

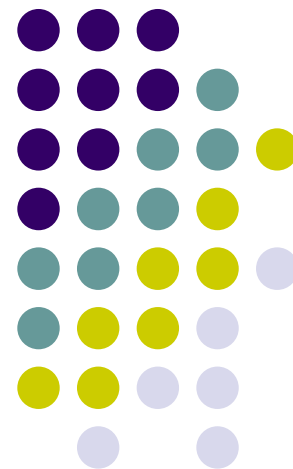


Структурный и функциональный аспекты бионанотехнологии

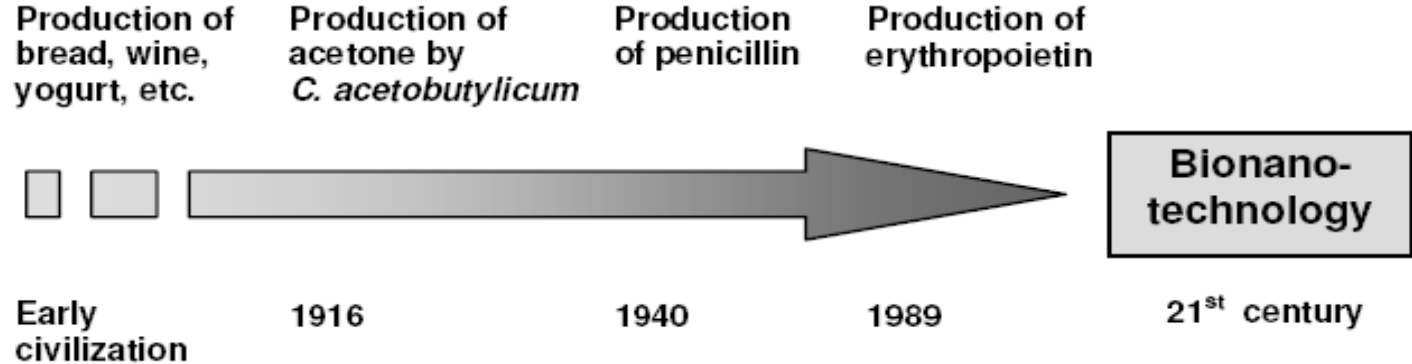
Курочкин Илья Николаевич

д.х.н., профессор
Химический Факультет МГУ

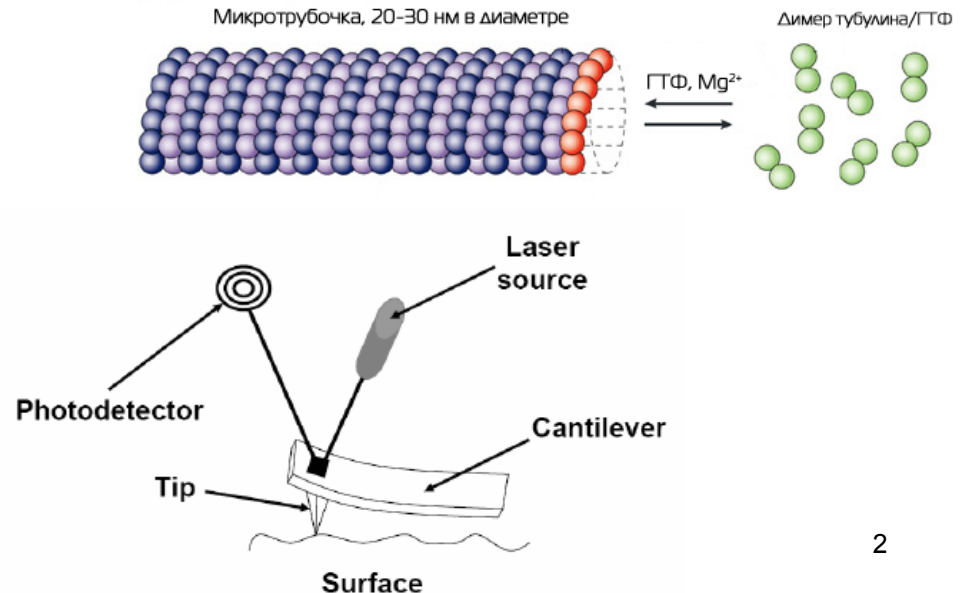
ikur@genebee.msu.su



Сближение научных дисциплин



- Конвергенция биотехнологии и нанотехнологии – новое явление.
- Результат – новые области исследований: бионанотехнология и наобиотехнология





Бионано- и нанобиотехнологии

Бионанотехнологии «Био» для нанотехнологии (2004 год.)

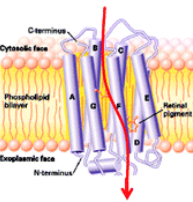
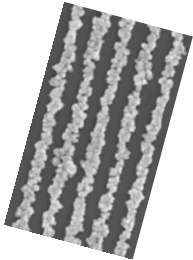
Самосборка наноструктур
из биомолекул

Биологические
наноструктуры в качестве
матриц для синтеза
наноматериалов

Биомиметика

Биомолекулярная
электроника

...



Нанобиотехнологии «Нано» для биологии первое упоминание – *MedLine* в 2000 году.

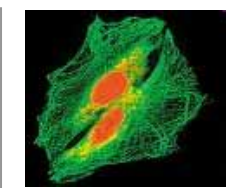
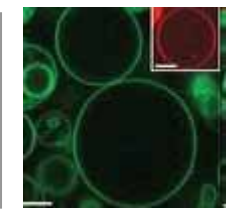
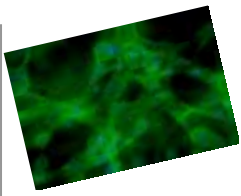
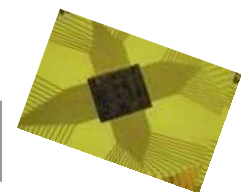
Lab-on-a-chip

Тканевая инженерия на
наноструктурированных
матрицах

Наноконтейнеры для
доставки лекарственных
средств

Неорганические
наночастицы для *in vivo*
диагностики и лечения

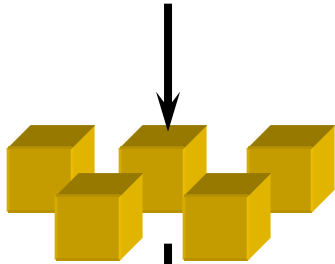
...



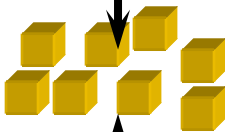
Самосборка: самоассоциация и образование гетерокомпонентных агрегатов



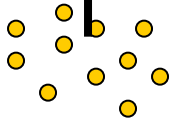
объемный материал



нано-объекты

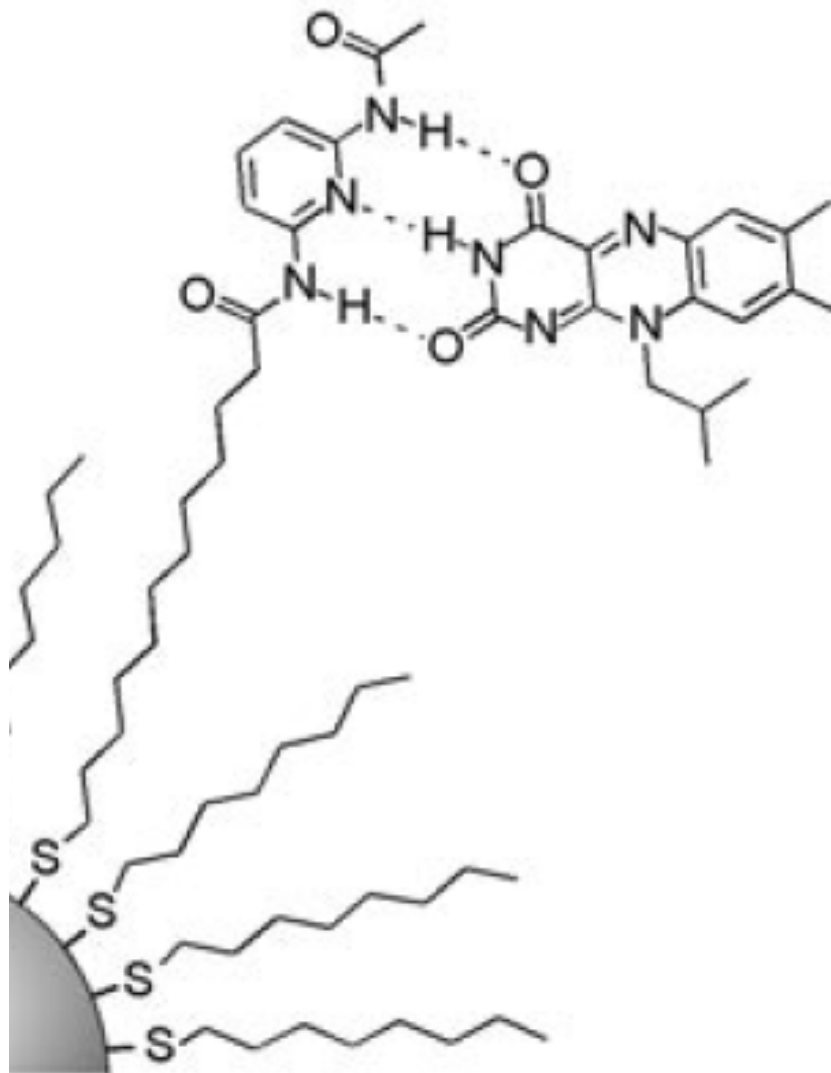


атомы



- Образование структур такого рода должно быть основано на комбинации узнающих модулей, что вытекает из геометрической комплементарности и химического узнавания.
- Самосборка – центральный процесс во всех биологических системах.

Трехточечное образование водородных связей (золото, модифицированное диамидопиридином и флавином)

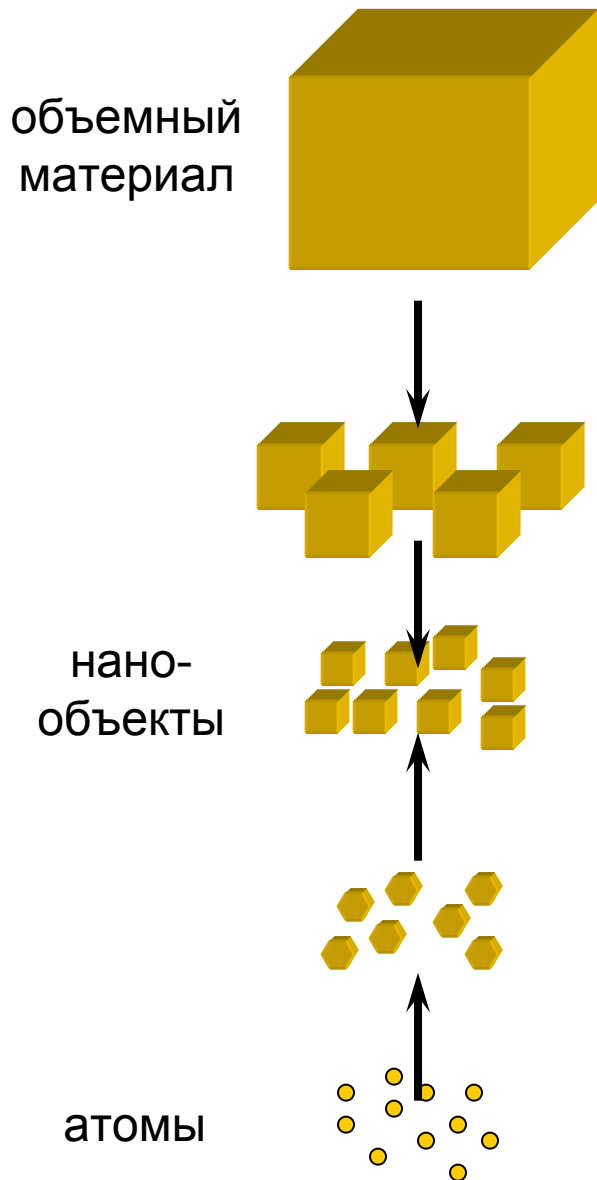
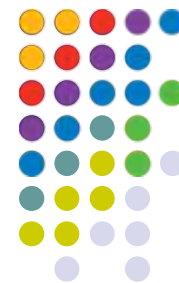


Самосборка и самоорганизация



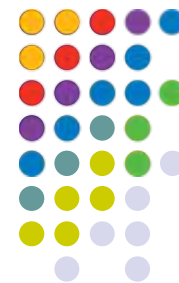
- Простые «строительные блоки» собираются вместе, образуя супермолекулы или ассоциаты с различной морфологией, специфическими функциями, уникальными физико-химическими свойствами.
- В природе существенную роль играет необратимость – основа большинства процессов самоорганизации. Диссипативные структуры.

Самосборка



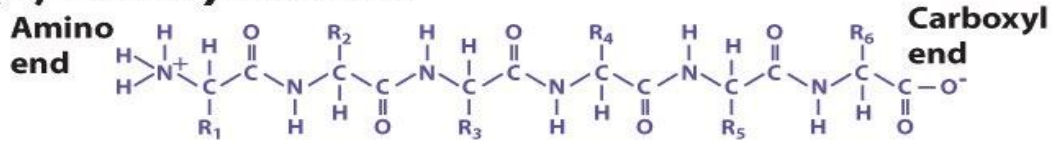
- В большинстве случаев сборка сложных биологических систем идёт **без использования исходных матриц.**
- Самосборка – идёт за счёт **многоочечных нековалентных взаимодействий «строительных блоков»:** водородные связи, электростатические и гидрофобные взаимодействия.

Самосборка

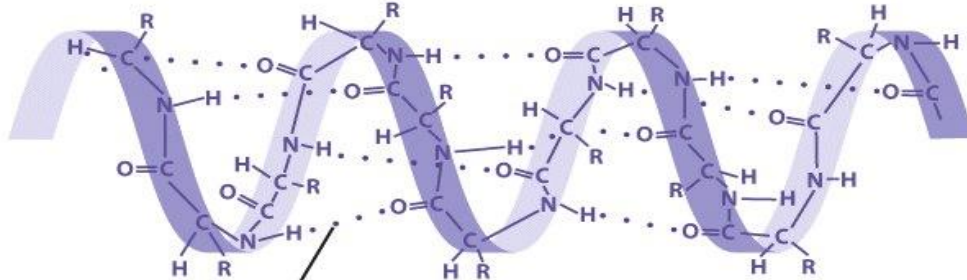


Тип связи	Длина связи, нм	Энергия связи в воде, ккал/моль
Ковалентная	0,15	90
Ионная	0,25	1
Водородная	0,30	1
Вандерваальсова	0,20	0,1

(a) Primary structure

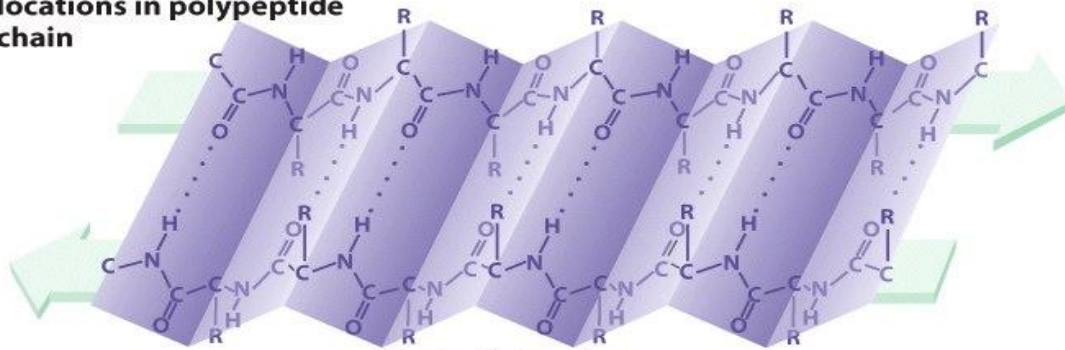


(b) Secondary structure



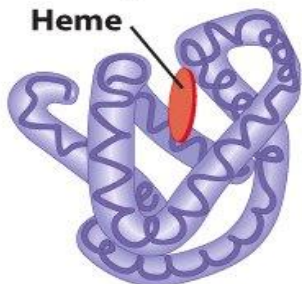
Hydrogen bonds between amino acids at different locations in polypeptide chain

α helix

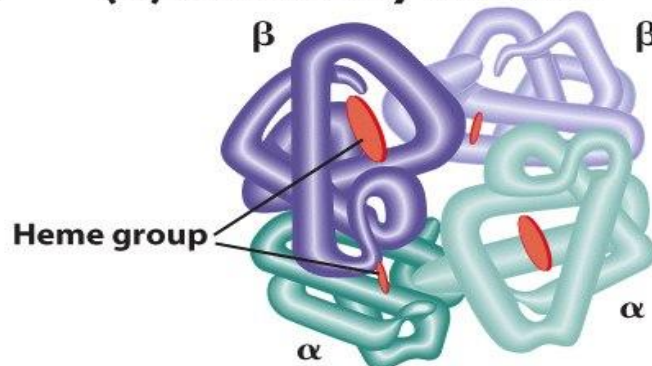


Pleated sheet

(c) Tertiary structure

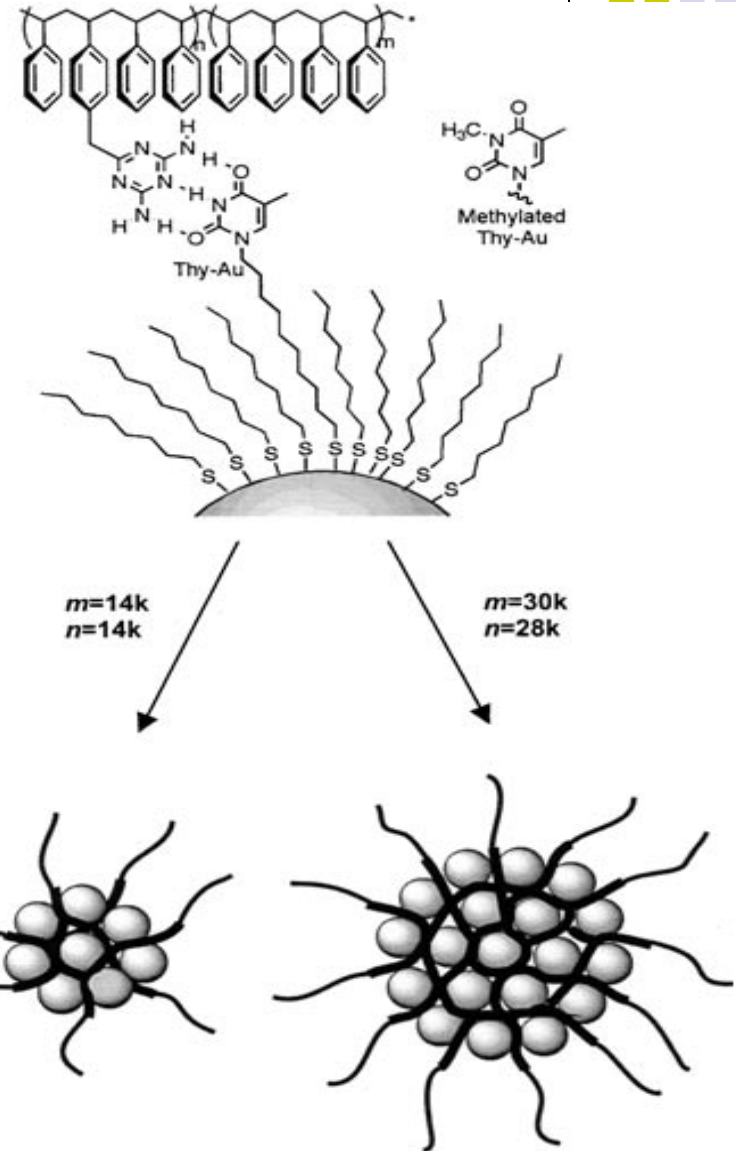
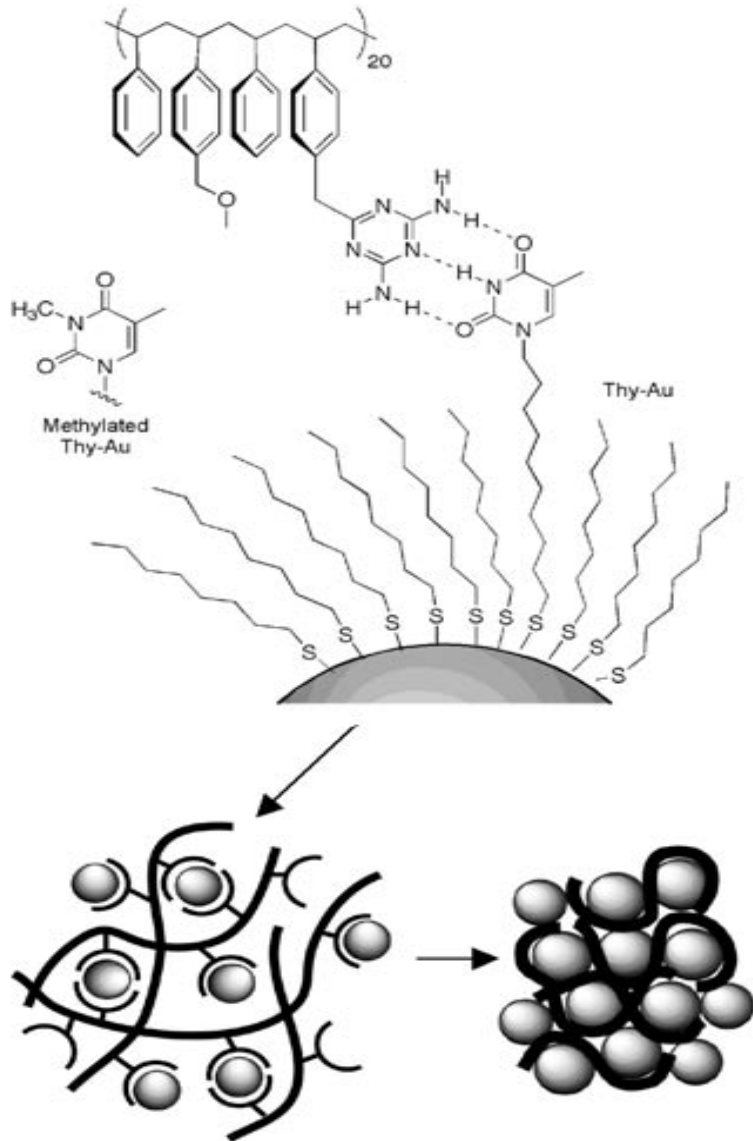


(d) Quaternary structure



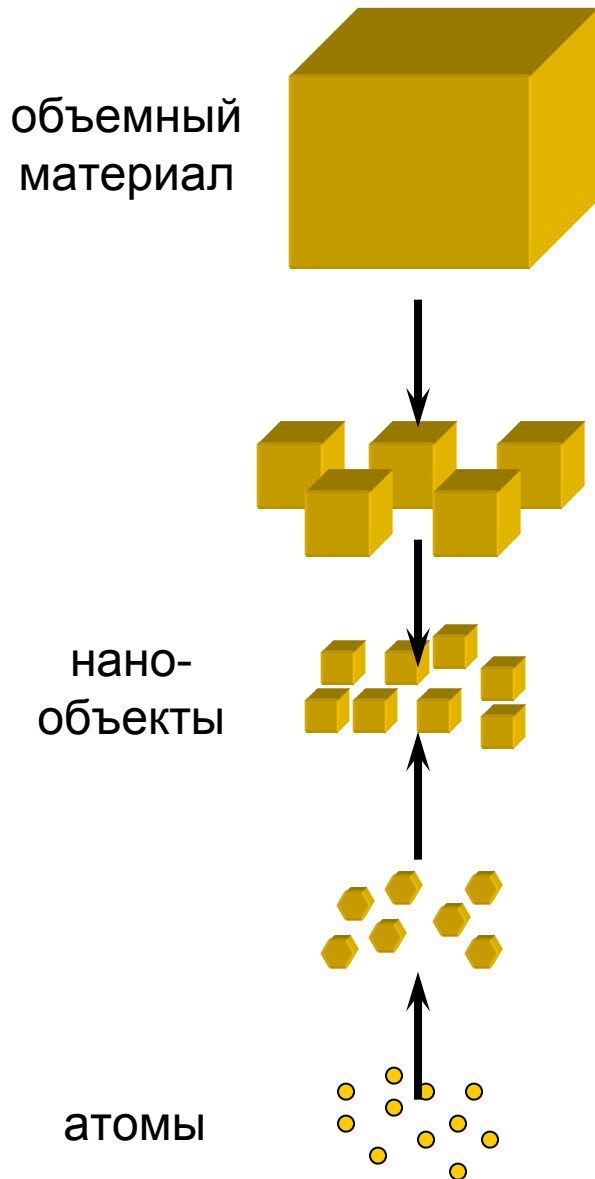
Самосборка

Конъюгаты полимер-Au: тимин-триазиновые трехточечные водородные связи, длина полимера – диаметр частицы



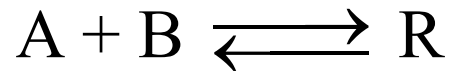


Самосборка



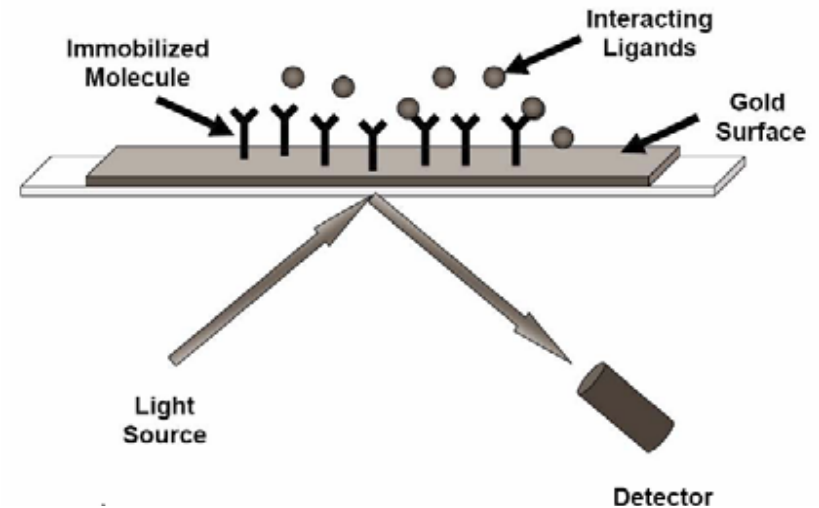
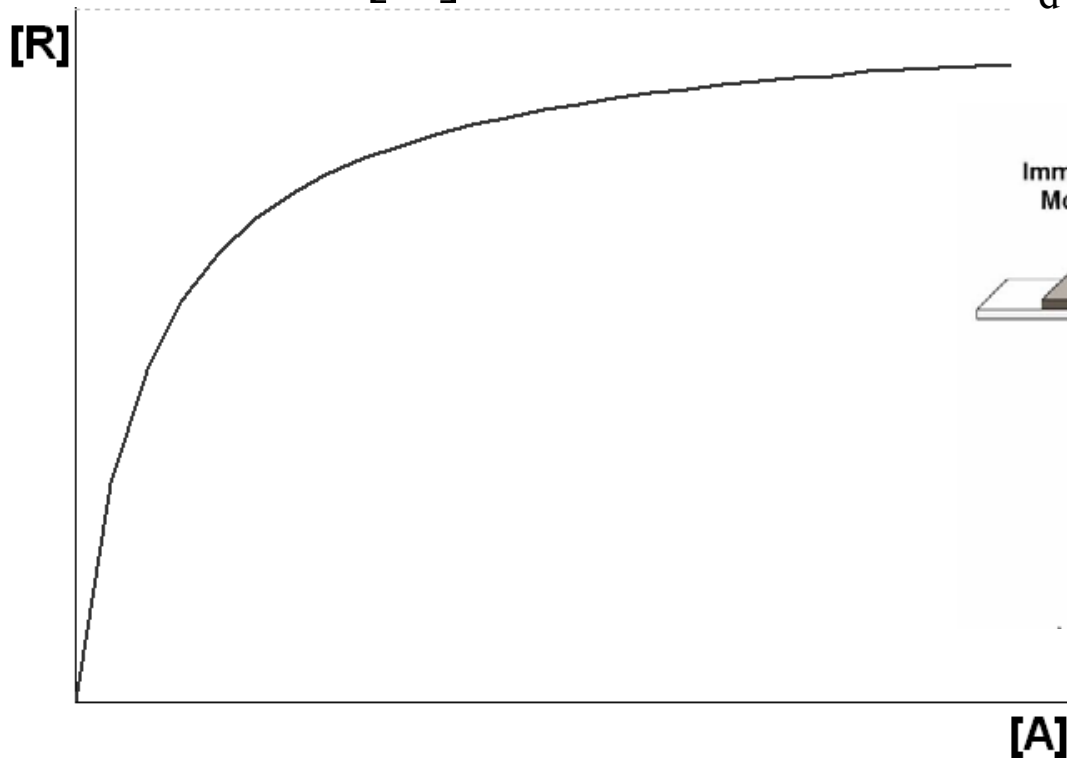
- «Молекулярное узнавание» описывает способность молекул взаимодействовать друг с другом с высокой аффинностью и специфичностью.
- Это один из краеугольных камней описания процессов самосборки.

Аффинность молекулярного узнавания



$$K_d = \frac{[A][B]}{[R]}$$

$$[R] = \frac{[B]_0 \times [A]}{K_d + [A]} \quad \text{при } [B] \ll [A]$$

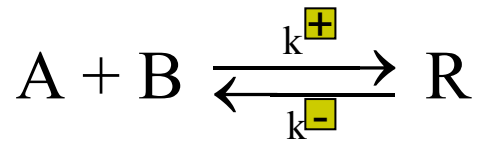


Аффинность молекулярного узнавания

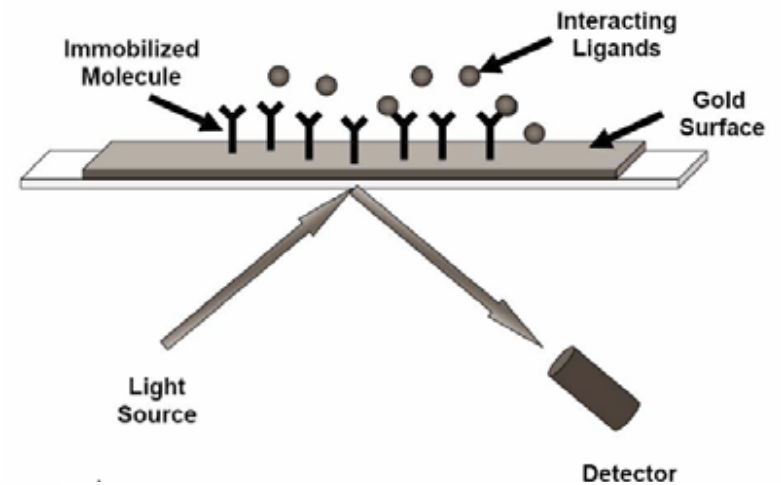
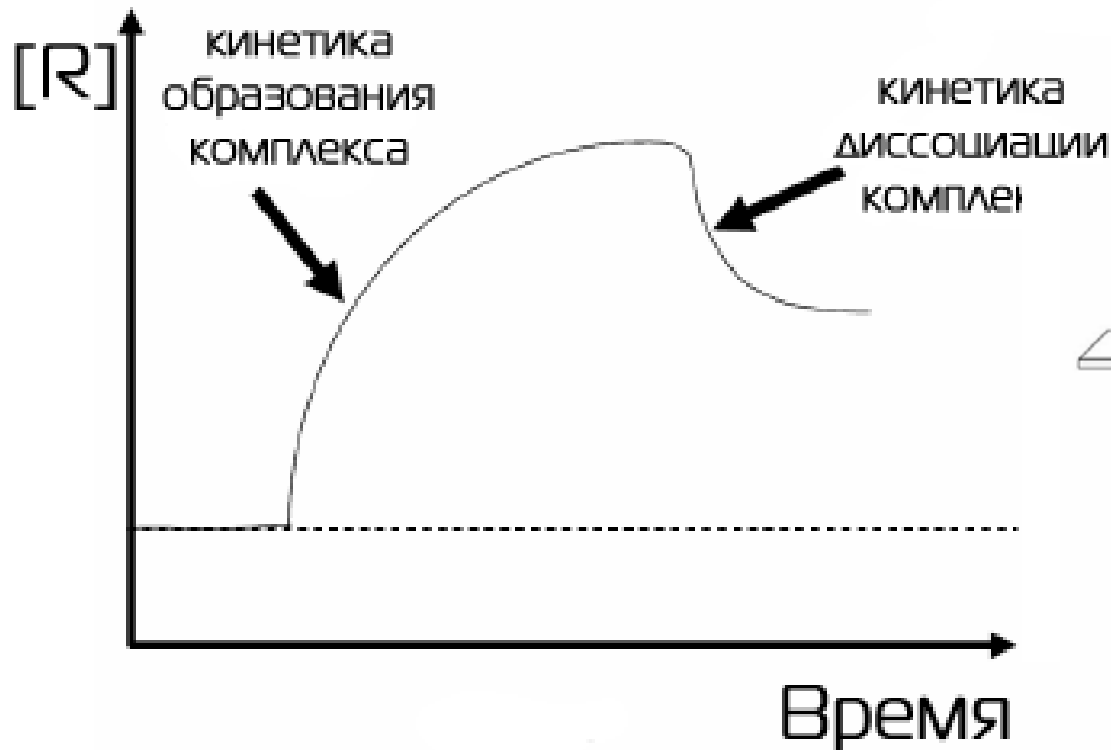


- Специфическим связыванием считают тогда, когда значение K_d – ниже 1 мкМ.
- Антиген-антитело - K_d – 10^{-9} – 10^{-12} М.
- Лиганд-рецептор - K_d – 10^{-6} – 10^{-10} М
- Фермент-ингибитор - K_d – 10^{-6} – 10^{-15} М

Кинетика процесса молекулярного узнавания



$$K_d = \frac{k^-}{k^+}$$

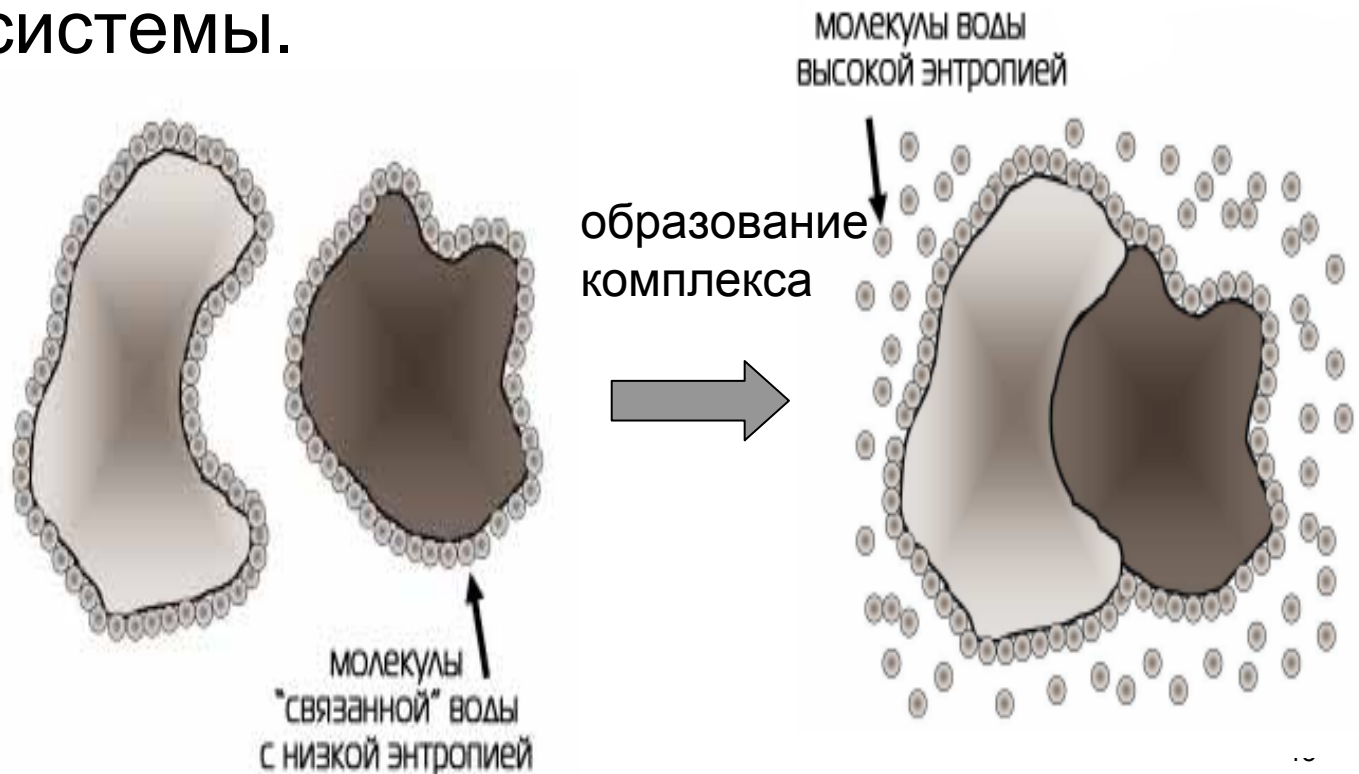


Термодинамика молекулярного узнавания



- Чаще всего движущей силой является увеличение энтропии системы.

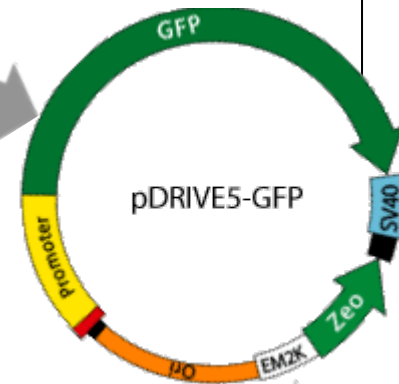
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$



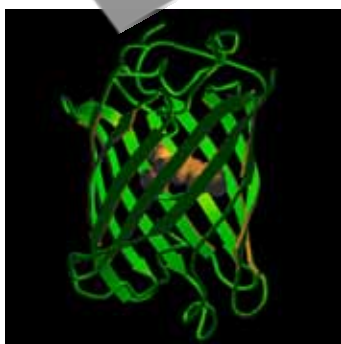
Белки – размножаемые «кирпичики»



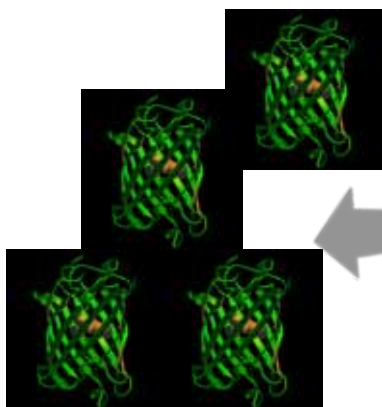
Выделение гена белка



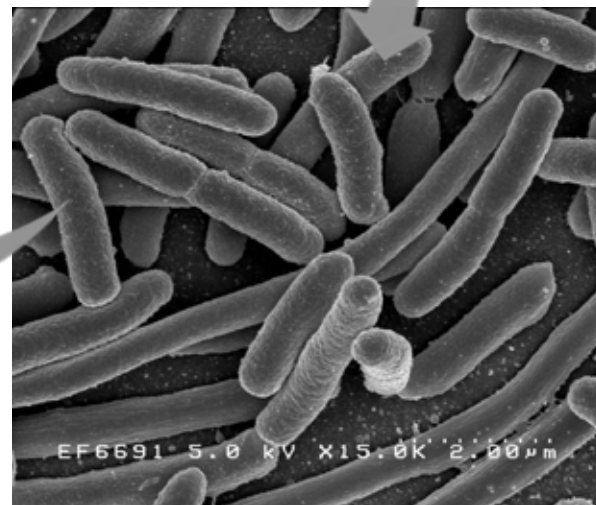
Трансформация бактерии

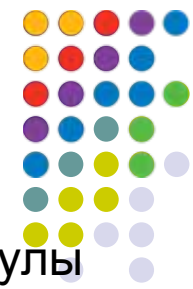


Белок с интересующей нас функцией



Наработка белка

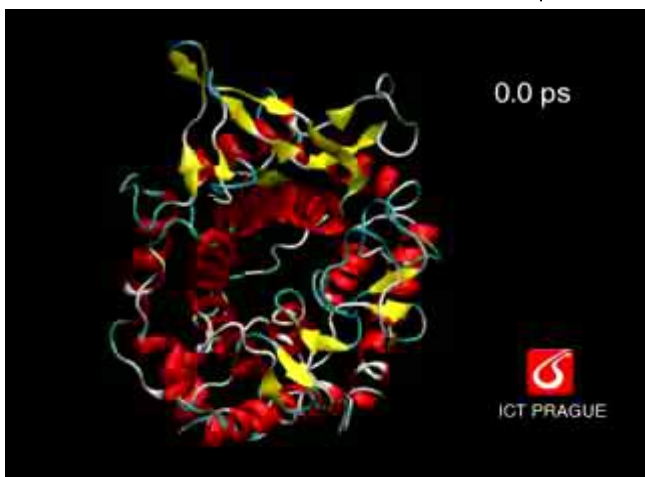
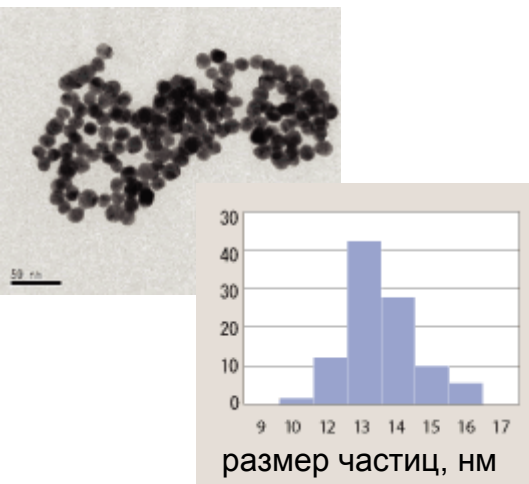




Белковые молекулы: идентичные и различающиеся «кирпичики» одновременно

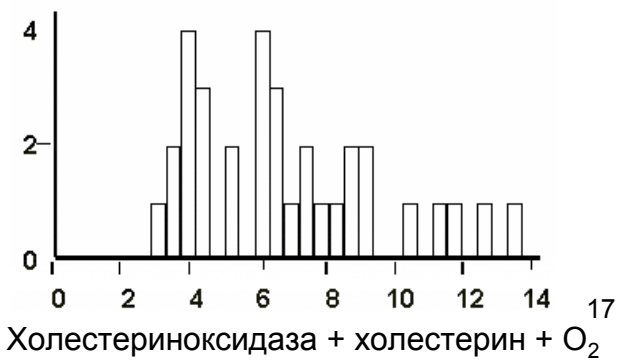
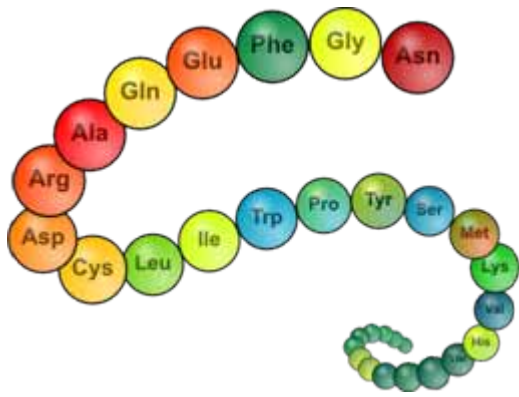
Золь золота: полидисперсность

Динамика белковой глобулы



Препарат белка: все молекулы имеют одинаковую первичную последовательность

Активность единичных молекул фермента варьируется во времени и от молекулы к молекуле:



Белки – настраиваемые «кирпичики».

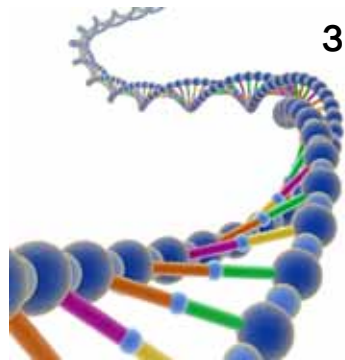
Мутантные белки



- Эволюция оптимизирует свойства белков под нужды организма
- Приемы генной инженерии для получения белков с заданными свойствами



белок

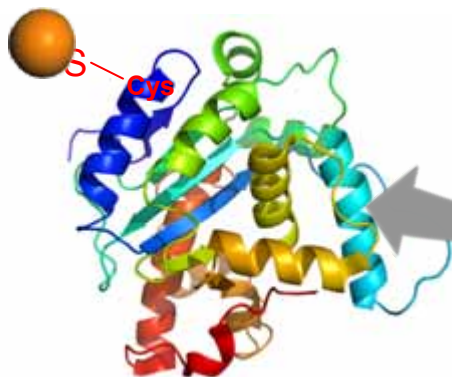
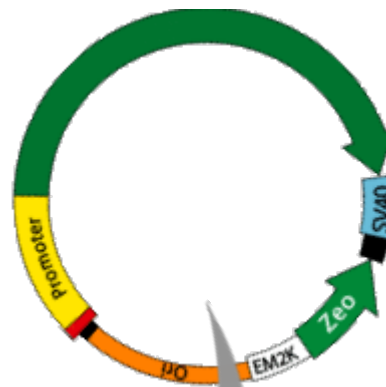


ген белка (ДНК)

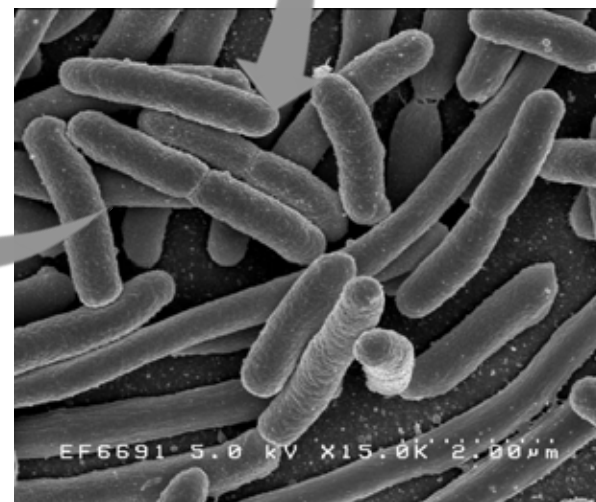
замена 1 триплета

- AAC

+TGT



мутантный белок



Химерные белки



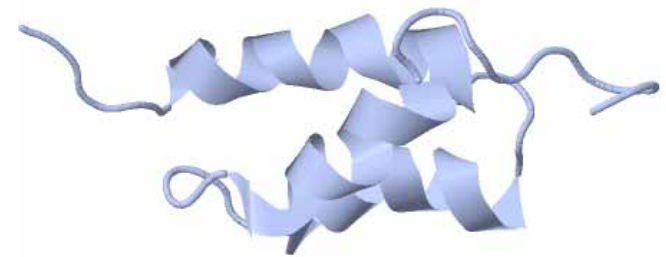
Иммуноглобулин-связывающие белки



Белок G из
Streptococcus sp.



Белок L из
Peptostreptococcus magnus



Белок A из
Staphylococcus aureus



+



+



=



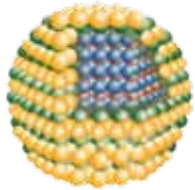
Химерный белок A/G/L

Конъюгация белков с неорганическими нанобъектами



Au

Золотые наночастицы: SH-группа аминокислоты цистеина



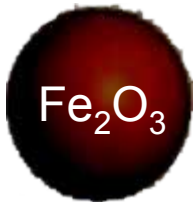
Наночастицы CdSe, CdTe, CdS и ZnS (квантовые точки):

- Полигистидиновая последовательность, например, (His)₆ или (His)₈
- «bZip domain» - лейциновая «молния» с последовательностью основных аминокислот



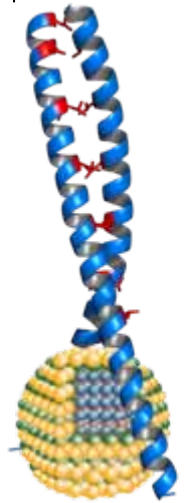
SiO₂

- Наночастицы SiO₂
додекапептид QBP3
Leu-Pro-Asp-Trp-Trp-Pro-Pro-Pro-Gln-Leu-Tyr-His



Fe₂O₃

- Наночастицы Fe₂O₃
пептид Arg-Arg-Thr-Lys-His-His-Val-Asn

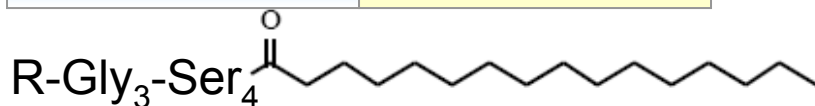


Пептидные наноструктуры

Молекулярное «Lego»

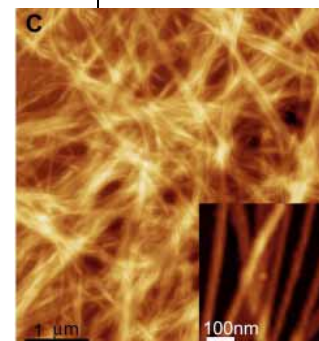
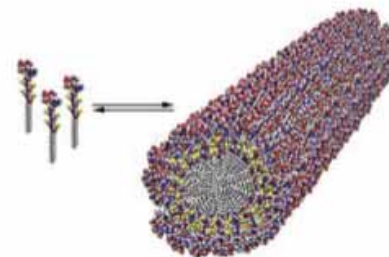
«ПАВ»

гидрофильно-гидрофобный



Asp-Val₆, Lys-Ala₆

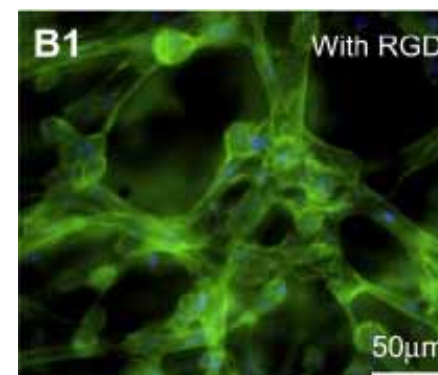
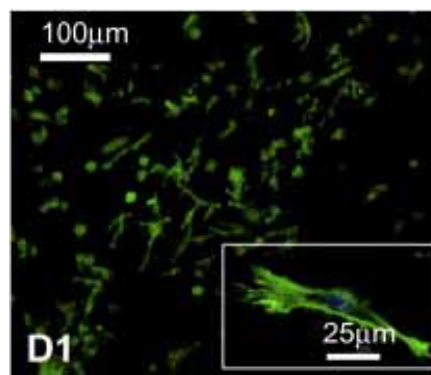
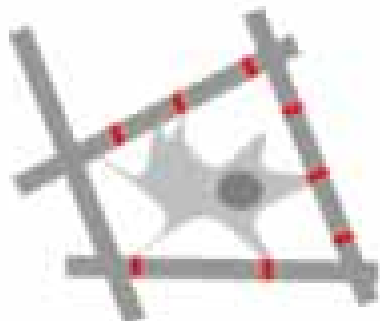
Нанофибриллы



Применение:

Биоразлагаемый каркас для выращивания мышечной или костной ткани

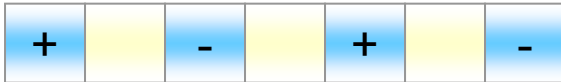
R = пептид Arg-Gly-Asp (+ Ser с фосфатной группой)



Пептидные наноструктуры

Молекулярное «Lego»

Ионные самокомплементарные пептиды

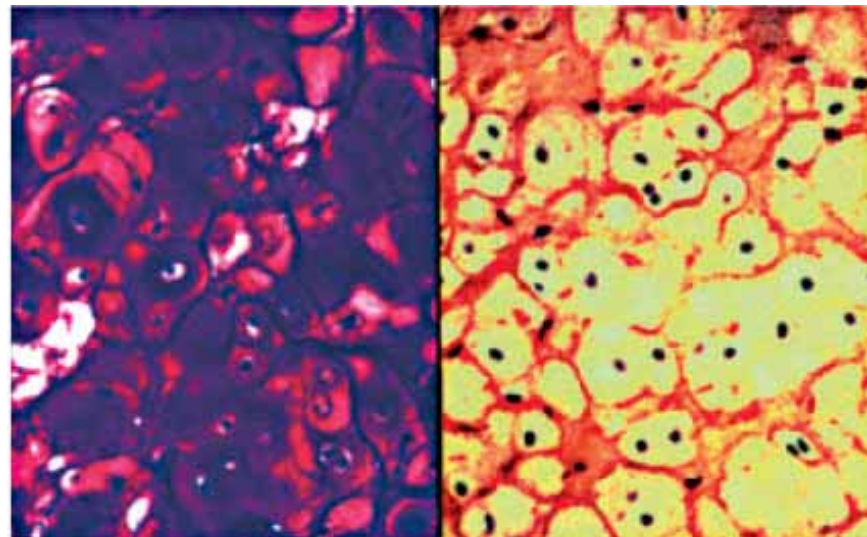
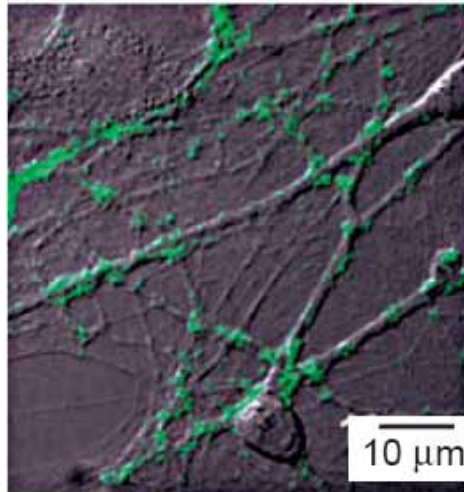
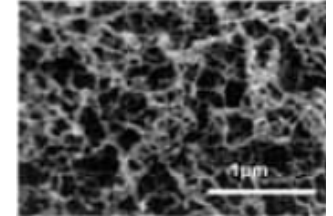
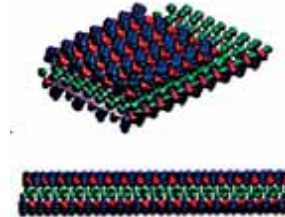


$(\text{Arg-Ala-Asp-Ala})_4$,
 $(\text{Lys-Leu-Asp-Leu})_3$

Применение:

Биоразлагаемый каркас для выращивания нейронов или хрящевой ткани

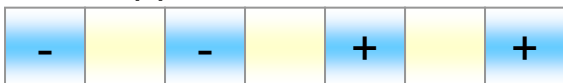
бислои, каркасные гидрогели



Пептидные наноструктуры

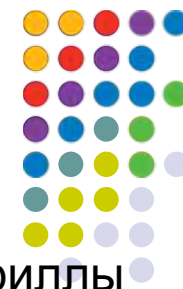
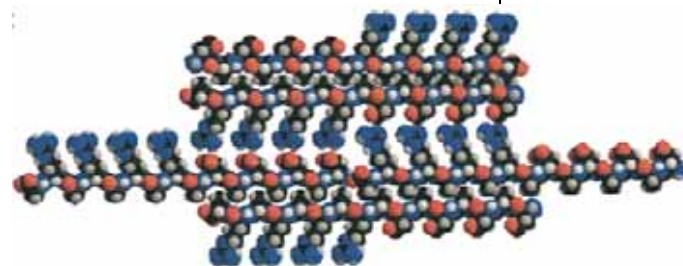
Молекулярное «Lego»

Ионные самокомплементарные пептиды



(Asp-Ala)₄-(Arg-Ala)₄,
(Ala-Glu)₄-(Ala-Lys)₂

β-амилоидные фибриллы

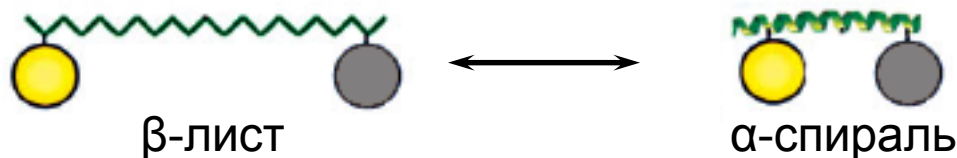


При повышении температуры или pH происходит обратимый переход в α-спиральную конформацию:



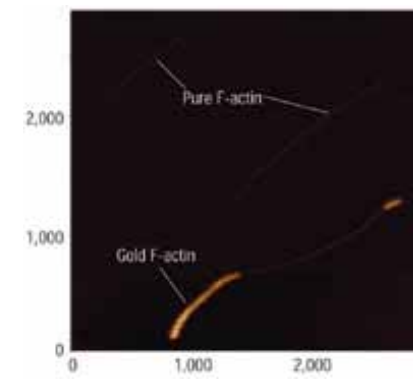
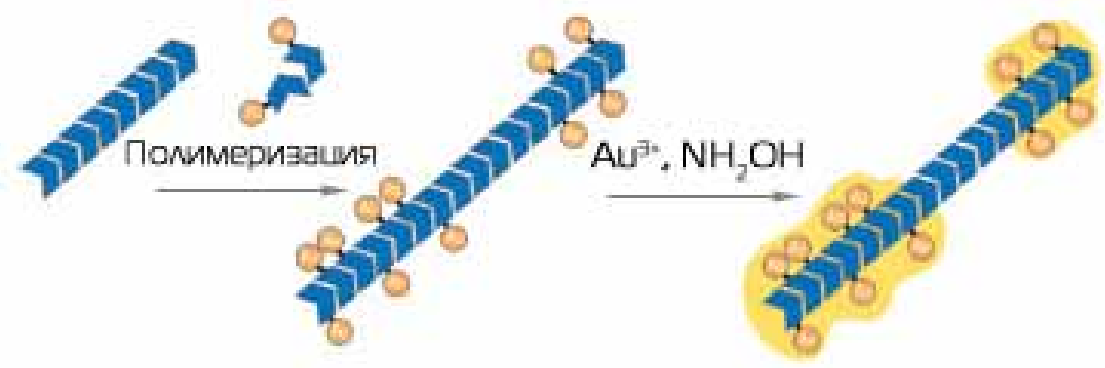
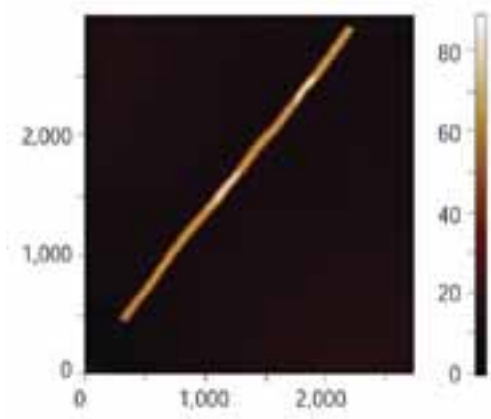
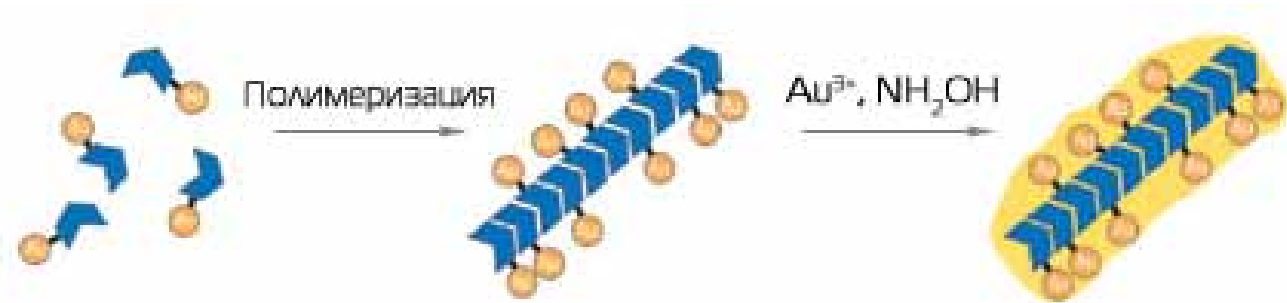
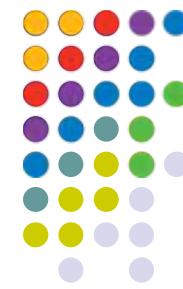
Применение:

Модификация пептида одной из «молекулярных линеек» (FRET, plasmon coupling, NSFET) позволяет создать pH- или температурный сенсор:



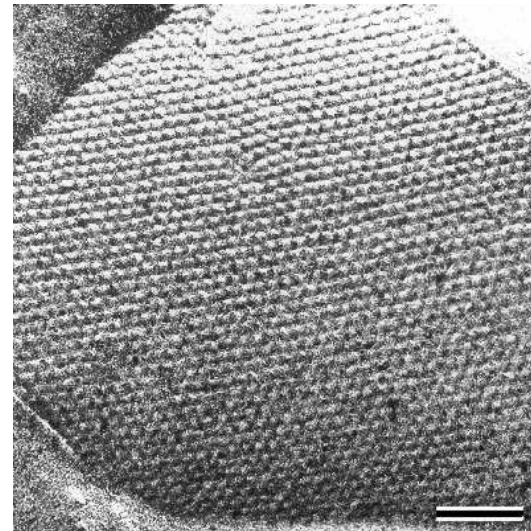
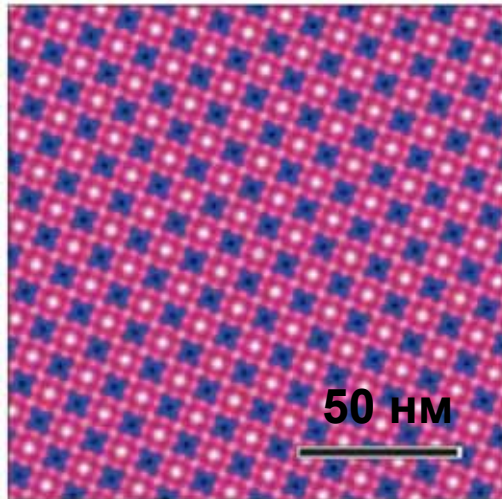
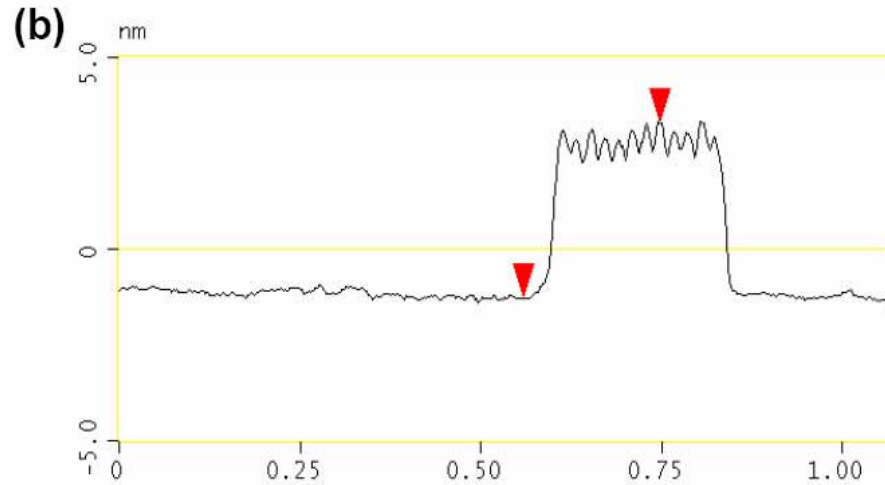
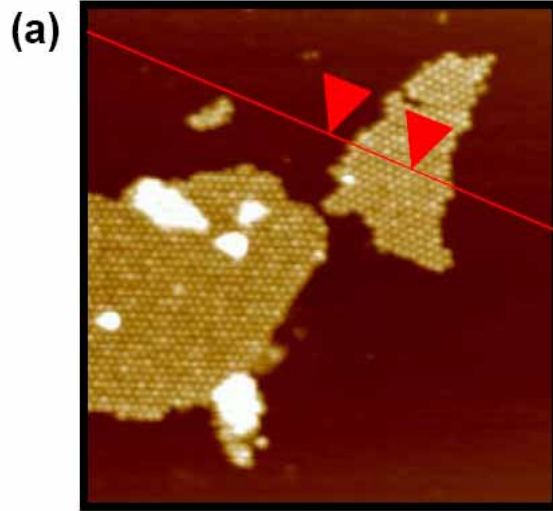
Нанопровода на основе актиновых филаментов

Использование конъюгатов актина с золотыми наночастицами

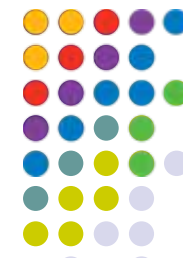


S-слой белков

Образованы идентичными субъединицами белков или гликопротеидов в клеточной стенке бактерий и археобактерий



Получение искусственных S-слоев



на Ленгмюровских липидных бислоях



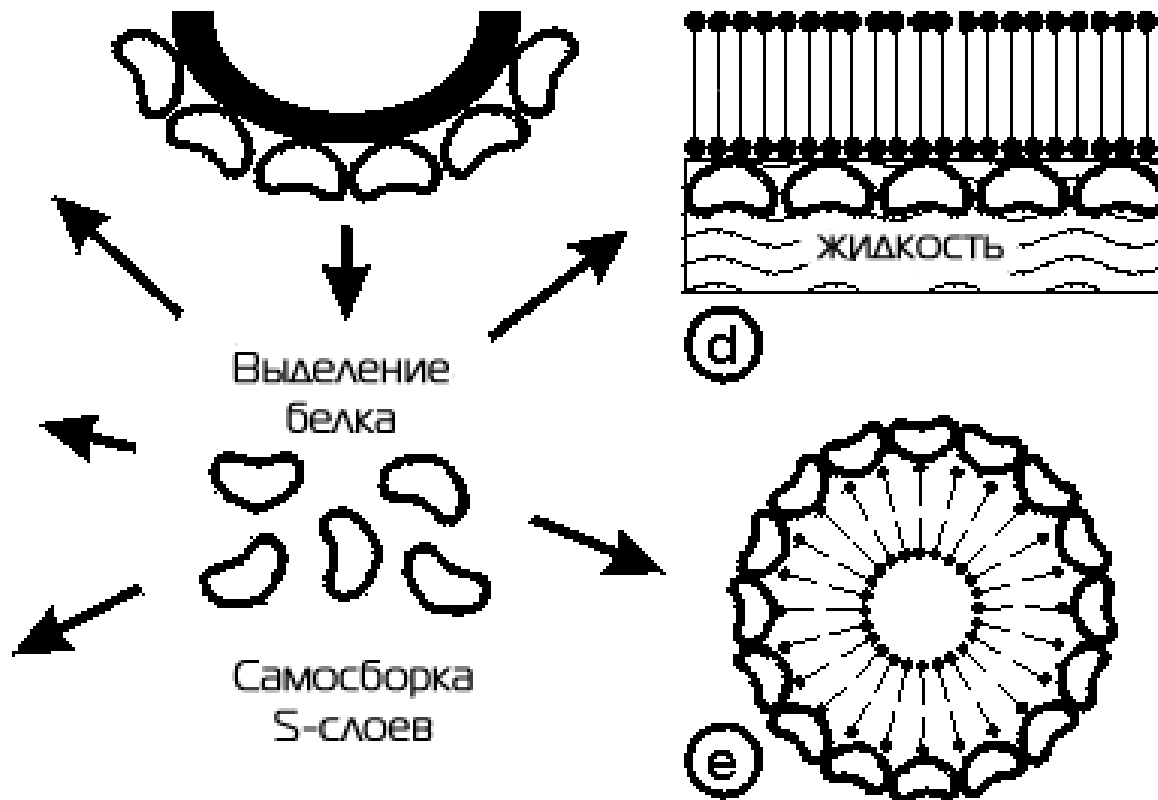
(a) в объеме раствора



(b) на границе ж.-газ



(c) на границе ж.-тв.



на поверхности мицелл ПАВ

Полезные свойства S-слоев

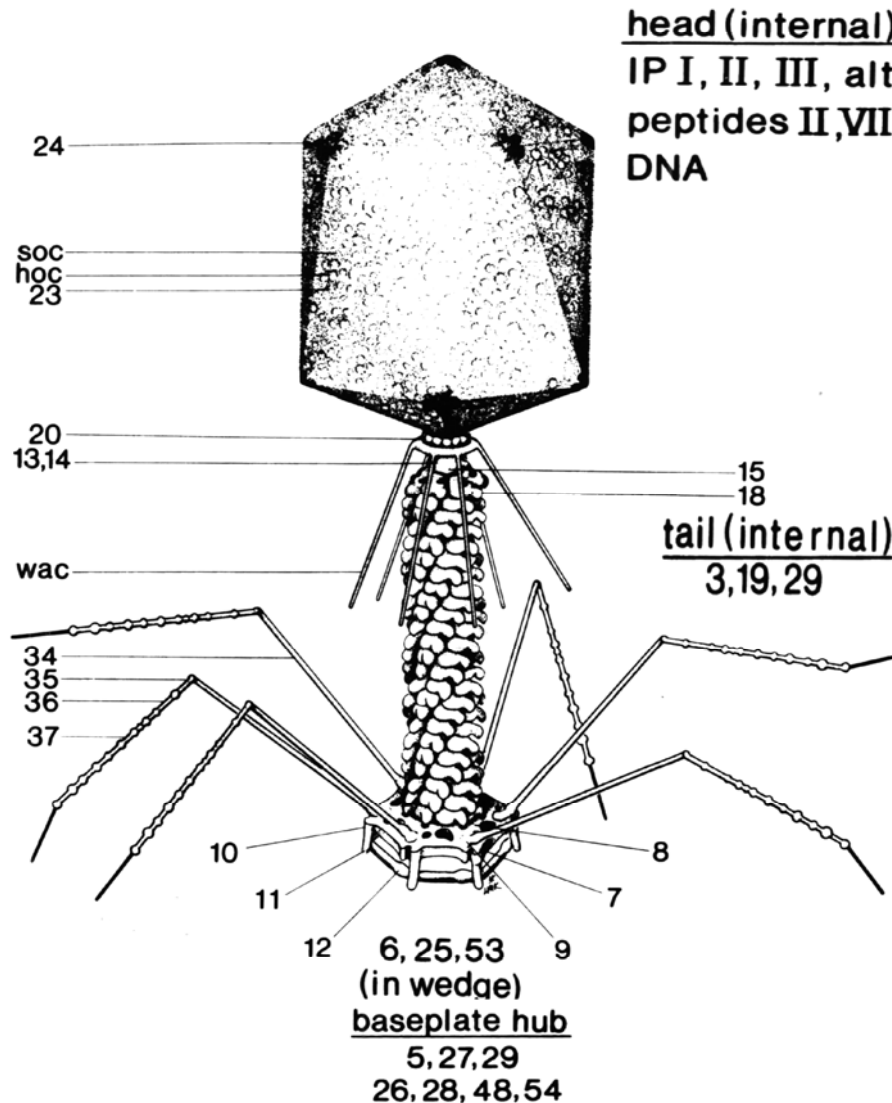


- **Формирование методом самосборки**
- **Высокая стабильность белков в составе S-слоев**
Например, мономеры бактериородопсина в растворе полностью денатурируют в течение суток. S-слои бактериородопсина выдерживают кратковременное кипячение (!)
- **Возможность формирования некоторыми белками регулярных массивов пор в S-слоях**
Диаметр пор варьируется в диапазоне 2-9 нм
- **Возможность химической модификации белков без разрушения S-слоя**
- **Широкий спектр белков, способных к образованию S-слоев**
(как следствие, наличие нескольких вариантов симметрии слоя и спектра периодов двумерной решетки в диапазоне 5-20 нм)
- **Возможность применения S-слоев как фоторезистов при использовании жесткого ультрафиолетового излучения**

Сложные самособирающиеся структуры



Бактериофаг Т4



Бактериофаг Т4 – вирус бактерий, инфицирует клетки *Escherichia coli*

Геном – 168 903 bp dsDNA
289 orf, >50 – структурные белки
(капсид – 24, хвост – 22,
фибриллы – 6)
>10 – скелетные белки, ферменты
и шапероны (фолдинг и сборка)

Капсид: 115 нм х 85 нм
Хвост: 100 нм х 21 нм
Базальная пластинка:
ø 50 нм

**>1500 белковых
субъединиц**

Инфицирование фагом T4 клетки E.coli

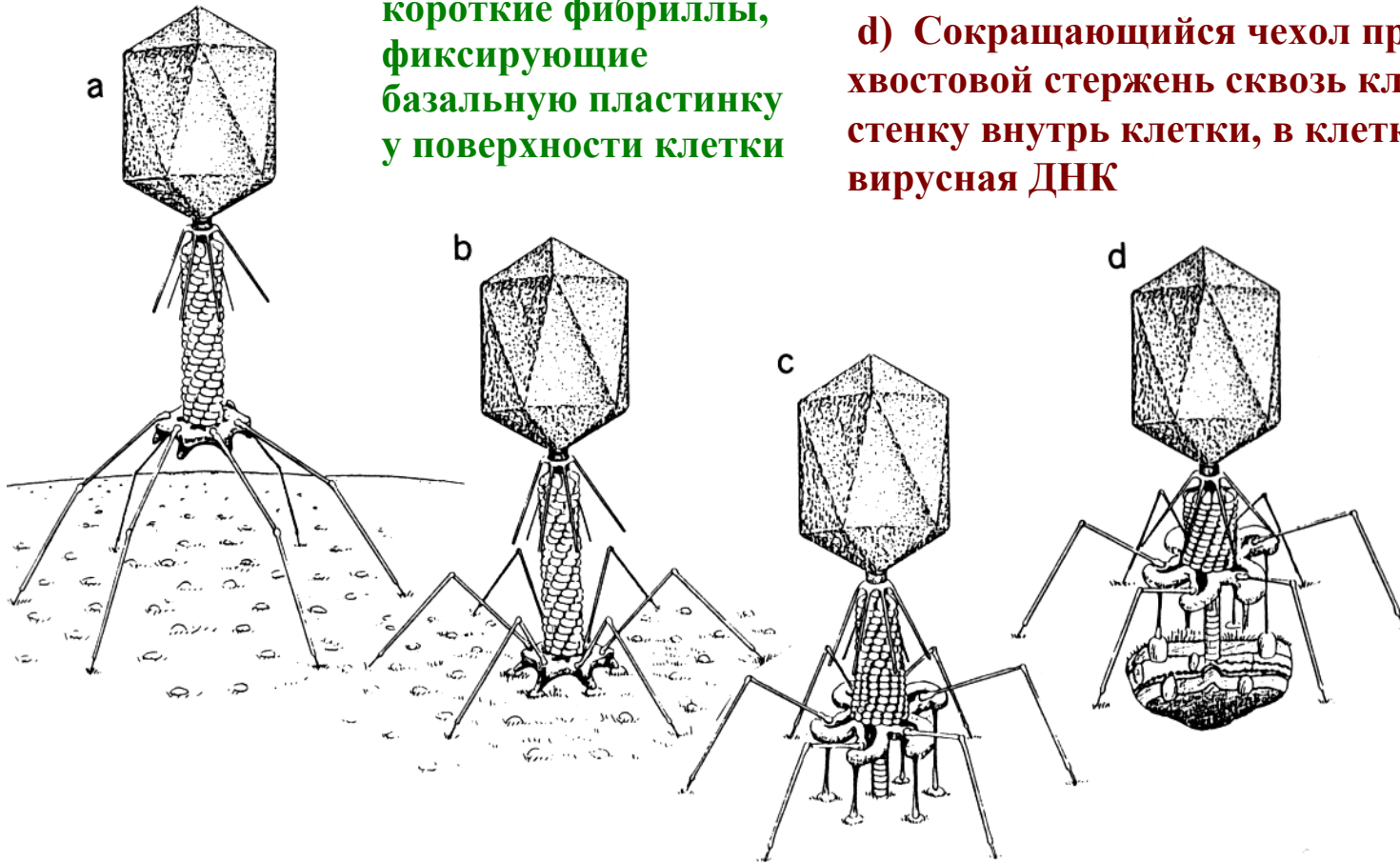


а) Длинные фибриллы связались с рецепторами на клеточной стенке и подтянули вирус.

б) Выпускаются короткие фибриллы, фиксирующие базальную пластинку у поверхности клетки

с) Базальная пластинка меняет форму из “шестиугольника” в “звезду”, вызывая сокращение хвостового чехла.

д) Сокращающийся чехол проталкивает хвостовую стержень сквозь клеточную стенку внутрь клетки, в клетку вводится вирусная ДНК

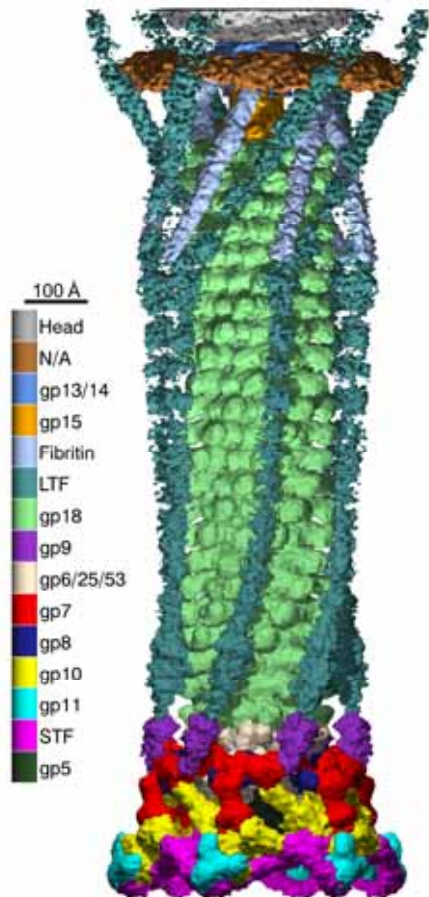


Petr G. Leiman,¹ Paul R. Chipman,¹
Victor A. Kostyuchenko,^{1,2} Vadim V. Mesyanzhinov,²
and Michael G. Rossmann^{1,*}

Сокращение хвоста фага T4

Хвост с растянутым чехлом

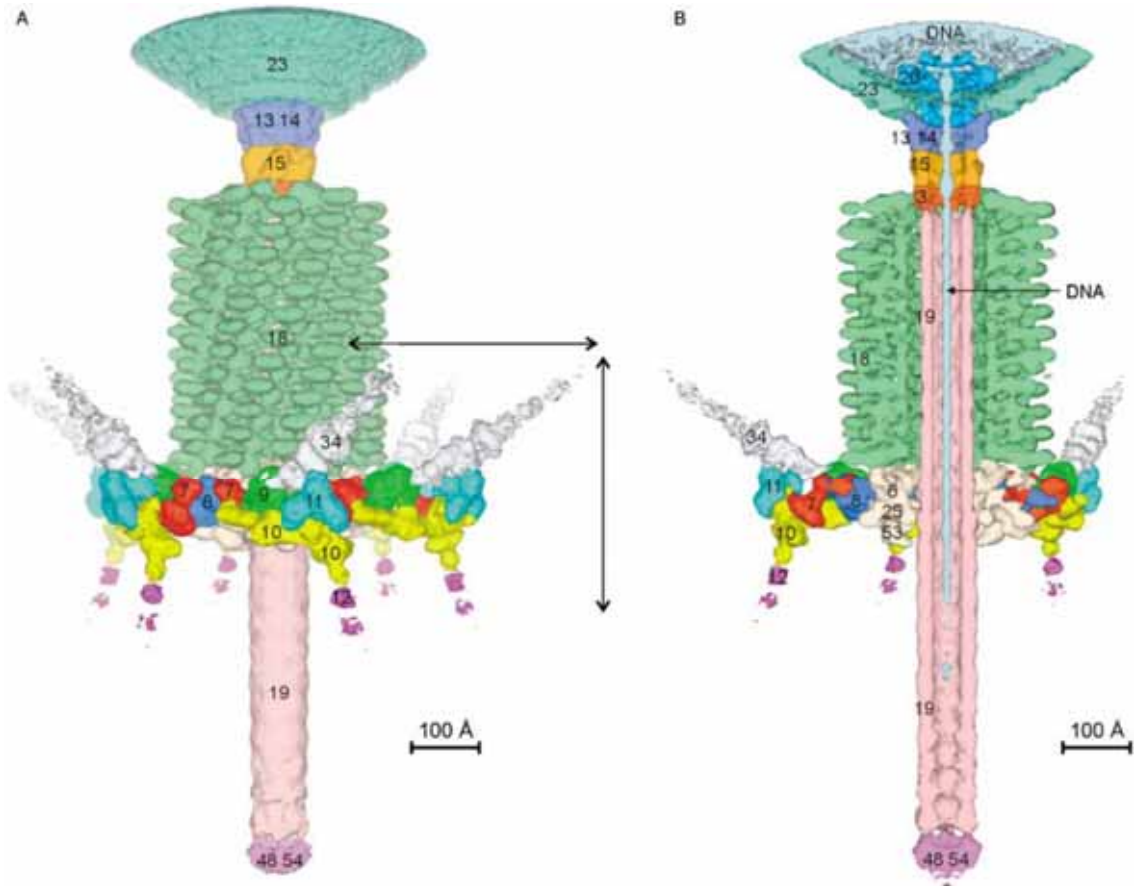
Высота 92,5 нм ø 24 нм



1,5 нм

Хвост с сокращенным чехлом

Высота 42 нм ø 33 нм



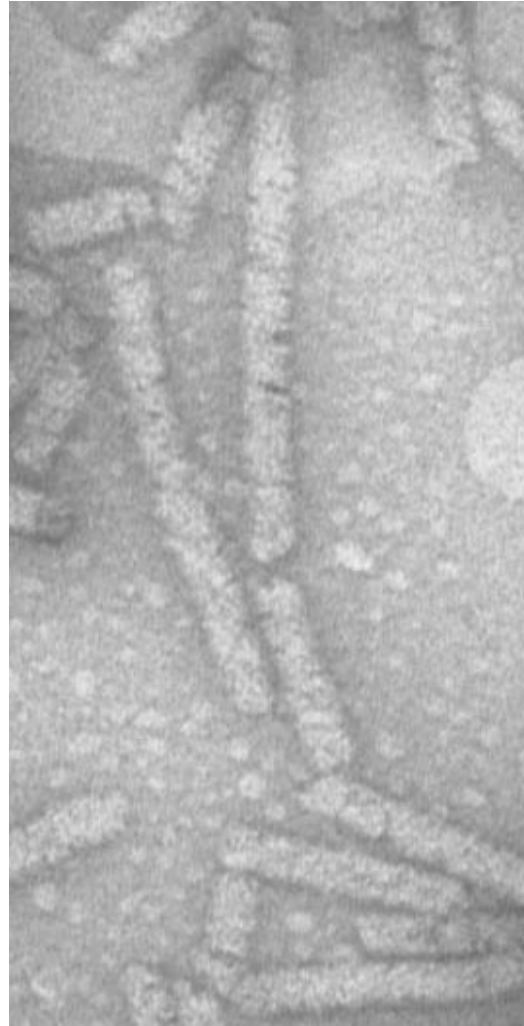
Внутренний диаметр

1,7 нм

EM-фото поличехлов в растворе (выделены из клеток *E. coli*)

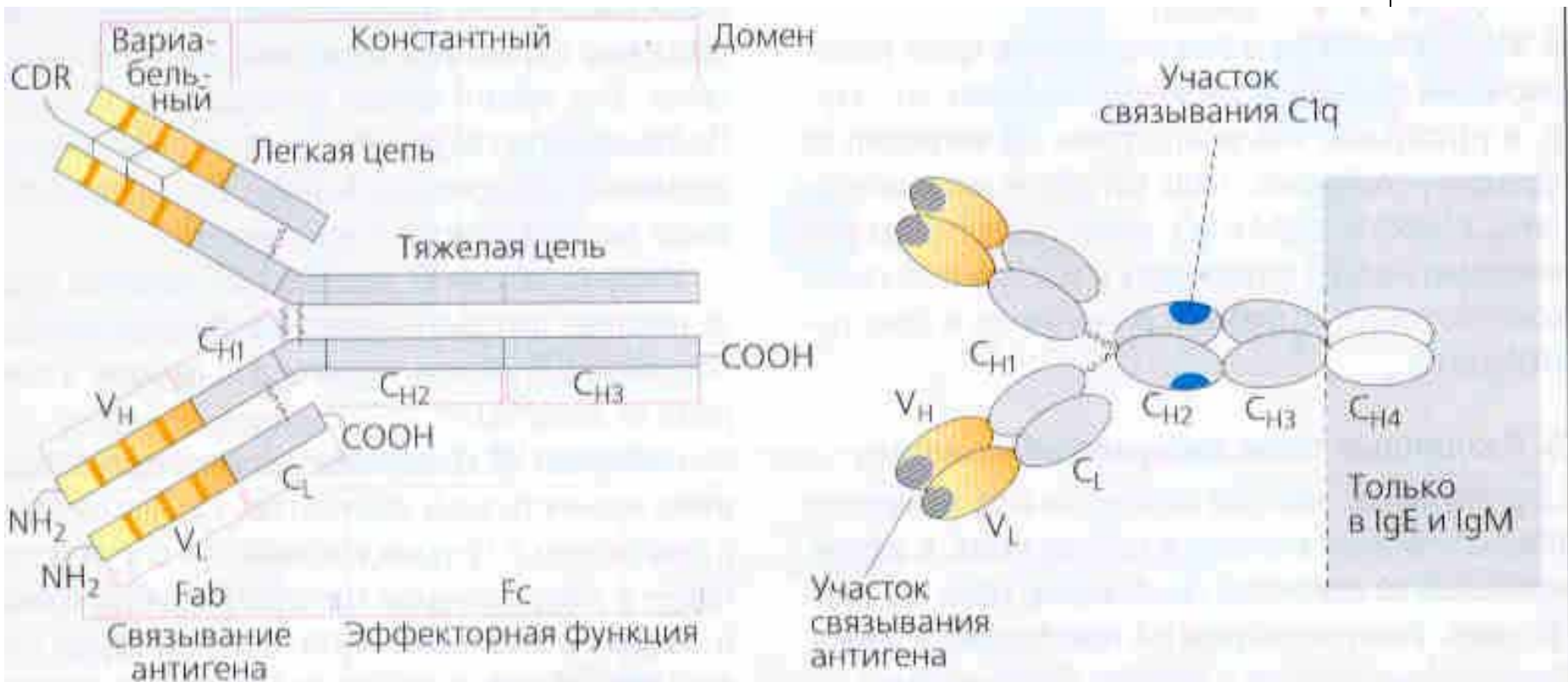


The EMBO Journal (2009), 1–9 | © 2009 European Molecular Biology Organization | All Rights Reserved 0251-4189/09
www.embojournal.org



Anastasia A Aksyuk¹, Petr G Leiman^{1,3},
Lidia P Kurochkina², Mikhail M Shneider²,
Victor A Kostyuchenko¹,
Vadim V Mesyanzhinov² and
Michael G Rossmann^{1,*}

Антитела

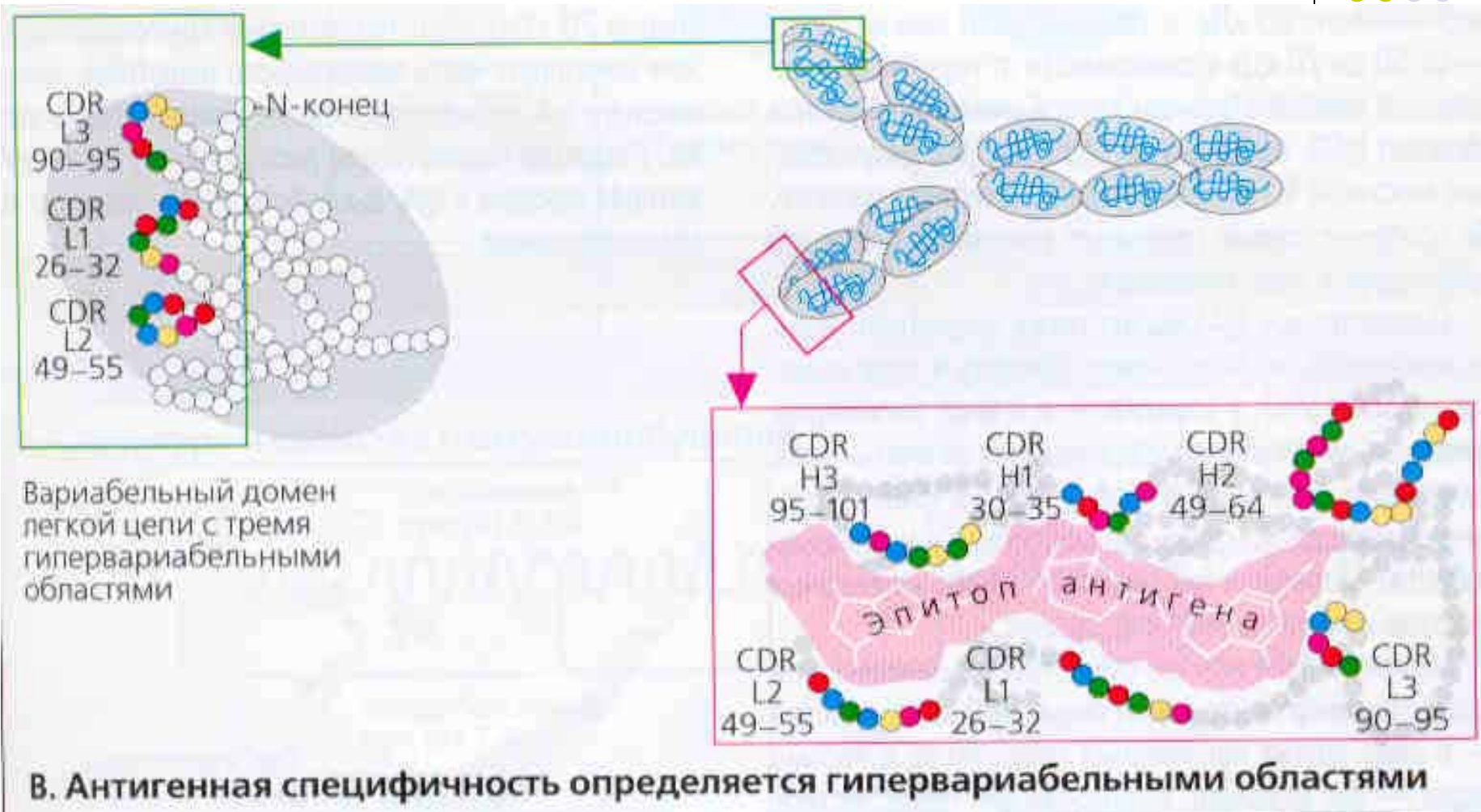
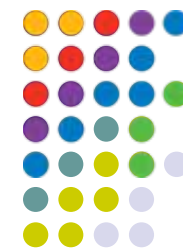


CDR = область, определяющая комплементарность
 Fab = антиген-связывающий фрагмент
 Fc = кристаллизирующийся фрагмент

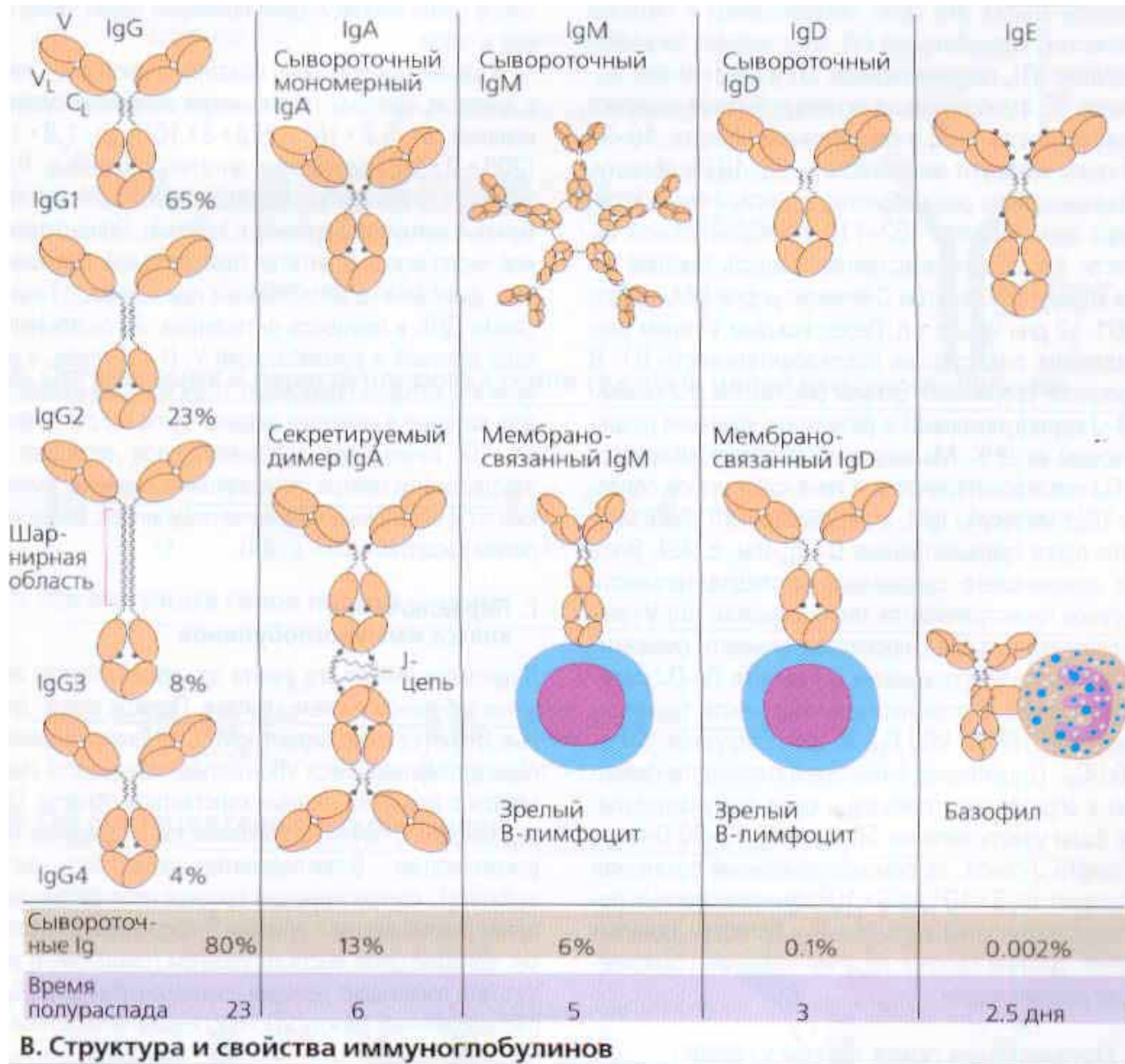
V_H = переменный домен тяжелой цепи
 V_L = переменный домен легкой цепи
 C_{H/L} = константный домен тяжелой/легкой цепи

А. Структура иммуноглобулинов

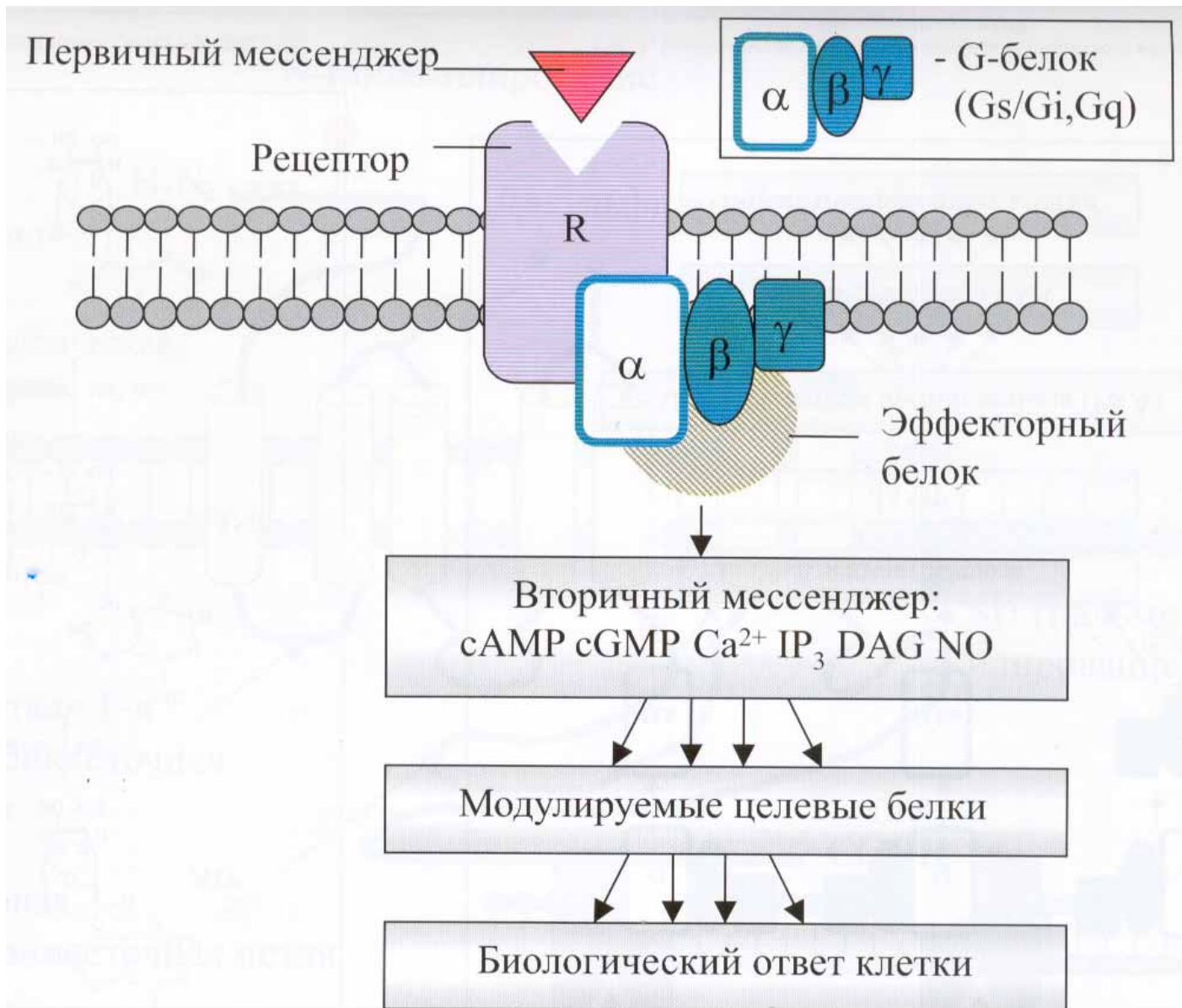
Антитела



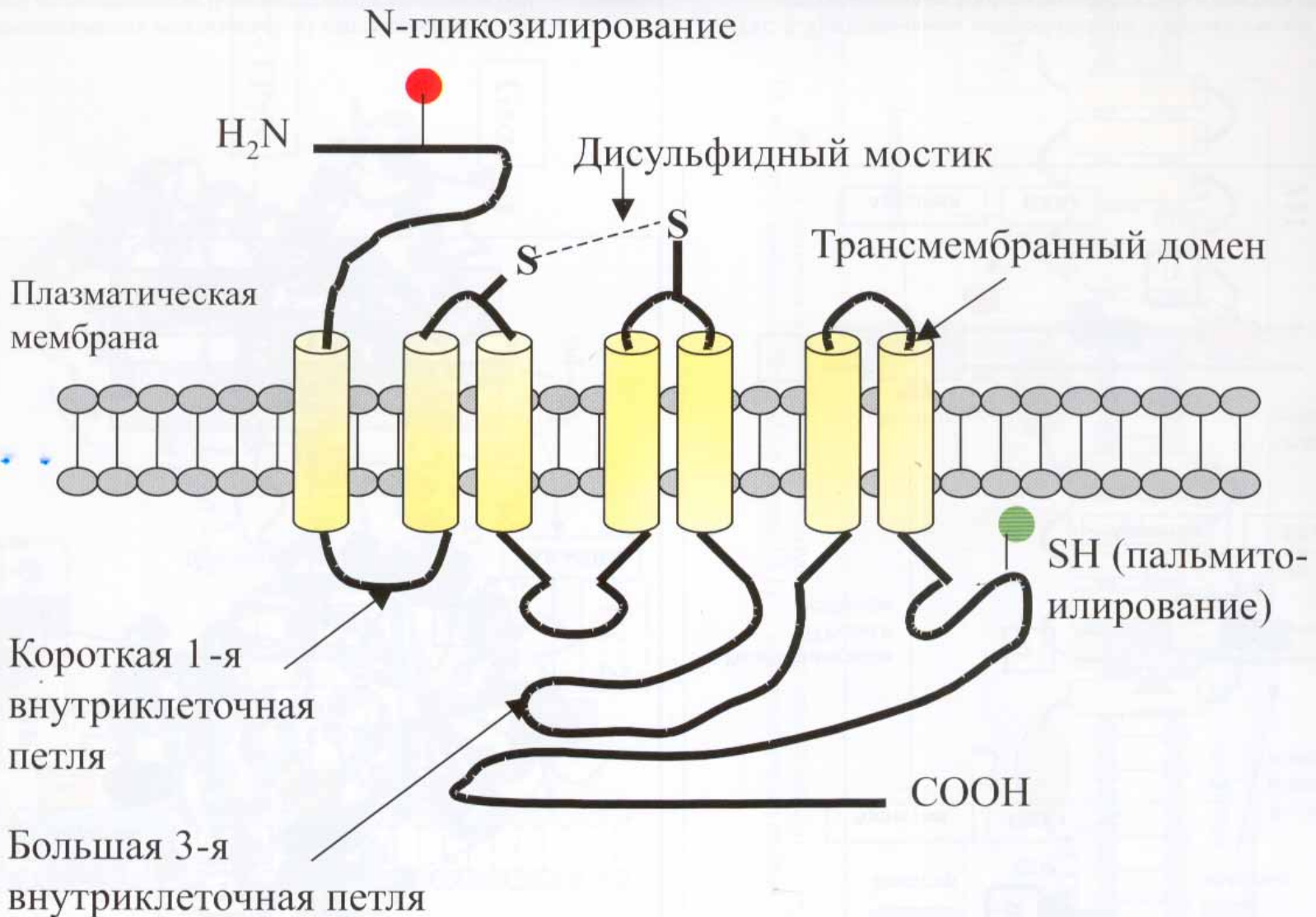
Антитела



Рецепторы



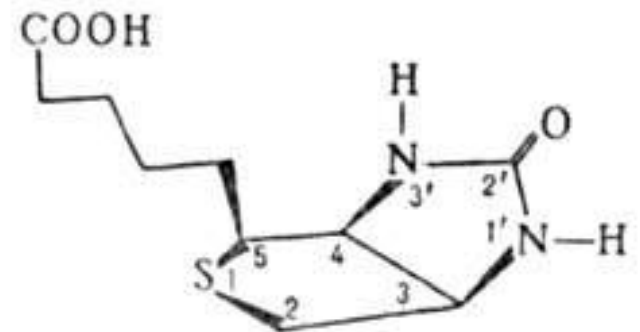
Рецепторы



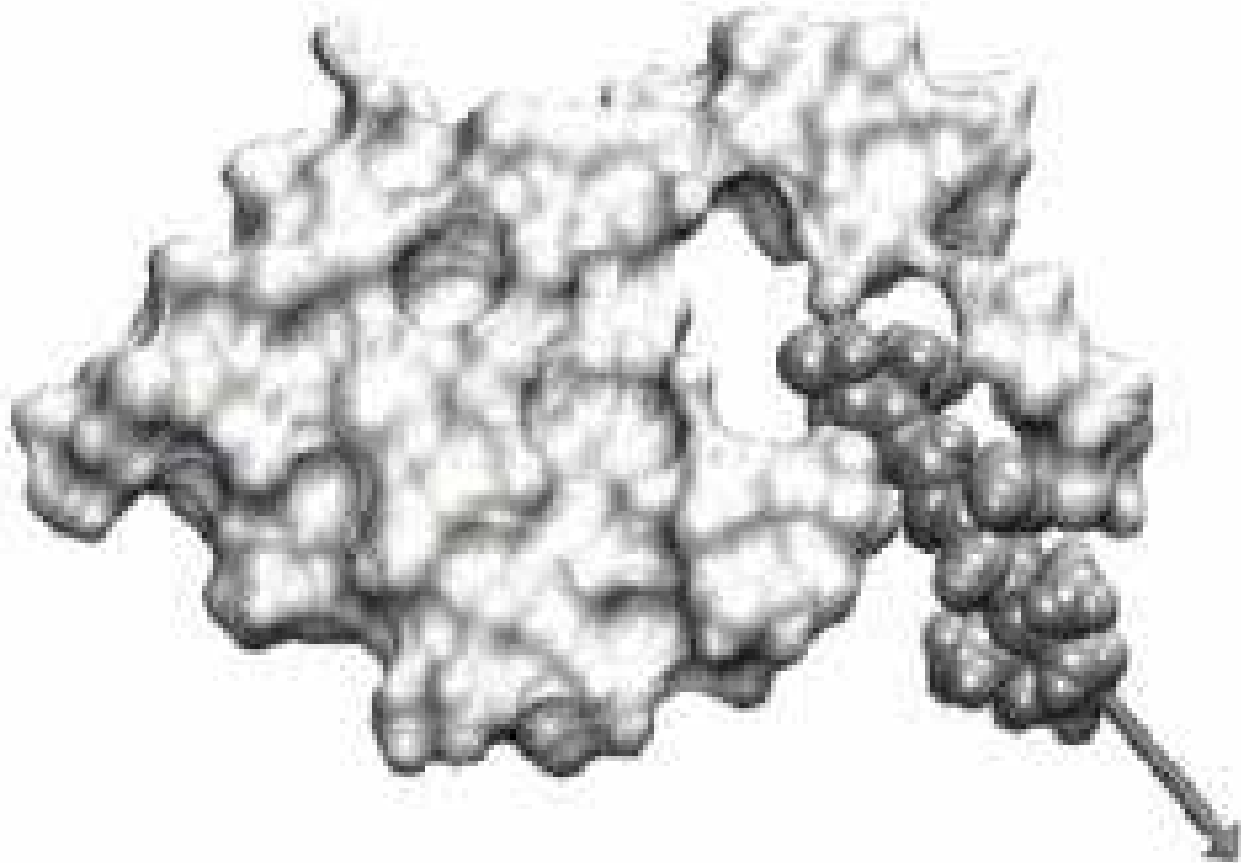
Аффинность молекулярного узнавания. Авидин-биотин.



- **Авидин** - гликопротеид, содержащийся в яичном белке птиц и рептилий.
- **Биотин (витамин Н, витамин В7, кофермент R)** — водорастворимый витамин группы В. Молекула биотина состоит из тетрагидроимидазольного и тетрагидротиофенового кольца, в тетрагидротиофеновом кольце один из атомов водорода замещен на валериановую кислоту. Биотин является кофактором в метаболизме жирных кислот, лейцина и в процессе глюконеогенеза.



Авидин-биотин.

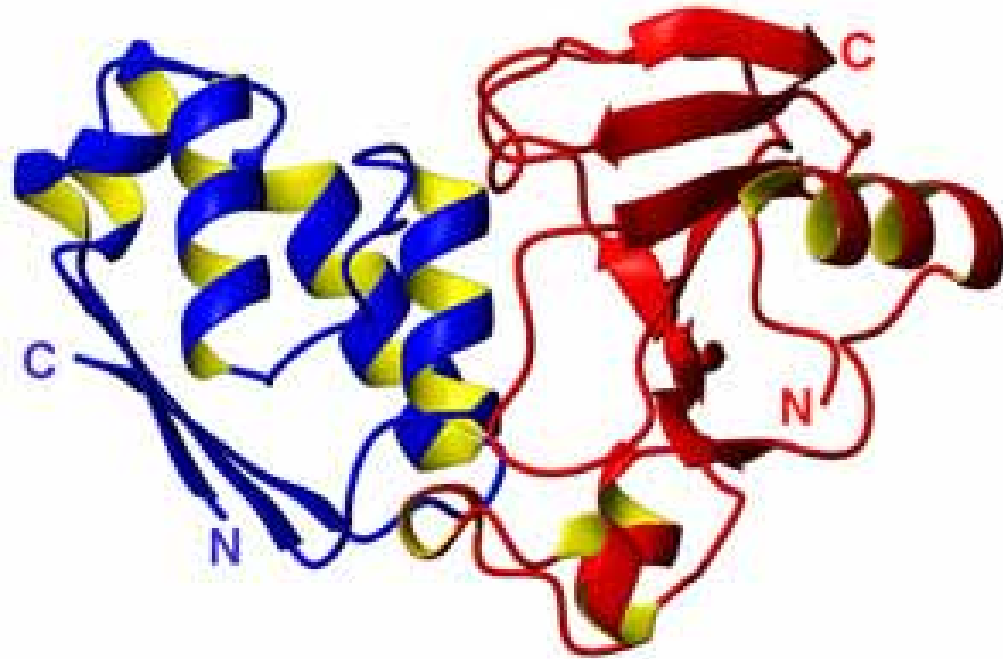


Экстракция лиганда биотина активным центром авидина

Фермент-ингибитор. Модуль барназа-барстар



- Барназа – бактериальная рибонуклеаза (12 КДа, рI - 9,3)
- Барстар – природный белковый ингибитор барназы (10,4 КДа, рI 4,6)



**Универсальный модуль:
барназа - барстар**

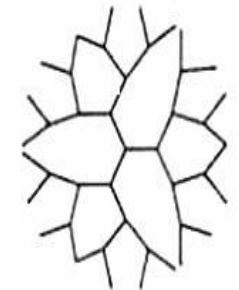
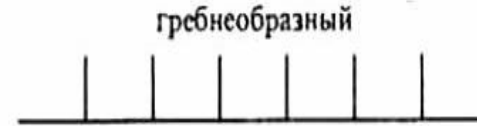
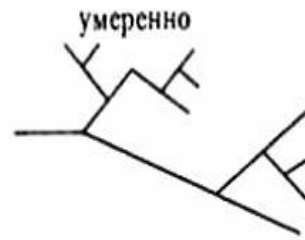
Технология послойного нанесения полиэлектролитов (ПНП)

Типы полиэлектролитов



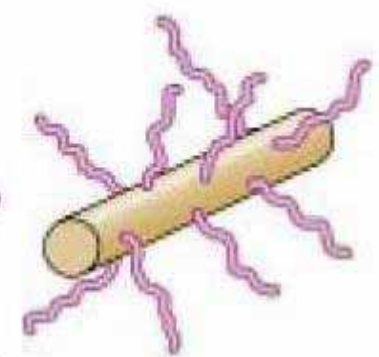
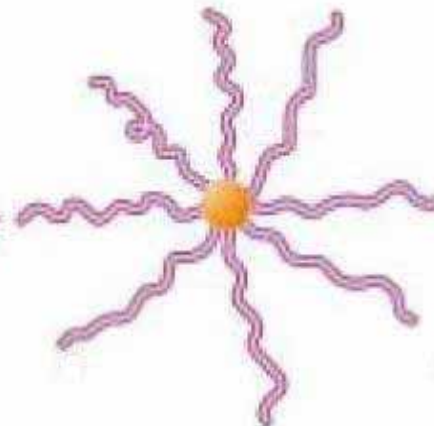
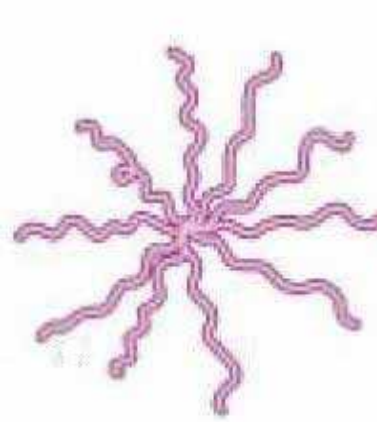
Линейные полиэлектролиты

Разветвленные полиэлектролиты



Полиэлектролиты нелинейной архитектуры

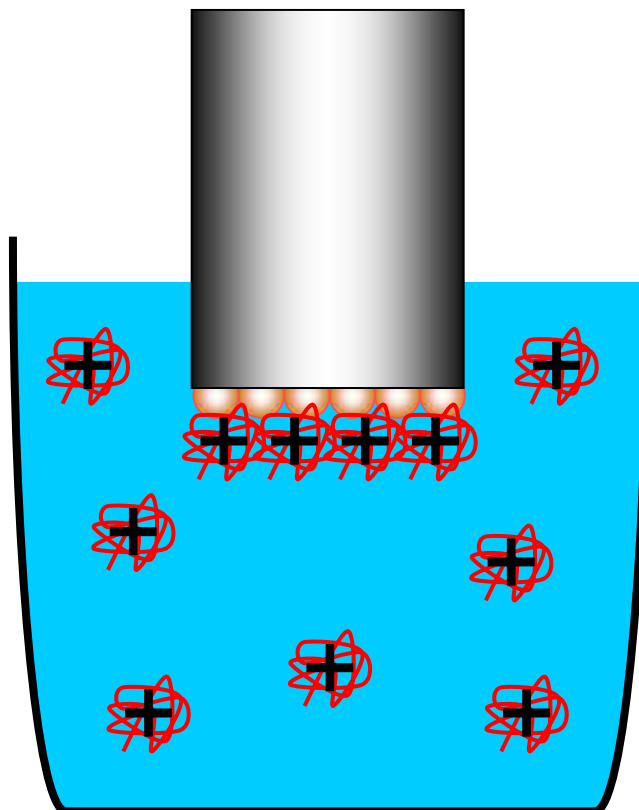
Полимерные звезды Сферические щетки Цилиндрические щетки



Технология ПНП («layer – by –layer», LBL)

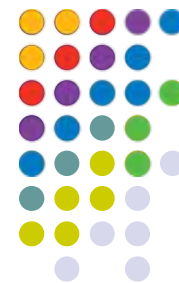


графитовый электрод

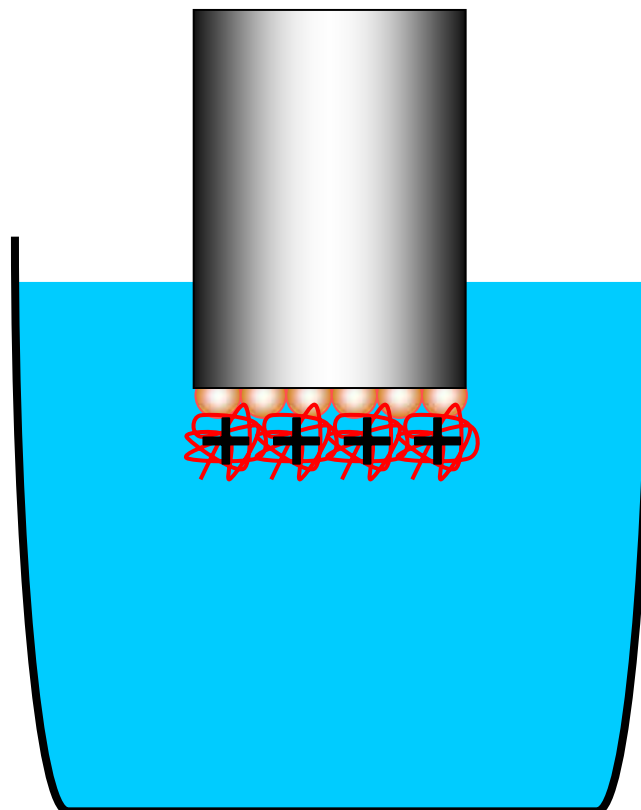


раствор
поликатиона

Технология ПНП («layer – by –layer», LBL)

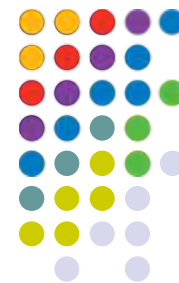


графитовый электрод

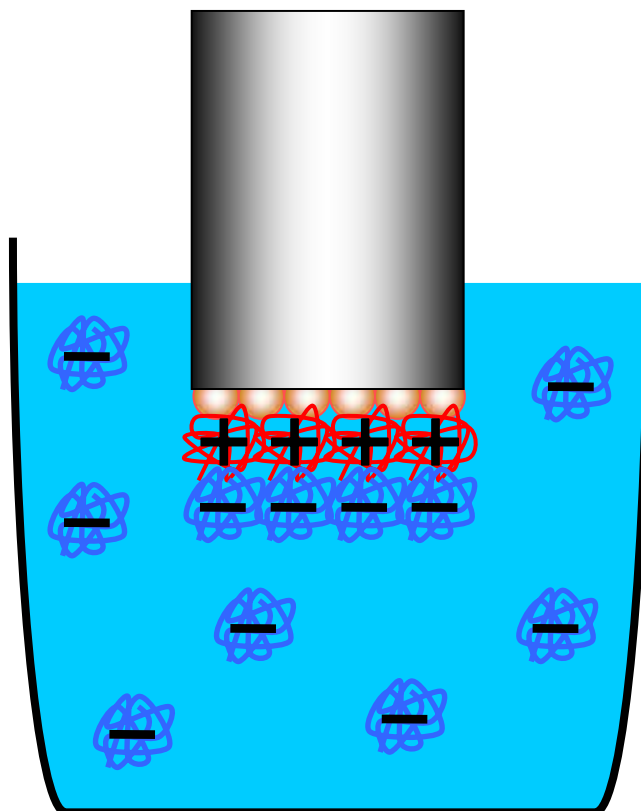


ОТМЫВКА

Технология ПНП («layer – by –layer», LBL)

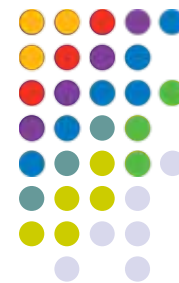


графитовый электрод

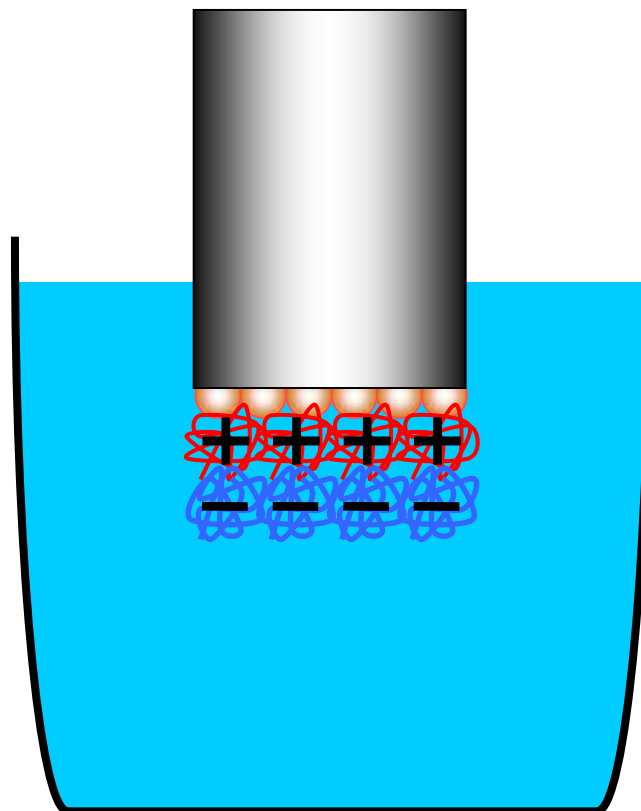


раствор
полианиона

Технология ПНП («layer – by –layer», LBL)

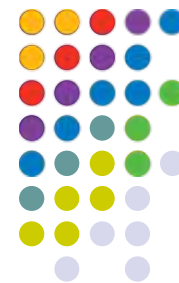


графитовый электрод



ОТМЫВКА

Технология ПНП («layer – by –layer», LBL)



графитовый электрод

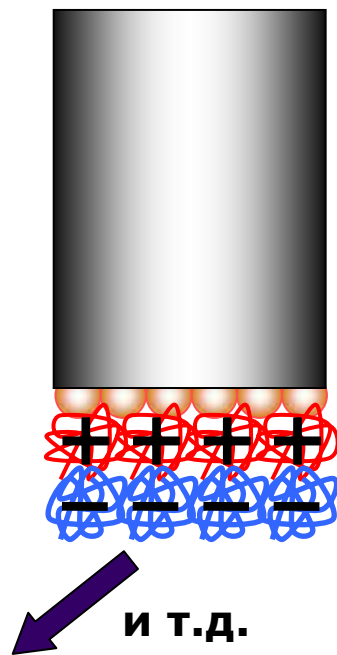
**Многочарядные
объекты:**

**Полиэлектролиты
(ПДДА, ПАС)**

Белки (БСА)

**Ферменты (БХЭ, АХЭ,
ХО)**

**Наночастицы (МСУНТ,
УНС)**



Холиноксидазные сенсоры

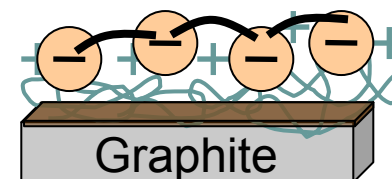


Предел обнаружения
холина: **100 нМ**

Линейность:
 $1 \cdot 10^{-6} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Чувствительность:
 $0,015 \text{ A}/(\text{M} \cdot \text{cm}^2)$

Конструкция:

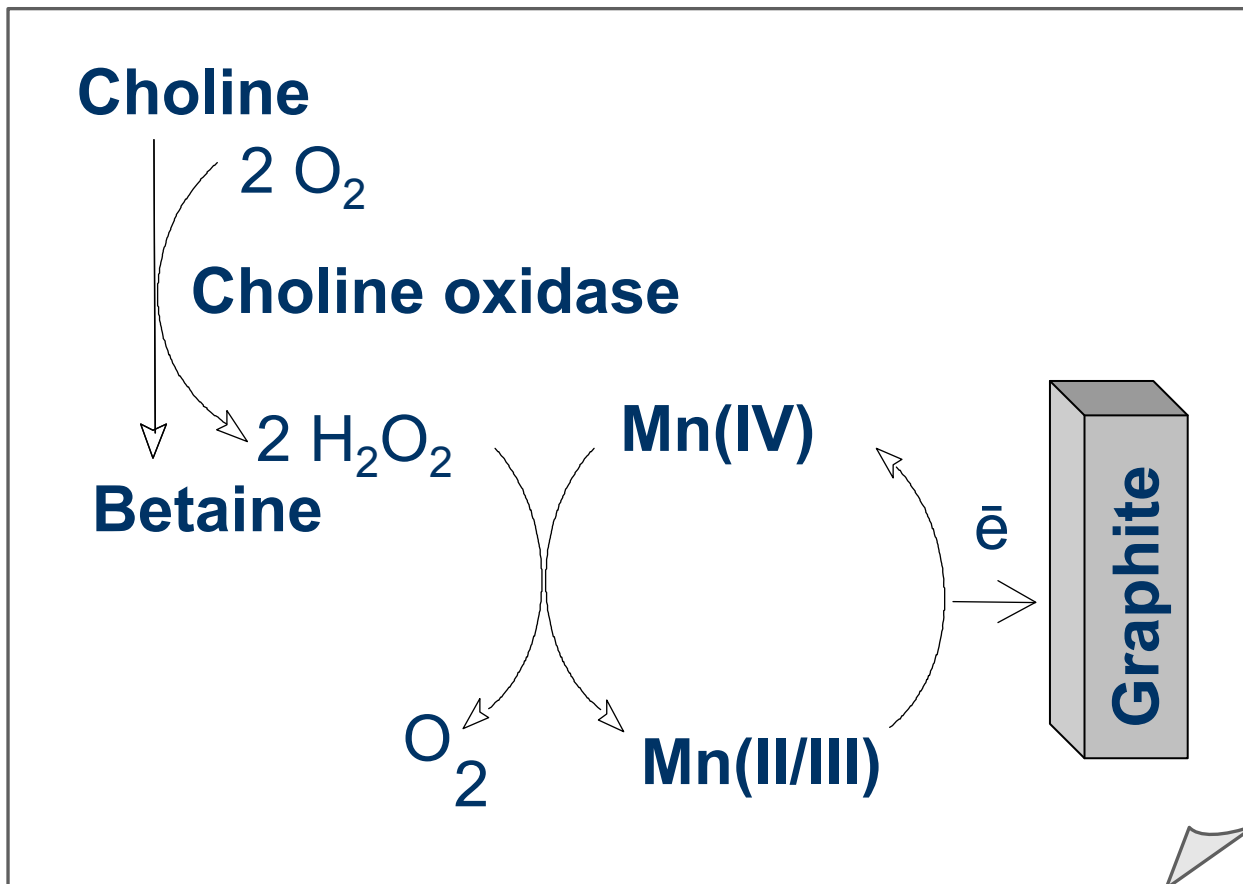


 - MnO_2

 - PDPA

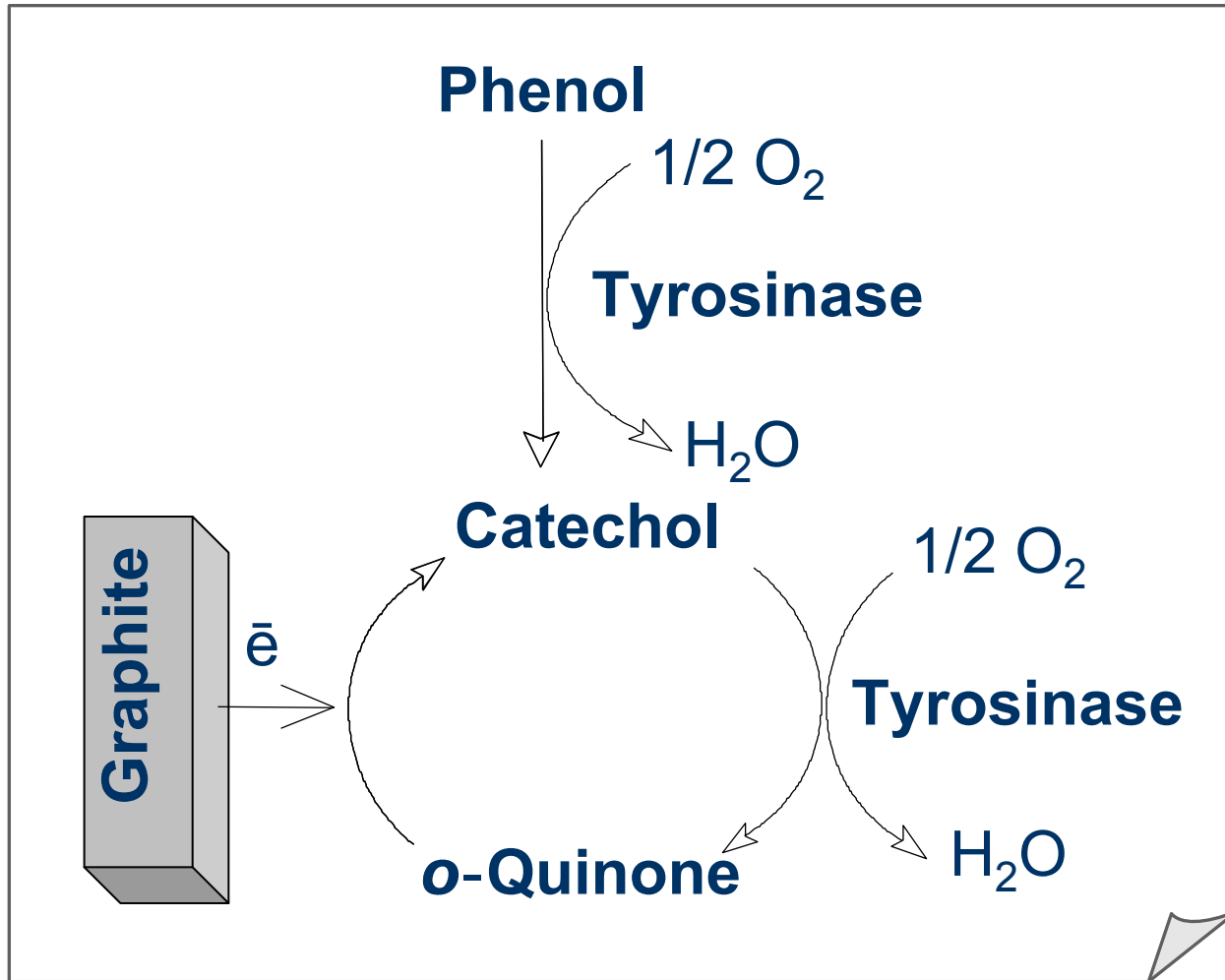
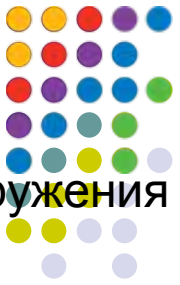
 - Холиноксидаза

 - ГА



Dubacheva G.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Nikitin I.P., Nikitina S.E., Sigolaeva L.V., Sokolovskaya L.G., Yaroslavov A.A. Sensing element for the analysis of bioactive compounds in solutions. // Useful model patent of The Russian Federation № 44483, priority – from 25.11.2004, registration – from 27.03.2005.

Тирозиназные сенсоры

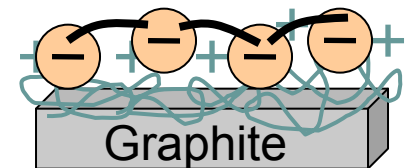


Предел обнаружения
фенола: **6 nM**

Линейность:
 $1 \cdot 10^{-8} M - 1 \cdot 10^{-5} M$

Чувствительность:
 $0,9 A/(M \cdot cm^2)$

Конструкция:



$+$ - PDDA

$-$ - Тирозиназа

\curvearrowright - ГА

[1] Dubacheva G.V. et al., *Sensornie Sistemi*, 2006. V. 20. № 4. P. 336-343.

[2] Dubacheva G.V. et al., *Rossiiskie nanotekhnologii*, 2007. V. 2. № 1-2. P. 154-159.

[3] Dubacheva G.V. et al., *Nanotechnologies in Russia*, 2008. V. 3. № 3-4. P. 221-227.

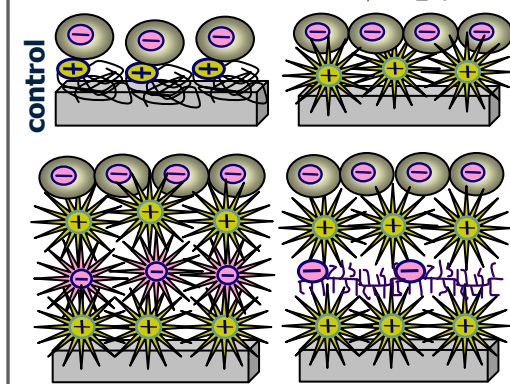
Полиэлектролиты с нелинейной топологией







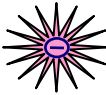

Электрохимические сенсоры

Конструкция	Отн. Акт.
PDDA/Enzyme (control)	1.0
(PTMAEMA) ₁₇ /Choline oxidase	1.5
(PTMAEMA)₁₇/(PAA)₂₁/(PTMAEMA)₁₇/Choline oxidase	4.6
PDADMA/(PAA) ₂₁ /(PTMAEMA) ₁₇ /Choline oxidase	1.9
PDADMA/(PAA) ₂₁ /PDADMA/Choline oxidase	3.0
PDADMA/PAS/(PTMAEMA) ₁₇ /Choline oxidase	2.2
(PTMAEMA) ₁₇ /Choline oxidase/(PTMAEMA) ₁₇	0.2
(PTMAEMA) ₁₇ /PBB/(PTMAEMA) ₁₇ /Choline oxidase	3.5
(PTMAEMA) ₆ /Choline oxidase	1.3
(PTMAEMA) ₆ /(PAA) ₅ /(PTMAEMA) ₆ /Choline oxidase	1.9
(PTMAEMA)₆/PBB/(PTMAEMA)₆/Choline oxidase	4.7
(PTMAEMA)₁₇/Tyrosinase	1.7
(PTMAEMA) ₁₇ /(PAA) ₂₁ /(PTMAEMA) ₁₇ /Tyrosinase	0.9
(PAA) ₂₁ /(PTMAEMA) ₁₇ /Tyrosinase	0.4

Оптимальная конструкция

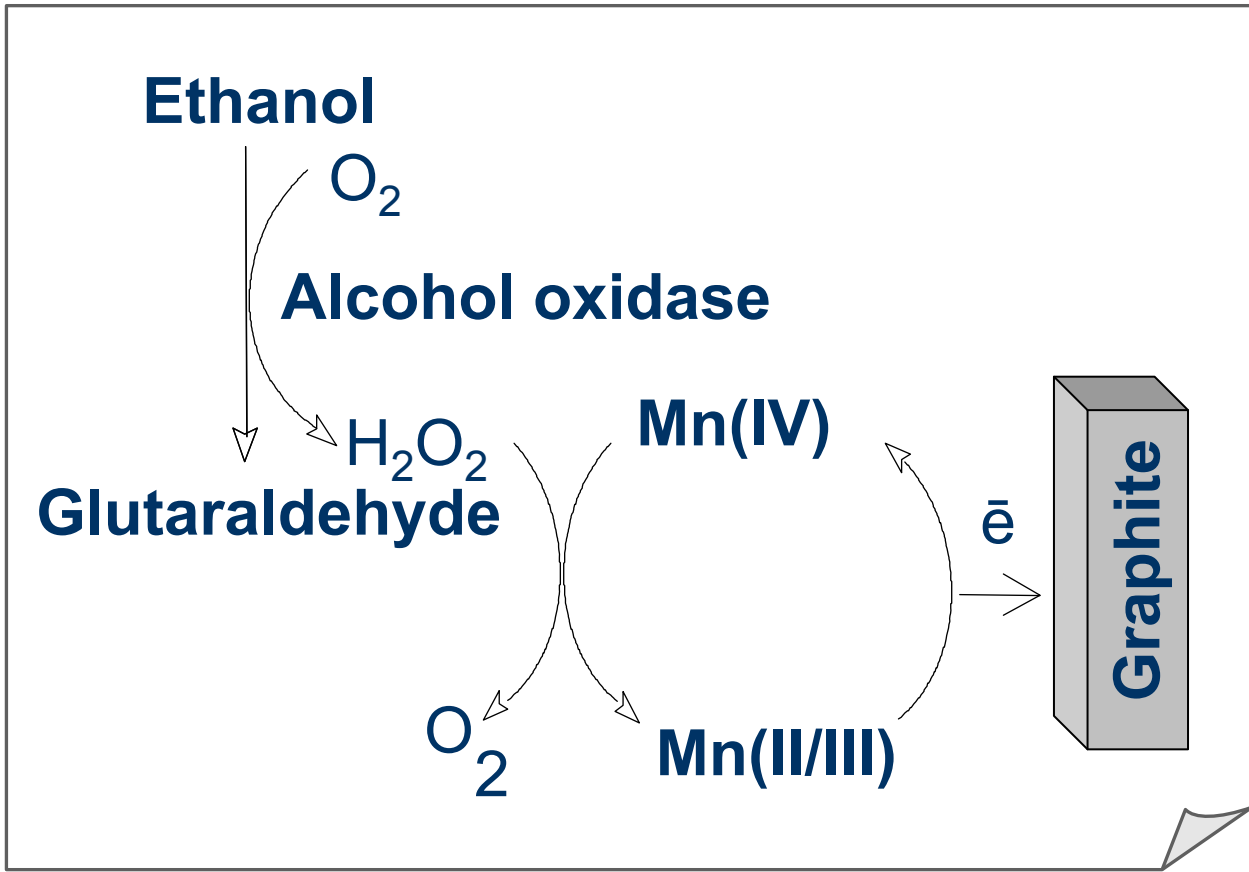


Объекты

-  - enzyme
-  - **PDDA**, poly(diallyldimethylammonium chloride)
-  - **PAS**, poly(sodium anetholsulfonate)
-  - **(PTMAEMA)_N**, poly(trimethylaminoethylmethacrylate iodide) star with N=6,17 arms, P_w=170-180, M_w/M_n<1.3
-  - **(PAA)_N**, poly(acrylic acid) star with 5, 21 arms (N), P_w=90-100, M_w/M_n<1.2
-  - **PBB**, polyelectrolyte bottle brush with main chain - poly-2-hydroxyethylmethacrylate, P_w=1500, side chain - poly(acrylic acid), P_w=25



Сенсоры на основе алкогольоксидазы

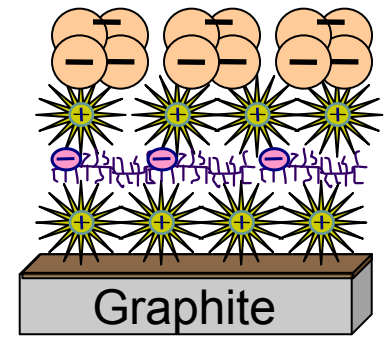





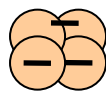
Предел обнаружения: **40 μM**

Линейность: **$5 \cdot 10^{-4} \text{ M} - 5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$**

Чувствительность: **$0,47 \text{ mA}/(\text{c} \cdot \text{M} \cdot \text{cm}^2)$**

Конструкция:



-  - MnO_2
-  - $(\text{PTMAEMA})_6$
-  - PVB
-  - Алкогольоксидаза

Электрохимические сенсоры

Конструкция	Отн. Акт.
PDDA/Enzyme (control)	1.0
$(\text{PTMAEMA})_6/(\text{PAA})_5/(\text{PTMAEMA})_6/\text{Alcohol oxidase}$	1.9
$(\text{PTMAEMA})_6/\text{PVB}/(\text{PTMAEMA})_6/\text{Alcohol oxidase}$	5.3