

## 9-я и 10-я лекции (продолжение)

**4. НИТЧАТЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ЦИТОСКЕЛЕТА.** Еще один тип упорядоченных биологических наносборок - строительные блоки цитоскелета, сложной сети белковых филаментов, пронизывающих цитоплазму и обеспечивающих механическую опору для клетки, внутриклеточную связь и транспорт. Основные нитчатые элементы цитоскелета - актиновые филаменты, микротрубочки и промежуточные филаменты - представляют собой нитевидные наноэлементы. Благодаря цитоскелету, клетки могут принимать самые разные формы, а также совершать координированные и направленные движения. Механическая жесткость наноэлементов цитоскелета была определена методом АСМ. Изменения сил деформации показали, что жесткость (значение модуля Юнга - названной в честь английского физика Томаса Юнга величины, характеризующей сопротивление материала физической деформации) липидных нанотрубок велика по сравнению с другими упорядоченными наноструктурами. Актиновые филаменты (микрофиламенты) встречаются во всех эукариотных клетках. Структура строительных блоков этих филаментов - молекул белка актина - почти не изменилась в ходе эволюции. Обнаруженные в бактериях более древние аналоги актина, белки FtsZ, также выполняют структурную функцию. По структуре эти белки представляют собой двухцепочечный полимер, закрученный в спираль диаметром около 7 нм. Эти структуры, обладающие значительной гибкостью, собраны в пучки различной толщины. Актиновые филаменты - основной компонент тонких нитей скелетных мышц, они также играют ключевую роль в обеспечении подвижности клетки. Микротрубочки имеют вид полых цилиндров (внешний диаметр - около 25 нм), образуются путем полимеризации строительных блоков, которыми являются молекулы белка тубулина. Микротрубочки намного жестче актиновых филаментов. Сеть микротрубочек прикреплена к расположенной в центре клетки структуре под названием центросома. Двигательные белки, такие как кинезин и динеины, транспортируют по клетке самые разные «грузы», перемещаются вдоль микротрубочек. Кинезин перемещается только от центросомы, а динеины - напротив, только в направлении центросомы. Промежуточные филаменты напоминают растянутые по клетке «тросы» диаметром примерно 10 нм. Они получили свое название за размер, который больше, чем у актиновых филаментов, но меньше, чем у микротрубочек. В отличие от актиновых филаментов и микротрубочек, собранных из строительных блоков одного вида (соответственно актина и тубулина), промежуточные филаменты образованы разными белками из довольно «обширного и неоднородного» семейства.

Филаменты этого типа выполняют разные функции: обеспечивают опору для клетки и образуют сеть вокруг ядерной мембраны.

**Использование элементов цитоскелета в нанотехнологиях, т.е. металлизация химически модифицированных актиновых филаментов.** Составляющие цитоскелет полимеры уже давно нашли свое применение в нанотехнологии. Как Вы знаете, эти фибриллы диаметром 7 нм образуются путем самосборки и обладают высокоупорядоченной структурой.

Известно, что из кристаллических структур мономеров актина можно сконструировать разные модифицированные варианты, обладающие нужными функциями. Эти фибриллы также весьма интересны как платформа для конструирования наноматериалов. Еще одним из преимуществ актиновых филаментов является возможность их управляемой полимеризации и деполимеризации в присутствии АТФ.

Так, Итамар Вилнер с коллегами продемонстрировали реполимеризацию покрытых золотом актиновых филаментов, из которых после каталитического наращивания наночастиц были получены металлические нанопроводники. Сначала к актиновым филаментам удалось ковалентно «пришить» наночастицы серебра. Далее модифицированные филаменты «разобрали», удалили излишки серебра и снова собрали, добавив «чистые» мономеры. В результате были получены филаменты, состоящие из «чистых» и меченных серебром мономеров. После этого на филаменты каталитическим методом нанесли золотое покрытие, используя частицы серебра как центры кристаллизации. В результате получились золотые проводники длиной 1—4 мкм и толщиной 80-200 нм, обладающие очень хорошей электропроводностью. Эти нанопроводы можно использовать в наноэлектромеханических устройствах (так называемые BioMEMS-системы).

Также этими авторами было показано, что актиновые филаменты с золотым нанопокрывтием способны перемещаться относительно миозина с использованием энергии АТФ. Это очень наглядные примеры использования биологических структур в качестве наноматриц для неорганических материалов.

**5. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ: НОСИТЕЛИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ И МАТРИЦЫ ДЛЯ НАНОТЕХНОЛОГИЙ.** Как биологи вам знакома двойная спираль ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота). Открывшие ее в 1953 г. Уотсон и Крик получили в 1962 г. Нобелевскую премию. Долгое время это соединение не считали типичным наноматериалом, но спиральная молекула ДНК представляет собой характерную упорядоченную наноструктуру. Ее диаметр составляет около 2 нм, длинна варьирует от нескольких нм до многих микрон (длина каждой пары оснований - 0,34 нм). Двойная спираль ДНК формируется спонтанно путем самосборки комплементарных цепей, в которых цитозин (Ц) из одной цепи взаимодействует с гуанином (Г) из другой цепи, а тимин (Т) «находит»

в противоположной цепи аденин(А). Общая структура стабилизируется взаимодействием ароматических колец азотистых оснований, подобное наблюдается и в других наноструктурах, речь о которых пойдет ниже. Молекулы РНК (рибонуклеиновой кислоты) также образуют сложные наноструктуры. В отличие от ДНК, эти структуры - одноцепочечные, а их образовании особую роль играют внутримолекулярные (а не межмолекулярные) взаимодействия. В результате образуются сложные трехмерные структуры, такие как транспортная РНК (тРНК) и компоненты наномашин - рибосом. Большинство первых работ по применению ДНК в качестве строительного материала для наноструктур выполнил Нэдриен Зеeman из Нью-Йоркского университета в 2005. Он получил комплементарные спирали ДНК, способные формировать сложные двухмерные структуры и даже нанокубы. Так как молекулы ДНК достаточно термостабильны по сравнению с белками, она является очень привлекательным материалом для нанотехнологий. Кроме того, благодаря революционному прорыву в генетической инженерии стал возможен грандиозный прогресс и в области химии ДНК. Теперь можно сравнительно дешево синтезировать большие количества очень крупных олигомеров ДНК и подвергать их химической модификации. Другая важная работа, в которой использовалась ДНК как наноматериал, - создание металлических нанопроводников на матрице ДНК (1998). Следующий шаг в работе той же группы исследователей - разработка белковой литографии на ДНК-матрицах (2002).

**Производство нанопроводников с помощью ДНК.** Несмотря на то, что ДНК - очень удобный строительный материал для нанотехнологий, полученные из него структуры довольно инертны. Особые свойства ДНК и ее способность к специфичному взаимодействию с различными белками находят прямое применение в нанотехнологии. В этом случае ДНК используется как матрица для создания нанопроводников, в которой закодирована необходимая для производства информация. Авторами одной из первых и наиболее изящных демонстраций применения ДНК в качестве биоматериала для нанотехнологий являются Ури Сиван с коллегами. Их первые работы по применению ДНК в нанотехнологиях были посвящены управляемой металлизации молекул ДНК. В этом методе частицы серебра осаждались на двухцепочечной молекуле ДНК и наращивались до образования металлического проводника равномерной толщины. 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 ее связывания с другими компонентами. Это открывает дорогу для создания электрических цепей, образующихся путем самосборки.

Дальнейшие достижения этой группы связаны с методом молекулярной литографии. В данной работе использовался белок RecA, специфически связывающийся с уникальными последовательностями в цепи ДНК. Молекулы данного белка, связываясь с ДНК, закрывают определенные участки цепи от химической металлизации. Таким образом, этот метод обеспечивает осаждение металла на строго определенных участках ДНК, заданных ее последовательностью. Авторы назвали метод молекулярной литографией. Если провести аналогию с традиционной литографией, информация, закодированная в молекуле ДНК, играет роль маски, а связывающийся с ДНК белок является эквивалентом защитного слоя.

**Создание биочипов на основе ДНК.** При высоком числе генов у эукариот (от 6200 у дрожжей до 100 000 и более у человека) возникает необходимость в использовании специальной техники для одновременного получения экспериментальной информации об активности большого числа генов в клетке. Современная экспериментальная техника позволяет создать матрицу - биочип размером всего несколько сантиметров, с помощью которой можно получить данные о функциональной активности многих (если не всех) генов организма.

Технология биочипов разработана в Институте молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта под руководством академика А.Д. Мирзабекова. При создании биочипа на специальную (стеклянную) подложку с помощью роботов наносят образцы молекулы ДНК, которые представляют собой либо отдельные гены, либо молекулы ДНК, полученные в результате полимеразной цепной реакции.

Для проведения анализа образец ткани (например, взятая для анализа кровь) проходит предварительную обработку, включающую флуоресцентное мечение присутствующих в нем молекул ДНК или РНК, а затем наносится на биочип, помещенный в специальную микрокамеру.

Затем проводят гибридизацию между содержащимися на чипах генами, с одной стороны, и содержащимися в пробе флуоресцирующими ДНК или РНК с другой. После того как молекулы образца провзаимодействовали по принципу комплементарности с соответствующими генами на чипе, при облучении светом определенной длины волны появляется свечение соответствующих ячеек. По характеру свечения прибор-анализатор определяет количество характерных последовательностей ДНК, РНК или набора белков в исследуемом образце.

Использование биочипов перспективно в разных направлениях и прежде всего для выявления генов, реагирующих на негативное (стрессовое) воздействие окружающей среды и осуществляющих защитные функции в организме. Применение биочипов позволяет оперативно выявлять бактерии и вирусы, выяснять индивидуальные генетические особенности пациента, определяющие предрасположенность к наследственным и онкологическим заболеваниям.

**Наноконплексы в диагностике мутаций.** В настоящее время ведутся работы по созданию сверхточного и быстрого ДНК-секвенатора на основе нанопор. Новое наноустройство способно контролировать положение молекулы ДНК в нанопоре с точностью до одного-нуклеотида и может совершить переворот в современной технологии секвенирования - определения последовательности нуклеотидов в ДНК. Создание данного устройства позволит расшифровывать геном человека всего за несколько часов, при этом процедура не будет дорогостоящей: ее смогут применять любые медицинские учреждения.

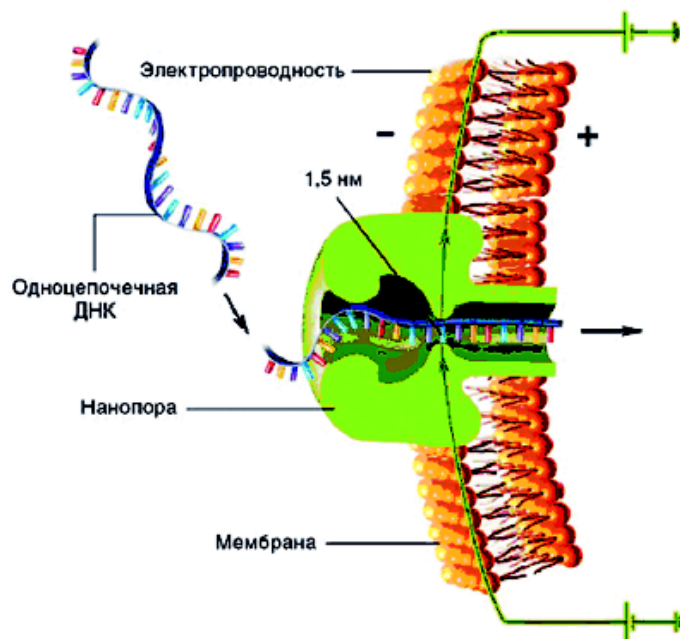


Схема функционирования наносеквенатора

Сущность метода заключается в изменении электрического потенциала при прохождении ДНК через нанопору (см. рис. выше). Ученые разработали математическую модель наносеквенатора, читающего отдельные нуклеотиды ДНК, что позволяет быстро устанавливать наличие той или иной мутации в геноме. Начаты работы по созданию ДНК-транзистора, с помощью которого будет производиться более эффективное секвенирование генома. ДНК-транзистор - это достаточно длинная нанопора с рядом полупроводниковых и металлических добавок, внутри которой находится длинная молекула ДНК. Диаметр нанопоры должен быть всего в несколько нанометров. Внутри нанопоры (ДНК-канала) благодаря добавкам располагаются заряды, сравнимые с зарядами одиночных электронов. Из-за разности потенциалов, между центральным и боковыми электродами, формируется электростатическая ловушка для ДНК. Изменение частоты напряжения приведет к движению молекулы внутри поры с заданной точностью, в частности, с точностью до одного нуклеотида, чего ранее достичь не удавалось. Нанопоры для ДНК-транзисторов можно будет изготавливать в больших

количества с помощью современных методов микроэлектронного производства.

Для сравнительной оценки нового способа следует упомянуть, что секвенация ДНК одного человека с помощью существующей техники занимает несколько месяцев и обходится в миллионы долларов. Естественно, это не позволяет изучать геномы пациентов с целью лечения генетических болезней. Создание массового производства описанного устройства быстрого секвенирования сделает анализ ДНК вполне обычной клинической процедурой, подобно анализу крови. Это, бесспорно, станет знаменательной вехой в развитии мировой медицины.