эндоплазматическом ретикулуме (рисунок 15.28)). Из эндоплазматического

ретикулума токсин транслоцируется в цитозоль и катализирует рибозилирование аденозин дифосфата с образованием АДФ-рибозы (рисунок 18.3) и инактивацию фактора элонгации EF2, что приводит к ингибированию синтеза белков и смерти клетки.

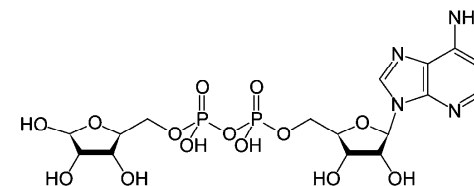


Рисунок 18.3 – АДФ-рибоза

18.3. ЛИПОСОМЫ

При обработке водных дисперсий фосфолипидов ультразвуком образуются мономеллярные липосомы (см [13], п. 3.4) — искусственные везикулы, состоящие из липидного бислоя, окружающего водный объём диаметром порядка 100 нм (рисунок 18.4(a)).

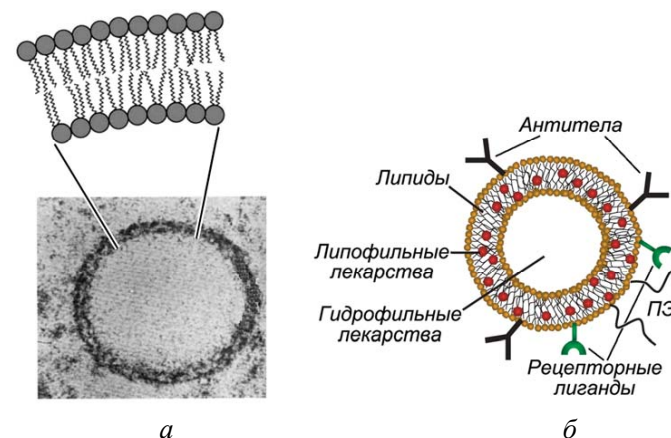


Рисунок 18.4 – Липосома: а – структура; б – схема функционализации

Липосомы могут транспортировать как водорастворимые молекулы во внутреннем водном объёме, так и липофильные водонерастворимые молекулы в гидрофобной области липидного бислоя (рисунок 18.4(б)). Если липосомы синтезированы из естественных липидов, то они *не токсичны, не иммуногенны* (не вызывают иммунологического отторжения организмом) и *биodeградебельны*. 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 *иммунолипосомы* поглощаются из крови макрофагами и, разрушившись в клетке, доставляют лекарства в цитозоль макрофага. 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 путём слияния с их мембраной, либо за счёт эндоцитоза, либо за счёт облегчённой диффузии из адсорбированной на плазматической мембране липосомы (рисунок 18.5).

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.

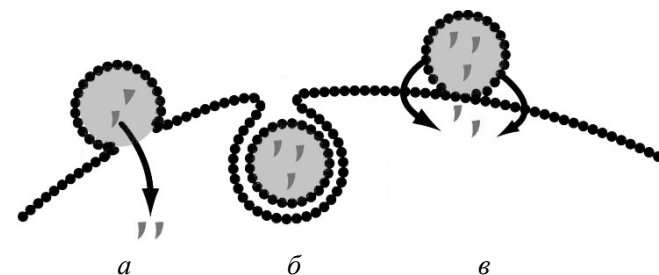


Рисунок 18.5 – Способы доставки лекарств в клетку липосомами: *а* – слияние с плазматической мембраной; *б* – эндоцитоз; *в* – облегчённая диффузия из адсорбированной липосомы

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 18.6). Такие стэлс-липосомы способны несколько дней циркулировать в кровотоке, медленно высвобождая своё содержимое за счёт диффузии и выполняя, таким образом, функцию дозатора лекарств.

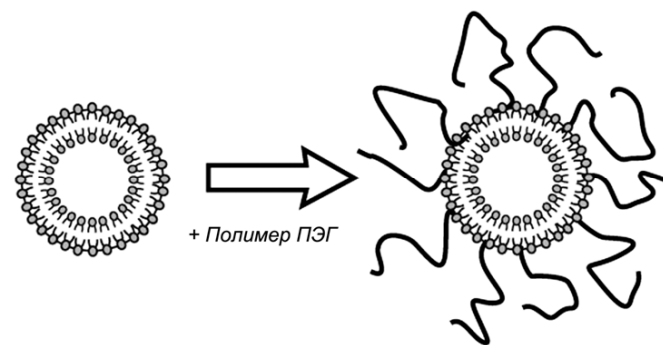


Рисунок 18.6 – Образование стэлс-липосомы

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. 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 [94] (рисунок 18.7). 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.

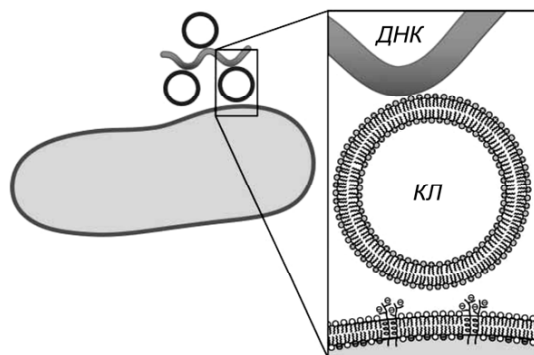


Рисунок 18.7 – Генная терапия с использованием катионных липосом (КЛ)

ДНК могут быть доставлены в ядро клетки либо слиянием липосомы с плазматической мембраной клетки, либо по эндоцитозному механизму. Максимально эффективным является слияние липосомы с плазматической мембраной клетки. В этом случае содержимое липосомы диффундирует через цитозоль к ядру, минуя нуклеазы лизосом. Эндоцитозный путь внесения ДНК в клетку менее продуктивный, поскольку липосомы транспортируют своё содержимое в лизосомы, где большая часть транспортируемой ДНК подвергается ферментативной деградации, а в ядро имеет шанс попасть только незначительная часть молекул ДНК из лизосомы.

18.4. ПОЛЕВЫЕ НАНОБИОСЕНСОРЫ

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 счёте, 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 [89] (рисунок 18.8(а)).

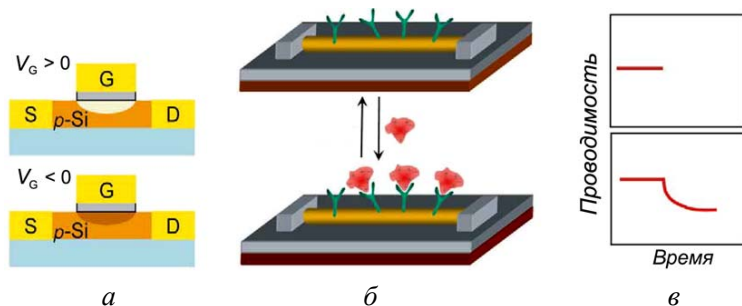


Рисунок 18.8 – Нанопроводной FET-сенсор: *а* – режимы работы полевого *p*-Si транзистора; *б* – схема Si-нанопроводникового FET-сенсора, сенсibilизированного антителами в качестве рецепторов аналитов; *в* – изменение проводимости сенсора при связывании с положительно заряженным белком

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 *положительно* 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 18.8(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, также можно использовать в качестве элементов полевых транзисторов.

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 18.8(б). Поверхность кремниевого нанопроводника сенсibilизирована 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 18.8(в)). Такие сенсоры настолько чувствительны, что изменяют проводимость даже при связывании единственной вирусной частицы, что позволяет обнаруживать единичные вирусы (рисунок 18.9). 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. На рисунке 18.9 показана схема, регистрирующая наличие в системе разноимённо заряженных вирусов (например, отрицательно заряженного аденовируса и положительно заряженного вируса гриппа А) [89]. Два нанонитевых полевых транзистора были сенсibilизированы рецепторами антител, специфичными для этих вирусов. Селективное мультиплексное детектирование вирусных частиц проявляется в виде перепадов тока при связывании/отсоединении различных вирусов с различными FET-датчиками.

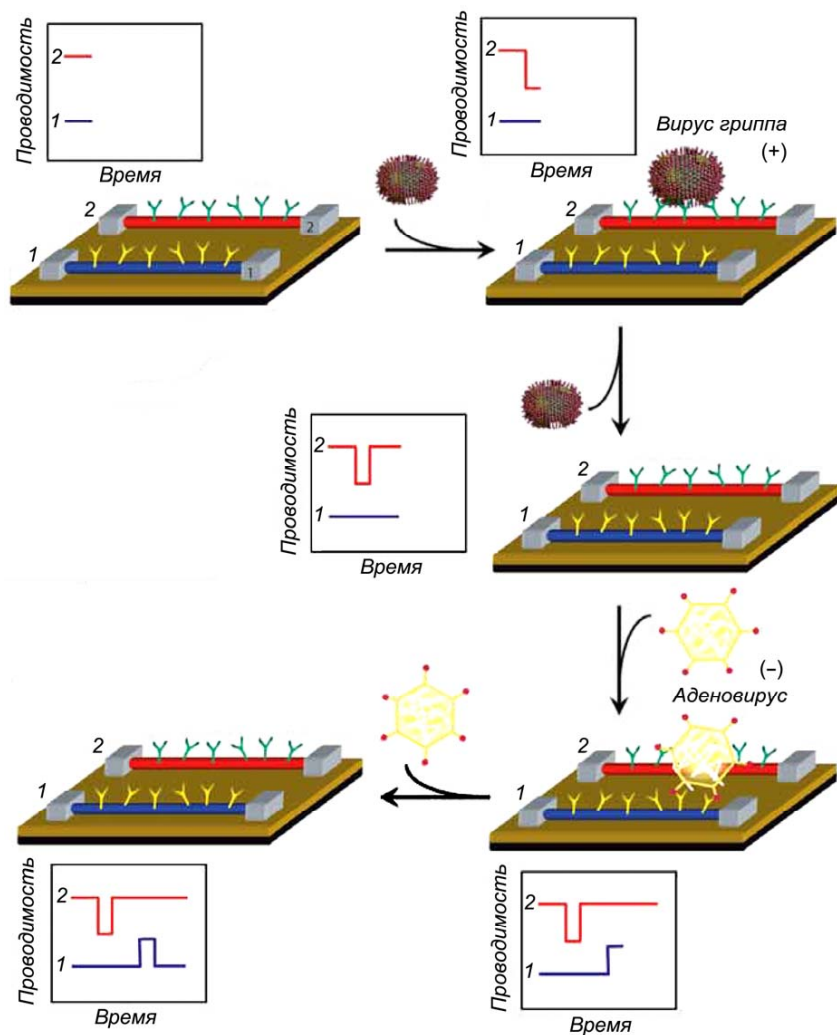


Рисунок 18.9 – Схема двойного FET-сенсора вирусов

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 управления работой таких нанотранзисторов.

На рисунке 18.10 представлена схема управления работой FET-транзистора [78]. В качестве полупроводниковой нанонити в этом полевом транзисторе использована углеродная нанотрубка (*carbon nanotube*, CNT) соответствующей хиральности, 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 мембранный ионный насос – белок Na^+/K^+ -АТФаза.

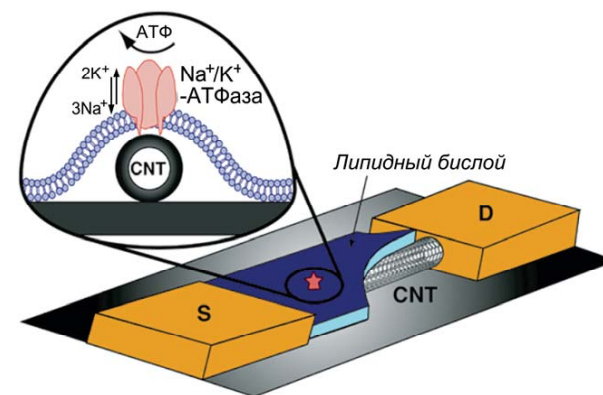


Рисунок 18.10 – Схема FET-CNT-транзистора

Добавление во внешнюю среду молекул АТФ приводит к перекачиванию Na^+/K^+ -АТФазой ионов (3Na^+ и 2K^+) через мембрану и увеличению

положительного потенциала на нанотрубке, что приводит к росту тока через транзистор (рисунок 18.11).

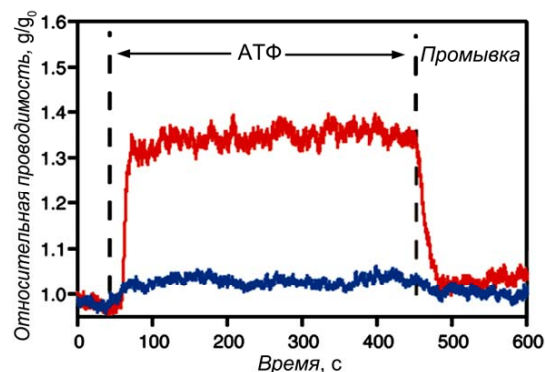


Рисунок 18.11 – Изменение проводимости FET-CNT-транзистора

18.5. 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 *нановентиллятора* на основе АТФ-синтазы [77] (рисунки 15.12 и 18.12).

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 [86] (рисунок 18.12(б)). Добавление в систему АТФ привело к вращению актинового филамента (рисунок 18.12(в)). В дальнейшем были разработаны варианты нановентилляторов с неорганическими пропеллерами вместо актиновой нити.

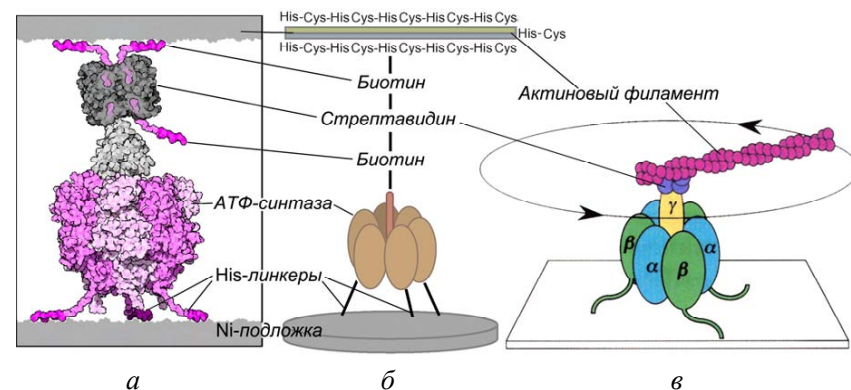


Рисунок 18.12 – Нановентиллятор: а – молекулярная схема; б – схема компоновки узлов; в – схема работы

Линейные белковые моторы – *динеин* и *кинезин* (*microtubule associated proteins*, MAP) – транспортируют грузы – органеллы и везикулы – вдоль микротрубочек в клетке (см. п. 15.1). Были разработаны демонстрационные системы, в которых кинезины иммобилизировались на подложке, а по ним перемещались микротрубочки, с которыми были ковалентно связаны грузы (рисунок 18.13(а)).

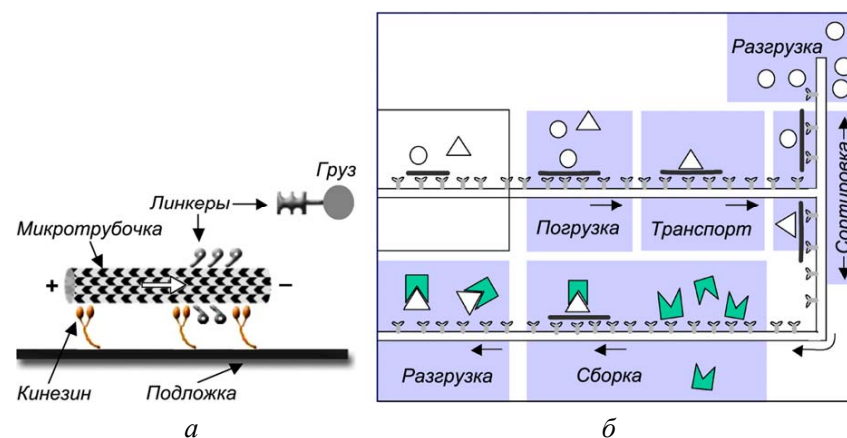


Рисунок 18.13 – Молекулярный шаттл: а – схема транспортного шаттла; б – схема нанотранспорта молекулярными шаттлами

Использование таких молекулярных шаттлов на основе микротрубочек позволяет организовать наносистему доставки, сортировки, ассемблирования и разгрузки молекулярных грузов (рисунок 18.13(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. Линейаризация нити нуклеиновой кислоты необходима для оптического секвенирования или для управляемого ассемблирования компонентов нанoeлектроники [73]. Схема такой системы представлена на рисунке 18.14.

Совершенно неожиданно оказалось, что и саму молекулу ДНК также можно использовать в качестве своеобразного *мотора*, который будет совершать механическую работу [101] (рисунок 18.15).

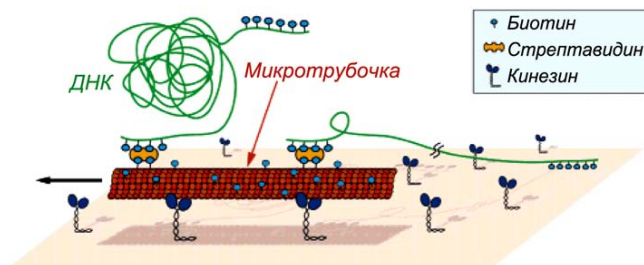


Рисунок 18.14 – Манипулирование ДНК с помощью молекулярных моторов

На рисунке 18.15(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).

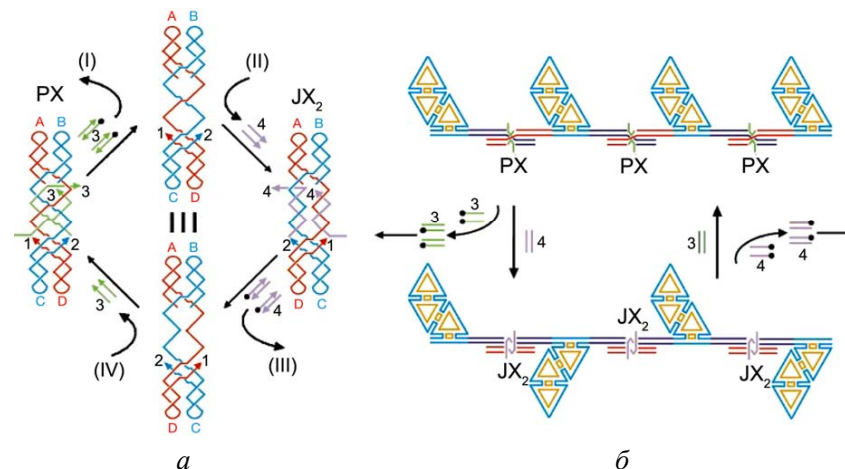


Рисунок 18.15 – ДНК-мотор: а – схема ДНК-реле; б – переключение ДНК-структуры

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 [101] (рисунок 18.15(б)). Электронные микрофотографии

зарегистрировали механический разворот одних модулей относительно других, стимулированный $PX \rightleftharpoons JX_2$ переходом, который в свою очередь индуцировался связыванием с ДНК-переключающим мотивом коротких олигонуклеотидных вставок (3) и (4).

Аналогичный подход был использован при разработке «нанопинцета» [102] (рисунок 18.16(a)). Сам ДНК-«нанопинцет» состоит из трёх нитей ДНК, обозначенных (A), (B) и (C) на рисунке 18.16(a). 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 ($F \cdot \bar{F}$) освобождает пинцет, и он снова открывается.

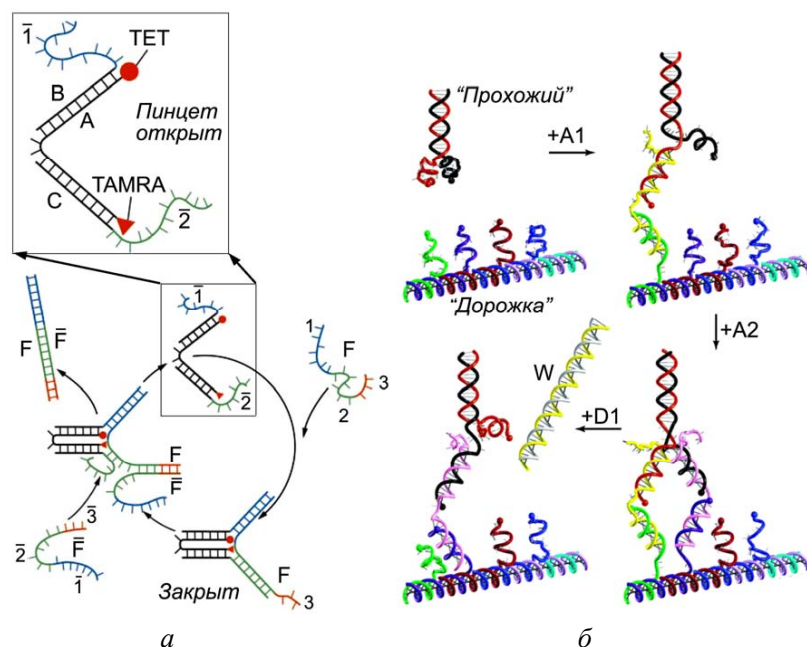


Рисунок 18.16 – ДНК-механизмы: а – схема ДНК-пинцета; б – шагающая ДНК

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 аргонного 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 на рисунке 18.16(б) – вдоль специальным образом сконструированной из шести нитей ДНК молекулярной «дорожки» «прогуливается» молекула ДНК-«прохожий», состоящая из двух ДНК нитей [97]. 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», что 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».

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 стэкс-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. Опишите устройство полевого транзистора на основе кремниевой нанонити.
15. Как FET-транзистор на основе кремниевой нанонити регистрирует вирусные частицы?
16. В чём состоит перспективность разработки нанонитевых FET-сенсоров?
17. Как можно управлять работой полевого транзистора на основе углеродной нанотрубки с помощью Na^+/K^+ -АТФазы?
18. Что такое кинезин-тубулиновый молекулярный шаттл?
19. Как используя молекулярные шаттлы можно организовать нанотранспортную схему?
20. Опишите принцип действия ДНК-мотора?
21. Опишите принцип действия ДНК-пинцета?
22. Опишите принцип действия транспортной системы по схеме «ДНК-дорожка»-«ДНК-прохожий»?

Глава 19

Методы молекулярной биологии в бионанотехнологии

19.1. ТЕХНОЛОГИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК

Технология рекомбинантных ДНК – это совокупность экспериментальных процедур, позволяющая осуществлять перенос генетического материала из одного организма в другой. Технология рекомбинантных ДНК является ключевой в бионанотехнологии. Эта технология позволяет конструировать любой белок, просто изменяя структуру гена, кодирующего этот белок. Чаще всего эксперименты с рекомбинантной ДНК проводят по следующей схеме.

- Из организма – донора нужных генов – экстрагируют нативную ДНК, подвергают её ферментативному гидролизу и соединяют с другой ДНК с образованием новой, рекомбинантной молекулы.
- Эту конструкцию вводят в клетку-хозяина (реципиент), где она реплицируется и передаётся потомкам. Этот процесс называется *трансформацией*.
- Идентифицируют и отбирают клетки, несущие рекомбинантную ДНК (трансформированные клетки).
- Получают специфический белковый продукт, синтезированный клетками-хозяевами.

Два природных фермента – *рестрикционные ферменты* и *ДНК-лигаза* – являются основными «инструментами» технологии рекомбинантных ДНК. Они позволяют «редактировать» генетический «текст» записанный в ДНК. Рестрикционные ферменты (эндонуклеазы рестрикции, *рестриктазы*), такие как фермент *EcoRI*, изображённый на рисунке 19.1(а), разрезают ДНК на определённых участках. Как правило (но не всегда), образующиеся фрагменты ДНК имеют «липкие концы» (рисунок 19.1(б)).

Фермент ДНК-лигаза (рисунок 19.1(в)) соединяет разъединённую молекулу ДНК.

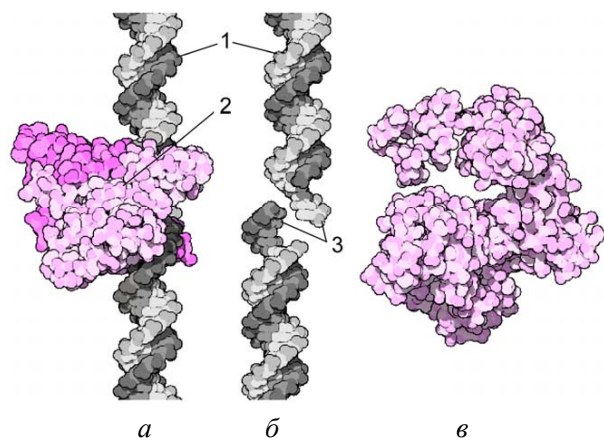


Рисунок 19.1 – Редактирование ДНК: а – разрезание ДНК рестрикционным ферментом; б – «липкие концы» молекулы ДНК; в – ДНК-лигаза; 1 – ДНК; 2 – рестрикционный фермент; 3 – «липкие» концы

Рестрикционные ферменты – чрезвычайно полезные белки. Они синтезируются бактериями для защиты от вирусных инфекций. Рестриктазы разрезают чужую ДНК в специфической области рестрикции, имеющей определённую последовательность нуклеотидов. В то же время собственные ДНК, имеющие такие же последовательности, модифицируются таким образом (метируются), 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.

19.2. КОНСТРУИРОВАНИЕ ДНК

Создание изменённых ДНК – это рутинная лабораторная процедура, которую ежедневно проводят в тысячах лабораторий во всём 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 односторонних «дыр» и для полного копирования фрагментов ДНК.

Химический синтез фрагментов ДНК дополняет эти три природных биомолекулярные инструменты манипулирования ДНК. Современные технологии химического синтеза позволяют автоматически формировать фрагменты ДНК длиной до 100 нуклеотидов. Сформированные таким образом комплементарные нити ДНК затем гибридизуются, 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 осуществлён серией реакций, показанных на рисунке 19.2 (см. [17] 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'-гидроксила 4',4'-диметокситрифила (DMT) для того, чтобы блокировать этот гидроксил, не дать ему вступать в неспецифические реакции. Кроме того, к 3'-гидроксила второго мономера присоединяют высокореактивный

фосфорамидит $\text{MeO}-\text{P}-\text{N}(\text{IP})_2$ (Me – метильная группа, $\text{N}(\text{IP})_2$ – диизопропиламинная группа). Такая молекулярная конфигурация и называется *фосфорамидитом* (рисунок 19.3).

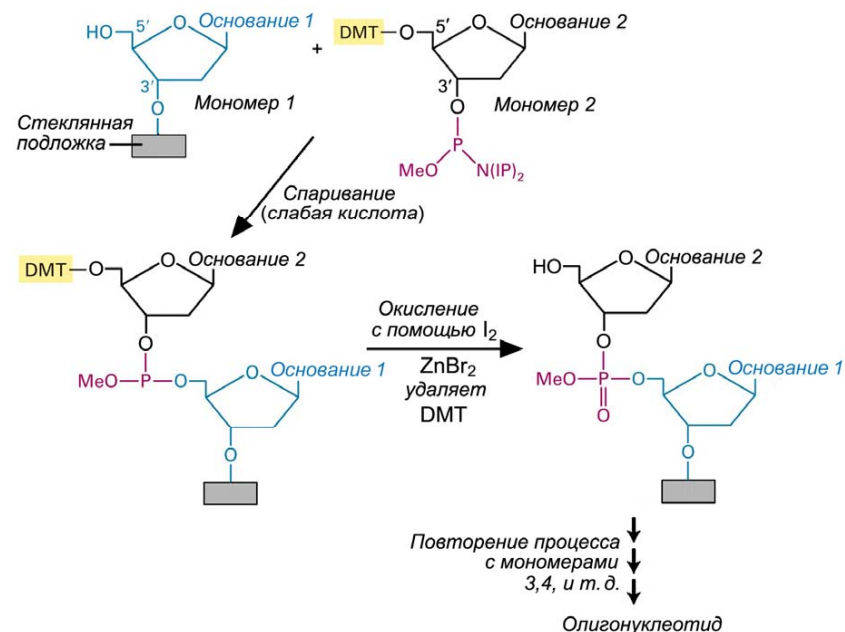
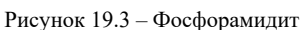


Рисунок 19.2 – Химический синтез олигонуклеотидов

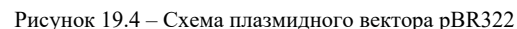
Когда эти два мономера смешиваются в присутствии слабой кислоты, они связываются, благодаря образованию фосфодиэфирной связи с фосфором в трёхвалентном состоянии. Окисление такого димера с помощью иодной смеси увеличивает валентность фосфора до 5, с последующим освобождением 5'-конца, благодаря удалению 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.



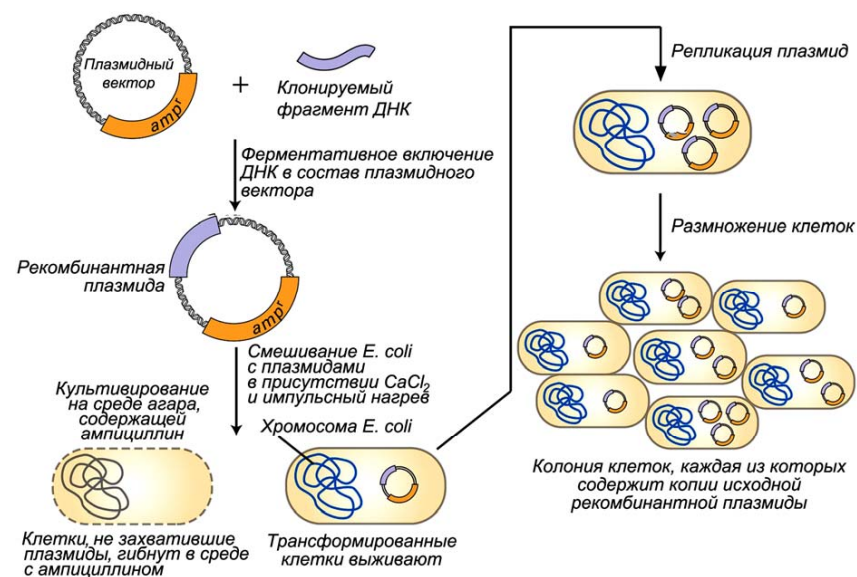
Бактерии, в дополнение к геномным ДНК, содержат в себе *плазмиды* – экстрахромосомальные кольцевые двухнитевые молекулы ДНК,

На рисунке 19.4 представлена схема плазмидного вектора pBR322, содержащего 4361 пару оснований ДНК, который часто используют в биотехнологии с клеткой *Escherichia coli*.



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 соответствующую рестриктазу,

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. Типичный эксперимент по клонированию генов включает следующие этапы (рисунок 19.5).



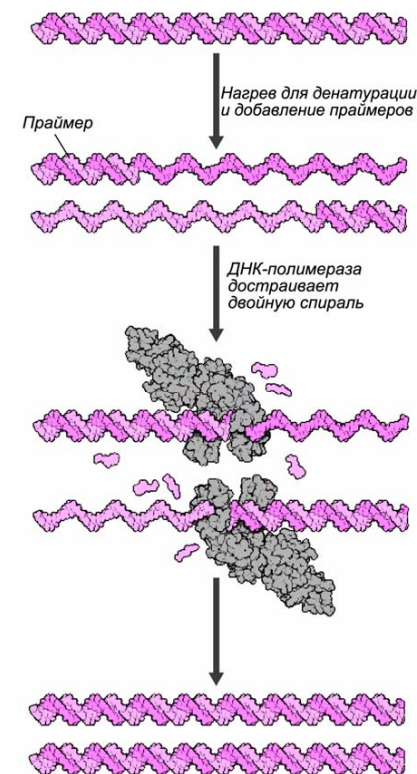
1. Рестриктазное расщепление ДНК, выделенной из организма, который содержит искомый ген.
2. Обработка вектора для клонирования (обычно плазмидного), который может реплицироваться в клетке-хозяине, теми же рестриктазами,

которые использовались для расщепления донорной ДНК.

3. Смешивание этих двух образцов ДНК и сшивание фрагментов ДНК-лигазой фага Т4.

4. Трансформация сшитыми молекулами клеток-хозяев. Амплификация рекомбинантной ДНК в трансформированных клетках.

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 19.6).



Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении следующих *трёх реакций*.

1. *Денатурация*. Первый этап ПЦР состоит в тепловой денатурации образца ДНК выдерживанием его при температуре 95°C в течение по крайней мере 1 минуты. Помимо ДНК в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза *Taq*, выделенная из бактерий *Thermus aquaticus*, и четыре дезоксирибонуклеотида.
2. *Отжиг праймеров*. Температуру смеси медленно понижают до ~55°C, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК.
3. *Синтез*. Температуру повышают до ~75°C – величины, оптимальной для ДНК-полимеразы *Taq*. Начинается синтез комплементарной цепи ДНК, иницируемый 3'-гидроксильной группой праймера (рисунок 19.7).

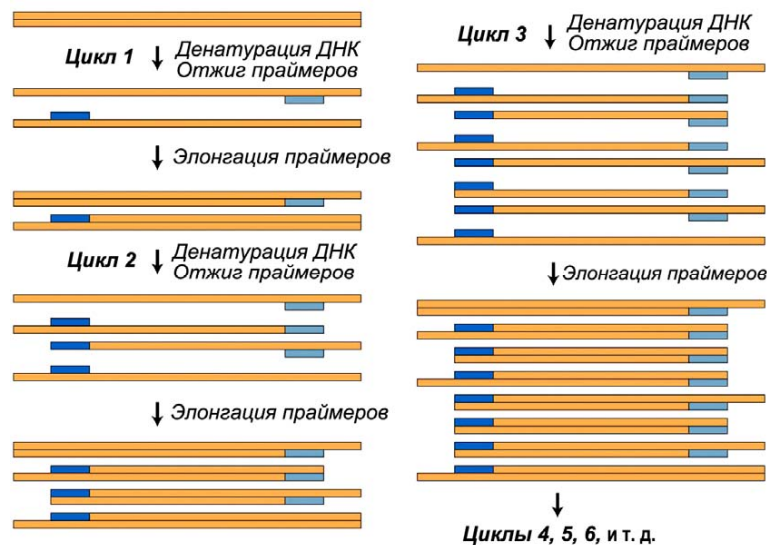


Рисунок 19.7 – Схема первых трёх циклов полимеразной цепной реакции

Каждая из синтезированных в *первом* цикле цепей имеет гораздо большую длину, чем расстояние от 3'-гидроксильной группы «её» праймера до конечного нуклеотида последовательности, комплементарной второму праймеру. Эти цепи служат матрицами во *втором* цикле ПЦР. После этого, поскольку в растворе сохраняется избыток олигонуклеотидных праймеров, охлаждение смеси до 50–60°C снова приводит к гибридизации праймеров с нитями ДНК, и начинается новый цикл ПЦР.

Второй цикл ПЦР. Исходным материалом в этом случае является смесь молекул ДНК, образовавшихся в первом цикле. При отжиге праймеры гибридизируются с комплементарными им участками как исходных цепей, так и «*длинных* матриц», синтезированных в первом цикле. В результате ферментативного синтеза *in vitro* на исходных цепях синтезируются «*длинные* матрицы», а на «*длинных* матрицах» – «*короткие*». Последние начинаются с одного праймера, а заканчиваются последовательностью, комплементарной второму праймеру.

Третий цикл ПЦР. При отжиге праймеры гибридизируются с комплементарными участками исходных цепей, а также «*длинных*» и «*коротких*» матриц. При ферментативном синтезе *in vitro* на исходных цепях синтезируются «*длинные*» матрицы, а на «*длинных*» и «*коротких*» матрицах – только «*короткие* матрицы».

Тридцатый цикл ПЦР. На этом этапе в реакционной смеси содержатся практически одни «*короткие* матрицы».

ПЦР – высокочувствительный метод, поэтому при наличии в исследуемом образце даже *ничтожного* количества ДНК, случайно попавшей из одной реакционной смеси в другую, могут быть получены *ложноположительные* результаты. Это заставляет тщательно контролировать все используемые для ПЦР растворы и посуду.

19.3. 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, присоединённых 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 биокomпонентов, 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.

19.4. 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 19.8).

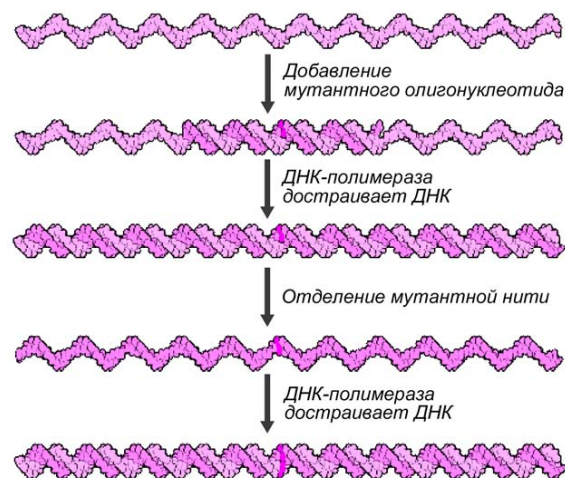


Рисунок 19.8 – Схема сайт-специфического мутагенеза

Олигонуклеотид полностью комплементарен гену везде, кроме того сайта, в котором произведено *изменение* (обозначен *сиреневым* 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.

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

Например, одна из попыток увеличения стабильности фермента лизоцима (*lysozyme*) изображена на рисунке 19.9.

В природном лизоциме аминокислоты концов цепи находятся рядом (рисунок 19.9(а)). Замена этих аминокислот на *цистеины* позволяет образовать *дисульфидный мостик* между ними (показан сиреневым цветом на рисунке 19.9(б)), который делает структуру лизоцима более устойчивой.

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.

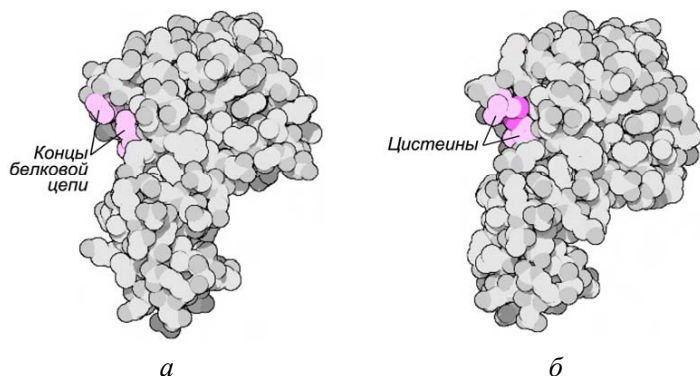


Рисунок 19.9 – Модификация лизоцима: а – исходная молекула лизоцима; б – изменённая молекула лизоцима с цистеинами на концах

19.5. КОНСТРУИРОВАНИЕ ХИМЕРНЫХ 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, отмечают специальными *сигнальными пептидами* на концах белковых цепей (см. п. 15.5). 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 19.10). Комбинируя два белка, можно получить новый, гибридный белок, обладающий функциями обоих компонентов.

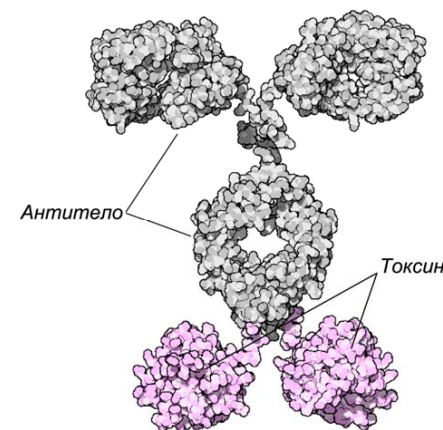


Рисунок 19.10 – Схема антиракового иммунотоксина

Например, *антираковые иммунотоксины* были созданы путём соединения антител, которые связываются с раковыми клетками, с белками-токсинами, которые убивают эти клетки (рисунок 19.10). Иммунотоксин находит раковую клетку и убивает её, снижая побочные эффекты традиционной антираковой химиотерапии (рисунок 18.2).

Для визуализации клеточных процессов *зелёный 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 зелёным светом.

Контрольные вопросы и задания

1. Как используют технологию рекомбинантных ДНК в бионанотехнологии?
2. Каковы достоинства и недостатки метода бесклеточного синтеза белков?
3. Как методом точечного мутагенеза была увеличена термостабильность лизоцима?
4. Приведите примеры успешного конструирования химерных белков.

Глава 20

Методы структурного анализа

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 (*Sir John Cowdery Kendrew*) 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*) [63]. Определение структуры биомолекул, хотя и имеет большую историю, всё 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 в качестве стартовой точки в бионанотехнологии результатов

этих методов, важно представлять себе, насколько точно эти структурные результаты представляют действительную структуру молекул.

20.1. РЕНТГЕНОВСКАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ

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

Кристаллические тела, у которых межатомные расстояния соизмеримы с длиной волны рентгеновского излучения, т. е. составляют $\sim 0,1$ нм, являются для этих лучей трёхмерной дифракционной решёткой. 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 20.1).

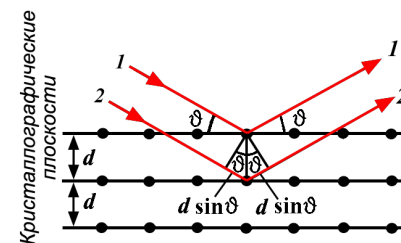


Рисунок 20.1 – Дифракция на кристаллической решётке

Пучок параллельных монохроматических лучей (1 и 2) падает под углом скольжения ϑ (угол между направлением падающих лучей и кристаллографической плоскостью) и возбуждает атомы кристаллической

решётки, 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)

$$2d \sin \vartheta = m\lambda, \quad (m = 1, 2, 3, \dots).$$

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 20.02. 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.

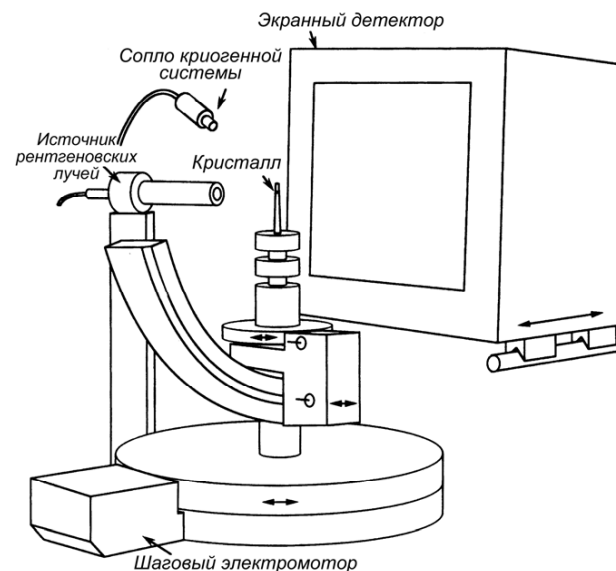


Рисунок 20.02 – Схема рентгеновского дифрактометра

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:

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

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

В качестве иллюстрации на рисунке 20.03 приведено одномерное преобразование Фурье.

Фурье преобразование сигнала f (рисунок 20.3(а)) представляет собой спектр F (рисунок 20.3(в)). Рисунок 20.3(б) представляет собой разложение на гармонические компоненты сигнала, показанного на рисунке 20.3(а). Это разложение было получено как Фурье преобразование спектра (в).

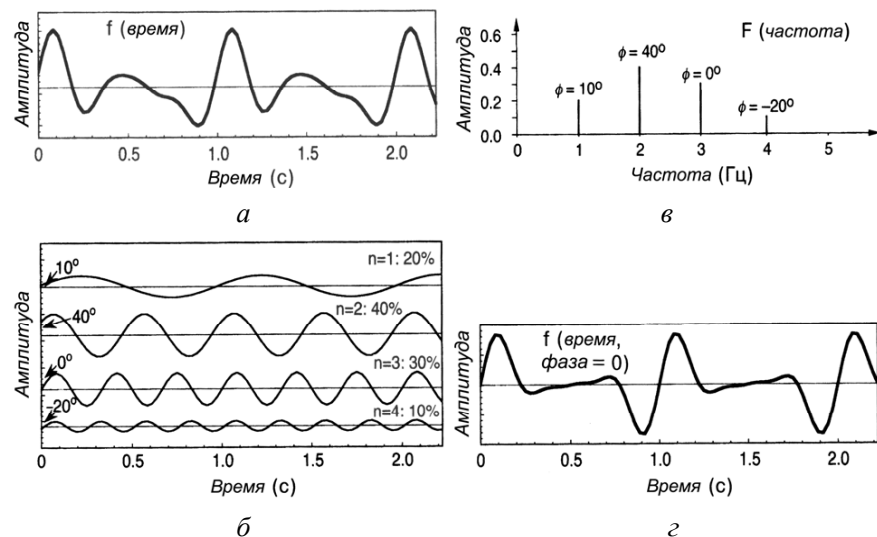


Рисунок 20.3 – Пример одномерного преобразования Фурье

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 20.3(г)). Если же использовать правильные начальные фазы, то обратное преобразование Фурье спектра (в) даёт в точности сигнал (а). 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 20.4) 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.

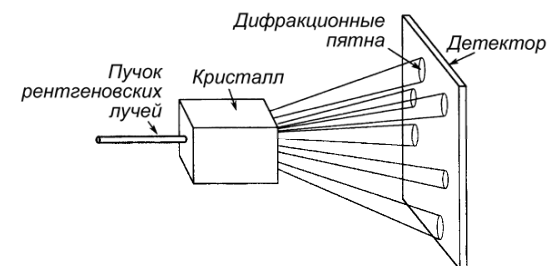


Рисунок 20.4 – Схема дифракции рентгеновских лучей на кристалле

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* (обозначается $\otimes$) кристаллической решётки и единичной ячейки, содержащей молекулу белка (рисунок 20.5):

$$\text{Кристалл} = \text{Решётка} \otimes \text{Единичная ячейка}.$$

Единичная ячейка – это наименьшая кристаллическая единица, из которой можно получить весь кристалл путём простого параллельного переноса.

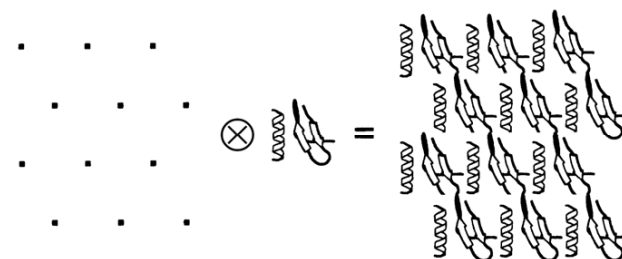


Рисунок 20.5 – Свёртка кристаллической решётки и единичной ячейки

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

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

Функция $f(x) \otimes g(x)$ определена почти всюду и также принадлежит $L(-\infty, +\infty)$.

По *теореме свёртки* преобразование Фурье (Fourier transform, FT) одновременно для двух функций свёртки $f_1(\vec{r})$ и $f_2(\vec{r})$ есть произведение их Фурье-преобразований

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

Таким образом, дифракционная картина белкового кристалла есть Фурье-преобразование единичной ячейки, умноженное на Фурье преобразование кристаллической решётки. Последнее называется обратной решёткой (рисунок 20.6).

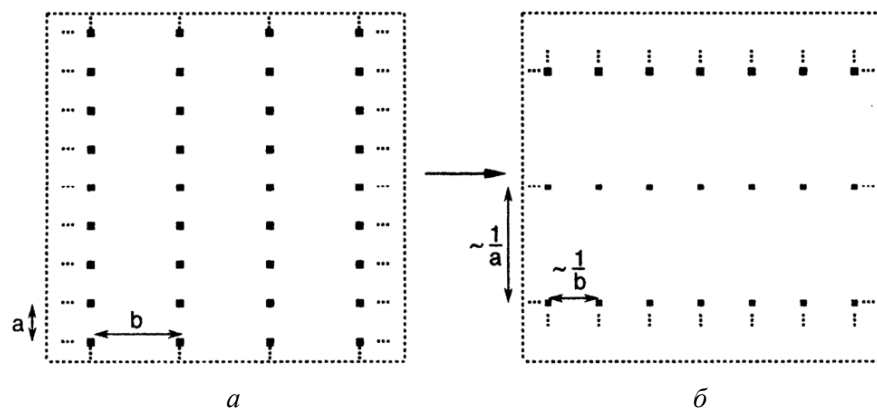


Рисунок 20.6 – Фурье-преобразование кристаллической решётки в реальном пространстве в обратную решётку: a – решётка в реальном пространстве; b – обратная решётка

Сравнивая дифрактограммы исследуемого кристалла с дифрактограммами, полученными от аналогичных кристаллов, которые содержат один или несколько атомов тяжёлых элементов в фиксированных положениях (рисунок 20.7(а)), можно определить фазы рассеянных волн, соответствующим разным пятнам на дифрактограмме, рассчитать пространственное распределение (карту) электронной плотности (рисунок 20.7(б)) и построить атомную модель объекта (рисунок 20.7(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 20.7(б) или рисунок 20.8(в)), которая отражает пространственное положение и форму компонентов молекулы.

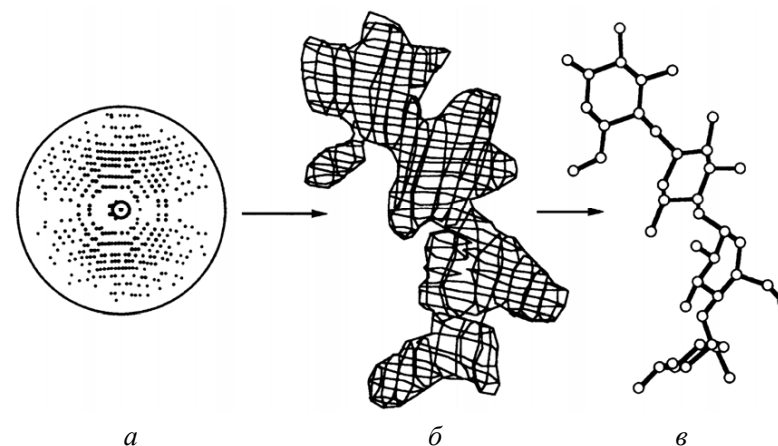


Рисунок 20.7 – Схема кристаллографического анализа белков: a – дифрактограмма; b – карта электронной плотности; v – атомная модель

На рисунке 20.8(в) представлена часть такой диаграммы кристалла молекулы ДНК. Области внутри контуров имеют повышенную электронную плотность. На диаграмме видно $C \equiv G$ пару и ион кальция, окружённый молекулами воды.

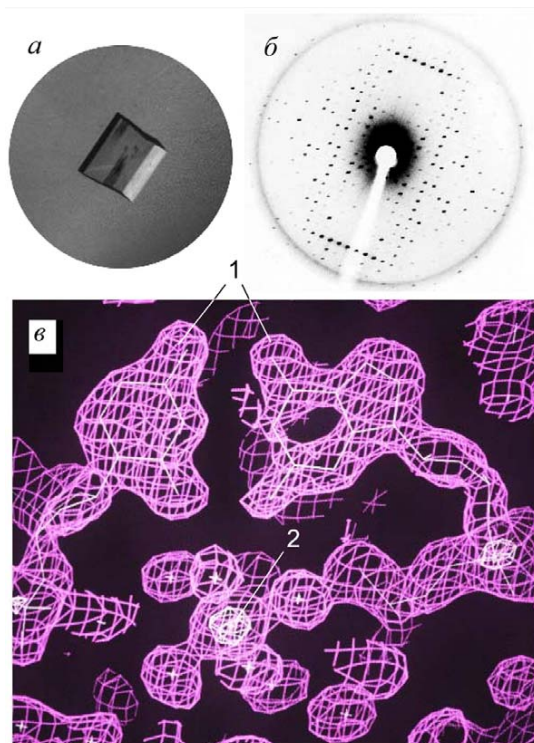


Рисунок 20.8 – Рентгеновская кристаллография: *а* – кристалл из биомолекул; *б* – дифрактограмма; *в* – распределение плотности, восстановленное компьютером. 1 – цитозин-гуаниновая пара оснований в ДНК; 2 – ион кальция

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 *трёхмерную «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.

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 *В-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. В-фактор пропорционален ширине такого распределения. Атомы с чётко определёнными позициями имеют В-факторы около 10. Если же величина В-фактора 30 и более, то это означает сильное разупорядочение и трактовка атомной структуры должна проводиться особо аккуратно.

Функциональные особенности, связанные с подвижностью компонентов биомолекулы, должны исследоваться на большом числе кристаллов, выращенных в различных условиях. Например, на рисунке 20.9 наложены друг на друга две структуры белка лизоцима (обозначенные сиреневым и чёрным цветом), полученные с использованием разных кристаллов. На рисунке отмечены стрелками перемещения внешних петель и смещение радикалов аминокислот.

Главным недостатком метода рентгеноструктурного анализа является необходимость выращивания кристалла. Однако молекулы в кристалле могут не соответствовать точно свободным молекулам в растворе,

точные молекулы в кристалле соответствуют какой-либо *одной*, замороженной, *конформации* свободной молекулы. Для большинства растворимых белков, к счастью, эти различия несущественны.

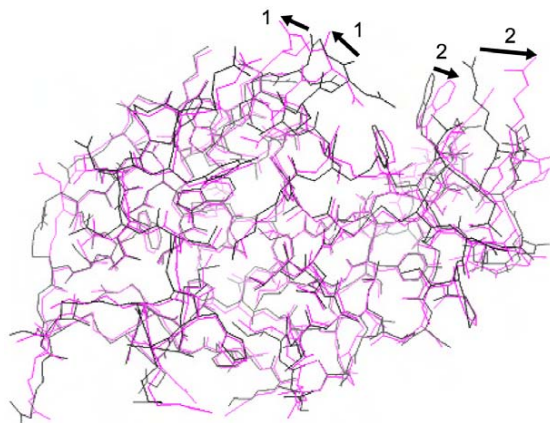


Рисунок 20.9 – Структура молекулы лизоцима. Стрелками показаны перемещения элементов глобулы: 1 – смещение петли; 2 – движение радикалов аминокислот

20.2. 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 вол-

ны 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 даёт 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 20.10(а) представлена электронная *микрофотография актиновых волокон*.

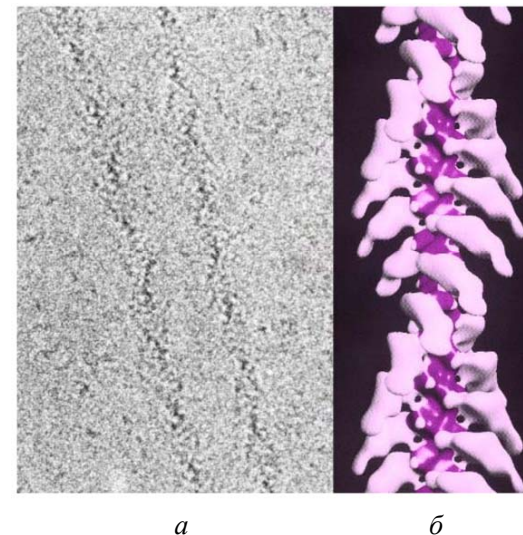


Рисунок 20.10 – Актиновые нити: *а* – электронная микрофотография; *б* – компьютерная модель

Компьютерная обработка электронных микрофотографий позволяет *воссоздать трёхмерную модель* активной нити (рисунок 20.10(б)). 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 20.11 представлена схема трансмиссионного электронного микроскопа.

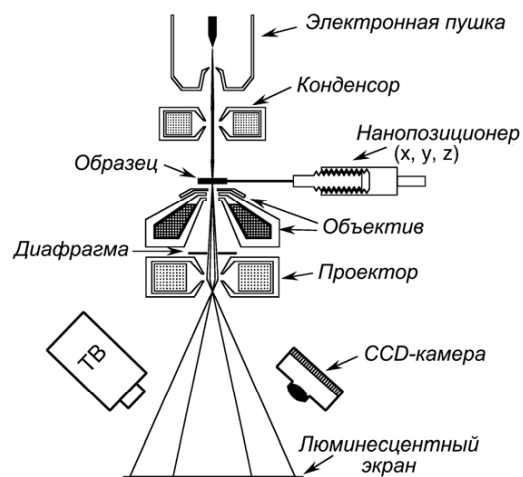


Рисунок 20.11 – Схема просвечивающего электронного микроскопа

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 распространённых 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 даёт 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 лёд, 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 20.12.

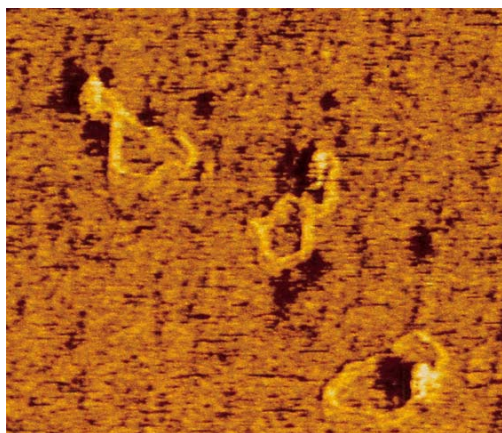


Рисунок 20.12 – Электронная микрофотография полисом

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 20.12).

20.3. 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). Обобщённая 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 20.13).

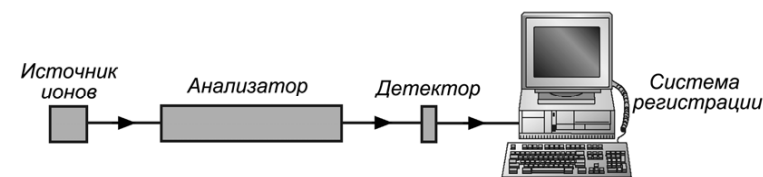


Рисунок 20.13 – Схема масс-спектрометрического анализа

Способность масс-спектрометра разделять ионы описывается с помощью величины *разрешения R* (или *разрешающей способности*)

масс-спектрометра, которое определяется как $R = \frac{m}{\Delta m}$, где m – масса иона; Δm – разность масс между двумя различными пиками. Область значений R лежит в интервале 100–500000.

Ионизация образцов. Общая схема ионизации конденсированного образца приведена на рисунке 20.14.

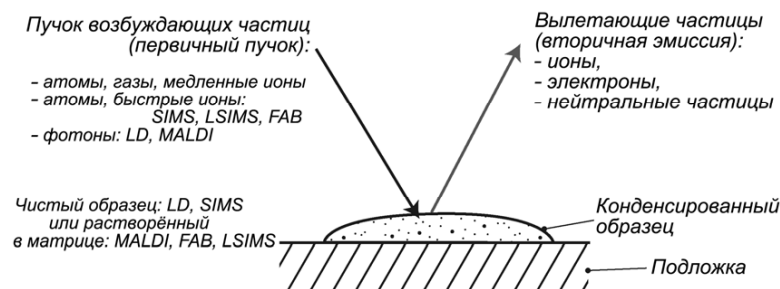


Рисунок 20.14 – Схема ионизации твёрдого образца

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 твёрдого 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*).

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.

Electrospray ionisation. В методике электроспрей-ионизации (электрораспылительный метод ионизации, ESI) жидкий раствор, содержащий исследуемые бионанообъекты, вводят в капилляр, к которому приложен высокий электростатический потенциал (рисунок 20.15).

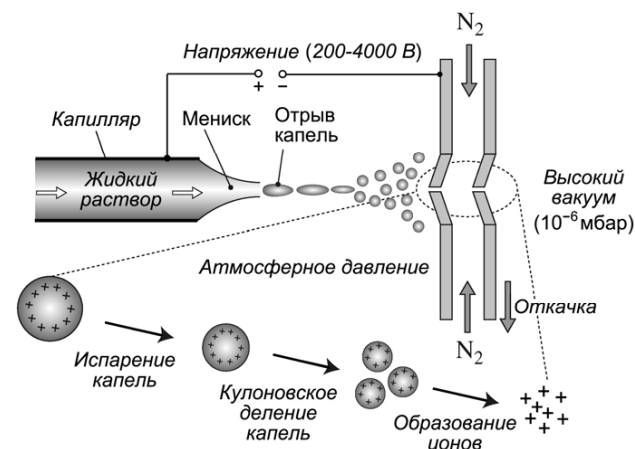


Рисунок 20.15 – Схема электроспрей-ионизации ESI

Электроспрей-ионизация происходит в три этапа: образование капль; испарение растворителя из капль; 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 20.16 приведён масс-спектр рибосомы *Thermus thermophilus*, полученные методом электроспрей-ионизации.

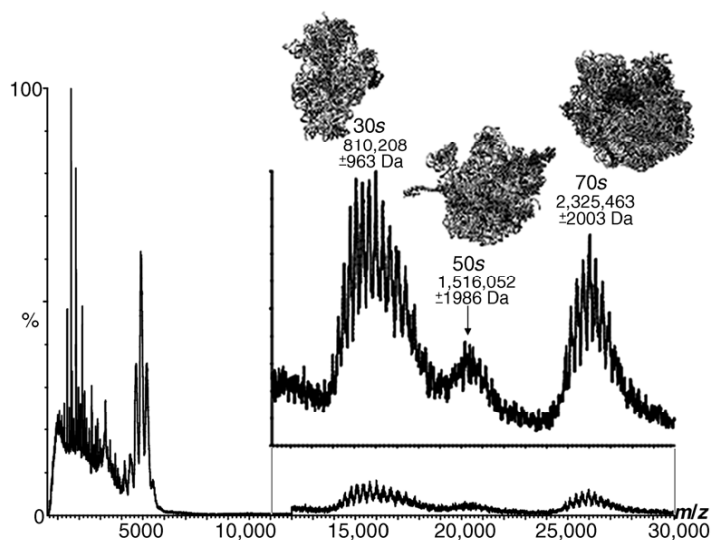


Рисунок 20.16 – ESI масс-спектр рибосомы *Thermus thermophilus*. Кроме собственно рибосомы 70S, в спектре присутствуют также серии пиков, относящихся к большой 50S и малой 30S субъединицам рибосомы

MALDI. В методике лазерно-десорбционной ионизации с участием конденсированной матрицы (MALDI) поглощение атомами матрицы импульсного лазерного излучения приводит к возбуждению и ионизации матрицы (рисунок 20.17(а)). Релаксация матрицы приводит к объёмному испарению образца в месте попадания лазерного луча и к возбуждению и ионизации биообъектов, расположенных в матрице (рисунок 20.17(б)).

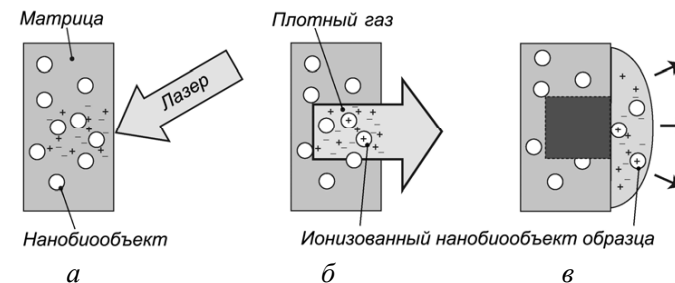


Рисунок 20.17 – Схема лазерно-десорбционной ионизации с участием конденсированной матрицы MALDI

Сверхзвуковое расширение образовавшегося плотного газа нейтральных и ионизованных молекул сохраняет ионизацию объектов (рисунок 20.17(в)), а приложенное внешнее электрическое поле вытягивает облако ионизованных частиц к анализатору.

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

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 всером.

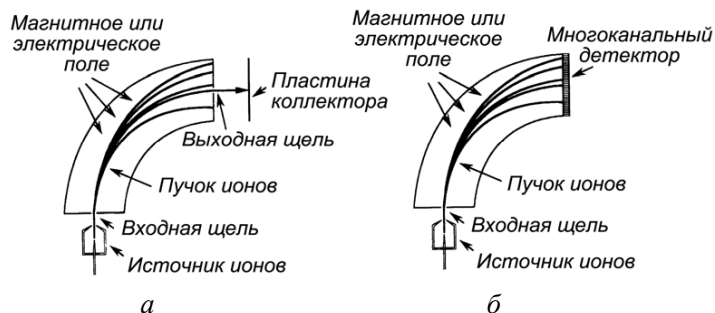


Рисунок 20.18 – Схема секторных масс-спектрометров: а – с одноканальным детектором, б – с многоканальным детектором

В сканирующем анализаторе масс (рисунок 20.18(а)) изменяют силу электрического или магнитного поля, при этом каждый момент времени регистрируется только одно значение m/z .

В несканирующем анализаторе (рисунок 20.18(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 20.19.

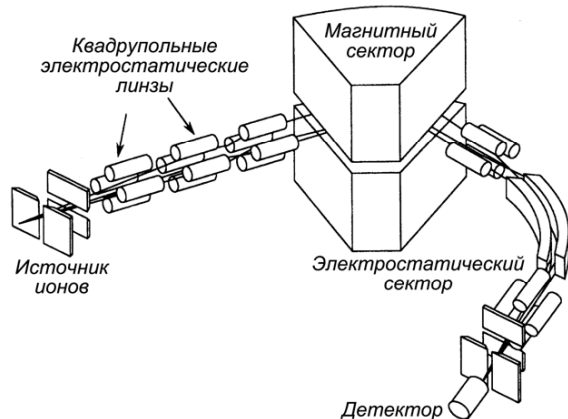


Рисунок 20.19 – Схема двухфокусного масс-спектрометра

Квадрупольный анализатор масс представляет собой две пары металлических стержней: одна пара находится под отрицательным электрическим потенциалом ($-U$), а другая – под положительным ($+U$) (рисунок 20.20).

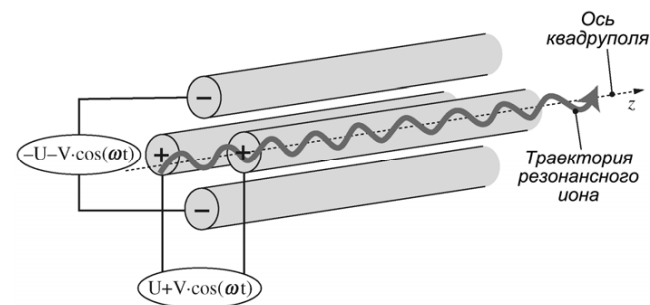


Рисунок 20.20 – Схема квадрупольного анализатора масс

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 20.21).

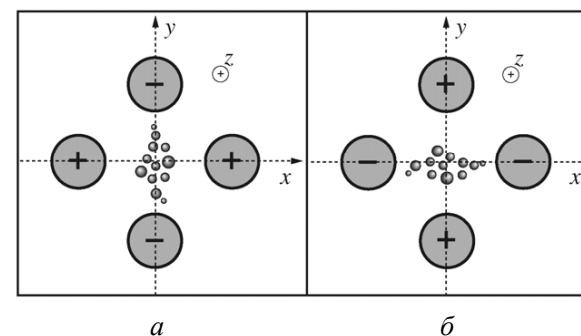


Рисунок 20.21 – Осцилляции ионного пучка в квадрупольном анализаторе: а – к концу первой половины периода осцилляции; б – к концу второй половины периода

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 20.22) 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.

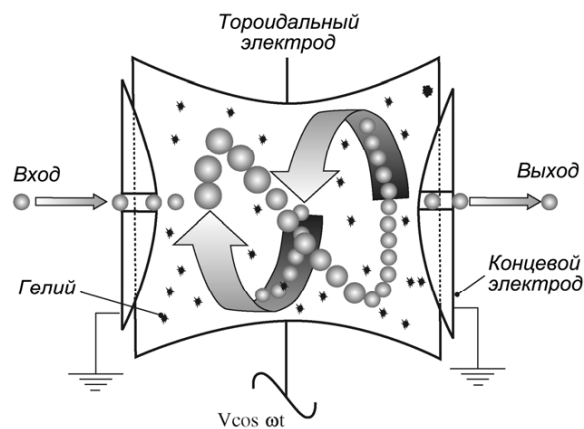


Рисунок 20.22 – Схема ионной ловушки

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.

Если же к такой ловушке приложить внешнее переменное поле в направлении оси (x) 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 x -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 20.23).

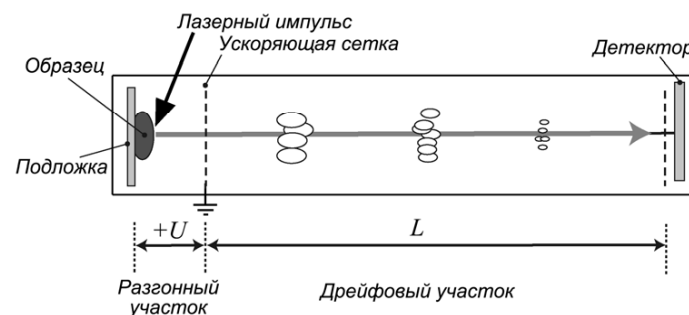


Рисунок 20.23 – Схема линейного время-пролётного масс-спектрометра

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, реги-

стрируя время прилёта ионов, детектор осуществляет развёртку спектра масс ионов. 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 aberrацией*. Хроматическая aberrация является одной из главных причин ограничивающих разрешение линейных время-пролётных масс-спектрометров.

Простейший способ снизить влияние хроматической aberrации состоит в использовании *отражательной* (рефлекторной) схемы время-пролётного масс-спектрометра (*рефлектрона*) (рисунок 20.24).

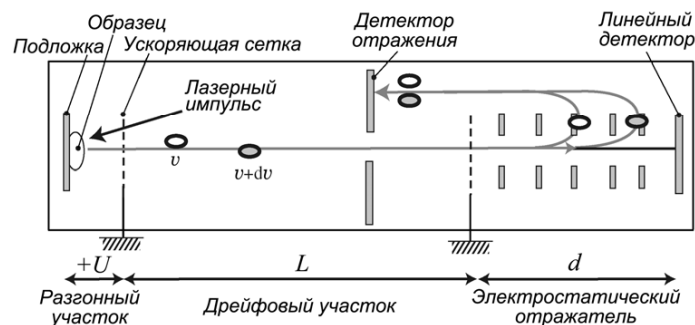


Рисунок 20.24 – Схема отражательного время-пролётного масс-спектрометра

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 aberrация

значительно снижается, а разрешение прибора, наоборот, значительно возрастает.

Для примера на рисунке 20.25 приведены масс-спектры смеси пептидов зарегистрированные с использованием линейного время-пролётного масс-спектрометра (рисунок 20.25(а)), и с использованием рефлектрона (рисунок 20.25(б)). Видно, что использование отражательной (рефлекторной) схемы значительно увеличило разрешение получаемых масс-спектров.

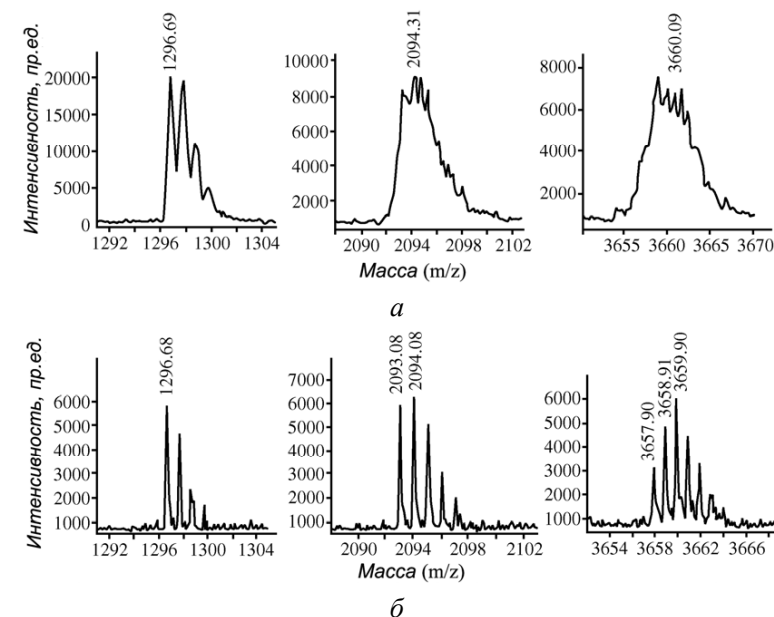


Рисунок 20.25 – Масс-спектры смеси пептидов: а – записанные линейным время-пролётным масс-спектрометром; б – записанные рефлектроном

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 20.26).

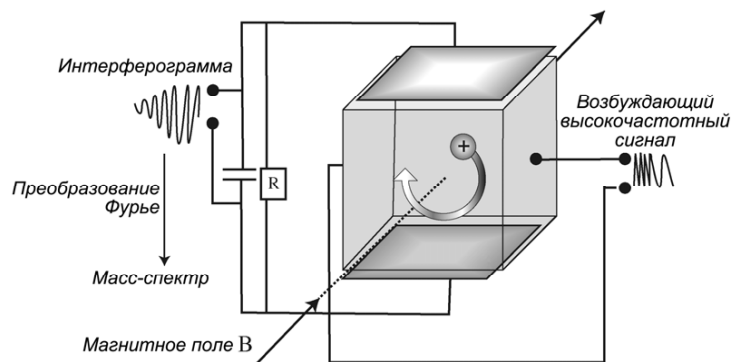


Рисунок 20.26 – Схема ячейки FT-ICR анализатора

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.

Детектирование сигнала. За исключением масс-спектрометров с Фурье преобразованием, ионные сигналы регистрируются с помощью *вторичного электронного умножителя* (ВЭУ) (рисунок 20.27) или, после преобразования в фотоны, *детекторами фотонов*.

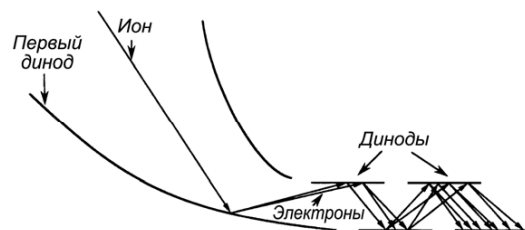


Рисунок 20.27 – Принцип работы ВЭУ

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 передаётся на счётчик.

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 20.26).

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*) (рисунок 20.28).

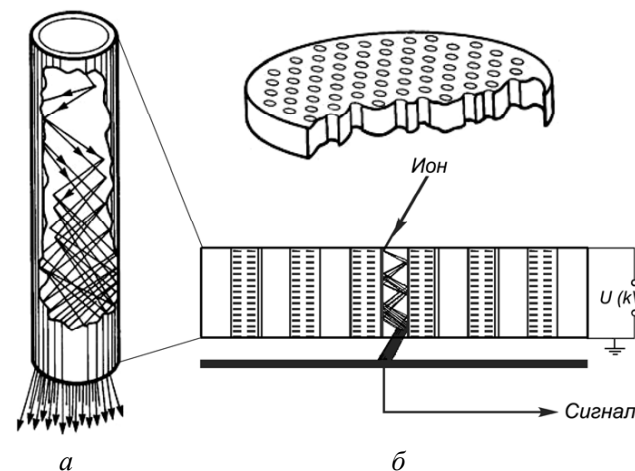


Рисунок 20.28 – Схема MCP-детектора: а – размножение электронов в микроканале; б – схема многоканальной пластины

Многоканальная пластина представляет собой многоканальный вариант ВЭУ, который может регистрировать двумерное распределение ионов в фокальной плоскости анализатора. Многоканальная пластина

(рисунок 20.28(б)) состоит из большого числа индивидуальных микроканалов (рисунок 20.28(а)), изготовленных из металлизированных стеклянных капилляров диаметром ~10 мкм каждый. Ион, попадая в такой канал, выбивает из его стенок электроны, которые, ускоряясь в электрическом поле, порождают лавину вторичных электронов.

В *многоканальном матричном детекторе* (рисунок 20.29) с помощью оптоволоконной системы (жгут световодов) объединены многоканальная пластина и детекторная матрица из фотодиодов.

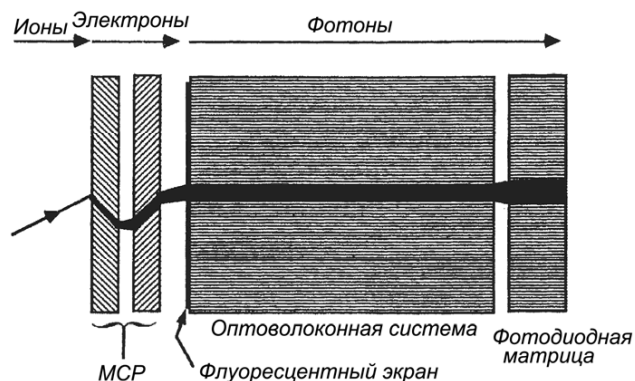


Рисунок 20.29 – Схема многоканального матричного детектора

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.

Контрольные вопросы и задания

1. Укажите достоинства и недостатки метода рентгеноструктурного анализа.
2. Каковы достоинства и недостатки электронной микроскопии?
3. Назовите виды электронной микроскопии. В чём заключаются преимущества каждого из видов?
4. Какие компоненты входят в обобщённую схему масс-спектрометра?
5. По какому параметру производится разделение сигнала в масс-спектрах?
6. Какие основные виды ионизации образца используются в масс-спектропии?
7. Какие пять типов анализаторов используются в масс-спектропии?

Глава 21

Моделирование бионаноструктур

21.1. МОДЕЛИРОВАНИЕ МАКРОМОЛЕКУЛ

При конструировании новых бионаномашин компьютерное моделирование используется наравне с биологическим экспериментом, причём, 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. 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 21.1).

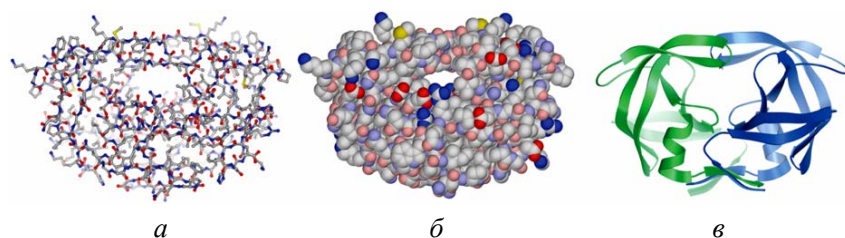


Рисунок 21.1 – Визуализация молекулярной структуры лизоцима: *а* – схема ковалентных связей; *б* – ван-дер-ваальсовая модель молекулы; *в* – «резиновая лента»

Можно изобразить пространственное расположение всех ковалентных связей в молекуле (рисунок 21.1(а)). Такое представление *наиболее полное*, но его сложно анализировать. Иногда удобно заполнить области, занимаемые каждым атомом, сферами соответствующего радиуса – *ван-дер-ваальсовая модель* (рисунок 21.1(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 21.1(в)). Такое представление удобно для *исследования фолдинга биомолекул*.

Наилучшие из программ визуализации представляют нам в зримом виде основные наносвойства молекул в виде трёхмерных моделей. Сегодня аппаратных средств компьютеров уже достаточно для интерактивного представления даже самых больших биомолекул.

21.2. ПРЕДСКАЗАНИЕ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ МАКРОМОЛЕКУЛ

Молекулярное моделирование позволяет исследователю строить любую желаемую молекулу на основе известной молекулярной геометрии составляющих атомов (см. [10], п. 14.3). Затем к этой трёхмерной структуре прикладывается поле сил, определяющих взаимодействие между каждым 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 расчёты 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.

21.3. ПРЕДСКАЗАНИЕ БЕЛКОВОГО ФОЛДИНГА

Прежде чем бионанотехнология действительно станет распространённой 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 уравнивают 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 даёт *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 структуру белковой цепи некоторым подобием

кристаллической решётки, чтобы уменьшить число координат в пространстве конформаций. Однако, эти приближения всё 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 промоделирована на основе структуры известного белка, имеющего подобную аминокислотную последовательность (если, конечно, такая информация существует).

Компьютерное моделирование (in silico), 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 использованием 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, свёрнутую 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.

21.4. 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 (*in silico*) можно спроектировать *всё 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 компьютеризированной 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.

Фармакологические мишени. Разработка препарата – это невероятно сложный, продолжительный и дорогостоящий процесс. Получение препарата начинается с установления потенциально подходящей мишени болезни. Этот процесс называют опознаванием *мишени*.

Ещё в начале XX в. Дж. Лэнгли (*John Newport Langley*) сформулировал общее теоретическое понятие «рецептивной субстанции» (*receptive substance*), благодаря взаимодействию с которой вещество (например, кураре (*curare*)) вызывает биологический эффект (в случае кураре – мышечный паралич). Эта концепция с тех пор используется для объяснения количественной зависимости фармакологического действия от концентрации вещества. Начиная с 80-х годов XX века, после первых экспериментов по клонированию и выяснению первичной структуры никотинового холинорецептора, стали быстро развиваться представления о специфических молекулярных мишенях (или фармакологических мишенях – *drug targets*). Большинство фармакологических мишеней – это белки. Уже идентифицировано около 1000 белков-мишеней, и ожидается, что общее их число составит не менее 10000. Наибольшая доля известных фармакологических мишеней (около 50 % от общего их числа) приходится на *рецепторы клеточных мембран*. Затем следуют *ферменты* (около 30 %). Важную группу составляют *ионные каналы* и *белки-переносчики* нейромедиаторов и гормонов (дофамина, серотонина, норадреналина, ГАМК (GABA) и других).

Самой многочисленной группой белков-мишеней являются *рецепторы, сопряжённые с G-белками* (GPCR, *G-protein coupled receptors*). Это обширное и функционально разнообразное семейство белков, которые передают сигнал через клеточную мембрану и тем самым регулируют многие биохимические процессы в клетках. Через посредство активации GPCR осуществляется биологическое действие примерно 80 % известных к настоящему времени гормонов и нейромедиаторов (например, дофамина, серотонина). Для выяснения механизмов связывания молекул-лигандов с GPCR-рецепторами применяется компьютерное моделирование структур GPCR-белков на основе уже известных структур белков.

Чтобы понять, как функционирует белок-мишень, необходимо знать не только его первичную аминокислотную последовательность, но и трёхмерную структуру макромолекулы, а также установить место связывания лиганда. При этом хорошие результаты даёт сочетание экспериментальных методов молекулярной биологии (рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии) с компьютерными методами. Однако до сих пор разрыв между числом известных аминокислотных последовательностей и числом установленных пространственных структур белков не сокращается, а возрастает.

Если пространственная структура белка-мишени неизвестна, пытаются построить его трёхмерную модель. Современное молекулярное компьютерное моделирование состоит из *четырёх* основных элементов: *компьютерная графика; расчёты квантовой механики; расчёты молекулярной механики; моделирование молекулярной динамики*.

С помощью *компьютерной графики* визуализируется пространственное расположение атомов и распределение электростатических потенциалов в молекулах. Это стало новым эффективным методом анализа соотношений структура-активность биологически активных соединений. *Методы квантовой механики* позволяют довольно точно рассчитывать структуру и электростатические потенциалы для небольших молекул, но квантово-механические расчёты белковых структур требуют много компьютерного времени. Расчёты методами *молекулярной механики* менее точны, но производятся быстро, и определение структуры белка из

нескольких сотен аминокислотных остатков можно выполнить на персональном компьютере. Независимо от того, с помощью каких вычислительных процедур производилось уточнение структуры белка, первоначальные параметры модели существенно влияют на конечную модель, оптимизированную с помощью процедур минимизации энергии. После расчёта конформации белка с минимальной внутренней энергией, возможно исследовать взаимодействие различных лигандов с известным участком связывания. При создании моделей белков-мишеней нужно иметь в виду, что в естественных условиях они не статичны, их геометрия непрерывно меняется, причём масштабы времени исчисляются пико- и даже фемтосекундами (10^{-15} с). Для исследования внутримолекулярных движений и уточнения трёхмерных структур белков применяется моделирование *молекулярной динамики*, при котором молекуле сообщается начальный импульс. Молекулярно-динамические расчёты производятся после минимизации энергии и состоят из большого числа вычислительных этапов, так что для получения модели макромолекулы, соответствующей масштабам даже нескольких наносекунд (10^{-9} с), нужны очень мощные компьютеры.

За опознаванием мишени следует процесс её утверждения. Последний предполагает всесторонние испытания терапевтического потенциала молекулярной мишени. Этот процесс может включать в себя моделирование болезней на опытных животных и анализ данных об экспрессии генов и белков. Путём сравнения уровней экспрессии генов в нормальном и болезненном состоянии новые медикаментозные мишени могут быть обнаружены *in silico* с использованием микроматриц. После того, как установлен ген, который в болезненном состоянии обнаруживает повышающую или понижающую регуляцию (экспрессируемый на более высоком или низком уровне, чем в нормальной ткани), определяют его природу с помощью методов биоинформатики. Адекватная мишень должна обладать высоким терапевтическим показателем, то есть должна быть гарантия существенного терапевтического эффекта при введении такого препарата.

После окончательного утверждения мишени начинается *поиск молекул-«снарядов»* – лидерных соединений (*lead compound*, лидов), которые взаимодействуют с этой мишенью. *Лид* – это любое соединение, которое

проявляет искомую биологическую активность. После обнаружения *лида*, он должен быть оптимизирован и оценён по качеству, принимая во внимание такие факторы, как лёгкость синтеза и приготовления лекарственной формы. Затем оптимальное соединение регистрируют как новый разработанный препарат и направляют на клинические испытания.

21.5. МОДЕЛИРОВАНИЕ ФАРМАКОФОРОВ И ДОКИНГА

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. 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 предсказывать энергию взаимодействия. *Компьютер перебирает множество возможных способов* связывания молекул, используя энергетический критерий для определения наилучшего из них.

Безусловно, для того, чтобы такие расчётные задачи на современных компьютерах возможно было *решить в разумное время*, используют 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 всё 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 ведётся в *двух* направлениях. 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. Второй подход, в котором «в лоб» моделируется атомная структура и атомные взаимодействия, *основан на успехах геномики и протеомики*, в которых структура и функции белков определены с использованием сравнения структур генов [10].

Применение высокопроизводительных отборочных испытаний в открытии лекарственных препаратов зависит от наличия разнообразных *химических библиотек* (например, создаваемых методами комбинаторной химии), так как они значительно увеличивают возможности отыскания

молекул, взаимодействующих с определённой белковой мишенью. В том случае, если о специфичности связывания белка-мишени почти ничего не известно, продуктивное открытие лидов могут обеспечить максимально объёмные химические библиотеки с высоким показателем разнообразия. Если же о последовательности или о структуре мишени удалось собрать информацию строго определённого вида, то можно из общих библиотек выбрать частные библиотеки, охватывающие какую-либо одну область химического пространства.

Например, если известна последовательность некоторого белка-мишени, то поиск гомологии в базе данных часто будет давать родственный белок с ранее установленной структурой и уже описанными взаимодействиями с маленькими молекулами. В таких случаях возможно спроектировать химическую библиотеку, содержащую один молекулярный каркас, который сохраняет относительное расположение *участков, присутствующих в известном лиганде*, но который может быть видоизменен путём прикрепления к нему разнообразных функциональных групп. Вполне возможно, что ранее уже было показано, что некоторые из этих групп необходимы для связывания лекарственных препаратов. Такие участки называют *фармакофорами*.

Термин *фармакофор* (*pharmacophore*) был введён Паулем Эрлихом (*Paul Ehrlich*) в 1909 году. Эрлих определил фармакофор, как молекулярный остов, который несёт (*phore*) существенные признаки, ответственные за биологическую активность лекарства (*pharmaco*). В 1977 году это определение было модифицировано Питером Гундом (*Peter Gund*): *фармакофор* – это набор структурных признаков в молекуле, которые распознаются биологическими рецепторами и являются ответственными за биологическую активность молекулы. Современное определение ИЮПАК (*IUPAC, The International Union of Pure and Applied Chemistry*) таково: *фармакофор* – это набор пространственных и электронных признаков, необходимых для обеспечения оптимальных супрамолекулярных взаимодействий со специфической биологической мишенью, которые могут вызывать (или блокировать) её биологический ответ. Под *фармакофорными признаками* обычно понимаются *фармакофорные центры* и

интервалы расстояний между ними, необходимые для проявления данного типа биологической активности. Типичными фармакофорными центрами при этом являются: гидрофобные области, ароматические кольца, доноры и акцепторы водородной связи, анионные и катионные центры. Для более детального описания фармакофора часто используют гидрофобные и исключённые объёмы, а также допустимые интервалы угловой ориентации векторов водородных связей и плоскостей ароматических колец. При фармакофорном поиске проводится *поиск соответствия между фармакофорной моделью и характеристиками молекул* из базы данных, находящихся в допустимых конформациях. Пример фармакофора приведён на рисунке 21.2 [61].

Функциональные группы фармакофора изображены на рисунке 21.2 в виде *сфер разного радиуса*. Компьютерные программы используют разные цвета для отображения сфер, соответствующих гидрофобным и гидрофильным областям, или же положительно и отрицательно заряженным функциональным группам. Узконаправленные водородные связи изображены конусами. Соответствующая молекула лида вписана в фармакофорную модель.

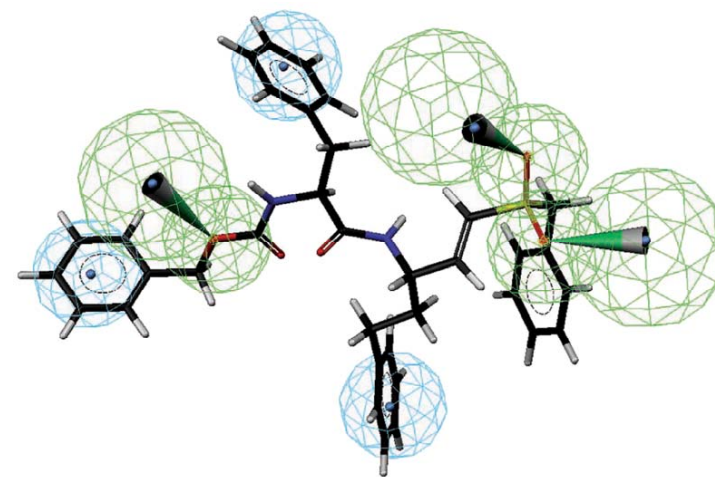


Рисунок 21.2 – Модель фармакофора с молекулой лида

Фармакофорный скрининг позволяет значительно сократить время поиска необходимых лидов. Прежде чем проводить отсеивающие эксперименты в лабораторных условиях, имеет смысл попытаться собрать как можно больше информации о потенциальных взаимодействиях препарата с мишенью. Одним из путей получения таких данных является *автоматический отборочный поиск* в химических базах данных (на соответствие молекулярной мишени с известной структурой). В других случаях структуру соединения можно попытаться определить *по подобию* с установленной *структурой близкой гомологии* или предсказать её с помощью алгоритма *трединга* (протягивания).

Если структура белка-мишени известна, то применяют основанные на критерии адекватности алгоритмы распознавания потенциальных взаимодействующих лигандов, так называемые «рациональные», прямые методы компьютерного конструирования лекарств на основании структуры белка-мишени (*structure-based drug design*).

Сначала устанавливают место связывания (рецептор) низкомолекулярного соединения (лекарства) с белком-мишенью.

Затем используют *докинг* (*docking*, стыковка) – производят молекулярно-графический анализ комплекса лиганд–рецептор – возможность размещения потенциального лиганда в полости активного центра макромолекулы и оценку энергии связывания и сродства для такого комплекса. Конструирование новых лигандов можно также осуществить посредством модификации структуры найденных соединений.

На рисунке 21.3 приведён пример [64] визуализации результатов докинга молекулы цитостатического лекарственного препарата *дактиномицин*. Программа докинга рассматривает каждый потенциальный лиганд как каркас, с присоединёнными функциональными группами.

Сначала алгоритм предсказывает возможные варианты стыковки путём анализа расположения ван-дер-ваальсовых сфер (только тех, которые находятся на каркасе), после чего проверяет на стерическую совместимость отдельные функциональные группы, используя разнообразные сочетания вращений связей. Наконец, алгоритм производит стыковку и вычисляет общий счёт комплекса.

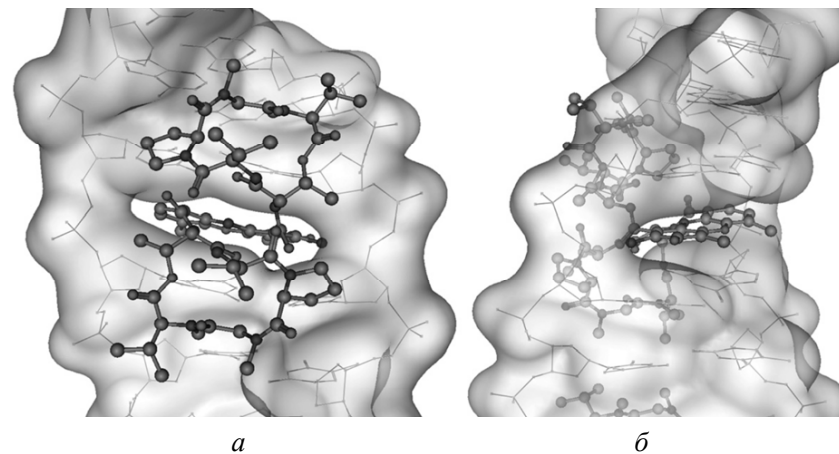


Рисунок 21.3 – Докинг молекулы дактиномицина интеркалировавшего между парами оснований молекулы ДНК: *a* – вид спереди; *б* – вид сбоку

В химических базах данных можно проводить поиск не только на соответствие участку связывания (поиск взаимодействий комплементарных молекул) но также и на соответствие некоторому лиганду. Известно несколько алгоритмов сравнения двумерных или трёхмерных структур и построения профилей подобных молекул. Установление трёхмерной структуры мишени является необходимым условием разработки лида, который должен или связываться с ней, или воздействовать на неё.

Лиды выбирают из *существующей библиотеки* химических соединений путём комбинаторной стыковки структур. Варианты лидов из библиотеки поочерёдно состыковывают с активным участком молекулярной мишени (путём перебора вариантов комплементарного связывания). Эта предварительная «подгонка» *in silico* сокращает число соединений, которые необходимо синтезировать и испытывать *in vitro*, так как базы данных содержат необходимые (для имитационного моделирования) описания химических свойств и методов синтеза соединений.

Другой метод поиска лидов *конструирует молекулы* из библиотеки функциональных групп на основе анализа сайта связывания на поверхности мишени. Специальный алгоритм имитационного моделирования

тщательно *анализирует активный участок* молекулярной мишени и *выстраивает молекулу* лида из отдельных фрагментов.

Поверхность молекулярной мишени, которая должна взаимодействовать с лидом, может соседствовать с различными по химическим свойствам областями белковой молекулы, например, с зонами гидрофобности, с зонами образования водородных связей или с каталитическим активным центром. В эти области последовательно помещают фрагменты гипотетического соединения. Оптимизация ориентации фрагментов помогает подобрать финальную пространственную структуру лида.

Иногда целая молекула сразу вписывается в рецепторный или активный участок, и программа докинга перебирает все возможные способы подогнать лиганд к рецепторному участку. Участок связывания в молекуле рецептора или фермента содержит области образования водородных связей, а также гидрофобные области. Первоначально программа помещает и ориентирует молекулу-прототип в активном участке таким образом, чтобы образовалось максимально возможное количество связей. Затем последовательно добавляет и подгоняет дополнительные функциональные группы до тех пор, пока не будут сформированы все необходимые связи лиганда с мишенью. Программа моделирует варианты расположения элементов активного участка мишени и затем ищет в базе данных химические структуры, которые удовлетворяли бы такой имитации.

Если нет данных о пространственной структуре белка, тогда при компьютерном конструировании применяются разнообразные *методы сравнительного моделирования*. Функционально важные участки в молекуле белка удаётся выявить путём сравнительного анализа аминокислотных последовательностей *гомологичных* белков. При построении трёхмерной модели белка с заданной аминокислотной последовательностью эта полипептидная цепочка вначале *«вписывается»* в координаты, соответствующие аминокислотным остаткам гомологичного белка с расшифрованной пространственной структурой, а затем осуществляется минимизация внутренней энергии, чтобы убрать возможные напряжения в структуре. После этого методами *молекулярной динамики* моделируется движение отдельных частей молекулы, чтобы уточнить расположение гибких

участков. Качество модели оценивается с помощью программы, сравнивающей расположение аминокислотных остатков с известной статистикой для белков, пространственная структура которых была расшифрована экспериментально. При анализе взаимодействия лиганд–рецептор следует принимать во внимание структурную подвижность молекулы лиганда. Чтобы произошло связывание лиганда, его молекула должна находиться в такой конформации, которая комплементарна структуре белка. Статическая модель взаимодействия лиганд–рецептор не учитывает конформационной подвижности. Конформационное пространство (набор конформационных вариантов) лиганда оценивается с помощью моделирования молекулярной динамики и минимизации энергии. Производится докинг возможных конформации лиганда в разных положениях. Наилучшие положения используются для молекулярно-динамического моделирования комплекса лиганд–белок.

Уже известны десятки лекарственных средств, сконструированных с применением технологий моделирования фармакофоров и докинга, которые успешно прошли клинические испытания и введены в медицинскую практику.

Контрольные вопросы и задания

1. Какова роль компьютерного моделирования в бионанотехнологии?
2. Назовите две причины, не позволяющие до настоящего времени осуществить компьютерное моделирование белкового фолдинга.
3. В чём заключается гомологическое моделирование структуры белков?
4. Для каких целей используют компьютерное моделирование молекулярного докинга?
5. Что такое лид?
6. Что такое фармакофор?
7. Чем отличаются процедуры конструирования молекул лекарств для случаев известной и неизвестной пространственной структуры белков-мишеней?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ОСНОВНАЯ

1. Огурцов А.Н. Бионанотехнология. Принципы и применение / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 480 с.
2. Огурцов А.Н. Физика и биофизика : в 2 ч. – Ч. 1. Основы общей физики / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2016. – 528 с.
3. Огурцов А.Н. Физика и биофизика : в 2 ч. – Ч. 2. Основы биофизики / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2016. – 560 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. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 304 с.
7. Огурцов А.Н. Основы молекулярной биологии : в 2-х ч. – Ч. 2. Молекулярные генетические механизмы / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 240 с.
8. Огурцов А.Н. Молекулярная биофизика и ферментативный катализ / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 400 с.
9. Огурцов А.Н. Физико-химические основы биотехнологии. Биотермодинамика / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2011. – 256 с.
10. Огурцов А.Н. Основы биоинформатики / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 400 с.
11. Огурцов А.Н. Научные исследования и научная информация / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : 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. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2012. – 368 с.
14. Огурцов А.Н. Введение в биофизику макромолекул / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2014. – 384 с.
15. Огурцов А.Н. Основы химической и молекулярной биофизики / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2017. – 400 с.
16. Огурцов А.Н. Физико-химические основы биотехнологии. Биокинетика / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2017. – 368 с.
17. Огурцов А.Н. Основы генной инженерии и биоинженерии : в 2-х ч. – Ч. 1. Молекулярные основы генных технологий / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк, Н.Ю. Масалитина. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2018. – 288 с.
18. Огурцов А.Н. Основы генной инженерии и биоинженерии : в 2-х ч. – Ч. 2. Теоретические основы биоинженерии / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк, Н.Ю. Масалитина. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2018. – 224 с.
19. Актуальные проблемы биотехнологии и биоинженерии : Монография / И.А. Белых, О.Н. Близнюк, А.А. Варанкина, О.В. Звягинцева, Н.Ф. Клещев, Ю.М. Краснопольский, Д.В. Лаврик, Н.Ю. Масалитина, А.Н. Огурцов, Д.М. Пилипенко, С.И. Самойленко / Под ред. А.Н. Огурцова. – Харьков : «Типография Мадрид», 2019. – 240 с.
20. Огурцов А.Н. Биохимия для студентов. – 2015. – 342 с. – Интернет-ресурс. – <https://sites.google.com/site/anogurtsov/lectures/biochem>
21. Огурцов А.Н. Основы биосинергетики / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2018. – 368 с.
22. Nanobiophysics: Fundamentals and Applications / Ed. by V.A. Karachev-tsev. – Boca Raton: CRC Press, 2016. – 428 p.
23. Рубин А.Б. Биофизика. В 2-х т. / А.Б. Рубин. – М. : Изд-во МГУ, 2004. – Т. 1. – 448 с. – Т. 2. – 469 с.
24. Anal A.K. Bionanotechnology: Principles and Applications / A.K. Anal. – Boca Raton : CRC Press, 2018. – 205 p.

25. Berg J.M. Biochemistry, 7th Ed. / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer. – New York : W.H. Freeman and Company, 2012. – 1224 p.
26. Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences / Ed. by D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama, F. Shahidi. – Chichester : Wiley, 2013. – 840 p.
27. Bionanotechnology: Global Prospects / Ed. by D.E. Reisner. – Boca Raton : CRC Press, 2009. – 376 p.
28. Bionanotechnology: Proteins to Nanodevices / Ed. by V. Renugopalakrishnan, R.V. Lewis. – Dordrecht : Springer, 2006. – 296 p.
29. Bionanotechnology II: Global Prospects / Ed. by D.E. Reisner. – Boca Raton : CRC Press, 2011. – 584 p.
30. Bionanotechnology to Save the Environment: Plant and Fishery's Biomass as Alternative to Petrol / Ed. by P. Morganti. – Basel : MDPI, 2019. – 410 p.
31. Bohidar H.B. Design of Nanostructures: Self-Assembly of Nanomaterials / H.B. Bohidar, K. Rawat. – Weinheim : Wiley-VCH, 2017. – 338 p.
32. Bolsover S.R. Cell Biology. A Short Course / S.R. Bolsover, J.S. Hyams, E.A. Shephard, H.A. White, C.G. Wiedemann. – Hoboken : Wiley, 2004. – 531 p.
33. Chemistry of Nanocontainers / Ed. by V. Albrecht, F.E. Hahn. – Berlin : Springer, 2012. – 173 p.
34. Dass C. Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry / C. Dass. – Hoboken : Wiley, 2007. – 610 p.
35. Davis F. Macrocycles: Construction, Chemistry and Nanotechnology Applications / F. Davis, S. Higson. – Chichester : Wiley, 2011. – 596 p.
36. Ehrlich H. Biological materials of marine origin. Invertebrates / H. Ehrlich. – Dordrecht : Springer, 2010. – 569 p.
37. Gazit E. Plenty of room for biology at the bottom: Introduction to bionanotechnology / E. Gazit. – Singapore : World Scientific, 2007. – 220 p.
38. Goodsell D.S. Atomic Evidence. Seeing the Molecular Basis of Life / D.S. Goodsell. – New York : Springer, 2016. – 180 p.
39. Goodsell D.S. Bionanotechnology: Lessons from nature / D.S. Goodsell. – New Jersey : Wiley, 2004. – 337 p.
40. Goodsell D.S. The Machinery of Life / D.S. Goodsell. – New York : Springer, 2009. – 171 p.
41. Handbook of biomineralization. Biological aspects and structure formation / Ed. by E. Bauerlein. – Weinheim : Wiley, 2007. – 440 p.
42. Hoffmann E. Mass Spectrometry: Principles and Applications / E. Hoffmann, V. Stroobant. – Hoboken : Wiley, 2007. – 490 p.
43. In Vivo Self-Assembly Nanotechnology for Biomedical Applications / Ed. by H. Wang, L.-L. Li. – Singapore : Springer, 2018. – 208 p.
44. Jafarizadeh-Malmiri H. Nanobiotechnology in Food: Concepts, Applications and Perspectives / H. Jafarizadeh-Malmiri, Z. Sayyar, N. Anarjan, A. Berenjian. – Cham : Springer, 2019. – 160 p.
45. Königsberger E. Biomineralization – Medical Aspects of Solubility / E. Königsberger, L. Königsberger. – Chichester : Wiley, 2006. – 312 p.
46. Koolman J. Color Atlas of Biochemistry / J. Koolman, K.-H. Roehm. – Stuttgart : Thieme, 2005. – 476 p.
47. Molecular Cell Biology / H. Lodish, A. Berk, L.S. Zipursky et al. – New York : Freeman, 2003. – 572 p.
48. NanoBioMaterials / Ed. by B. Singh, R.J.Y. Ho, J.R. Kanwar. – London : CRC Press, 2018. – 308 p.
49. Nanobiomaterials in Drug Delivery / Ed. by A.M. Grumezescu. – Cambridge : William Andrew, 2016. – 602 p.
50. Nanobiomaterials: Nanostructured Materials for Biomedical Applications / Ed. by R. Narayan. – Duxford : Woodhead Publishing, 2018. – 578 p.
51. Nanobiotechnology Applications in Plant Protection / Ed. by K.A. Abd-El salam, R. Prasad. – Cham : Springer, 2018. – 400 p.
52. Nanobiotechnology for Sensing Applications: From lab to field / Ed. by A.K. Kaushik, C.K. Dixit. – Oakville : Apple Academic Press, 2017. – 377 p.
53. Nanobiotechnology in Energy, Environment and Electronics: Methods and Application / Ed. by C. Nicolini. – Boca Raton : CRC Press, 2015. – 380 p.
54. NanoBiotechnology Protocols / Ed. by A.J. Rosenthal, D.W. Wright. – New York : Humana Press, 2013. – 196 p.

55. Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology / Ed. by P. Boisseau, P. Houdy, M. Lahmani. – Berlin : Springer, 2010. – 1200 p.
56. Nicolini C. Nanobiotechnology and Nanobiosciences / C. Nicolini. – Singapore : Pan Stanford, 2009. – 380 p.
57. Nölting B. Methods in modern biophysics / B. Nölting. – Berlin : Springer-Verlag, 2005. – 257 p.
58. Norde W. Colloids and Interfaces in Life Sciences and Bionanotechnology / W. Norde. – Boca Raton : CRC Press, 2011
59. Papazoglou E.S. Bionanotechnology / E.S. Papazoglou. – Morgan & Claypool, 2007. – 139 p.
60. Self-Assembled Peptide Nanostructures: Advances and Applications in Nanobiotechnology / Ed. by J. Castillo-Leon, L. Sasso, W.E. Svendsen. – Boca Raton : CRC Press, 2012. – 316 p.
61. Selzer P.M. Applied Bioinformatics: An Introduction / P.M. Selzer, R.J. Marhöfer, A. Rohwer. – Berlin : Springer, 2008. – 297 p.
62. The Nanobiotechnology Handbook / Ed. by Y. Xie. – Boca Raton : CRC Press, 2013. – 648 p.
63. The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB) archive. – Интернет-ресурс. – <http://www.wwpdb.org/>
64. Young D.C. Computational Drug Design: A Guide for Computational and Medicinal Chemists / D.C. Young. – Hoboken : Wiley, 2009. – 321 p.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ

65. Antoniou D. Protein Dynamics and Enzymatic Chemical Barrier Passage / D. Antoniou, S.D. Schwartz // The Journal of Physical Chemistry B. – 2011. – V. 115, №51. – P. 15147–15158.
66. 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, D.R. Weinberger, S.W. Moore, E.T. Bullmore // PLoS Computational Biology. – 2010. – V. 6. – P. 1–14.
67. Biomineralization / Ed. by P.M. Dove, J.J. de Yoreo, S. Weiner // Reviews in Mineralogy and Geochemistry. – 2003. – V. 54. – P. 1–381.

68. Boggon T.J. Structure and regulation of Src family kinases / T.J. Boggon, M.J. Eck // Oncogene. – 2004. – V. 23. – P. 7918–7927.
69. 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.
70. Catalan J. H-bonded N-heterocyclic Base-Pair Phototautomerizational Potential Barrier and Mechanism: The 7-azaindole dimer / J. Catalan, P. Pérez, J.C. del Valle, J.L.G. de Paz, M. Kasha // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101, № 2. – P. 419–422.
71. Dahiyat B.I. De novo protein design: Fully automated sequence selection / B.I. Dahiyat, S.L. Mayo // Science. – 1997. – V. 278. – P. 82–87.
72. DeGrado W.F. De Novo Design and Structural Characterization of Proteins and Metalloproteins / W.F. DeGrado, C.M. Summa, V. Pavone, F. Nastro, A. Lombardi // Annual Review of Biochemistry. – 1999. – V. 68. – P. 779–819.
73. Diez S. Stretching and Transporting DNA Molecules Using Motor Proteins / S. Diez, C. Reuther, C. Dinu, R. Seidel, M. Mertig, W. Pompe, J. Howard // Nano Letters. – 2003. – V. 3. – P. 1251–1254.
74. Egholm M. Peptide Nucleic Acids (PNA). Oligonucleotide Analogues with an Achiral Peptide Backbone / M. Egholm, O. Buchardt, P.E. Nielsen, R.H. Berg // Journal of the American Chemical Society. – 1992. – V. 114. – P. 1895–1897.
75. Gutte B. The synthesis of ribonuclease A / B. Gutte, R.B. Merrifield // The Journal of Biological Chemistry. – 1971. – V. 246. – P. 1922–1941.
76. Hecht M.H. De Novo Design, Expression and Characterization of Felix: A Four-Helix Bundle Protein of Native-Like Sequence / M.H. Hecht, J.S. Richardson, D.C. Richardson, R.C. Ogden // Science. – 1990. – V. 249, № 4971. – P. 884–891.
77. Hess H. Biomolecular Motors / H. Hess, C.D. Bachand // Materials Today. – 2005. – V. 8. – P. 22–29.
78. Huang S.-C. Carbon Nanotube Transistor Controlled by a Biological Ion Pump Gate / S.-C. Huang, A.B. Artyukhin, N. Misra, J.A. Martinez,

- P.A. Stroeve, C.P. Grigoropoulos, J.-W.W. Ju, A. Noy // Nano Letters. – 2010. – V. 10, № 5. – P. 1812–1816.
79. 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, № 5578. – P. 72–75.
 80. Looking at Proteins: Representations, Folding, Packing, and Design. Biophysical Society National Lecture, 1992 / J.S. Richardson, D.C. Richardson, N.B. Tweedy, K.M. Gernert, T.P. Quinn, M.H. Hecht, B.W. Erickson, Y. Yan, R.D. McClain, M.E. Donlan, M.C. Surles // Biophysical Journal. – 1992. – V. 63, № 5. – P. 1186–1209
 81. Monod J. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model / J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux // The Journal of Molecular Biology. – 1965. – V. 12, № 1. – P. 88–118.
 82. Nagel Z.D. A 21st century revisionist's view at a turning point in enzymology / Z.D. Nagel, J.P. Klinman // Nature Chemical Biology, 2009. – V. 5, № 8. – P. 543–550.
 83. Nakatani N. Red Light in Chemiluminescence and Yellow-Green Light in Bioluminescence: Color-Tuning Mechanism of Firefly, *Photinus pyralis*, Studied by the Symmetry-Adapted Cluster-Configuration Interaction Method / N. Nakatani, J. Hasegawa, H. Nakatsuji // Journal of the American Chemical Society. – 2007. – V. 129, № 28. – P. 8756–8765.
 84. Nanda V. Designing artificial enzymes by intuition and computation / V. Nanda, R.L. Koder // Nature Chemistry. – 2010. – V. 2. – P. 15–24.
 85. Nielsen P.E. An Introduction to Peptide Nucleic Acid / P.E. Nielsen, M. Egholm // Current Issues in Molecular Biology. – 1999. – V. 1. – P. 89–104.
 86. Noji N. Direct observation of the rotation of F1-ATPase / H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida et al. // Nature. – 1997. – V. 386. – P. 299–302.
 87. 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.

88. Patolsky F. Actin-based Metallic Nanowires as Bio-Nanotransporters / F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner // Nature Materials. – 2004. – V. 3 – P. 692–695.
89. Patolsky F. Nanowire Nanosensors / F. Patolsky, C.M. Lieber // Materials Today. – 2005. – V. 8. – P. 20–28.
90. Petka W.A. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins / W.A. Petka, J.L. Harden, K.P. McGrath, D. Wirtz, D.A. Tirrell // Science. – 1998. – V. 281. – P. 389–392.
91. Reches M. Casting Metal Nanowires within Discrete Self-Assembled Peptide Nanotubes / M. Reches, E. Gazit // Science. – 2003. – V. 300. – P. 625–627.
92. Reches M. Molecular Self-Assembly of Peptide Nanostructures: Mechanism of Association and Potential Uses / M. Reches, E. Gazit // Current Nanoscience. – 2006. – V. 2. – P. 105–111.
93. Rutgers and the Scripps Research Institute Protein Data Bank Molecule of the Month. – Интернет-ресурс. – <https://pdb101.rcsb.org/motm/motm-about>
94. Safinya C.R. Cationic Liposome-DNA Complexes: From Liquid Crystal Science to Gene Delivery Applications / C.R. Safinya, K. Ewert, A. Ahmad, H.M. Evans, U. Raviv, D.J. Needleman, A.J. Lin, N.L. Slack, C. George, C.E. Samuel // Philosophical Transactions of the Royal Society A. – 2006. – V. 364, № 1847. – P. 2573–2596.
95. 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.
96. Schwartz S.D. Enzymatic transition states and dynamic motion in barrier crossing / S.D. Schwartz, V.L. Schramm // Nature Chemical Biology, 2009. – V. 5, № 8. – P. 551–558.
97. Shin J.-S. A Synthetic DNA Walker for Molecular Transport / J.-S. Shin, N.A. Pierce // Journal of the American Chemical Society. – 2004. – V. 126, № 35. – P. 10834–10835.

98. Surwade S.P. Molecular Lithography through DNA-Mediated Etching and Masking of SiO₂ / S.P. Surwade, S. Zhao, H. Liu // Journal of the American Chemical Society. – 2011. – V. 133. – P. 11868–11871.
99. Walker S. The Potential of Cucurbit[n]urils in Drug Delivery / S. Walker, R. Oun, F.J. McInnes, N.J. Wheate // Israel Journal of Chemistry. – 2011 – V. 51. – P. 616–624.
100. Xie J. Adding amino acids to the genetic repertoire / J. Xie, P.G. Schultz // Current Opinion in Chemical Biology. – 2005. – V. 9, № 6. – P. 548–554.
101. 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.
102. Yurke B. A DNA-Fuelled Molecular Machine Made of DNA / B. Yurke, A.J. Turberfield, A.P. Mills, F.C. Simmel, J.L. Numan // Nature. – 2000. – V. 406. – P. 605–608.
103. Огурцов А.Н. Структурные принципы бионанотехнологии / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2008. – 140 с.
104. Огурцов А.Н. Функциональные принципы бионанотехнологии / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 146 с.
105. Огурцов А.Н. Нанобиотехнология. Основы молекулярной биотехнологии / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2010. – 384 с.
106. Огурцов А.Н. Самоорганизация биологических систем / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2014. – 158 с.
107. Огурцов А.Н. Физико-химические основы биотехнологии. Практикум / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк, Л.А. Антропова. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2015. – 288 с.
108. Огурцов А.Н. Механика и молекулярная физика и биофизика / А.Н. Огурцов. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2015. – 272 с.
109. Огурцов А.Н. Биоэлектромагнетизм / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2015. – 256 с.
110. Огурцов А.Н. Колебания и волны, оптика и фотобиофизика / А.Н. Огурцов, О.Н. Близнюк. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2016. – 256 с.
111. Бионанотехнология – Prof. A.N. Ogurtsov. – Интернет-ресурс. – <https://sites.google.com/site/anogurtsov/lectures/bnt/>.

СОДЕРЖАНИЕ

Вступление	3
Раздел 3. Функциональные принципы бионанотехнологии	5
Глава 11. Информационно-управляемое наноасемблирование	5
11.1. Информационно-управляемое асемблирование бионаномашин	5
11.2. Информационная функция нуклеиновых кислот в асемблировании бионаномашин	7
11.3. Рибосома как информационно-управляемый наноасемблер	13
11.4. Компактность хранения информации в ДНК	16
Глава 12. Бионаноэнергетика	18
12.1. Энергопитание бионаномашин	18
12.2. Функциональная роль топливных молекул в биосистемах	20
12.3. Поглощение света специализированными малыми молекулами в биосистемах	24
12.4. Бионаноэлектрические цепи переноса электронов	27
12.5. Электропроводность и перенос заряда в ДНК	31
12.6. Электрохимический градиент на биомембранах как источник энергопитания бионаносистем	33
Глава 13. Бионанотрансформации и регулирование	36
13.1. Особенности химических нанотрансформаций	36
13.2. Принципы химических нанотрансформаций в биосистемах	42
13.3. Моделирование ферментативных нанотрансформаций	47
13.4. Нанобиофизические принципы регуляции бионаносистем	64

Глава 14. Биоматериалы	72	Глава 18. Бионаносистемы	190
14.1. Спиральное асемблирование биоматериалов	73	18.1. Наномедицина	190
14.2. Функциональные особенности формирования фибриллярных микроструктур	81	18.2. Иммунотоксины	193
14.3. Биоминерализация тканей	87	18.3. Липосомы	195
14.4. Функциональные особенности формирования эластичных биоматериалов	95	18.4. Полевые нанобиосенсоры	199
14.5. Функциональные особенности формирования адгезивных биоматериалов	99	18.5. Молекулярные моторы	204
Глава 15. Бионанотранспорт	102	Глава 19. Методы молекулярной биологии в бионанотехнологии	211
15.1. Функциональные особенности строения линейных АТФ-моторов	102	19.1. Технология рекомбинантных ДНК	211
15.2. Нанобиофизические принципы строения вращательных моторов	110	19.2. Конструирование ДНК	213
15.3. Применение броуновского храповика для использования энергии теплового движения	118	19.3. Методы синтеза белков	221
15.4. Нанобиофизические принципы трансмембранного транспорта	121	19.4. Точечный мутагенез	224
15.5. Функциональные особенности везикулярного транспорта	132	19.5. Конструирование химерных белков	226
Глава 16. Биомолекулярная сенсорика и саморепликация	145	Глава 20. Методы структурного анализа	228
16.1. Нанобиофизические принципы биомолекулярной сенсорики	145	20.1. Рентгеновская кристаллография	229
16.2. Саморепликация в бионанотехнологии	152	20.2. Электронная микроскопия	238
16.3. Машинная фаза вещества	156	20.3. Масс-спектрометрия	243
Раздел 4. Бионаносистемы и методы их исследования	163	Глава 21. Моделирование бионаноструктур	257
Глава 17. Нанотехнологии	163	21.1. Моделирование макромолекул	257
17.1. Белковая инженерия	163	21.2. Предсказание структуры и функций макромолекул	259
17.2. Нестандартные аминокислоты	170	21.3. Предсказание белкового фолдинга	260
17.3. Пептидные нуклеиновые кислоты	173	21.4. Моделирование новых функций молекул	263
17.4. ДНК нанотехнологии для электроники	175	21.5. Моделирование фармакофоров и докинга	268
17.5. Фибриллярная металлизация	179	Список литературы	276
17.6. Молекулярные наноконтейнеры	183		

Навчальне видання

ОГУРЦОВ Олександр Миколайович
БЛИЗНЮК Ольга Миколаївна
МАСАЛІТІНА Наталія Юрївна

БІОНАНОТЕХНОЛОГІЯ ТА НАНОБІОФІЗИКА

Навчальний посібник
з курсів «Біонанотехнологія та нанобіофізика»,
«Біонанотехнологія, нанобіофізика та нанофармація»,
«Нанобіотехнологія», «Сучасні проблеми нанофармації»
та «ДНК-нанотехнології»
для студентів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія»,
в тому числі для іноземних студентів

У двох частинах

Частина 2

Функціонування біонаносистем

Російською мовою

Роботу до видання рекомендувала *М.Г. Зінченко*
В авторській редакції

План 2019 р., поз. 80.

Підп. до друку 27.06.2019 р. Формат 60×84 1/16. Папір офсетний.
Цифровий друк. Гарнітура Таймс. Ум. друк. арк. 18,0. Наклад 300 пр.
Зам. № 194466. Ціна договірна

Видавництво «Стильна типографія»
61002, м. Харків, вул. Чернишевська, 28А
Тел.: (057) 754-49-42
e-mail: zebraprint.zakaz@gmail.com
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи:
серія ДК №5493 від 22.08.2017 р.

