

Структурный и функциональный аспекты бионанотехнологии

Курочкин Илья Николаевич

д.х.н., профессор
Химический Факультет МГУ

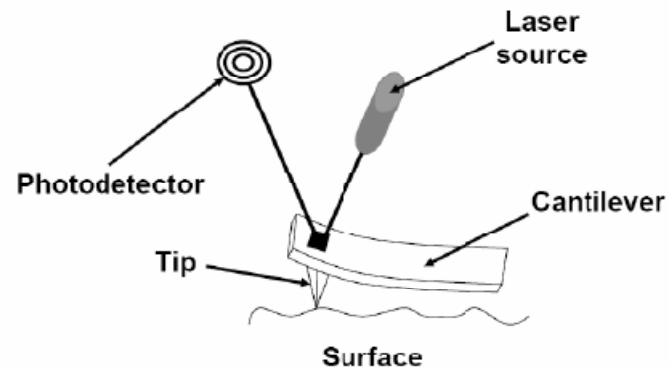
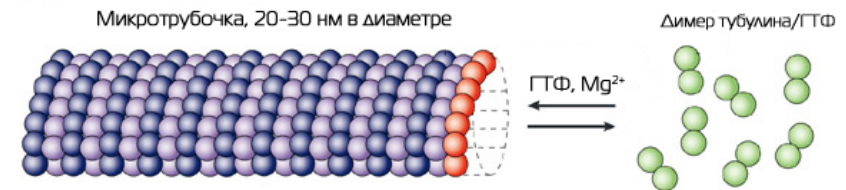
ikur@genebee.msu.su



Сближение научных дисциплин



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



Бионано- и нанобиотехнологии



Бионанотехнологии «Био» для нанотехнологии

Самосборка наноструктур
из биомолекул

Биологические
наноструктуры в качестве
матриц для синтеза
наноматериалов

Биомиметика

Биомолекулярная
электроника

...

Нанобиотехнологии «Нано» для биологии

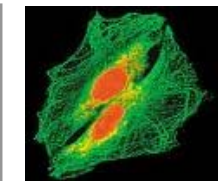
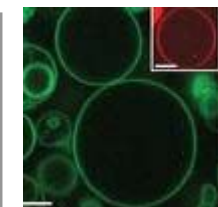
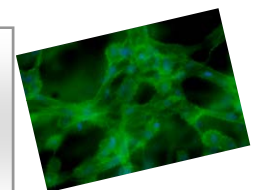
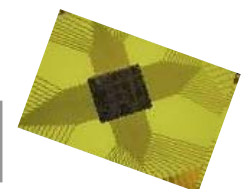
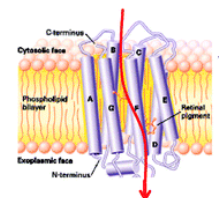
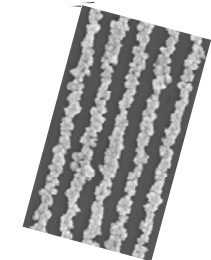
Lab-on-a-chip

Тканевая инженерия на
наноструктурированных
матрицах

Наноконтейнеры для
доставки лекарственных
средств

Неорганические
наночастицы для *in vivo*
диагностики и лечения

...



Бионанотехнология и нанобиотехнология



- Нанобиотехнология – первое упоминание в *MedLine* в 2000 году.
- Бионанотехнология – 2004 год.

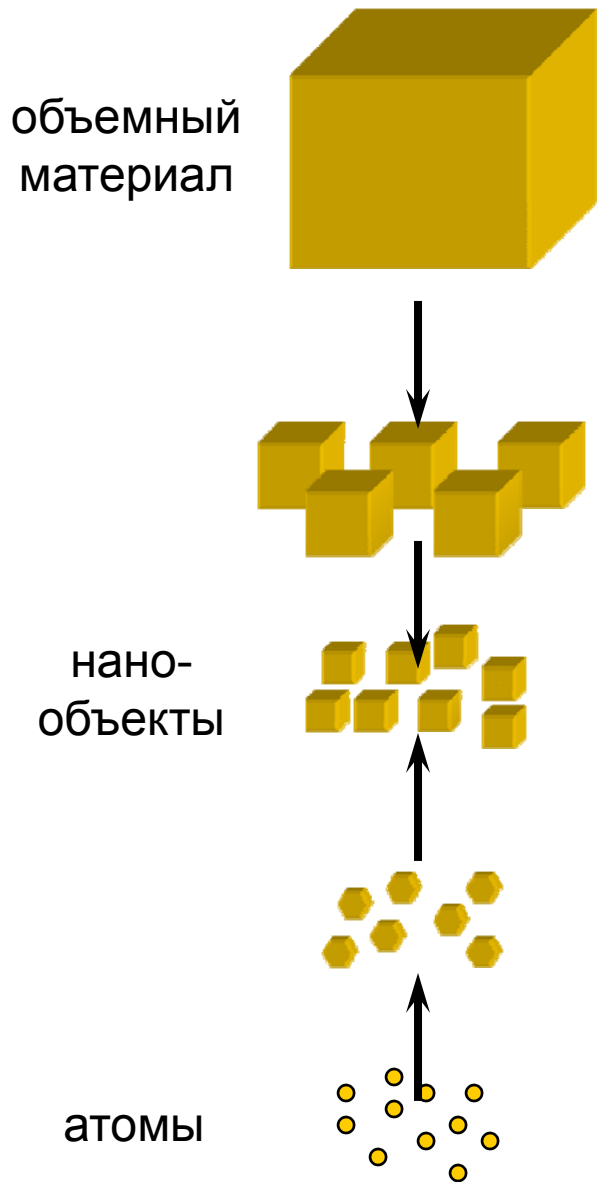
НАНОТЕХНОЛОГИИ



ПОЗВОЛЯТ ПОЛУЧИТЬ
ДО **500 ТОНН** СГУЩЕННОГО МОЛОКА
ИЗ ОДНОЙ ДОХЛОЙ СУХОЙ МЫШИ

antiteomprador.ru

Самосборка: самоассоциация и образование гетерокомпонентных агрегатов



- 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.

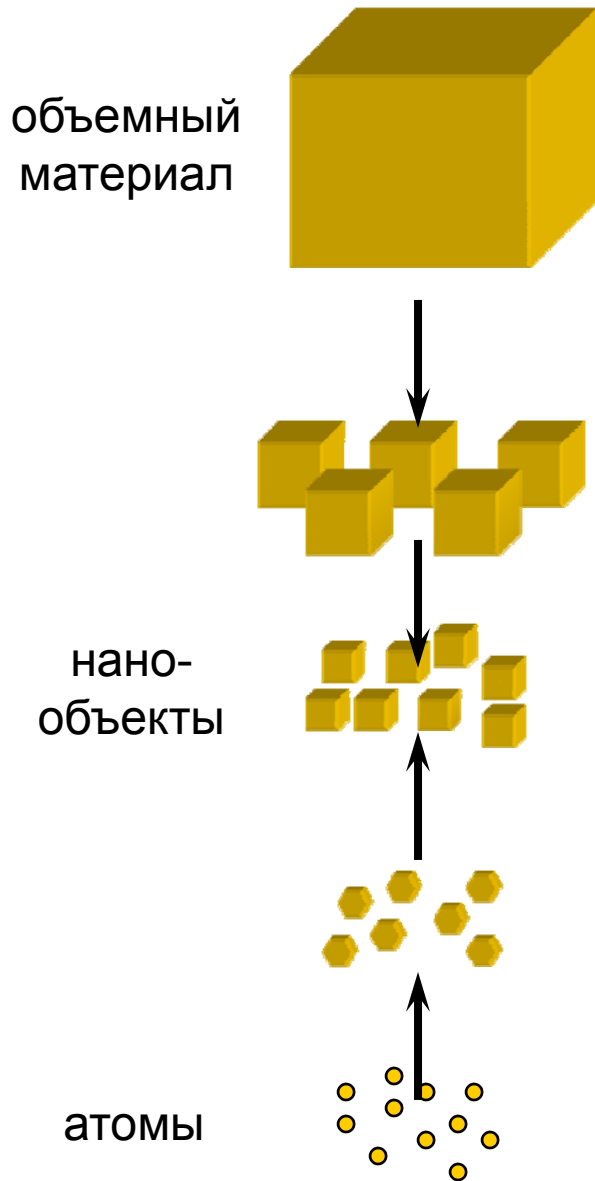
Самосборка и самоорганизация



- 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.



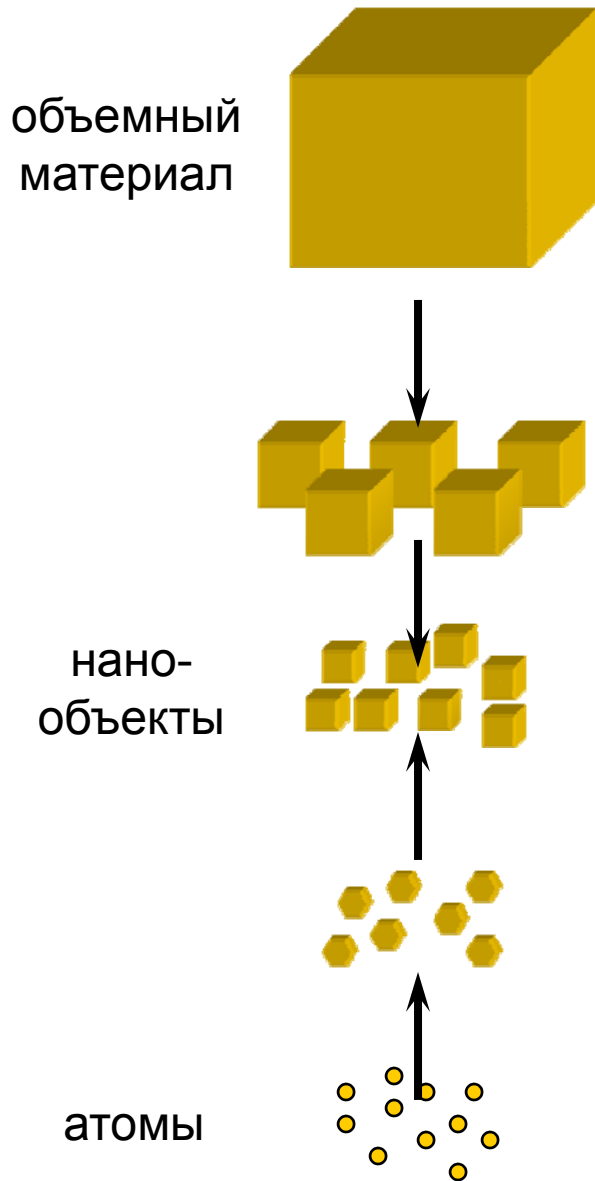
Самосборка



- 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.

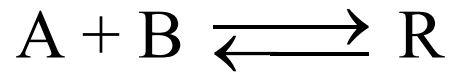


Самосборка

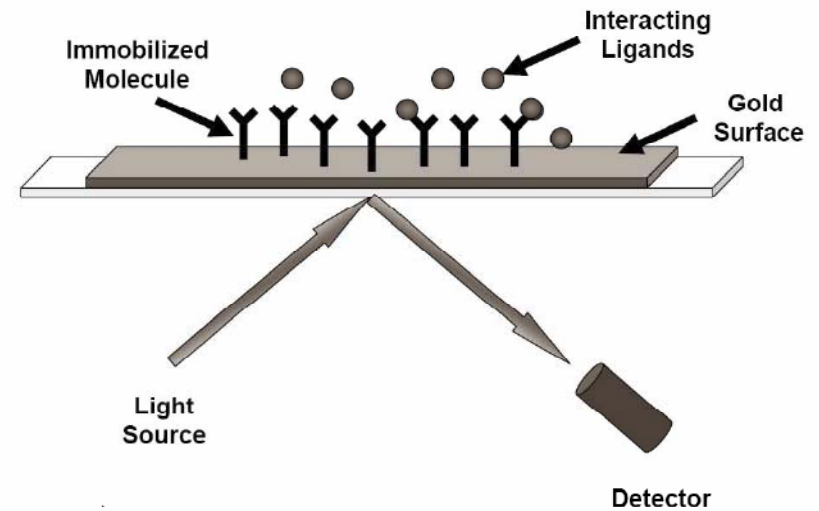
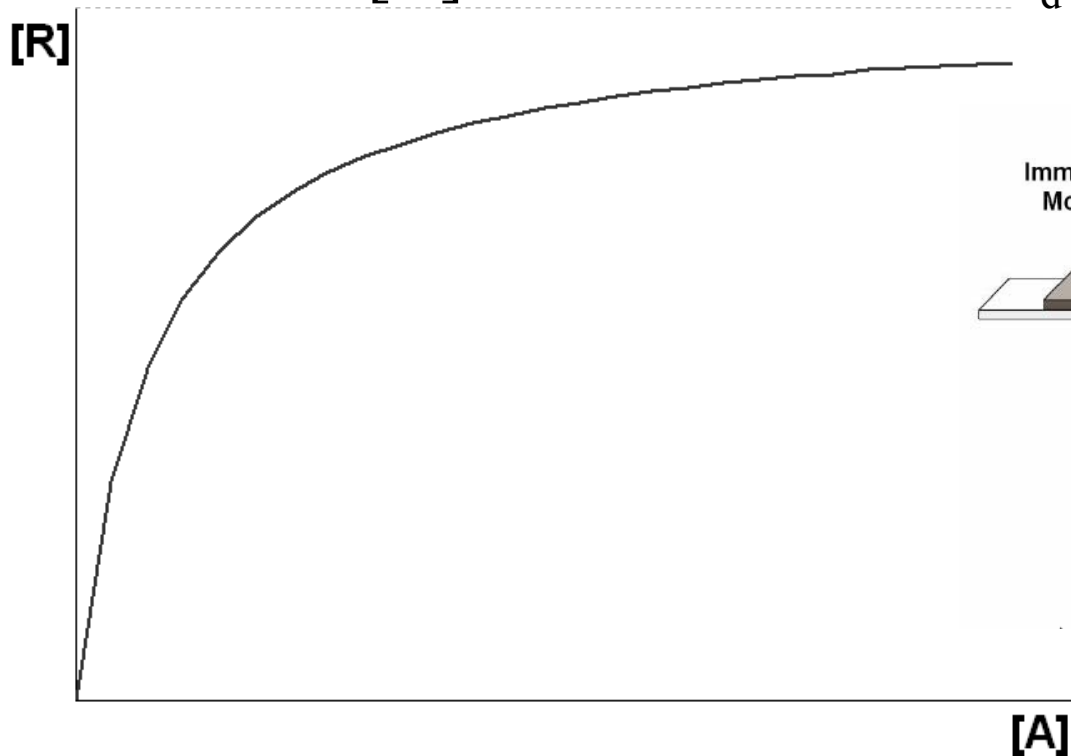


- «Молекулярное узнавание» описывает способность молекул взаимодействовать друг с другом с высокой аффинностью и специфичностью.
- Это один из краеугольных камней описания процессов самосборки.

Аффинность молекулярного узнавания



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

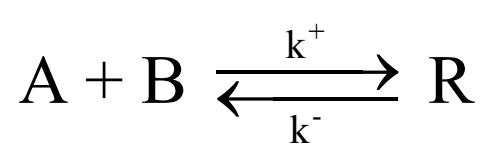


Аффинность молекулярного узнавания

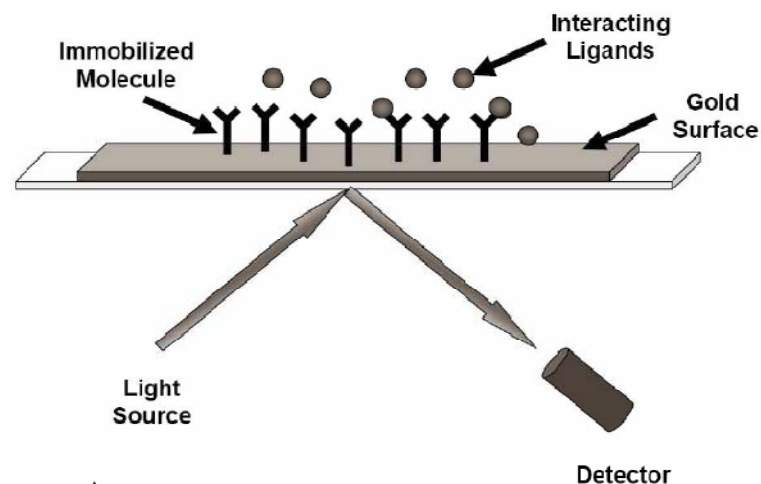
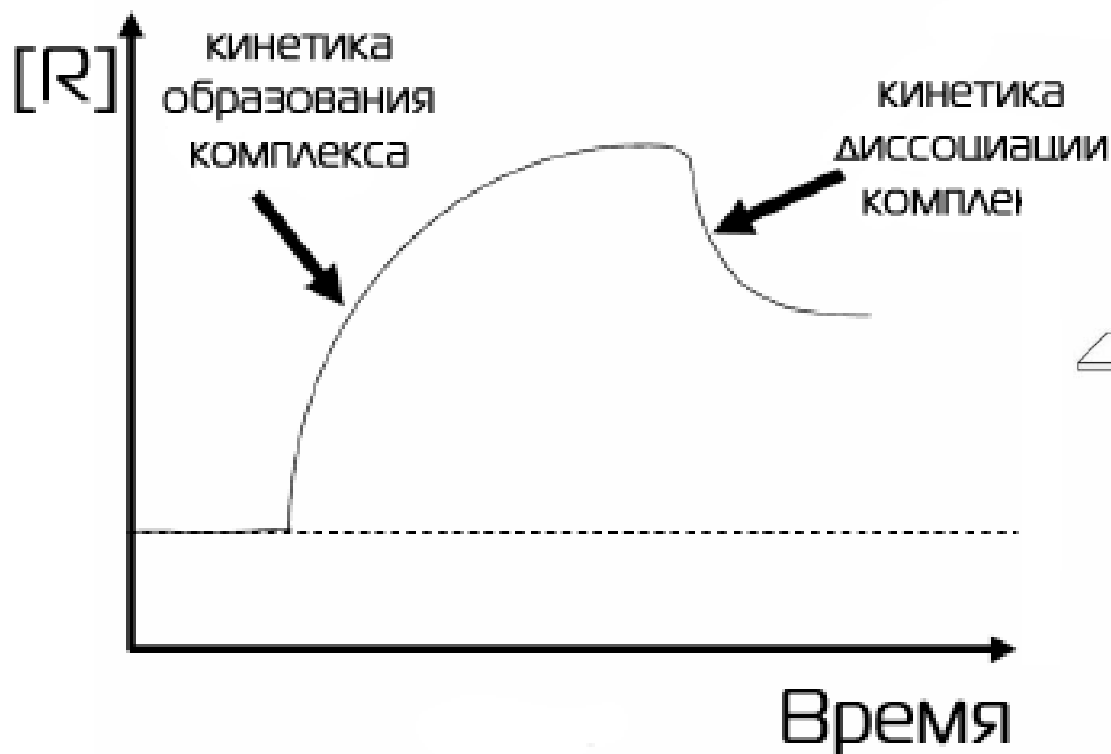


- Специфическим связыванием считают тогда, когда значение K_d – ниже 1 мкМ.
- Антиген-антитело - K_d – 10^{-9} – 10^{-12} М.
- Лиганд-рецептор - K_d – 10^{-6} – 10^{-10} М

Кинетика процесса молекулярного узнавания



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

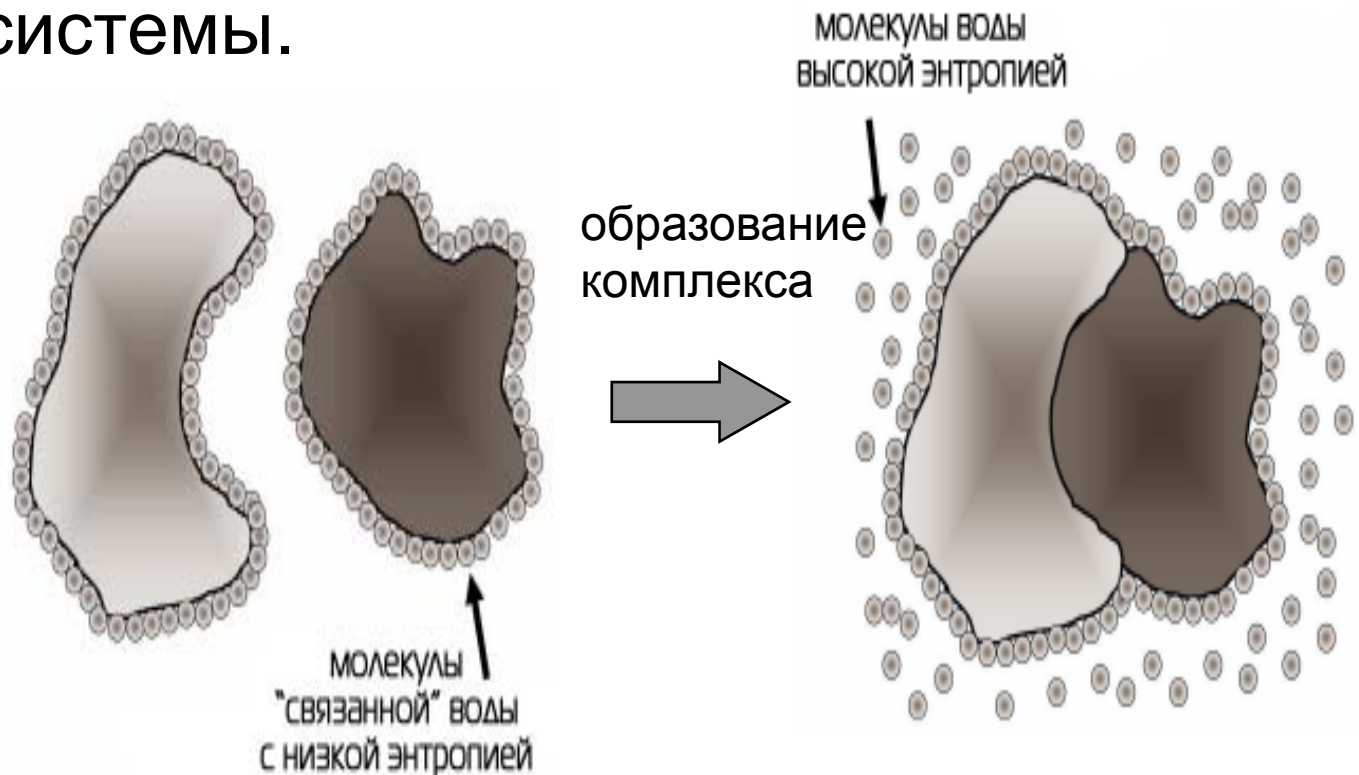


Термодинамика молекулярного узнавания

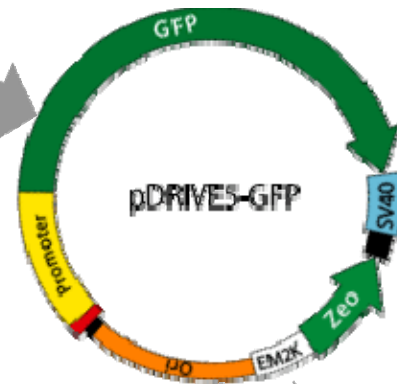


- Чаще всего движущей силой является увеличение энтропии системы.

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

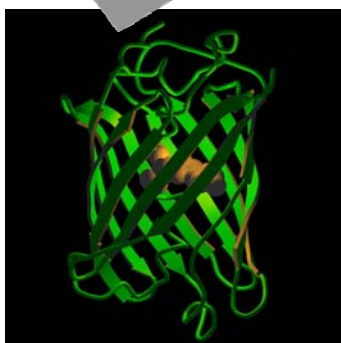


Белки – размножаемые «кирпичики»

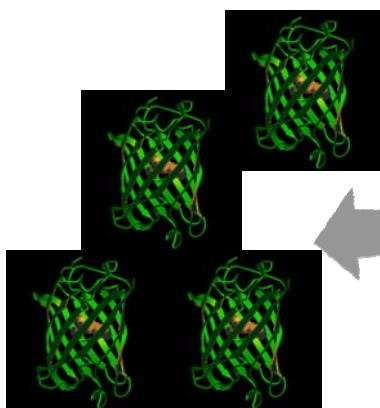


Выделение
гена белка

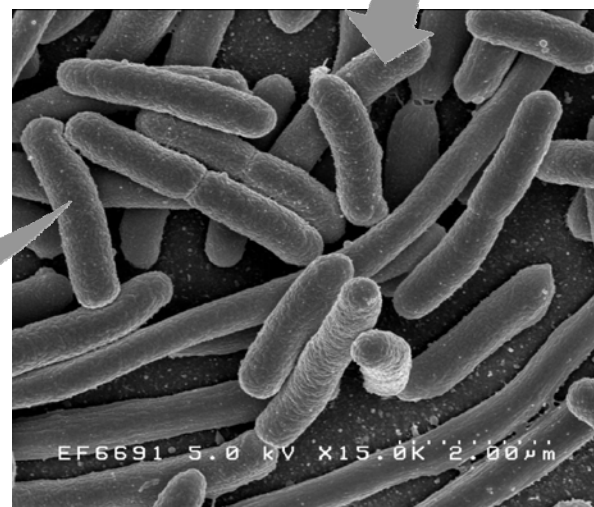
Трансформация бактерии



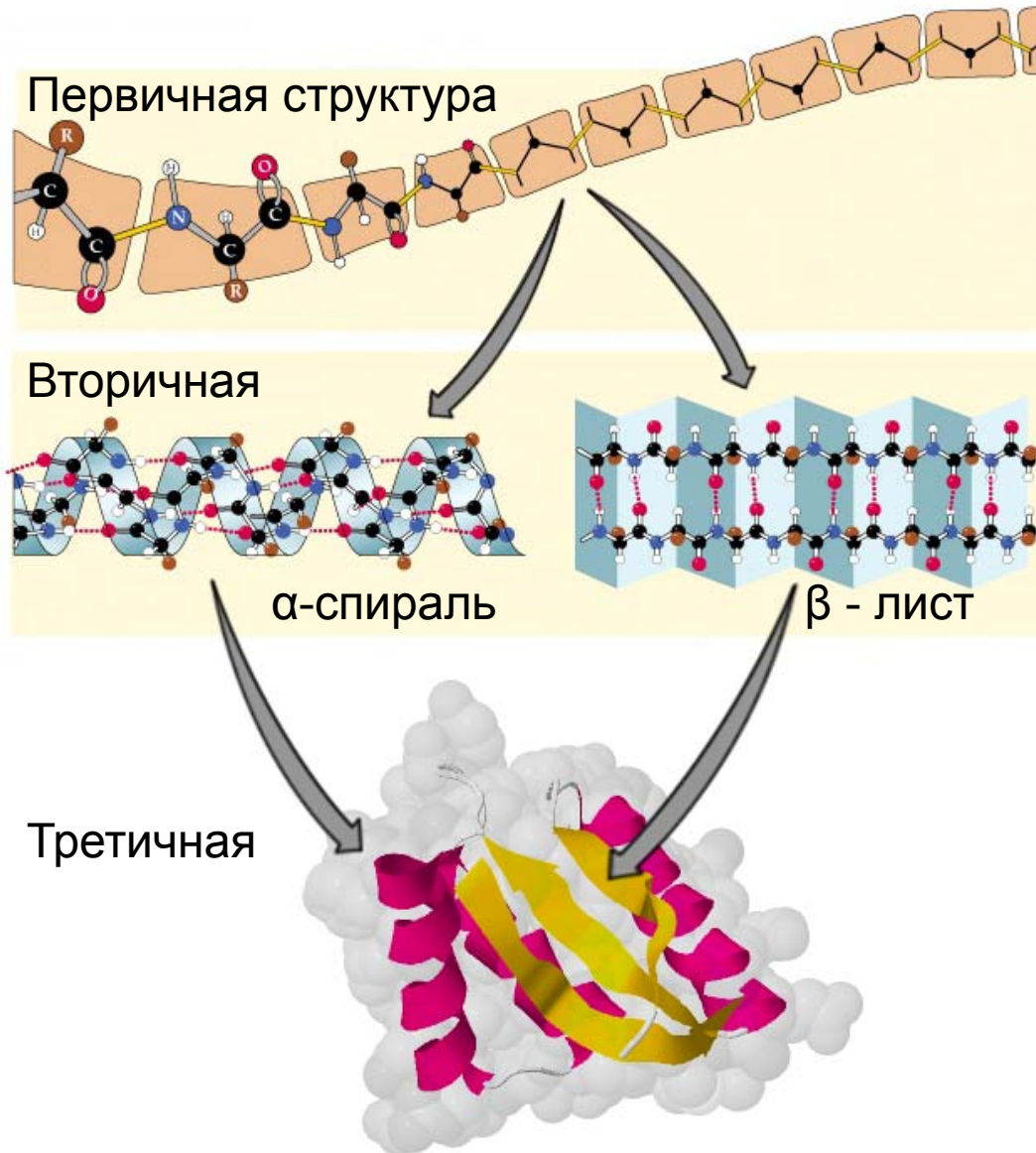
Белок с
интересующей нас
функцией



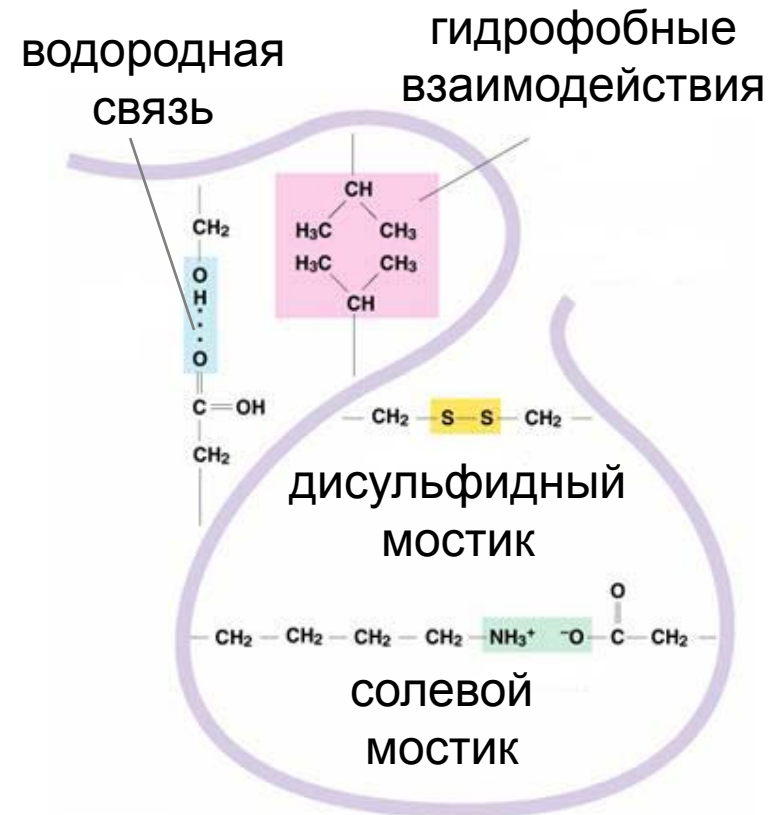
Наработка белка



Структура глобулярных белков



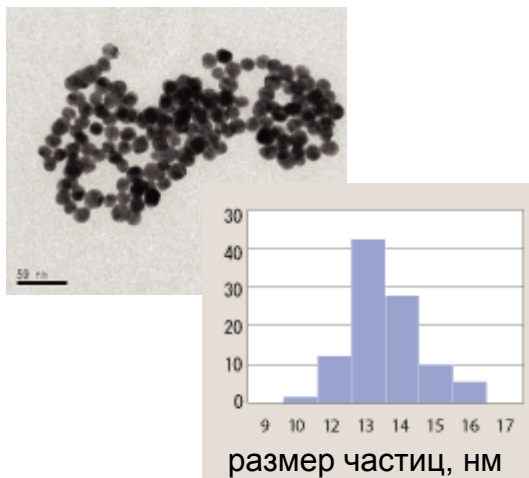
Взаимодействия между боковыми радикалами:



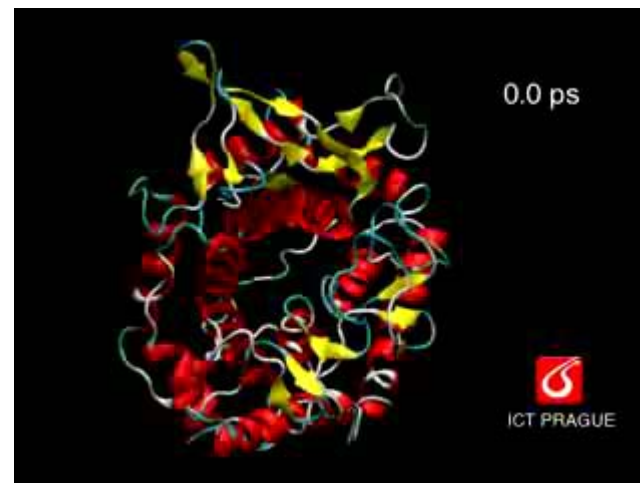
Белковые молекулы: идентичные и различающиеся «кирпичики» одновременно



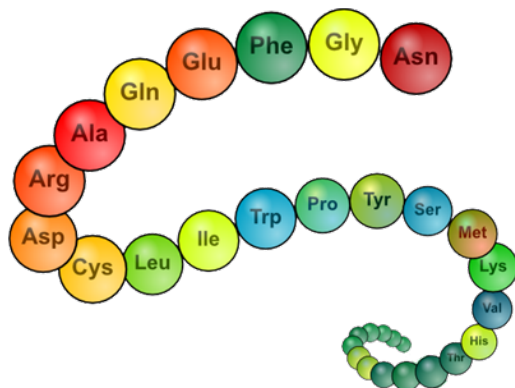
Золь золота: полидисперсность



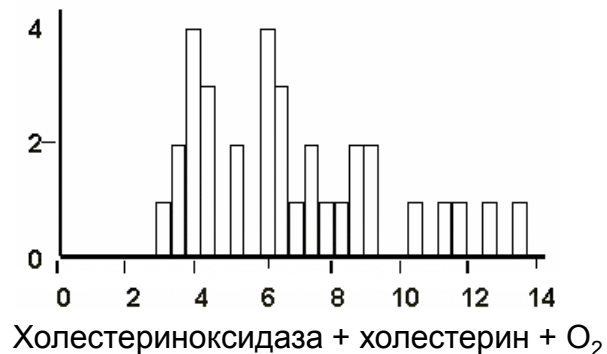
Динамика белковой глобулы



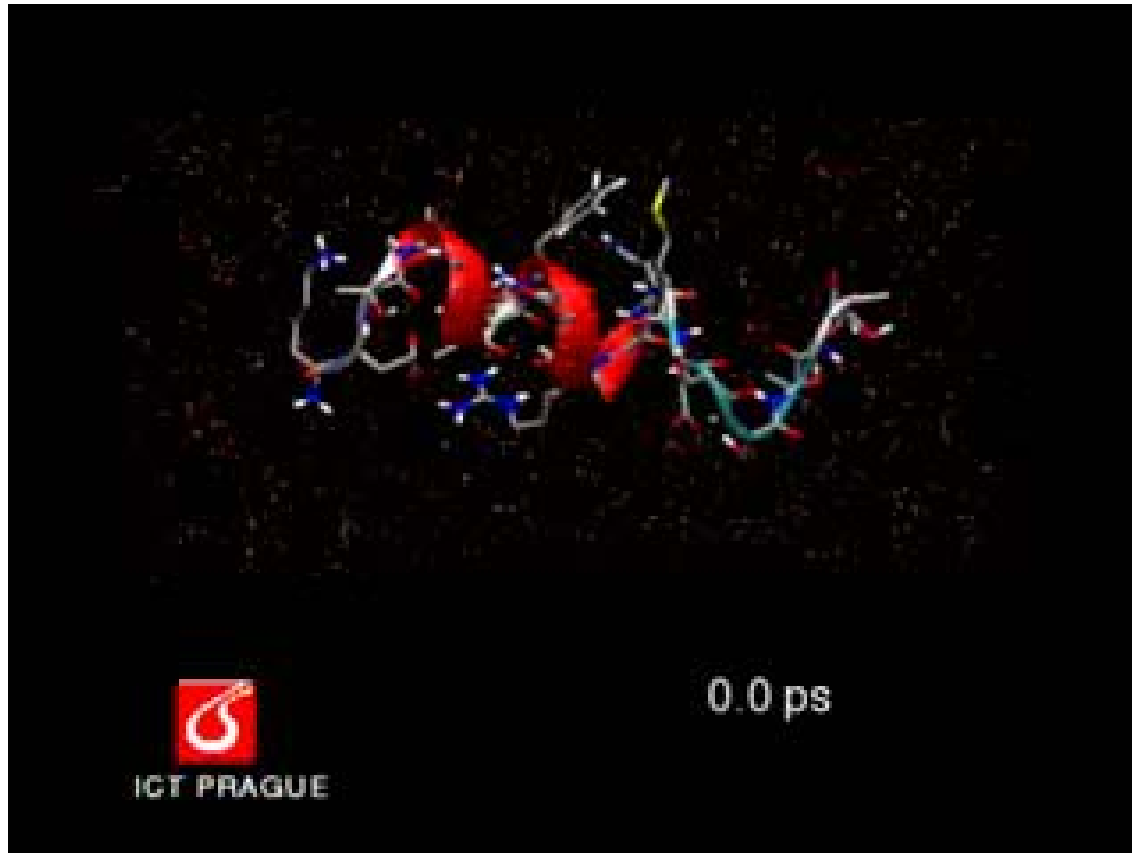
Препарат белка: все молекулы имеют одинаковую первичную последовательность



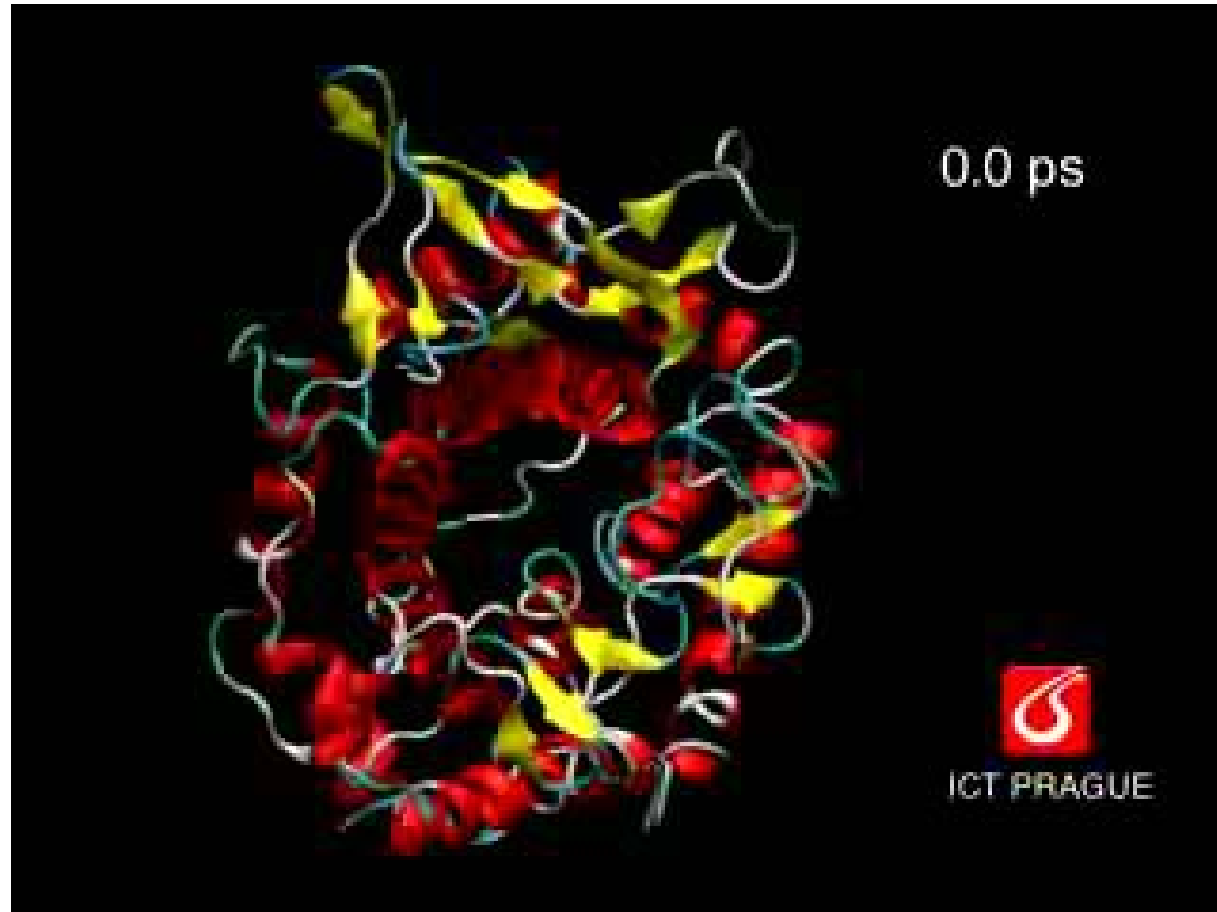
Активность единичных молекул фермента варьируется во времени и от молекулы к молекуле:



Динамика белковой глобулы (пептид)



Динамика белковой глобулы (ксиланаза)



Белки – настраиваемые «кирпичики»

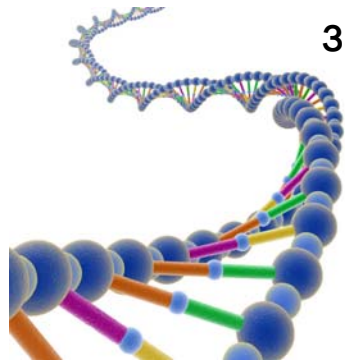
Мутантные белки



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



белок

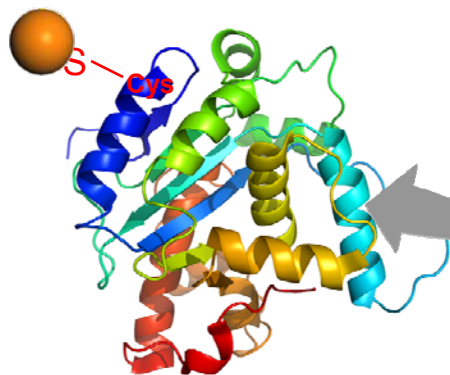
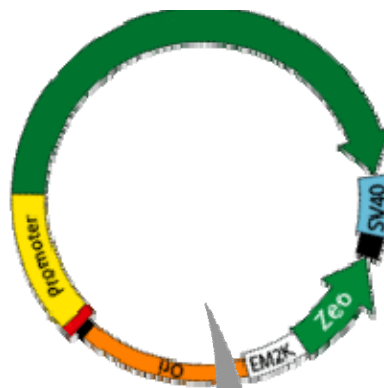


ген белка (ДНК)

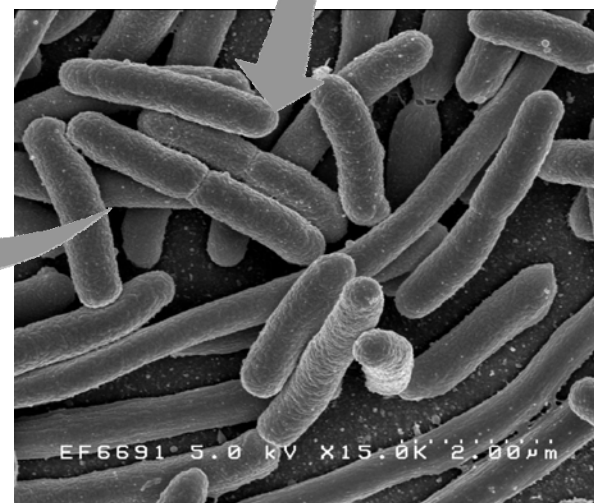
замена 1 триплета

- AAC

+ TGT



мутантный белок



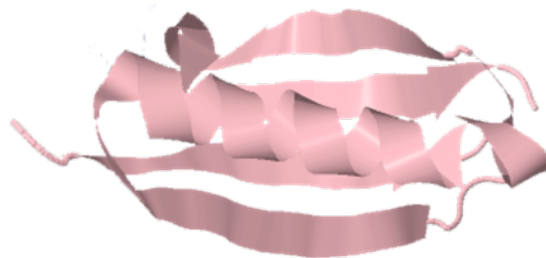
Химерные белки



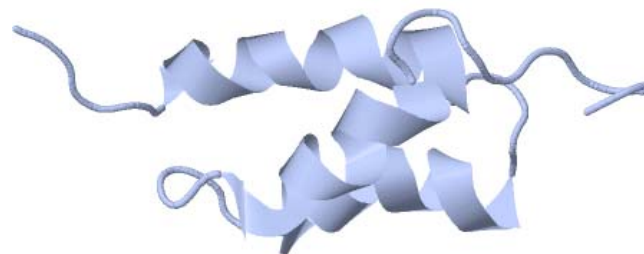
Иммуноглобулин-связывающие белки



Белок G из
Streptococcus sp.



Белок L из
Peptostreptococcus magnus



Белок A из
Staphylococcus aureus



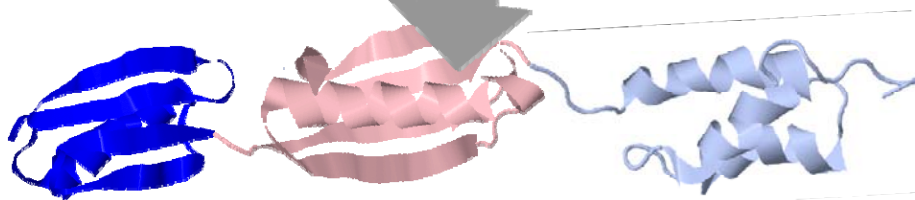
+



+

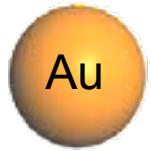


=



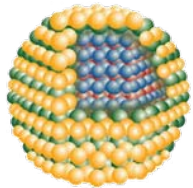
Химерный белок A/G/L

Конъюгация белков с неорганическими нанобъектами



Au

Золотые наночастицы: SH-группа аминокислоты цистеина



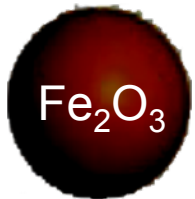
Наночастицы CdSe, CdTe, CdS и ZnS (квантовые точки):

- 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

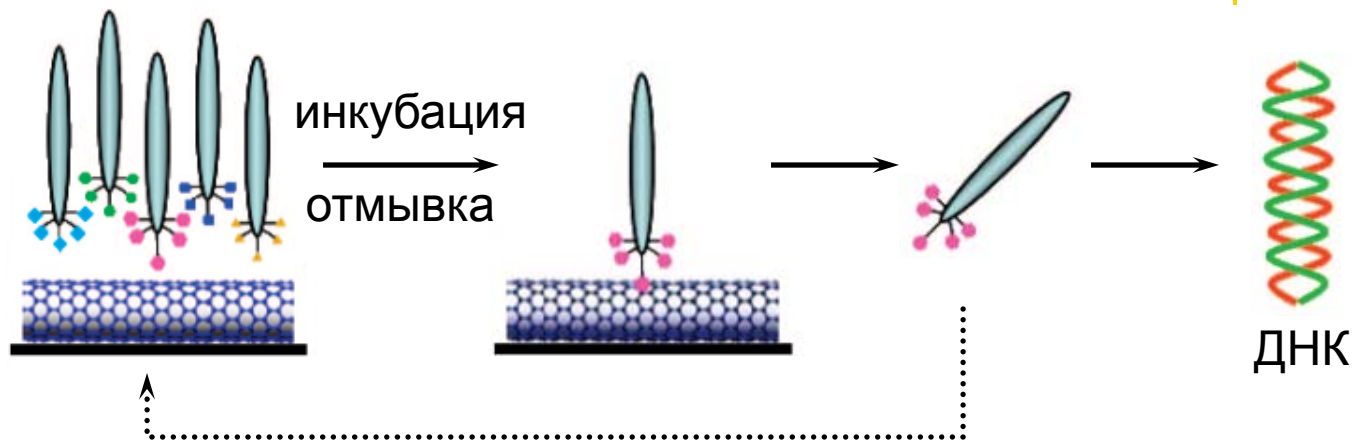
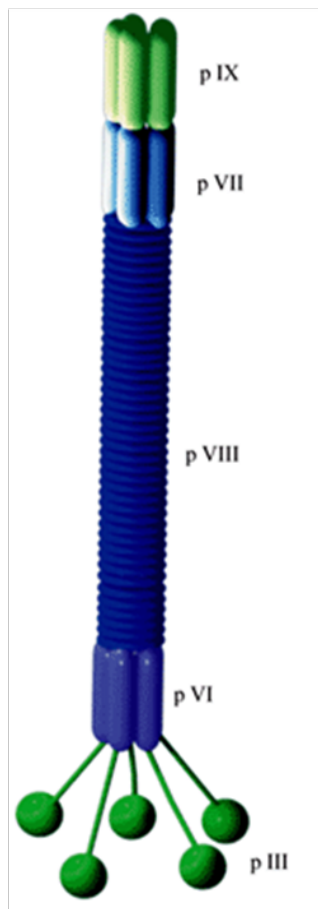


Fe₂O₃

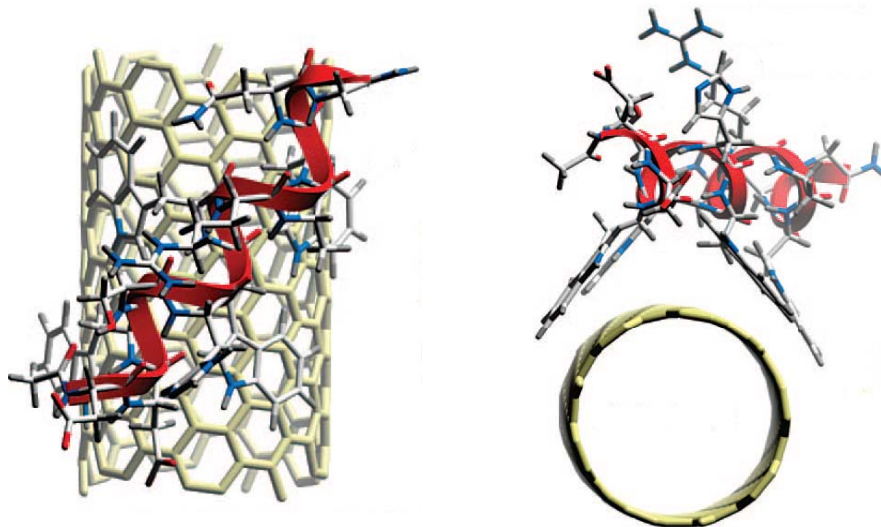
- Наночастицы Fe₂O₃
пептид Arg-Arg-Thr-Lys-His-His-Val-Asn



Скриннинг пептидов с помощью фаговых библиотек на примере SWNT



Семество пептидов, связывающихся с одностенными нанотрубками: Ser-__-Trp-Trp-__-__-Trp



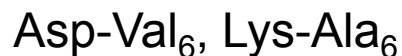
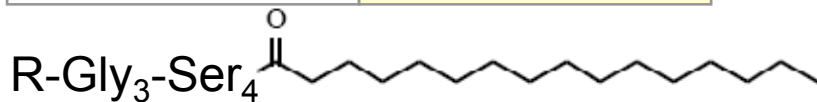
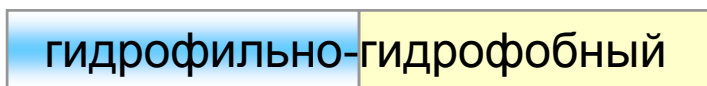
Бактериофаг M13

Пептидные наноструктуры

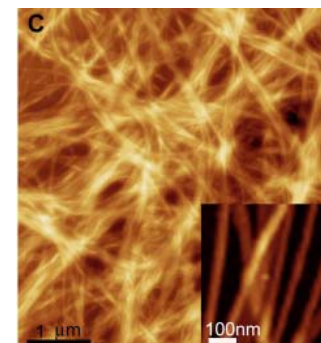
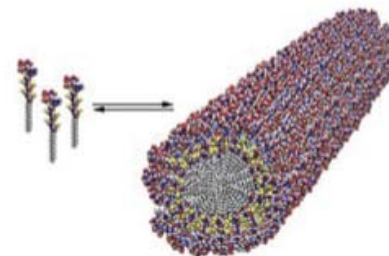
Молекулярное «Lego»



«ПАВ»



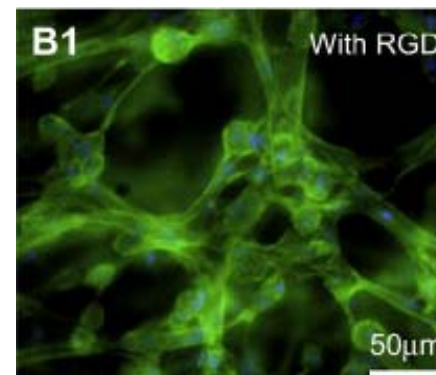
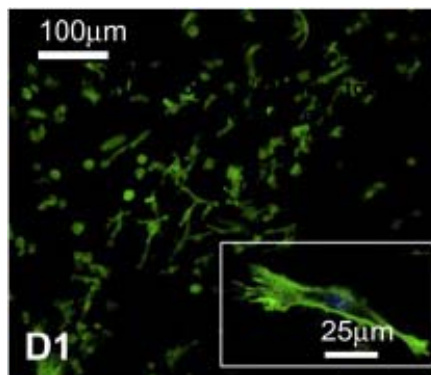
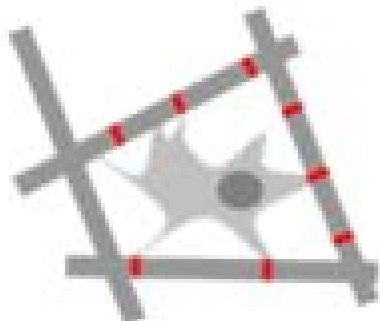
Нанофибриллы



Применение:

Биоразлагаемый каркас для выращивания мышечной или костной ткани

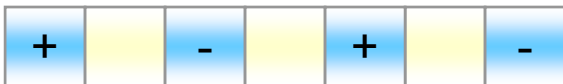
R = пептид Arg-Gly-Asp (+ Ser с фосфатной группой)



Пептидные наноструктуры

Молекулярное «Lego»

Ионные самокомплементарные пептиды



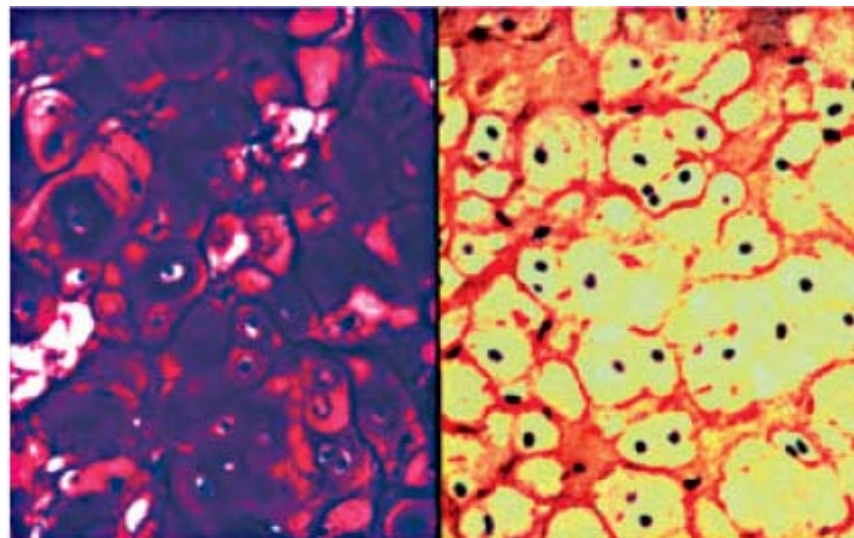
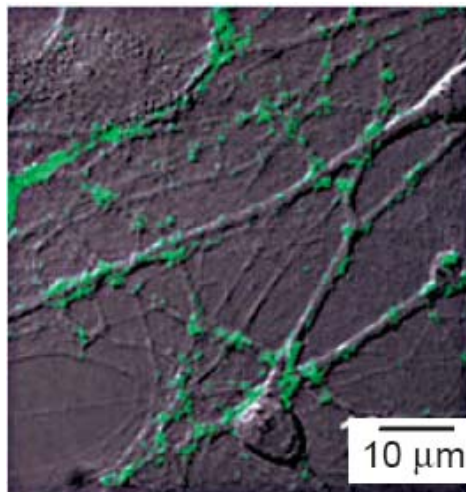
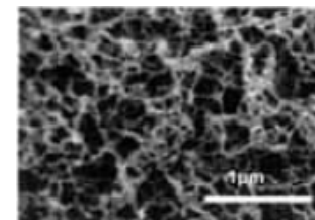
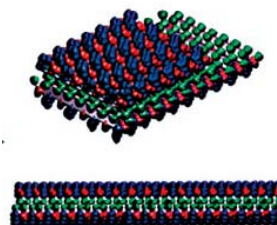
$(\text{Arg-Ala-Asp-Ala})_4$,
 $(\text{Lys-Leu-Asp-Leu})_3$

Применение:

Биоразлагаемый каркас для выращивания нейронов или хрящевой ткани



бислои, каркасные гидрогели

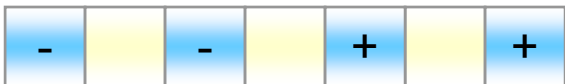


Пептидные наноструктуры



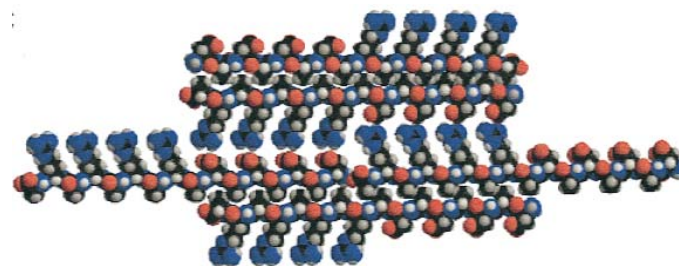
Молекулярное «Lego»

Ионные самокомплементарные пептиды



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

β-амилоидные фибриллы

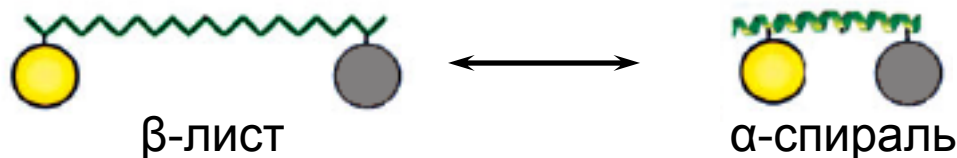


При повышении температуры или pH происходит обратимый переход в α-спиральную конформацию:



Применение:

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



Пептидные наноструктуры

Молекулярное «Lego»

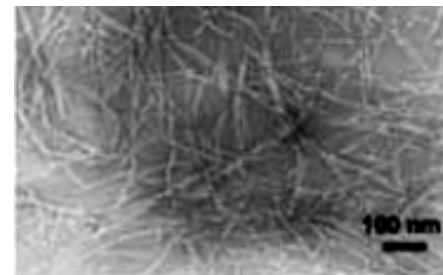


Амилоидные пептиды



Asn-Phe-Gly-Ser-Val-Gln

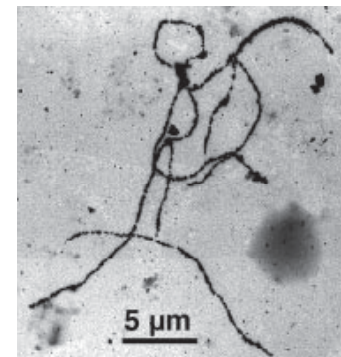
β -амилоидные фибриллы



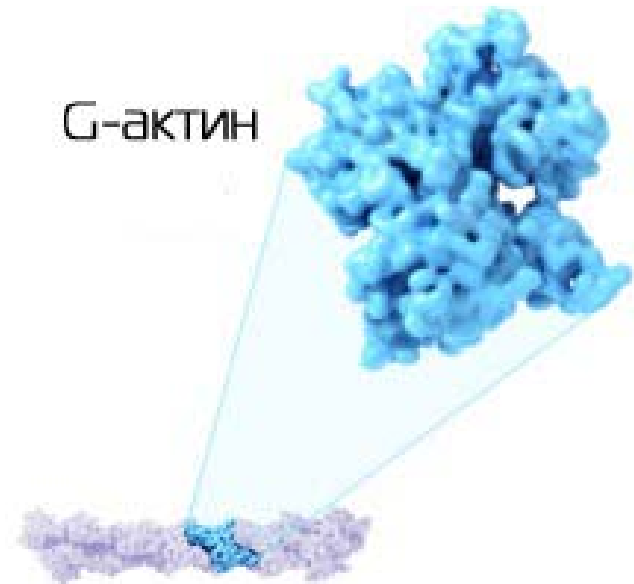
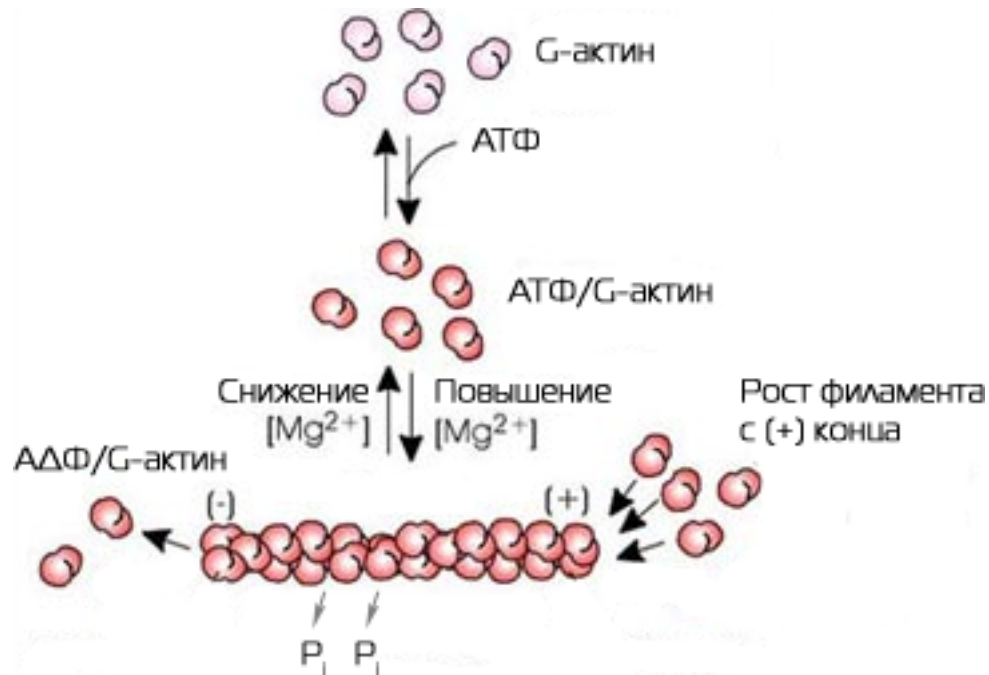
Амилоидные фибриллы обладают высокой устойчивостью к денатурирующим агентам и протеазам (ферментам, расщепляющим белки)

Применение:

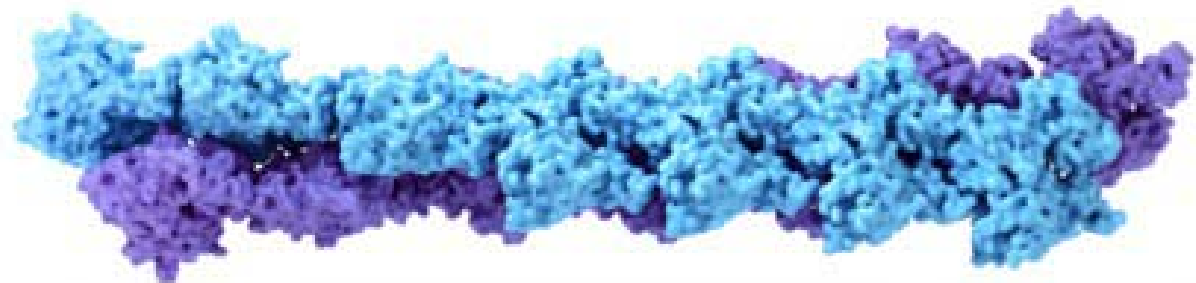
Введение остатков Cys (SH-группа) для конъюгации с золотыми наночастицами с последующим серебряным усилением приводит к образованию нанопроводов



Актиновые филаменты



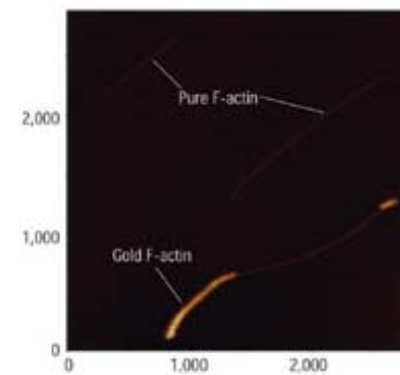
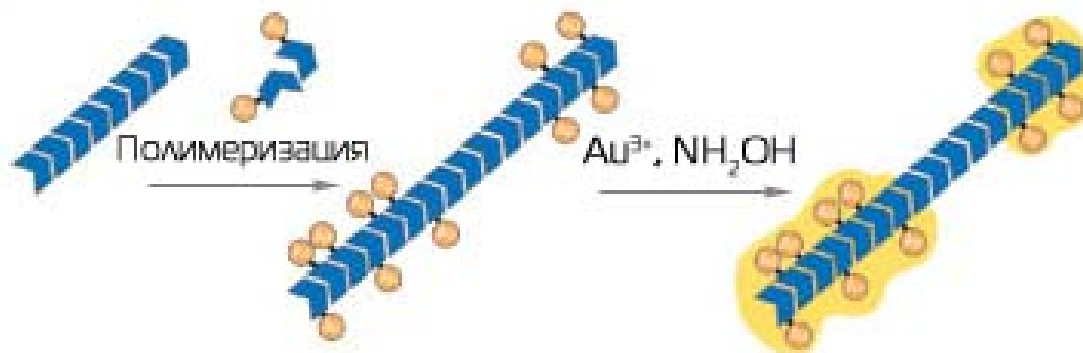
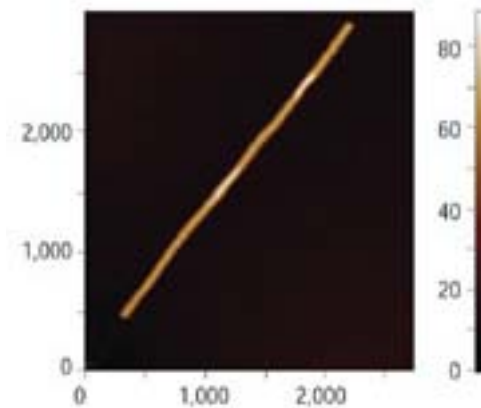
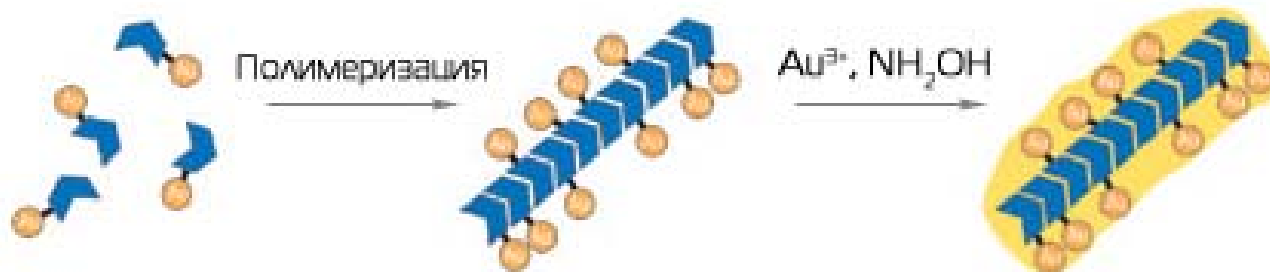
актиновый филамент (F-актин)



Нанопровода на основе актиновых филаментов

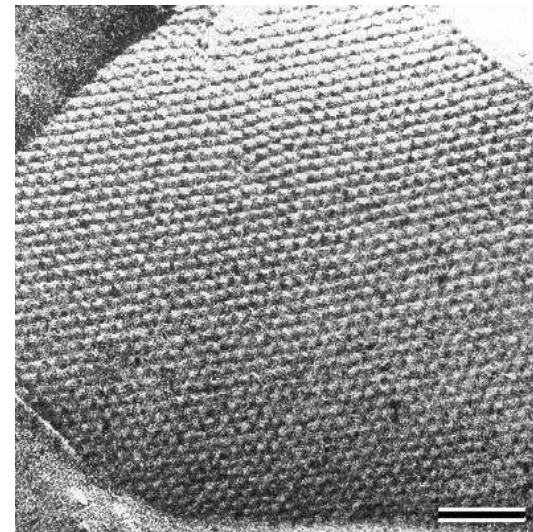
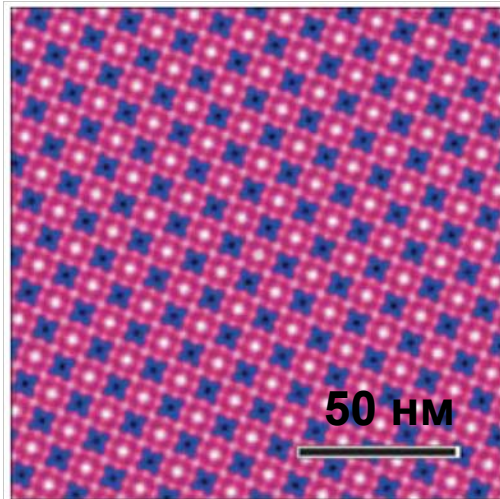
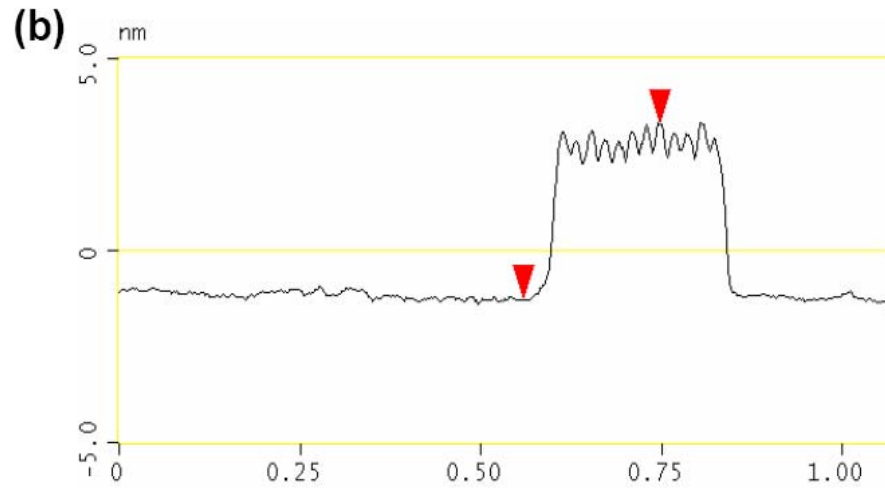
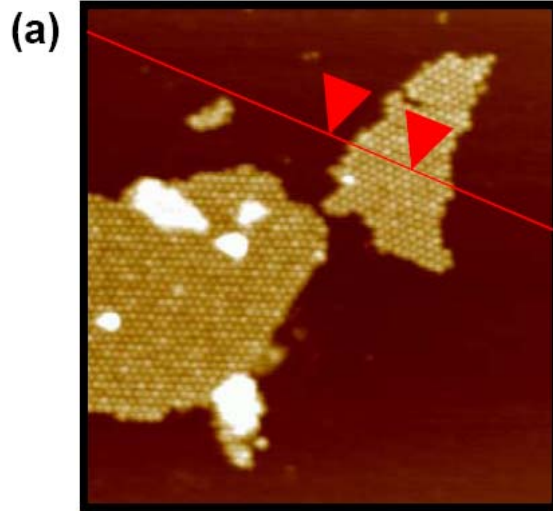


Использование конъюгатов актина с золотыми наночастицами



S-слои белков

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



Получение искусственных S-слоев



на Ленгмюровских липидных бислоях



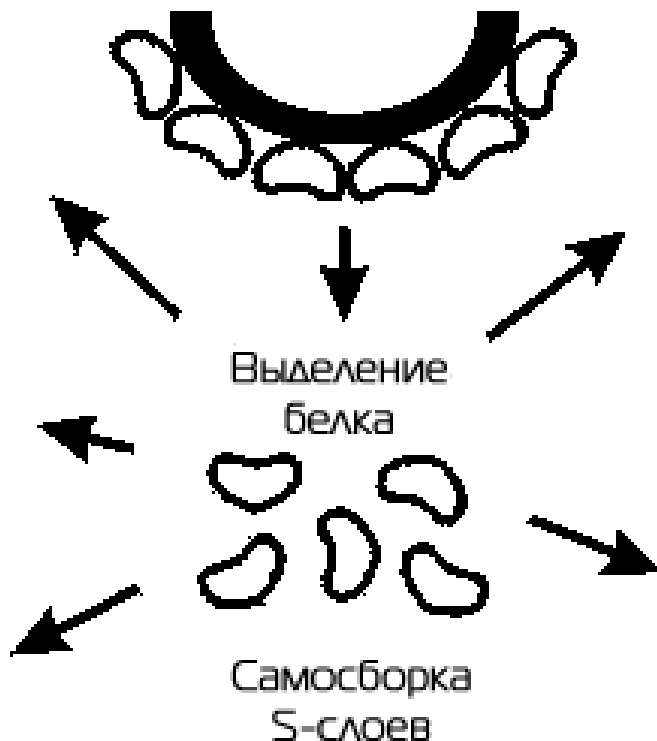
(a) в объеме раствора



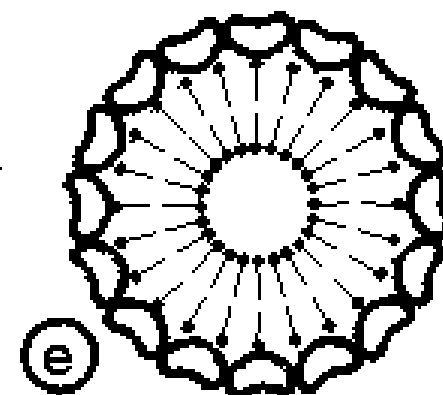
(b) на границе ж.-газ



(c) на границе ж.-тв.



(d)



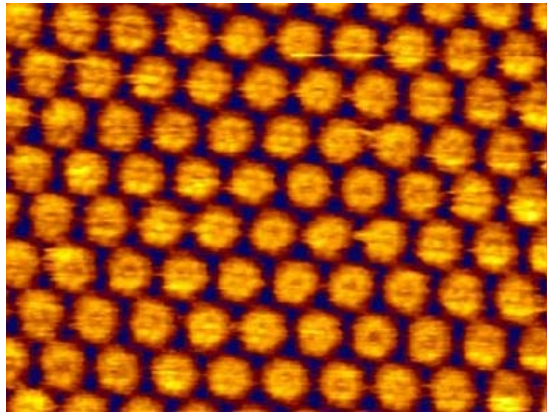
на поверхности мицел ПАВ

Полезные свойства S-слоев

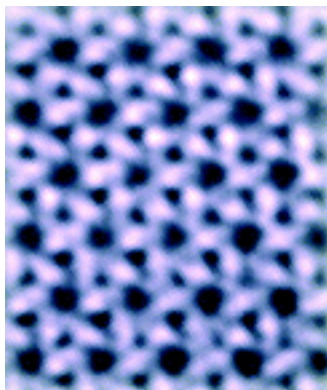


- **Формирование методом самосборки**
- **Высокая стабильность белков в составе S-слоев**
Например, мономеры бактериородопсина в растворе полностью денатурируют в течение суток. S-слои бактериородопсина выдерживают кратковременное кипячение (!)
- **Возможность формирования некоторыми белками регулярных 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**

Формирование упорядоченных двумерных массивов наночастиц при помощи S-слоев



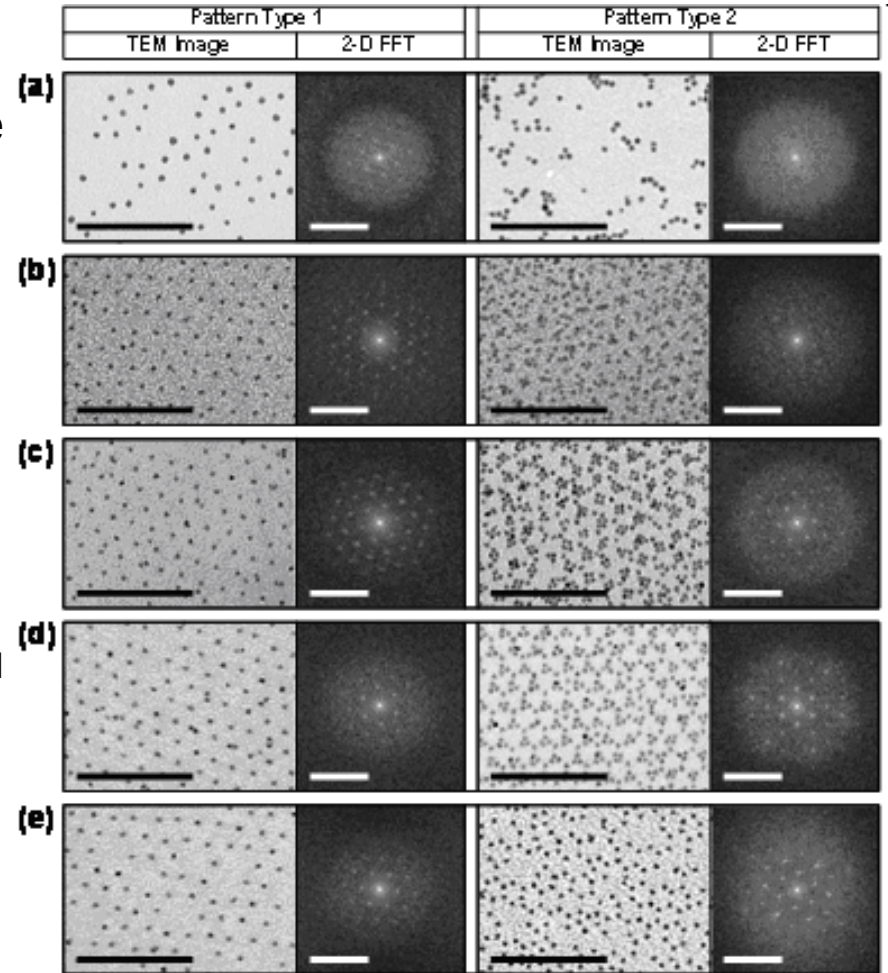
S-слой белка из *Deinococcus radiodurans*



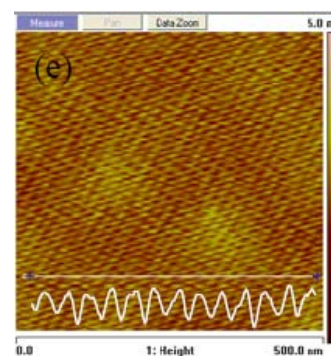
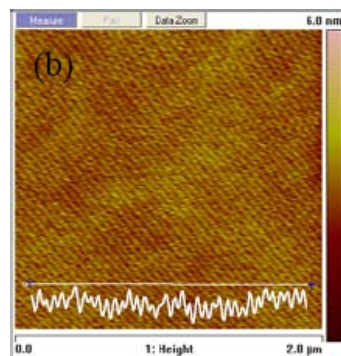
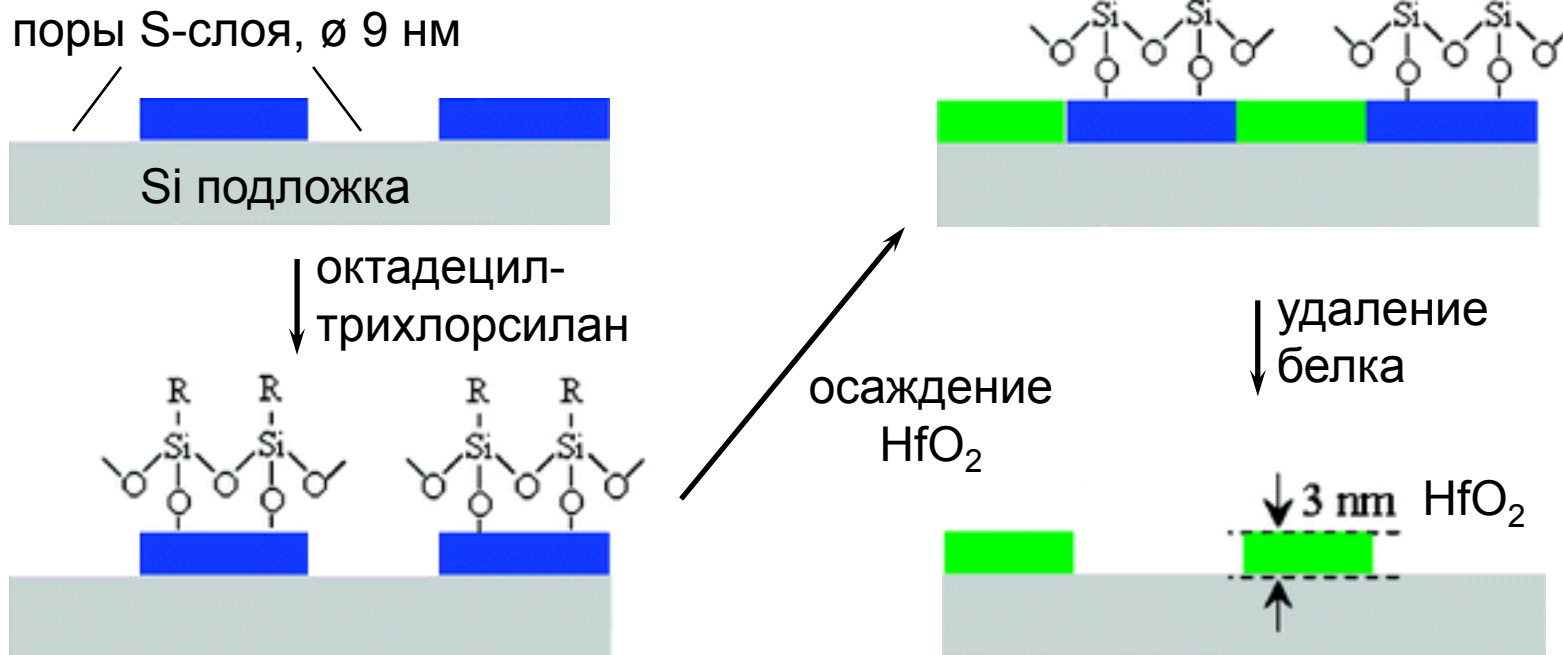
S-слой белка из *Sulfolobus acidocaldarius*

цитратные
Au нч

CdSe/ZnS
квантовые
точки с
различными
лигандами

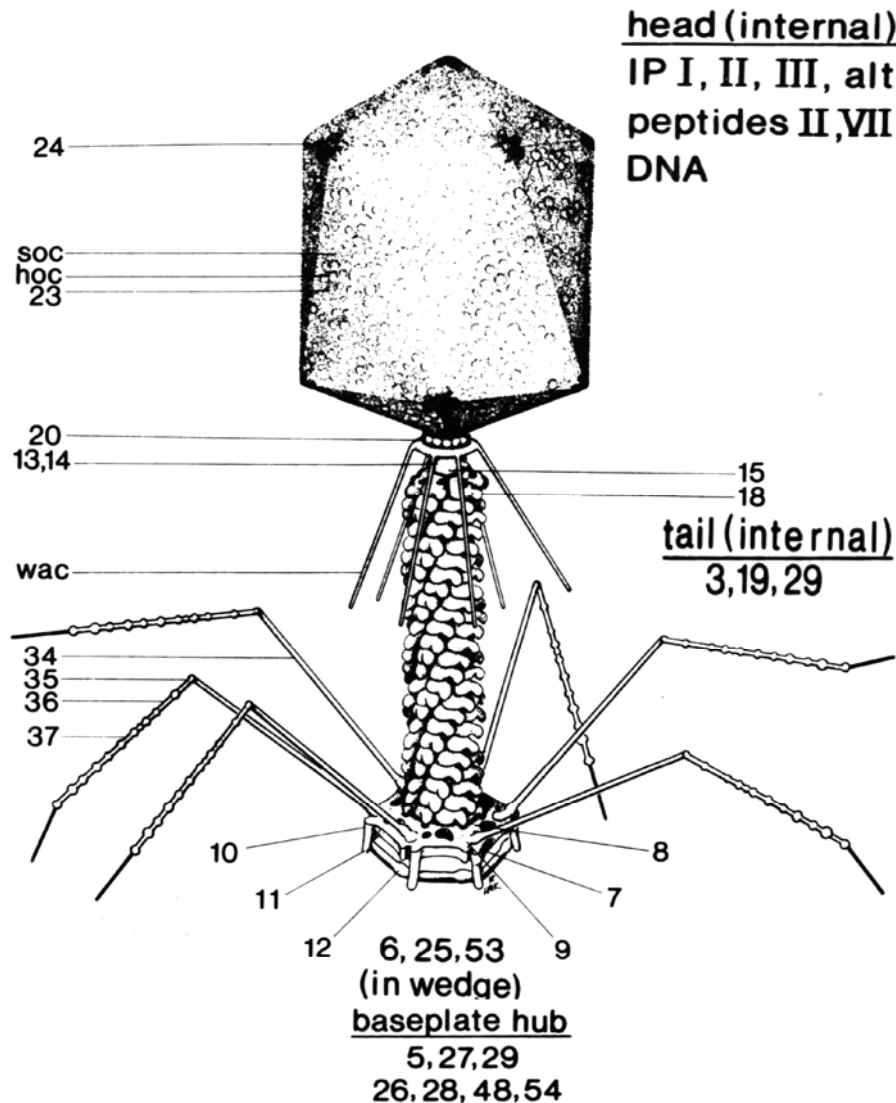


Формирование упорядоченных массивов полупроводников с использованием S-слоев



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

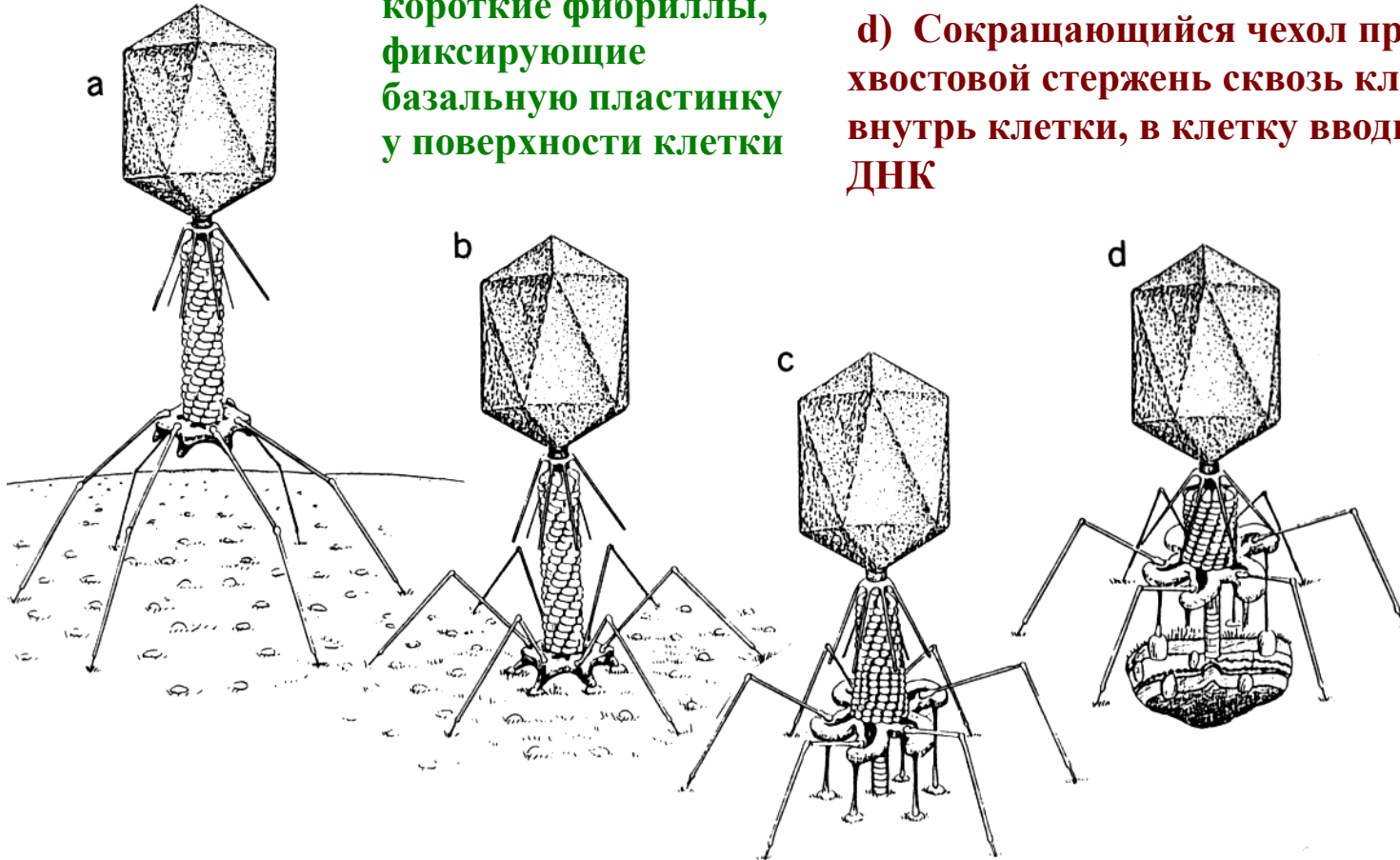


а) Длинные фибриллы
связались с
рецепторами на
клеточной стенке и
подтянули вирус.

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
внутри 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,*}

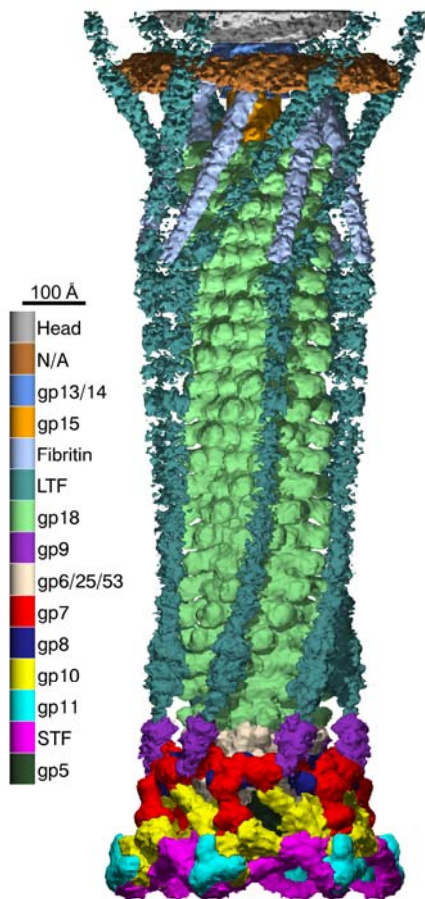
Сокращение хвоста фага T4

Хвост с растянутым чехлом

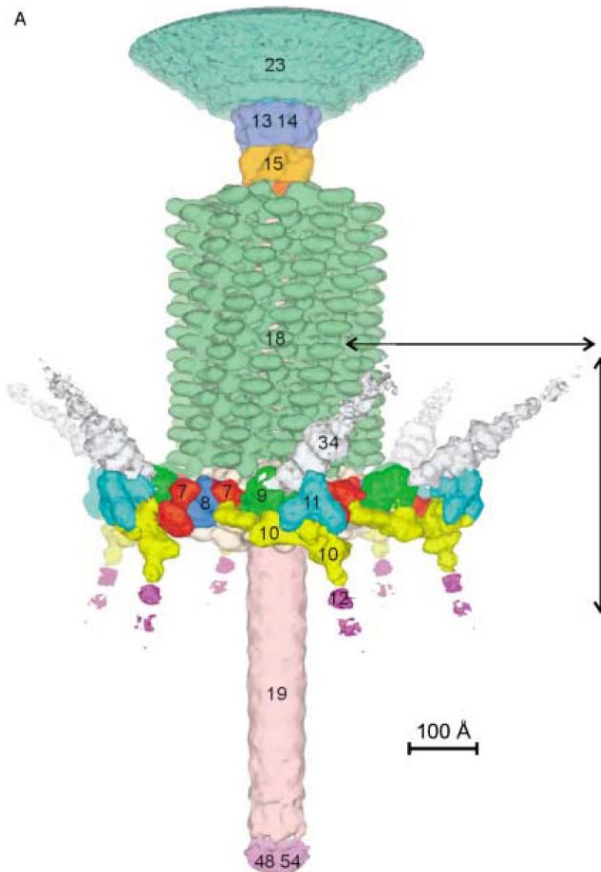
Высота 92,5 нм \varnothing 24 нм

Хвост с сокращенным чехлом

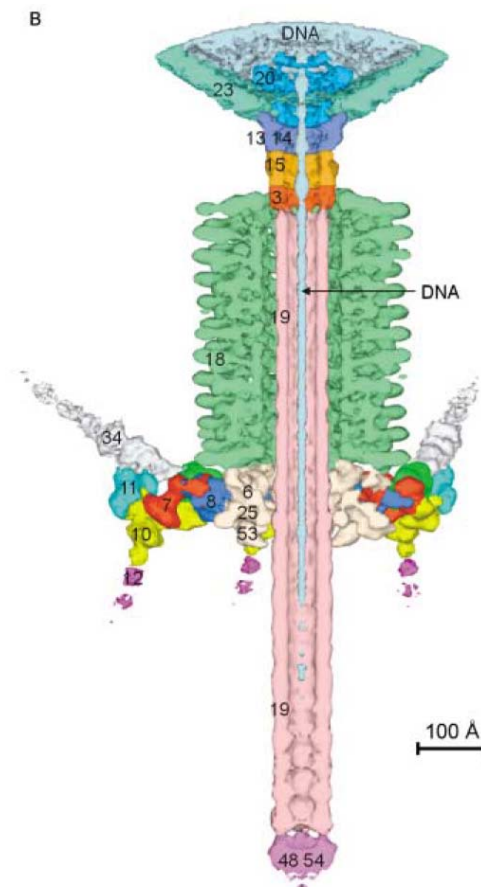
Высота 42 нм \varnothing 33 нм



1,5 нм



Внутренний диаметр

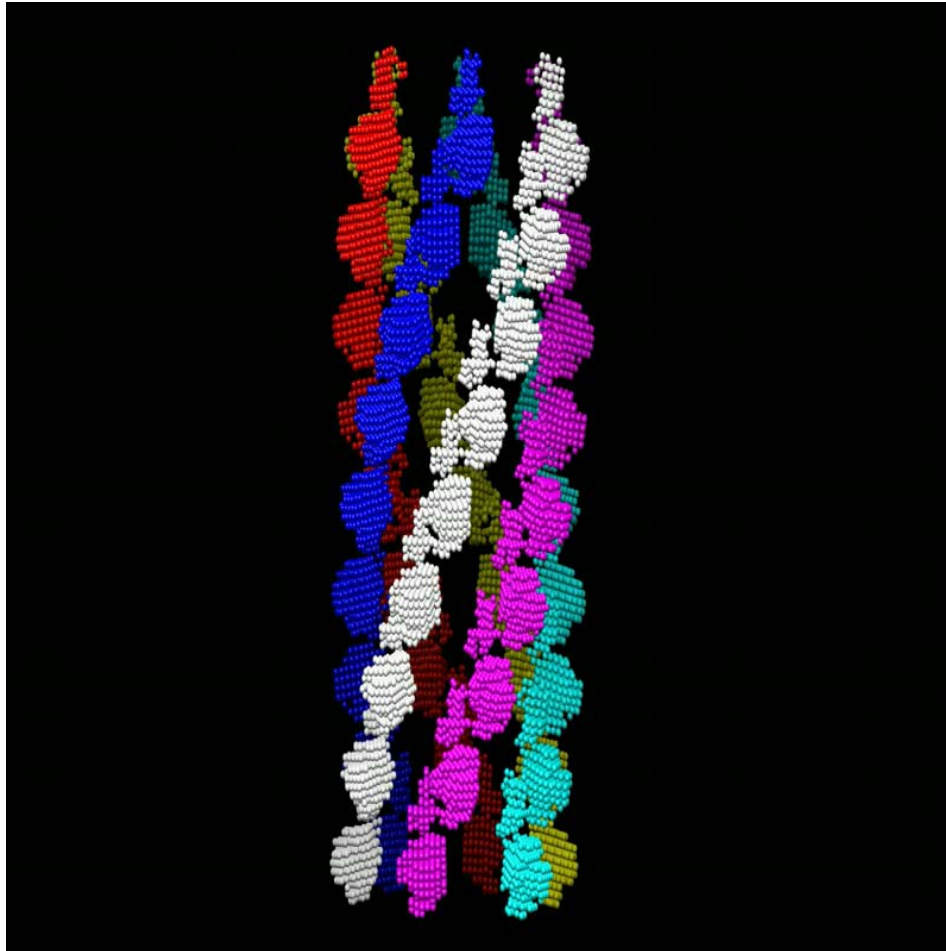


1,7 нм

Сокращение хвоста фага T4



The EMBO Journal (2009), 1–9 | © 2009 European Molecular Biology Organization | All Rights Reserved 0261-4189/09
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,*}

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

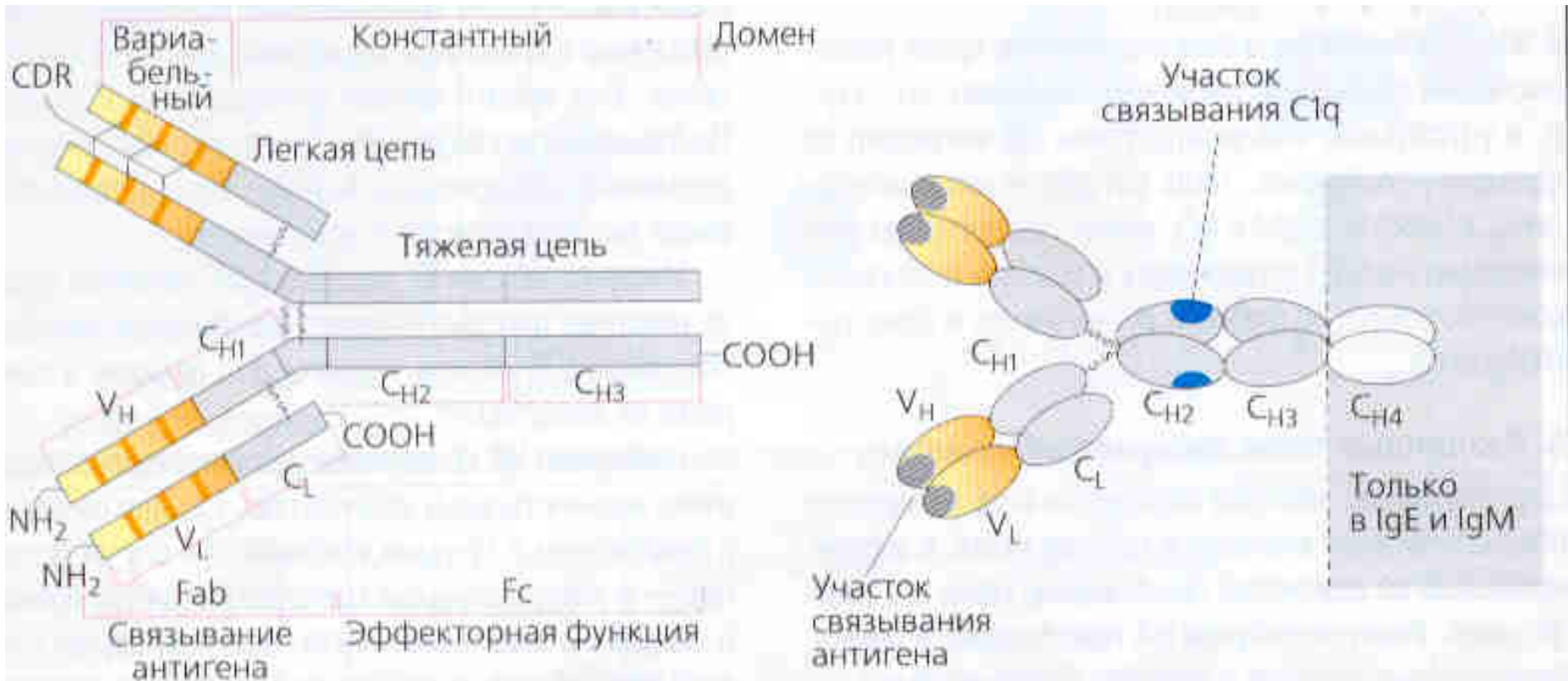


The EMBO Journal (2009), 1–9 | © 2009 European Molecular Biology Organization | All Rights Reserved 0261-4189/09
www.embojournal.org



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

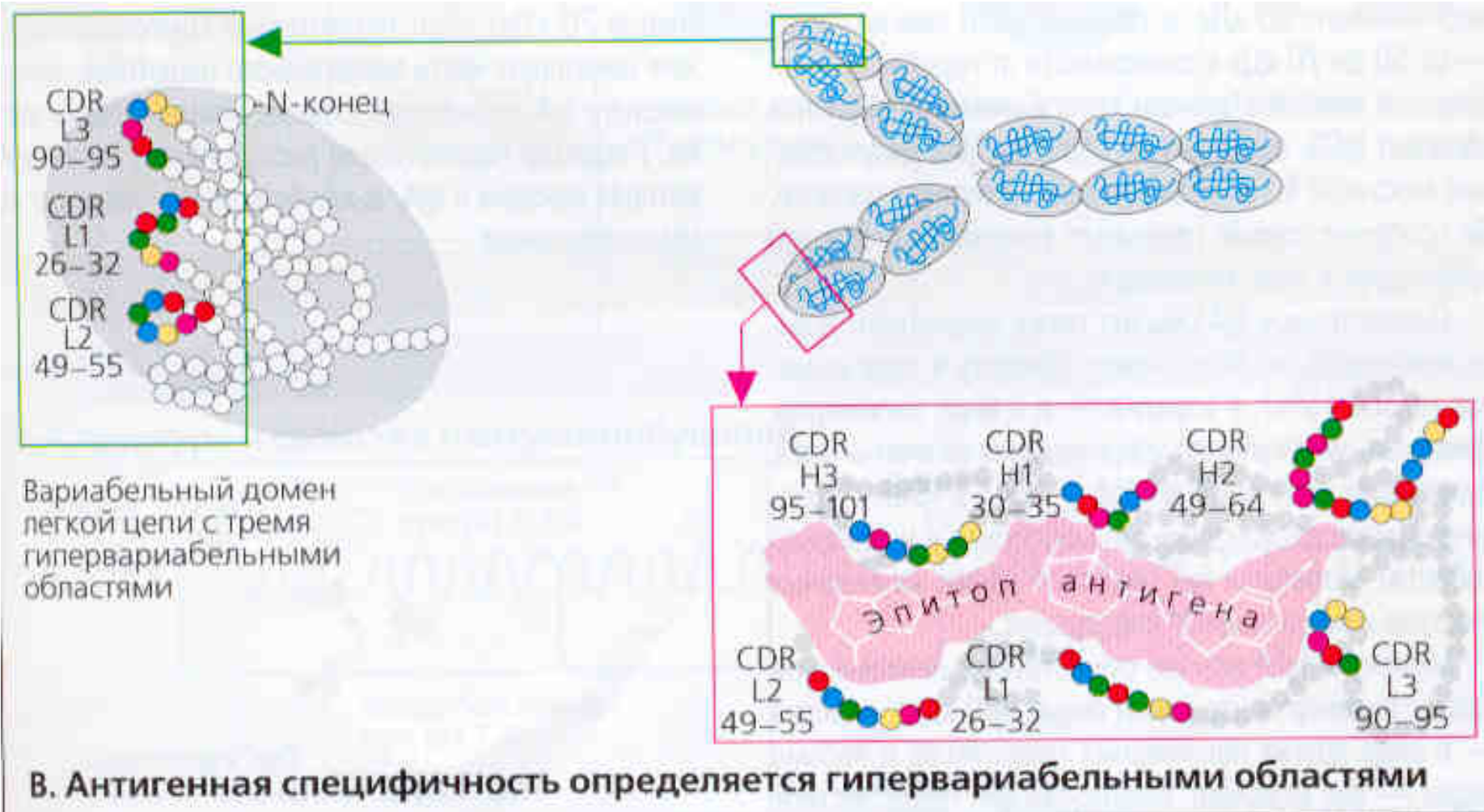


CDR = область, определяющая комплементарность
 Fab = антиген-связывающий фрагмент
 Fc = кристаллизирующийся фрагмент

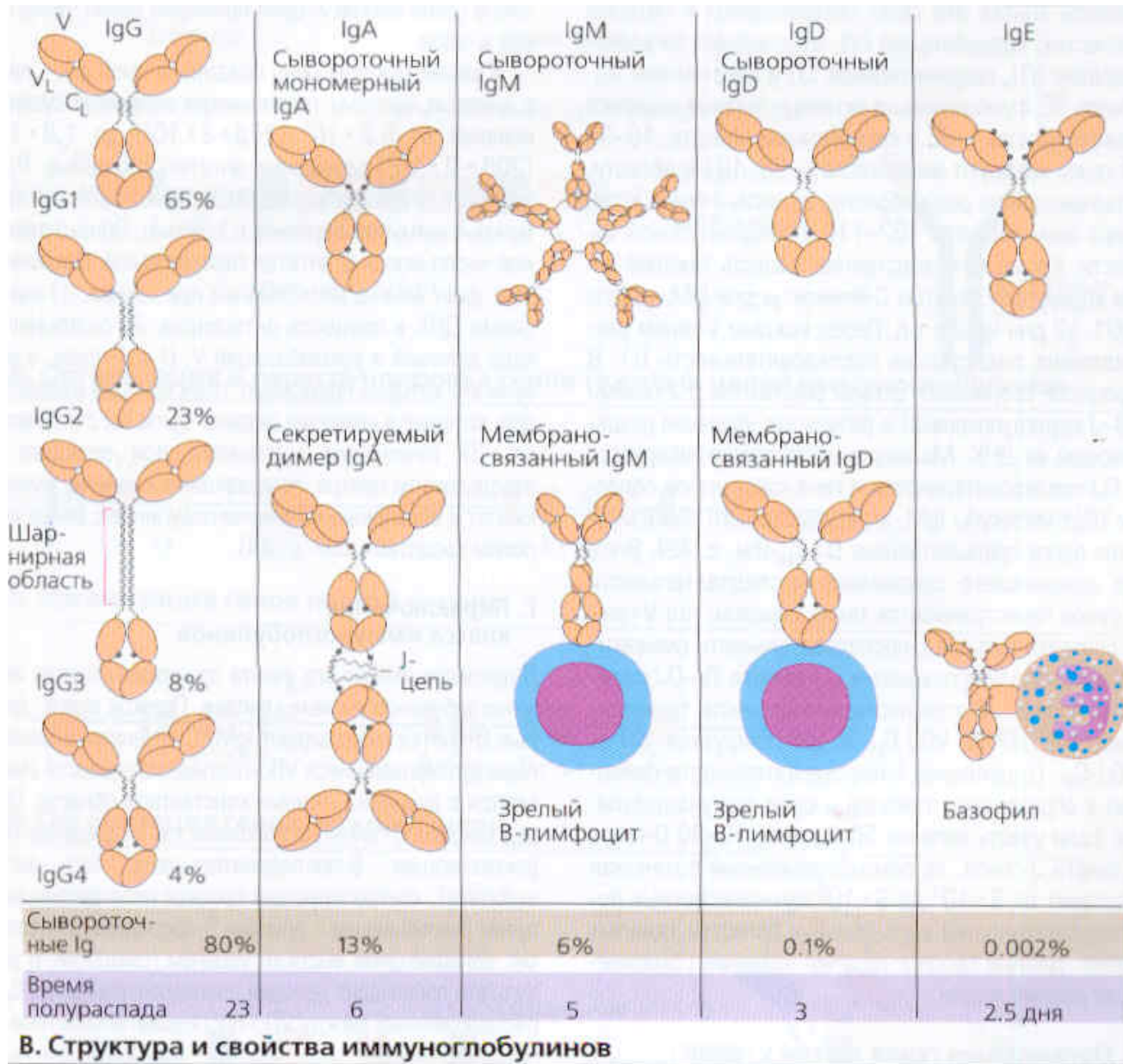
V_H = переменный домен тяжелой цепи
 V_L = переменный домен легкой цепи
 C_{H/L} = константный домен тяжелой/легкой цепи

А. Структура иммуноглобулинов

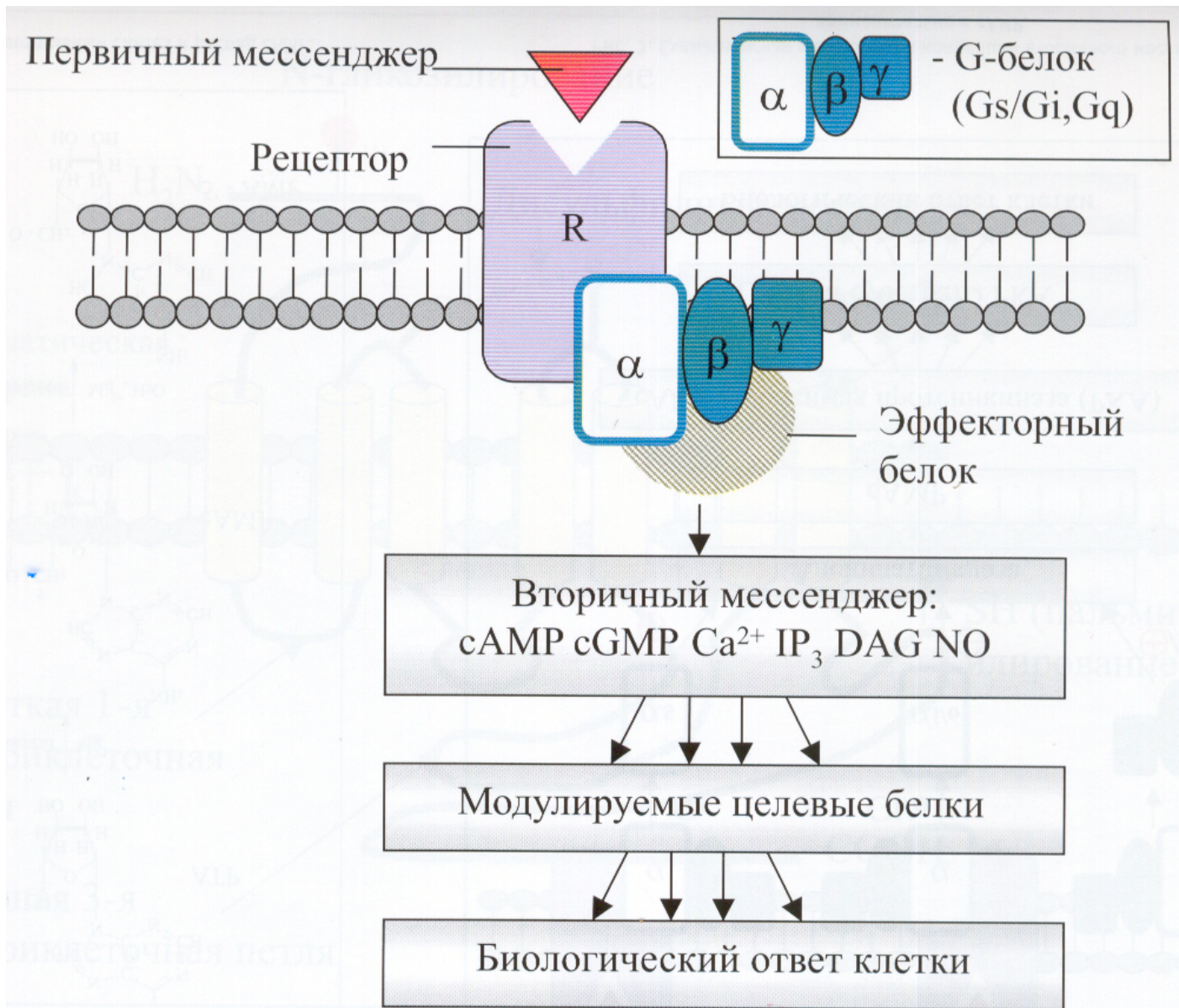
Антитела



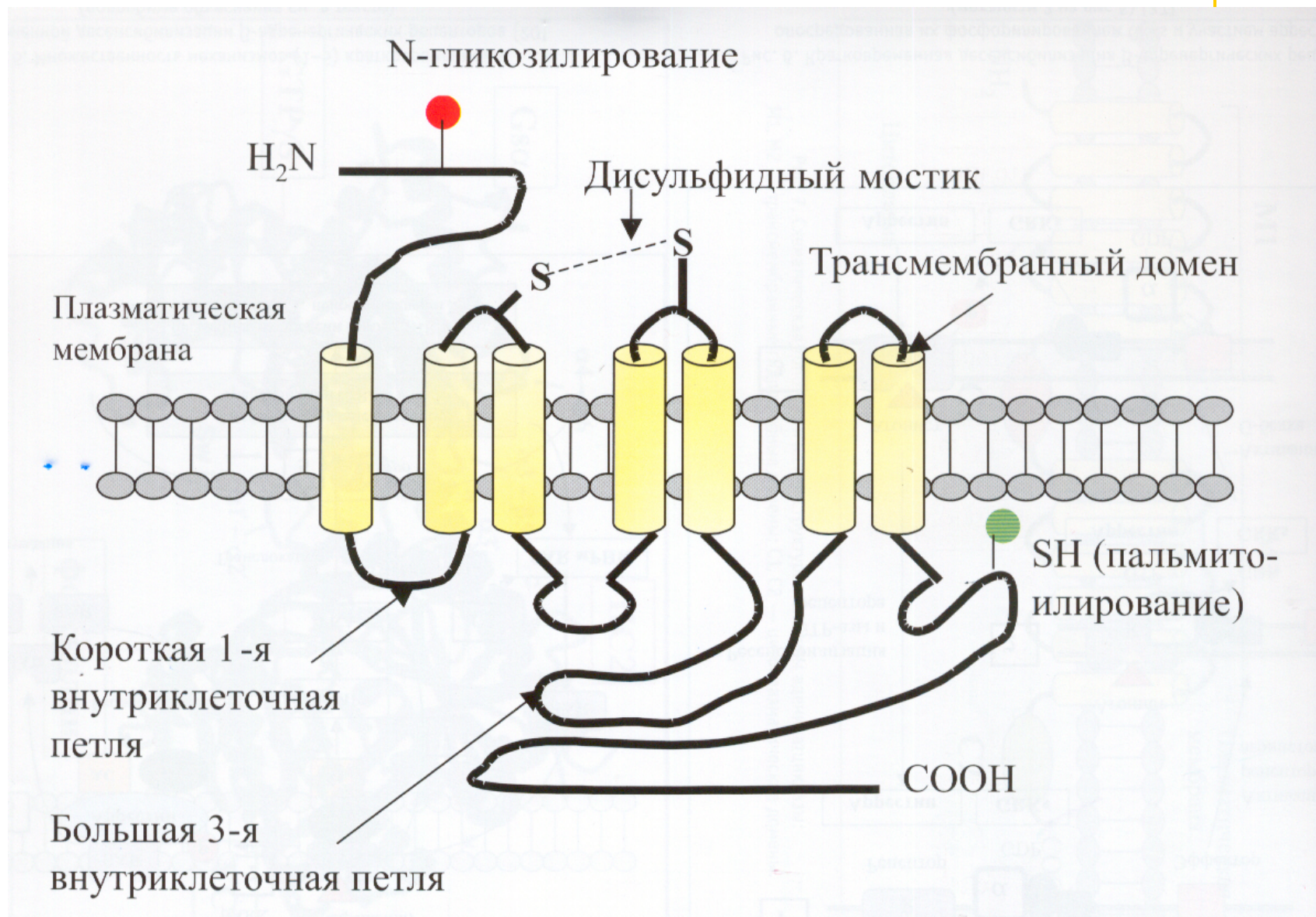
Антитела



Рецепторы



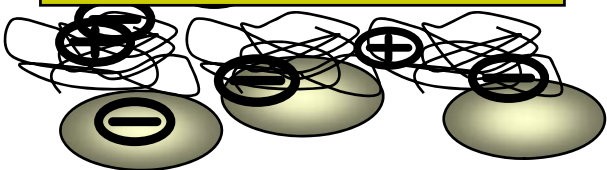
Рецепторы



Технология послойного нанесения полиэлектролитов (ПНП)

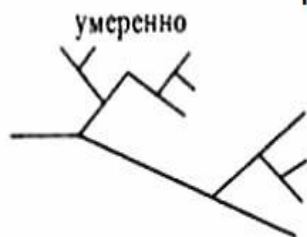


Типы полиэлектролитов

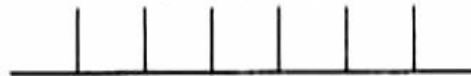


Линейные полиэлектролиты

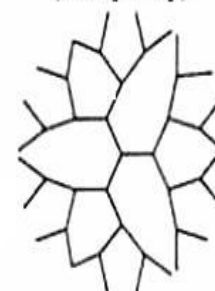
Разветвленные полиэлектролиты



гребнеобразный

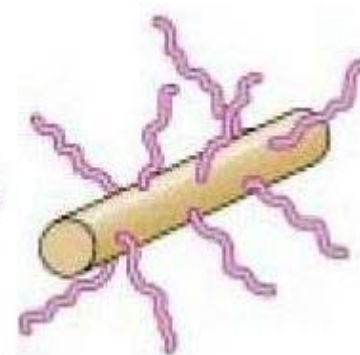
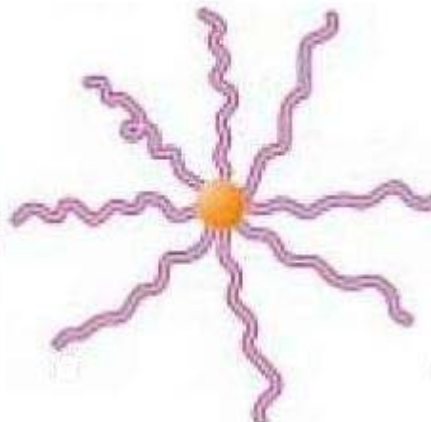
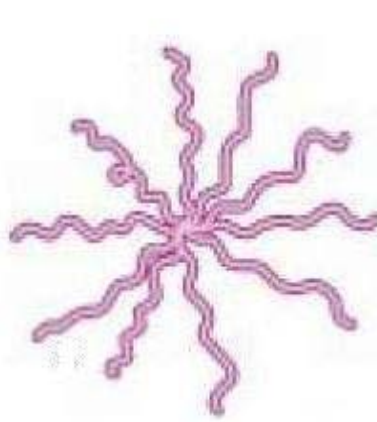


сверхразветвленный
(дендример)



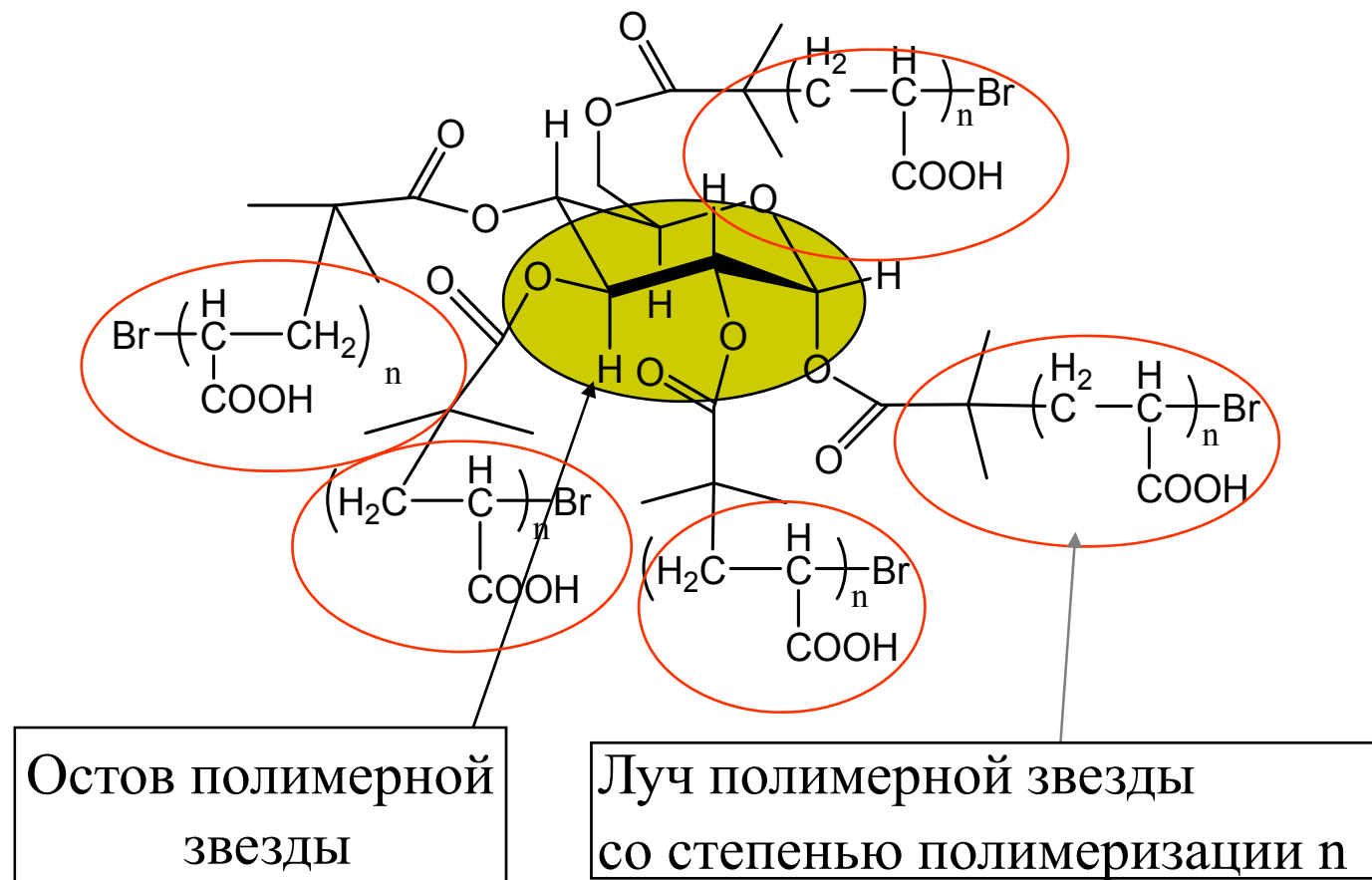
Полиэлектролиты нелинейной архитектуры

Полимерные звезды Сферические щетки Цилиндрические щетки





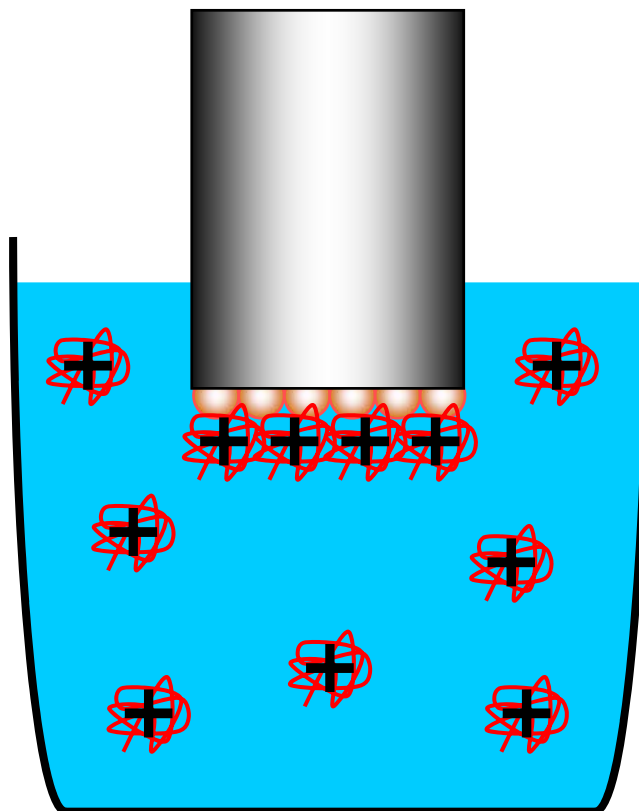
"Полимерная звезда"



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



графитовый электрод

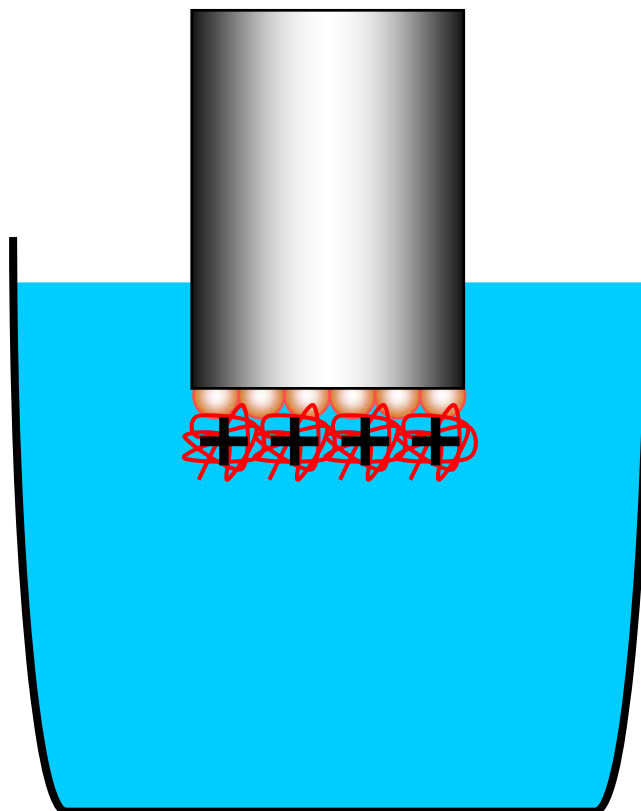


раствор
поликатиона

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



графитовый электрод

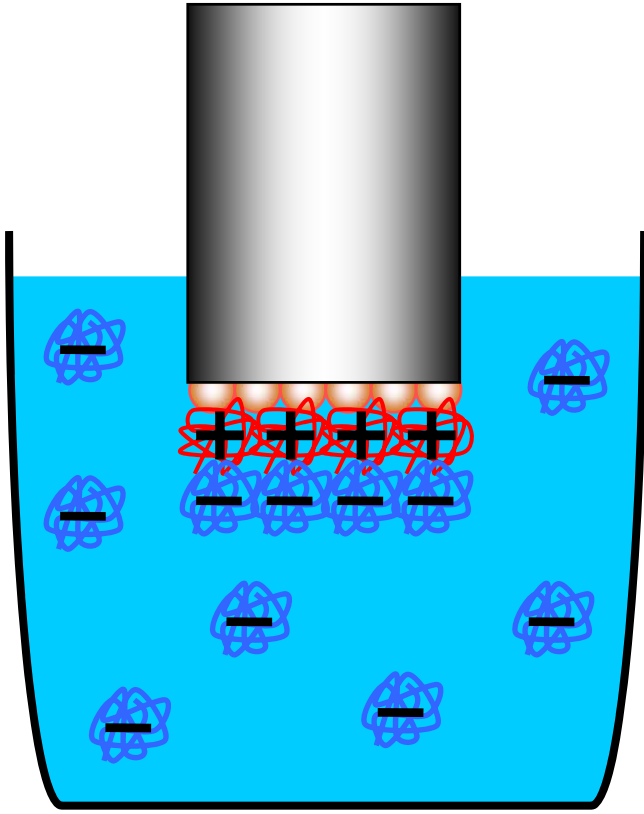


ОТМЫВКА

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



графитовый электрод

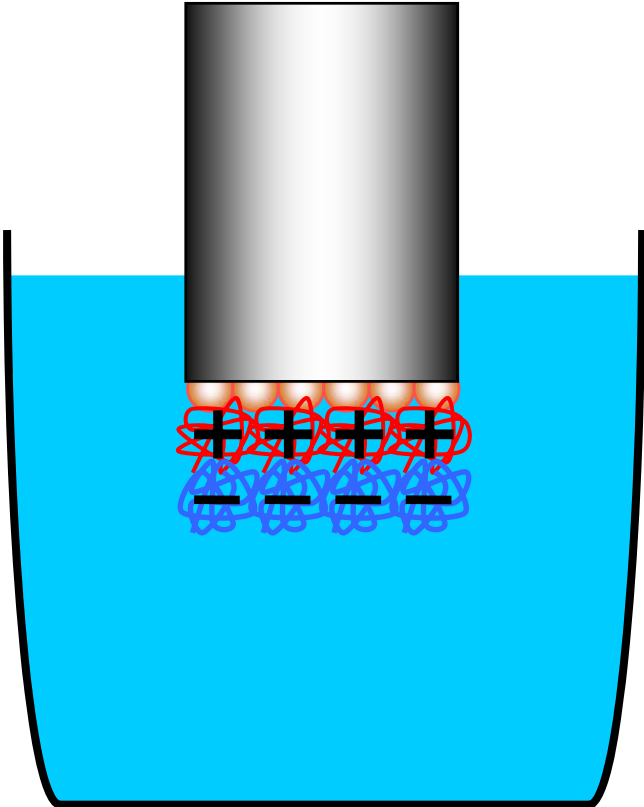


раствор
полианиона

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



графитовый электрод



ОТМЫВКА



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

графитовый электрод

Многочарядные

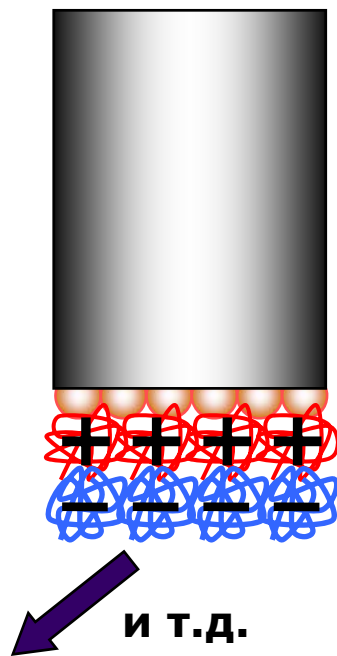
объекты:

**Полиэлектролиты
(ПДДА, ПАС)**

Белки (БСА)

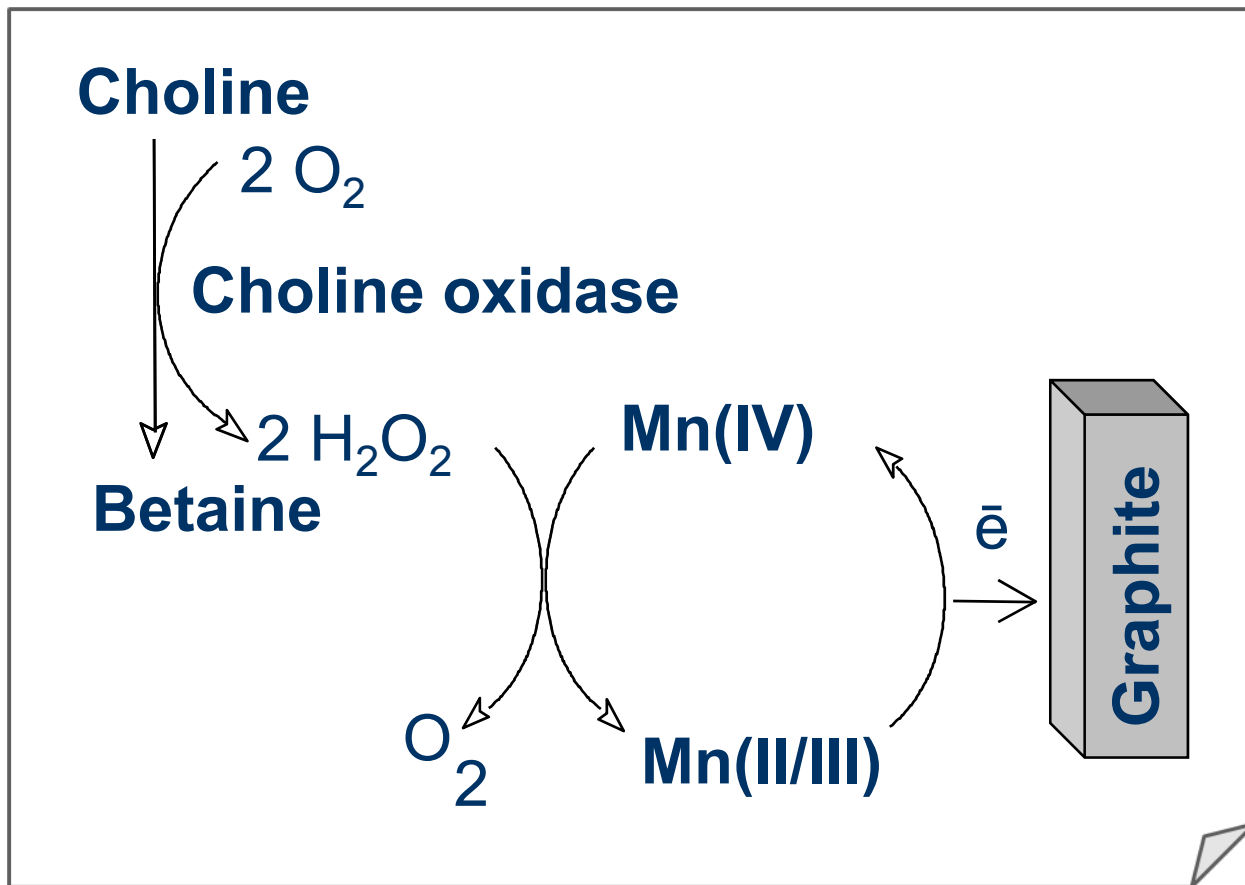
**Ферменты (БХЭ, АХЭ,
ХО)**

**Наночастицы (МСУНТ,
УНС)**



и т.д.

Холиноксидазные сенсоры

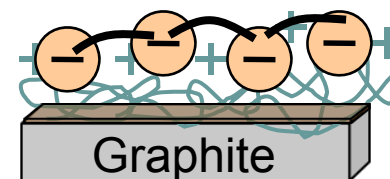


Предел обнаружения
холина: **100 nM**

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

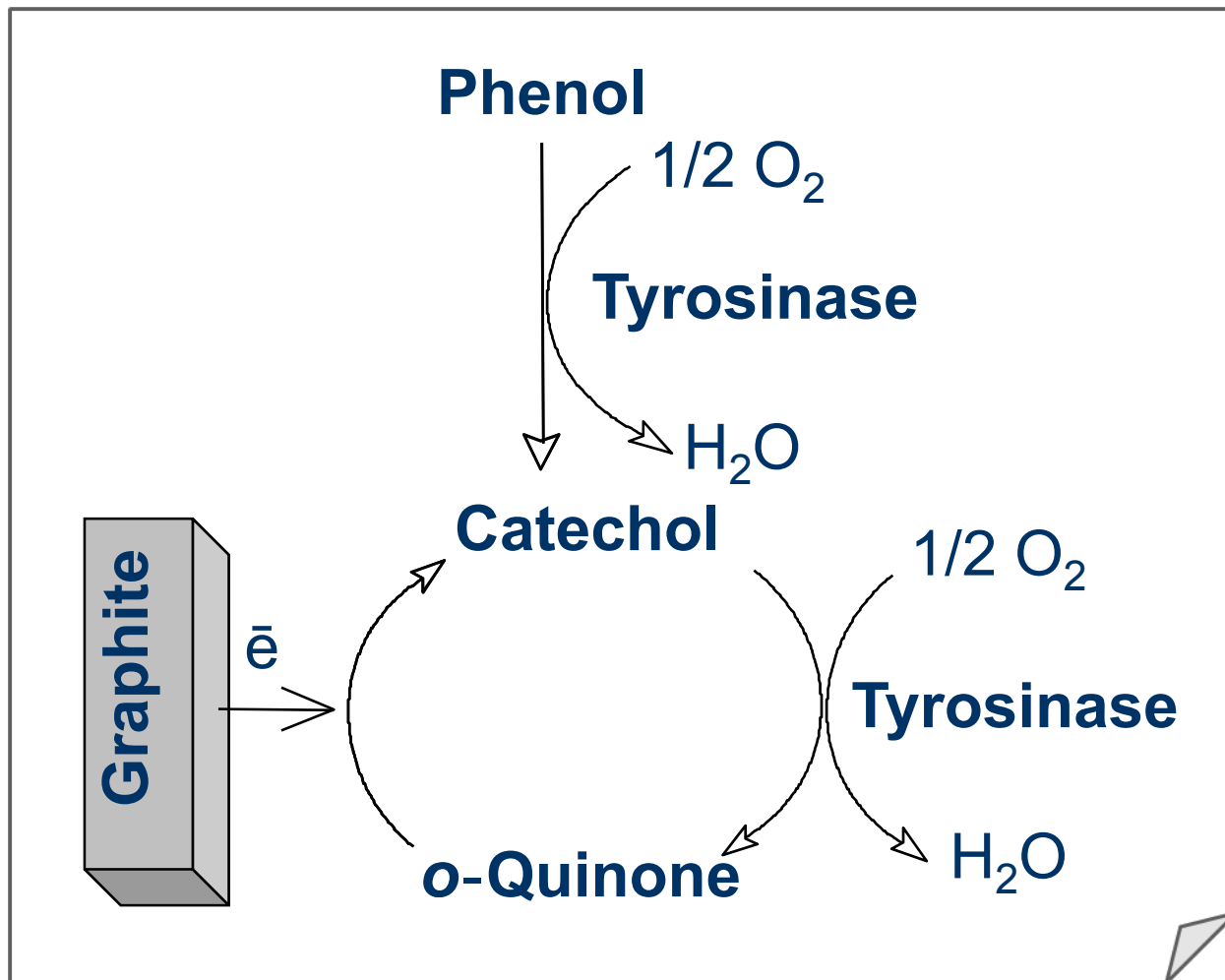
- PDDA

- 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

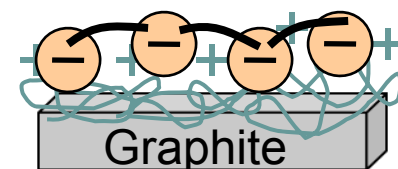


Предел обнаружения
фенола: **6 nM**

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

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

Конструкция:



$+$ - PDDA

$-$ - Тирозиназа

$-$ - 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

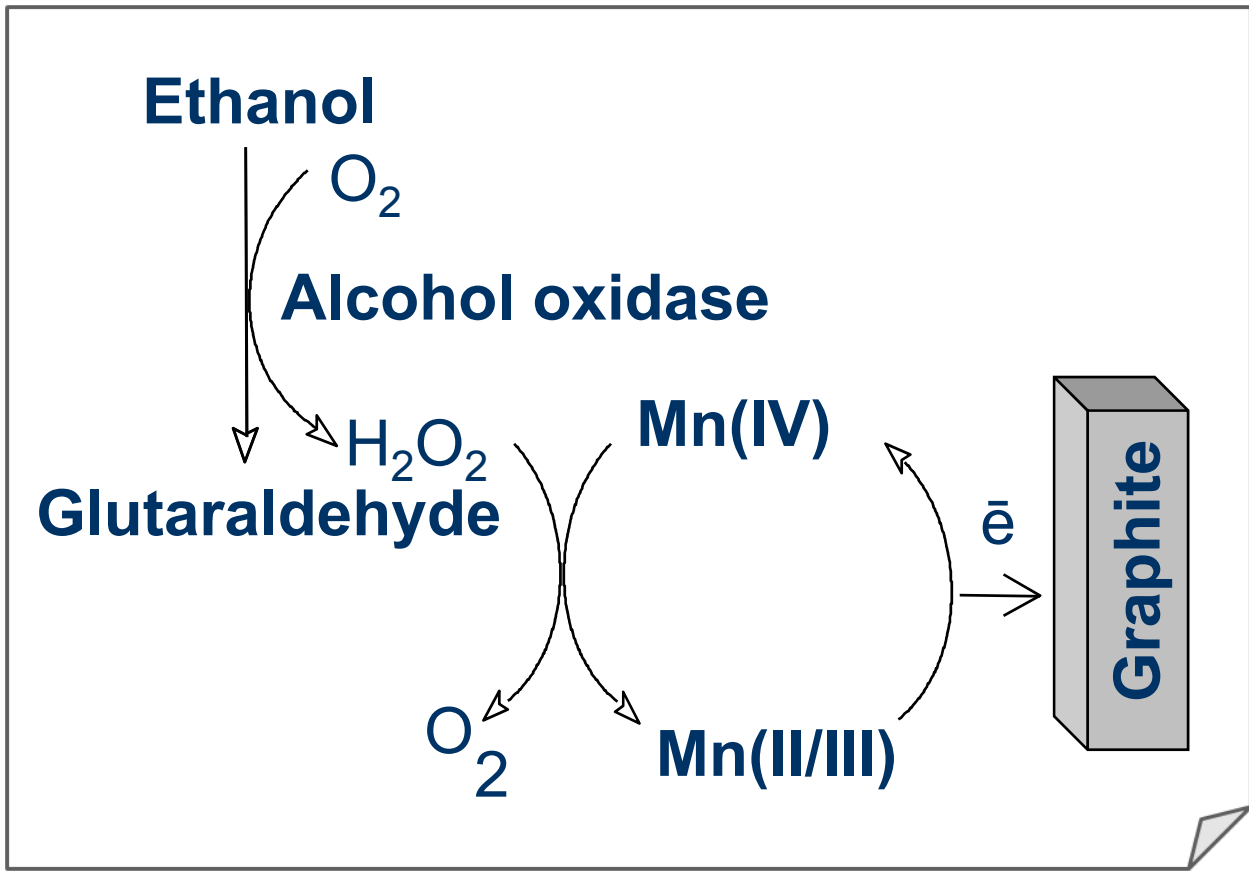
Оптимальная конструкция

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

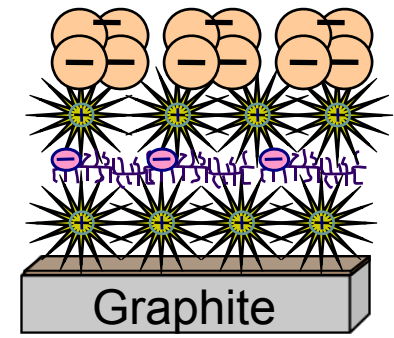





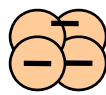
Предел обнаружения: **40 μM**

Линейность:
5·10⁻⁴ M – 5·10⁻³ M

Чувствительность:
0,47 mA/(с·M·cm²)

Конструкция:



-  - MnO₂
-  - (PTMAEMA)₆
-  - PVB
-  Алкогольоксидаза

Электрохимические сенсоры

Конструкция	Отн. Акт.
PDDA/Enzyme (control)	1.0
(PTMAEMA) ₆ /(PAA) ₅ /(PTMAEMA) ₆ /Alcohol oxidase	1.9
(PTMAEMA)₆/PVB/(PTMAEMA)₆/Alcohol oxidase	5.3