На правах рукописи

ПРОТОПОПОВА Анна Дмитриевна

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОМАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Специальность 02.00.06 — высокомолекулярные соединения

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата

физико-математических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре физики полимеров и кристаллов физического факультета Московского Государственного Университета имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук Яминский Игорь Владимирович.

Официальные оппоненты:
доктор физико-математических наук
профессор Шайтан Константин Вольдемарович,
кандидат физико-математических наук Клинов Дмитрий Владимирович.

Ведущая организация: Институт общей физики имени А.М.Прохорова РАН.

Защита состоится 13 февраля 2013 г в 17 час. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 501.002.01 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 35, Центр коллективного пользования МГУ, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в Отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27).

Автореферат разослан 28 декабря 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат физико-математических наук Лаптинская Т. В.

Общая характеристика работы

Актуальность работы. Микроскопические исследования биомакромолекул — белков и нуклеиновых кислот — проводятся, главным образом, методами просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). В настоящее время оба метода активно развиваются, определяются ниши применения того и другого экспериментального подхода. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) преимущественно используется для изучения процессов адсорбции вещества на подложки, например для исследования адсорбции белков, для работы в жидких средах и газах, для изучения механической жесткости биологических объектов и проведения экспериментов по растяжению единичных молекул — силовой спектроскопии. Широкий спектр возможностей, предоставляемых зондовой микроскопией для изучения биополимеров, обуславливает большое количество работ по этой тематике, публикуемых ежегодно в ведущих научных журналах.

Цель настоящей работы — разработать методики для исследования с помощью метода АСМ структуры, свойств и особенностей процесса формирования биомакромолекулярных комплексов на примере двух биологически значимых систем — системы свертывания крови и вирусных частиц.

Первый объект исследования — белок фибриноген, играющий ключевую роль в свертывании крови. Под действием тромбина он переходит в активную форму, называемую фибрином, и ассоциирует, образуя крупную сеть макроскопических волокон — основу будущего тромба. В настоящей работе исследовалась молекулярная структура ассоциатов фибрина, образующихся на ранних стадиях реакции.

Второй объект — белок оболочки (БО) X вируса картофеля (ХВК). Известно, что в определенных условиях БО ХВК может образовывать спирально-симметричную оболочку вокруг РНК. В настоящей

работе исследовались структура, свойства и условия формирования комплексов, образованных БО ХВК с ДНК.

Основное различие между этими системами состоит в том, что ассоциаты фибрина — это чисто белковые структуры, в то время как вирусные частицы стабилизируются нуклеиновой кислотой и являются более сложным нуклеопротеидным комплексом.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Разработать методики для визуализации ассоциатов фибрина на разных стадиях формирования волокон и исследовать структуру ранних ассоциатов фибрина методом АСМ.

2. Исследовать конформации молекул фибриногена, адсорбированных на различные подложки методами АСМ и молекулярной динамики (МД), сопоставить результаты моделирования с экспериментальными данными.

3. Исследовать условия формирования и структуру дезоксирибонуклеопротеидов (ДНП), полученных *in vitro* на основе БО ХВК и ДНК, сравнить их структуру с рибонуклеопротеидами (РНП).

4. Исследовать возможность создания ДНП на основе БО другого потексвируса — вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт).

5. Разработать методику для анализа механических свойств вирусных частиц методом силового картирования (СК).

Материалы и методы. АСМ-измерения проводили на микроскопах Nanoscope 3a (Digital Instruments, США) и Multimode 5 (VEECO, США) в резонансном режиме на воздухе и в буферных растворах. При измерениях на воздухе использовали стандартные кремниевые кантилеверы fpN01 (резонансная частота 118–190 кГц, жесткость 5,3 Н/м и гарантированный радиус закругления иглы

25 нм, NT-MDT, Россия) и острые кантилеверы fpN01S (гарантированный радиус закругления иглы 10 нм, остальные параметры те же). При сканировании в жидкости использовали кантилеверы SNL-10 B (резонансная частота 23 кГц, жесткость 0,12 Н/м и гарантированный радиус закругления иглы менее 12 нм, VEECO, США) и DNP-10 D (резонансная частота 18 кГц, средняя жесткость 0,06 Н/м и гарантированный радиус закругления иглы 20 нм, VEECO, США). Для обработки данных использовали программу ФемтоСкан Онлайн (ЦПТ, Россия).

Работа по исследованию процесса формирования фибриновой сети была проведена совместно с кафедрой химии природных соединений химического факультета МГУ. Использовали рекомбинантный человеческий тромбин со специфической активностью 3600 о.е./мг (HTI, США), человеческий тромбин со стандартной активностью 110 о.е./мл (NIBSC, Великобритания) и человеческий фибриноген, выделенный из плазмы крови (Calbiochem, Германия). Все реакции проводили при температуре около 27° С в буфере, состоящем из 20 мМ Трис-ацетат, pH 7,4, 0,14 М NaCl, 50 мМ KCl, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ $CaCl_2$. Перед каждым экспериментом по формированию фибриновой сети определяли активность тромбина, поскольку этот фермент очень чувствителен к циклам заморозки-разморозки и его активность может спонтанно падать. Для модификации поверхности слюды и стекла при сканировании в жидкости использовали гексаметилдисилазан (ГМДС, Sigma-Aldrich, США).

Работа по моделированию адсорбции фибриногена методом МД была проведена совместно с кафедрой биофизики физического факультета МГУ. Моделирование сорбции проводили в программе NAMD 2.7 — бесплатной программе для МД, обладающей высокой эффективностью распараллеливания вычислений и часто применяемой для симуляции больших систем, состоящих из миллионов атомов. Использовали силовое поле CHARMM. Все вычисления произ-

водились на суперкомпьютере Ломоносов, были задействованы 128 восьмиядерных процессоров.

Работа по реконструкции искусственных вирусных частиц была проведена совместно с кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Были использованы БО вирусов ХВК и ВМАльт, РНК ХВК и вируса табачной мозаики (ВТМ), ДНК-копия РНК ХВК, выделенные по стандартным протоколам из соответствующих вирусных частиц.

Научная новизна работы.

1. Разработана методика визуализации ассоциатов фибрина, образующихся на начальной стадии свертывания крови. Впервые показано, что наряду с протофибриллами существуют более тонкие ассоциаты — профибриллы, образованные при связывании α-С доменов соседних молекул друг с другом.

2. Проведено исследование процесса сорбции фибриногена на слюду и слюду, модифицированную ГМДС, методами АСМ и МД. Показано, что конформации молекул на гидрофильной и гидрофобной подложках существенно различаются.

3. Показана возможность формирования комплексов БО ХВК с ДНК, подобраны оптимальные условия для формирования этих НП. Показано, что укладка белка в ДНП существенно отличается от структуры оболочки нативного вируса и РНП. Предположено, что БО ХВК связывается с малой бороздкой ДНК.

4. Показано, что при использовании БО другого потексвируса — ВМАльт — ДНП не образуются. Вместо этого формируются длинные тяжи — ассоциаты БО, не содержащие ДНК.

5. Разработана методика для анализа механических свойств вирусных частиц методом СК.

Практическая значимость работы. Результаты диссертации носят в первую очередь фундаментальный характер. По мнению автора, наиболее интересны три результата: обнаружение тонких ассоциатов фибрина, в которых молекулы белка связанны, предположительно, за счет взаимодействия α-С доменов соседних молекул, определение особенностей структуры ДНП и определение жесткости вирусных частиц методом СК.

Важным методологическим результатом диссертации является разработанный алгоритм для анализа данных СК. Силовое картирование — весьма трудоемкий экспериментальный метод, требующий сложного анализа и имеющий серьезные артефакты, которые часто не учитываются при обработке. Настоящая работа вносит вклад в развитие этого метода.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы докладывались на следующих научных конференциях и школах: 2nd International School on Surface Science «Technologies and Measurements on Atomic Scale» — 2012, Sochi, Russia; Шестая международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» — 2012, Москва, Россия; X чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова — 2011, Москва, Россия; 17th International Biophysics Congress — 2011, Beijing, China; 2nd International School «Nanomaterials and Nanotechnologies in Living Systems. Safety and Nanomedicine» — 2011, Moscow region, Russia; Пятая международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» — 2011, Москва, Россия; XXIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» — 2011, Москва, Россия; ESF-EMBO Research Conference «Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions» — 2010, Sant Feliu de Guixols, Spain; 20th Anniversary Korea-Russia Science and Technology Forum — 2010, Москва, Россия; Четвертая международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» — 2010, Москва, Россия; Тре-

тья международная конференция «Современные достижения бионаноскопии» — 2009, Москва, Россия; Первая международная научная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах» — 2009, Россия.

Личный вклад автора. Все экспериментальные измерения зондовой микроскопии и подготовка образцов к сканированию выполнены автором лично. Анализ и интерпретация экспериментальных данных проведены автором лично.

Эксперименты по динамическому светорассеянию проведены совместно с Завьяловой Еленой. Моделирование методом МД проведено совместно с Толстовой Анной, Оферкиным Игорем и Годзи Максимом. Эксперименты по ферментному анализу ДНП и РНП проведены совместно с Никитиным Николаем и Полозовым Василием.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликована 21 работа, в том числе 7 статей и 14 публикаций в сборниках тезисов докладов конференций.

Структура и объем диссертационной работы. Диссертационная работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка литературы, включающего 126 наименований. Работа изложена на 134 страницах, содержит 69 рисунков и 6 таблиц.

Основное содержание работы

Во **Введении** излагается актуальность выбранной темы диссертационной работы, определяются ее цели и задачи.

Глава I диссертации представляет собой обзор литературы и состоит из четырех разделов. В **разделе I.1** описываются основные методики АСМ, в **разделе I.2** рассказано об общих особенностях белок-белковых взаимодействий. В **разделе I.3** описывается система свертывания крови, перечисляются существующие модели молекулярной структуры волокон, образованных фибрином.

Подробно описаны результаты проводившихся ранее микроскопических исследований ранних волокон фибрина, отдельных молекул фибрина и фибриногена. В **разделе I.4** содержатся базовые сведения о структуре вирусных частиц, описаны известные экспериментальные результаты по созданию искусственных вирусов и по упаковке чужеродных материалов (нуклеиновых кислот, металлов и др.) в вирусную оболочку.

Глава II диссертации предствляет собой описание и анализ результатов исследования процесса ассоциации фибрина при свертывании крови. В **разделе II.1** описываются использованные в данной части работы методики: методы приготовления образцов фибриногена, разработанные для наблюдения отдельных молекул, методика определения активности тромбина, различные способы приготовления образцов ассоциатов фибрина, использовавшиеся методы сканирования.

В **разделах II.2, II.3 и II.4** описываются результаты АСМ-экспериментов, проводится сравнение этих результатов с известными из литературы данными экспериментов по ПЭМ. Несмотря на то что интенсивные исследования процесса свертывания крови ведутся уже более 50 лет, механизм ассоциации фибрина на молекулярном уровне не до конца ясен. Имеющиеся данные о структуре волокон были получены главным образом при помощи ПЭМ. В соответствии с общепринятой моделью считается, что элементарным ассоциатом фибрина является двутяжевой комплекс — протофибрилла (рис. 1а). В протофибрилле каждый центральный E-домен взаимодействует с двумя концевыми D-доменами двух соседних молекул. В данной работе предпринята попытка получить новые сведения о структуре первичных ассоциатов фибрина, для этого применяется другой микроскопический метод — АСМ. В результате обнаружен альтернативный, возможно патологический, способ формирования тонких первичных ассоциатов — профибрилл (рис. 1б).

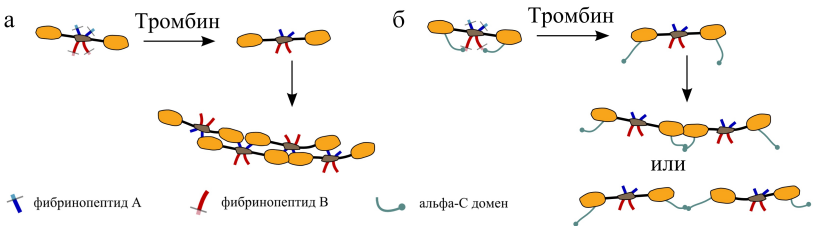

Рис. 1: Схемы образования ассоциатов фибрина: а) протофибрилл б) профибрилл.

Из литературных данных известно, что скорость сорбции фибриногена на различные подложки примерно одинакова, но влияние подложки на структуру белка может быть очень сильным. Исходя из этого все эксперименты проводили как на гидрофильной слюде, так и на гидрофобных ГМДС-слюде и ВОПГ. Стабильнее всего удавалось визуализировать доменную структуру фибриногена на поверхности слюды (рис. 2). В ходе сорбции на ВОПГ и ГМДС-слюду молекулы «распластываются» по поверхности из-за взаимодействия гидрофобных участков поверхности белка с подложкой, кроме того, на графите молекулы склонны к спонтанной агрегации друг с другом.

Было установлено, что у 20% молекул фибриногена на слюде при pH 7,5 визуализируются все три глобулярных домена. В то время как 80% молекул выглядят как двухдоменные «гантели». На рис. 2 показаны оба типа молекул, по увеличенным фрагментам АСМ-изображений можно предположить, как именно расположена на поверхности та или иная молекула (рис. 2 А, Б, Е). Средняя высота D-доменов составила $2,2 \pm 0,4$ нм (размер выборки N=600), E-доменов — $1,3 \pm 0,4$ нм (N=150), средняя длина молекул 402 ± 6 нм (N=150). Расстояние между D-доменами одной молекулы 20 ± 4 нм (N=150). Из изображений, приведенных на рисунке, ясно видно,

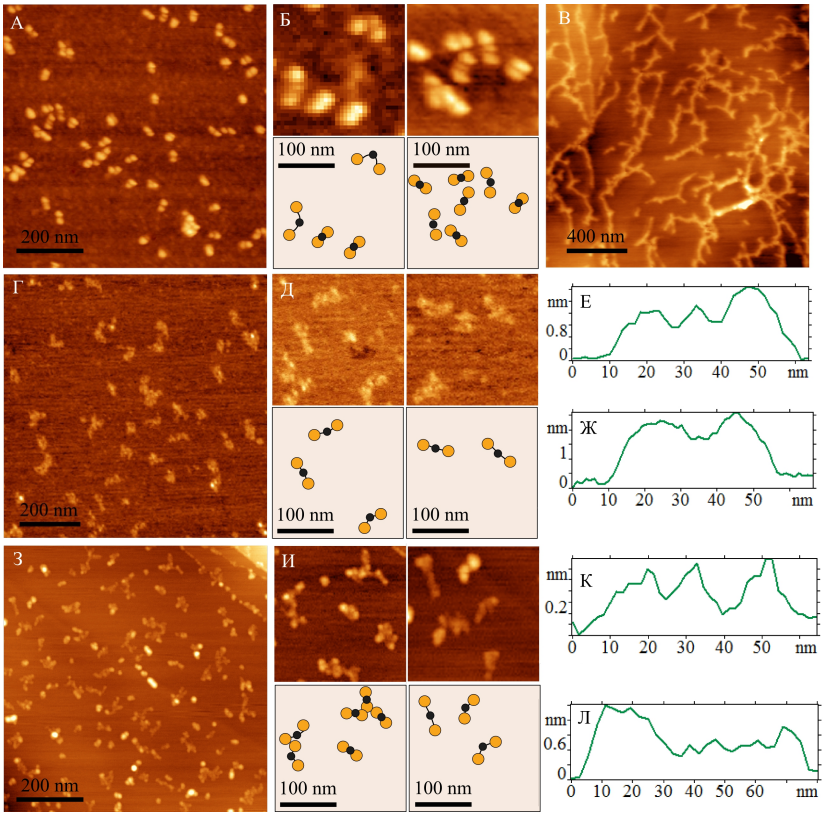

Рис. 2: АСМ-изображения молекул фибриногена на слюде (А, Б), ГМДС-слюде (Г, Д) и ВОПГ (З, И). На схемах Б, Д и И представлено возможное расположение молекул на поверхности. На графиках Е и Ж представлены характерные профили отдельных молекул фибриногена на слюде, на рисунке Е различимы все три домена, на рисунке Ж — только D-домены. На графиках К и Л представлены характерные профили отдельных молекул фибриногена на ГМДС-слюде (К) и на ВОПГ (Л).

что E-домен четко различим только у самых длинных молекул, которые «растянуты» по поверхности. Известно, что участки альфа-спиралей, соединяющие глобулярные домены фибриногена, обладают большой подвижностью. Благодаря этому они способны изгибаться в ходе сорбции на поверхность и D-домены могут по-разному расположиться друг относительно друга. Если они расположены близко, а участки альфа-спиралей между ними представляют собой извивающиеся нити, то из-за уширения, вносимого кантилевером, центральный E-домен оказывается практически неразличим и визуализируется только как перемычка (понижение профиля между двумя концевыми D-доменами). Этим же объясняется и большой разброс в значениях контурных длин молекул, определенных по АСМ-изображениям.

Изображения, полученные при pH 7,5 на поверхности ГМДС-слюды, существенно отличаются. Такая поверхность гидрофобна, и белок взаимодействует с ней иначе, чем с гидрофильной слюдой. На полученных изображениях трудно идентифицировать D- и E-домены, хотя в отдельных случаях это удается (рис. 2 Г, Д, Ж). Средняя высота D-доменов на поверхности ГМДС-слюды составила $1,2 \pm 0,4$ нм (N=100), средняя длина отдельных молекул — 60 ± 9 нм (N=30).

Третья из использованных подложек — графит — также гидрофобная. Высота D-доменов на нем составила $1,6 \pm 0,4$ нм (N=200), средняя длина отдельных молекул 50 ± 11 нм (N=30). На графите еще труднее, чем на ГМДС-слюде, определить, как именно расположены домены молекулы, но иногда это можно сделать. Отдельно хочется отметить, что на образцах, приготовленных на графите, не всегда возможно рассмотреть отдельные молекулы, поскольку часто молекулы агрегируют с образованием протяженных ассоциатов (см. рис. 2 В). Аналогичное сильное влияние ВОПГ на молекулы фибриногена было отмечено в ряде работ. Вследствие этого все экспе-

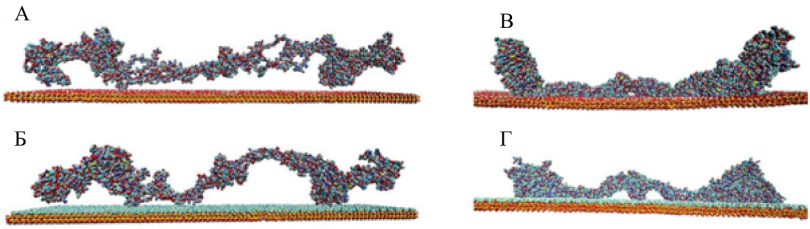

Рис. 3: Данные моделирования: А) начальная конформация молекулы на слюде; Б) начальная конформация молекулы на ГМДС-слюде; В) конечная конформация молекулы на слюде; Г) конечная конформация молекулы на ГМДС-слюде.

рименты по наблюдению ассоциации фибрина проводили на слюде и дублировали на слюде, модифицированной ГМДС.

Для более глубокого понимания механизма сорбции белка на подложки и для более детальной интерпретации данных АСМ было проведено моделирование процесса сорбции при помощи метода МД, в котором временная эволюция системы атомов отслеживается путем интегрирования их уравнений движения. Силы межатомного взаимодействия представляются в классической форме как градиент потенциальной энергии системы. Данный метод был изначально разработан в теоретической физике, но получил большое распространение в химии и, начиная с 80-х годов XX века, в биофизике.

Отправной точкой в нашей модели является кристаллическая структура фибриногена, полученная путем рентгеноструктурного анализа и имеющая разрешение 2,90 Å. Структура находится в открытом доступе в базе данных pdb-database под именем 3GHG.

На рис. 3 изображены начальные и конечные конформации белка, полученные в моделировании. Адсорбция произошла в обоих случаях, но существенно по-разному на слюде и ГМДС-слюде. Наи-

более существенные различия наблюдаются в областях глобулярных D- и E-доменов. Легко видеть, что на поверхности гидрофобной ГМДС-слюды глобулярные домены белка более плотно прилегают к поверхности подложки. В то же время, область альфа-спиралей на ГМДС-слюде образует меньше контактов с поверхностью, чем на чистой слюде.

Напротив, на слюде D-домены «отталкиваются» от подложки и неплотно примыкают к ней. Область E-домена не касается подложки. Участки альфа-спиралей на слюде плотно примыкают к подложке.

Для того чтобы сравнить полученные данные с АСМ-изображениями, результаты моделирования удобно представить в виде топографических карт. Для этого в плоскости XY выбирали узлы сетки с шагом 3 Å и в каждом узле определяли высоту белка над подложкой. Полученная сеточная функция $Z(X, Y)$ представляет собой идеальную топографию адсорбированного белка и не является моделью АСМ-изображения, поскольку не учитывает деформаций, происходящих при сканировании. В реальном эксперименте игла оказывает на образец сильное воздействие, и в результате этого высота белка оказывается занижена. Для корректной симуляции процесса сканирования необходимо применять методы МД и производить расчеты на времена, которые существенно превышают возможности современных суперкомпьютеров (реальное время взаимодействия иглы с образцом 10^{-6} с в каждой точке изображения).

Тем не менее, сравнивать АСМ-данные с идеальной топографией фибриногена удобнее, чем с моделью атомной структуры. Модельную топографию визуализировали с помощью программы ФемтоСкан (рис. 4). В таблице 1 приведены сравнительные данные по высотам доменов на разных подложках. Из таблицы видно, что при переходе от гидрофильной подложки к гидрофобной как в эксперименте, так и в моделировании высота D-доменов становится меньше

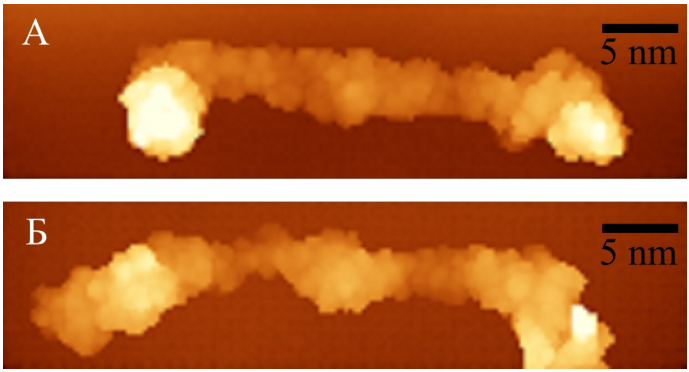

Рис. 4: Топографическая визуализация результатов моделирования методом МД: А) на слюде, Б) на ГМДС-слюде.

	Слюда		**ГМДС-слюда**	
	D-домен, нм	Длина, нм	D-домен, нм	Длина, нм
АСМ	$2{,}2 \pm 0{,}4$	42 ± 7	$1{,}2 \pm 0{,}4$	60 ± 9
МД	7,5	34	5,5	41

Таблица 1: Сравнение данных АСМ и МД о высоте D-доменов и общей протяженности адсорбированного фибриногена.

(на 45% по данным АСМ и на 27% по данным МД). Длина молекулы становится больше (на 30% по данным АСМ и на 17% в модели).

Исследование процесса ассоциации фибрина проводили при разных концентрациях фибриногена. Концентрация фибриногена в крови около 9 мкМ. При такой концентрации через 30 секунд после добавления тромбина на поверхности наблюдаются крупные волокна высотой $11{,}7 \pm 4{,}5$ нм (рис. 5а), а через 5–10 минут вся поверхность подложки покрыта плотной сетью со среднеквадратичной шероховатостью рельефа около 30 нм (рис. 5б).

При концентрации 2 мкМ удалось получить зависимость толщины фибриновых волокон от времени реакции. Данные согласуются с результатами экспериментов по динамическому светорассеянию. Для того чтобы рассмотреть более мелкие детали, мы уменьшили концентрацию фибриногена до 0,2 мкМ. Процесс свертывания замедлился, средняя высота волокон спустя 1 минуту после добавления тромбина составила $8{,}5 \pm 2{,}5$ нм. Стало возможно наблюдать поперечные полосы с периодом 23 нм на поверхности волокон (рис. 5г), хорошо известные из экспериментов по ПЭМ.

При дальнейшем уменьшении концентрации до 20 нМ нам удалось визуализировать первичные ассоциаты фибрина. Оказалось, что большая часть ассоциатов представляет собой не двутяжевые протофибриллы, а более тонкие однотяжевые ассоциаты, которые мы назвали профибриллами. Такие структуры наблюдали как на образцах, приготовленных на слюде (рис. 6a, c, e), так и на образцах, приготовленных на ГМДС-слюде (рис. 6, b, d, f).

Далее была предложена модель для описания процесса формирования профибрилл за счет взаимодействия α-С-доменов молекул (некристаллизуемых С-концов α-цепей). Известно, что в фибриногене α-С-домены располагаются вблизи центрального Е-домена, но после отщипления фибринопептида В в фибрине они отдаляются от этой области молекулы. Кроме того, методами силовой спектроско-

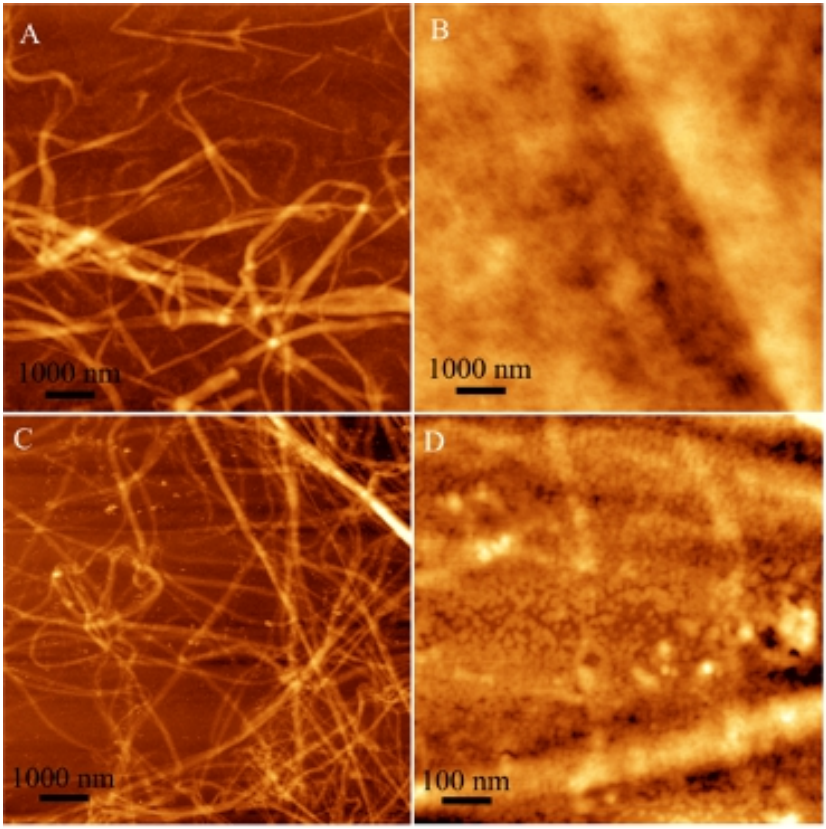

Рис. 5: АСМ-изображения ассоциатов фибрина, образующихся при высокой концентрации фибриногена: A) 9 мМ спустя 30 секунд после добавления тромбина B) 9 мМ спустя 10 минут после добавления тромбина C) 0,2 мМ спустя 1 минуту после добавления тромбина D) 0,2 мМ спустя 1 минуту после добавления тромбина, при увеличении виден период на волокнах.

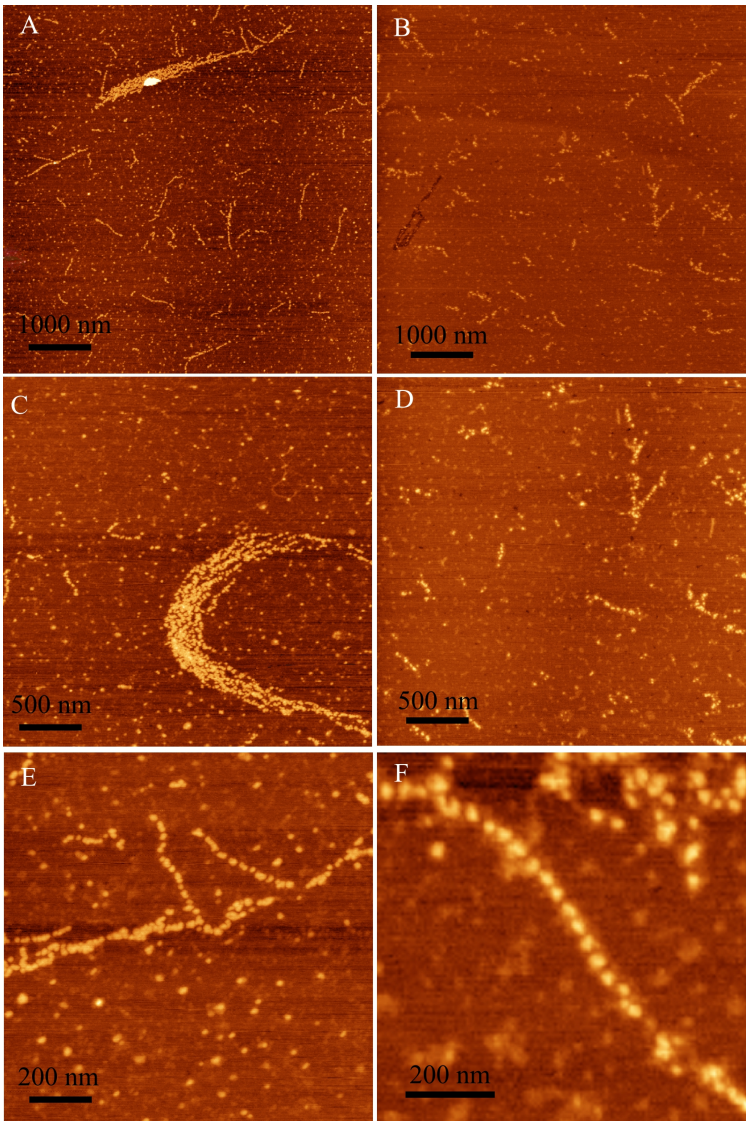

Рис. 6: АСМ-изображения первичных ассоциатов фибрина — протофибрилл и профибрилл — на слюде (A, C, E) и на ГМДС-слюде (B, D, F).

пии и оптического пинцета было показано, что α-С-домены способны к взаимодействию друг с другом. Для проверки выдвинутой гипотезы были проведены эксперименты по ПЭМ ранних ассоциатов фибрина, исследовали свертывание фибрина в присутствии ингибитора GPRP, блокирующего образование протофибрилл, а также исследовали возможность образования однотяжевых профибрилл из desα-С-фибриногена.

В экспериментах по ПЭМ было показано, что короткие однотяжевые профибриллы наблюдаются также и этим методом. В присутствии ингибитора GPRP в малых концентрациях фибриногена методом АСМ наблюдали образование ассоциатов, структура которых более соответствовала однотяжевым профибриллам. Образование профибрил из desα-С-фибрина не было зафиксировано.

В результате проведенных экспериментов мы предполагаем, что профибриллы действительно образуются в разбавленных растворах фибрина за счет взаимодействия α-С-доменов соседних молекул друг с другом. Мы предполагаем, что обнаруженные однотяжевые ассоциаты являются переходной формой в структуре волокон, которая обеспечивает сближение молекул в ходе свертывания, для дальнейшей перегруппировки и образования протофибрилл.

Глава III. В **разделе III.1** описываются экспериментальные методики получения и исследования НП, синтезированных на основе БО спиральных вирусов растений. В том числе описываются методы выделения НК и вирусных белков, методики сборки искусственных РНП и ДНП комплексов на основе БО ХВК и ВМАльт, описываются методы приготовления образцов для АСМ и использованные методики сканирования.

В **разделе III.2** описываются результаты АСМ-исследования НП. Несмотря на то что общий принцип реконструкции вирусных частиц известен с середины 70-х годов XX века, разработка конкретных методик сборки искусственных НП с использованием нового БО

или новой НК, а также определение структуры полученных частиц каждый раз представляют собой новую научную задачу. В данной работе использовали два различных БО — ХВК и ВМАльт и два типа НК — РНК и ДНК.

В работе показано, что в 0,01 М буфере Трис-HCl при pH 6,0 образуется стабильный комплекс БО ХВК с ДНК. Для получения фрагментов ДНК использовалась плазмида, содержащая полногеномную кДНК копию генома ХВК. Обработанный рестриктазами препарат разделяли на фракции, содержащие фрагменты определенной длины: 500, 1000, 3000 и 5000 п. н. Полученные частицы исследовали при помощи АСМ, ПЭМ и гельэлектрофореза. Типичные изображения ДНП приведены на рисунке 7г. Отметим, что при pH 8,0 комплекс ДНК с БО ХВК образуется малоэффективно и имеет характерную морфологию «бусин на нити».

Для контроля сборки использовали гомологичные и гетерологичные РНП. Для этого использовали описанную ранее методику: смесь РНК и БО в молярном соотношении 1:700 инкубировали в течение 15 минут в 0,01 М буфере Трис-HCl pH 7,5–8,0 в небольшом объеме 10–20 мкл при 20°C, реакцию останавливали добавлением бромфенолового синего, либо охлаждением реакционной смеси во льду. Ранее было показано, что при pH 8,0 сборка комплекса проходит наиболее эффективно. Типичные изображения гомологичных и гетерологичных РНП приведены на рисунке 7б и 7в. Средняя высота как гомологичных, так и гетерологичных РНП, определенная по нашим данным, составила $10{,}0 \pm 0{,}6$ нм. Длина РНП варьировалась от 30–40 нм до 350–400 нм.

Анализируя эти результаты, мы видим, что гомологичные и гетерологичные РНП неразличимы по своей морфологии. От нативных вирионов ХВК они отличаются только длинной: при сборке РНП мы намеренно используем меньшее соотношение РНК:белок, чем в нативном вирионе (1:700 вместо 1:1350). Это дает возможность

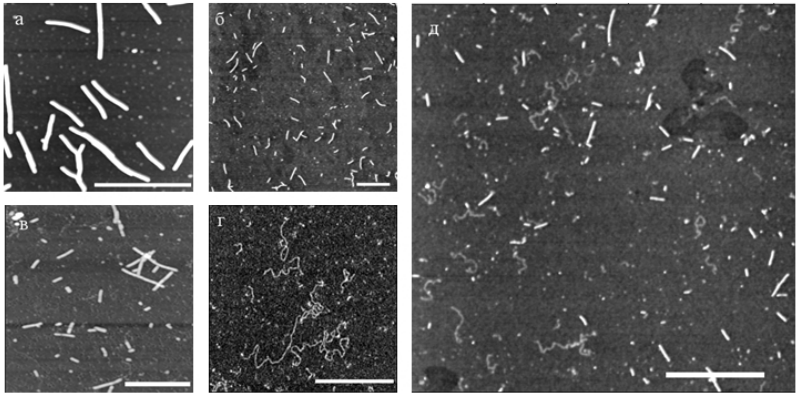

Рис. 7: АСМ-изображения различных нуклеопротеидов на поверхности свежесколотой слюды: а) ХВК; б) гомологичные РНП; в) гетерологичные РНП; г) ДНП; д) ДНП и РНП на одном поле. Мерный отрезок на всех изображениях составляет 1 мкм.

наблюдать недособранные «однохвостые частицы» и гарантировать отсутствие избытка белка на поверхности.

При помощи АСМ было показано, что морфология ДНП существенно отличается от морфологии РНП и нативных вирионов (рис. 7г, д). Частицы ДНП представляют собой протяженные извитые нити, высота которых неоднородна по длине и значительно ниже высоты РНП и ХВК. Это отчетливо видно на рис. 7д, на котором приведено изображение обоих типов частиц, РНП и ДНП на одном поле. Длина ДНП изменялась в зависимости от длины использованной ДНК. При использовании ДНК, состоящей из 5000 п. н., средняя длина полученных ДНП составила 1700 нм. Поскольку длина одной пары оснований составляет 0,34 нм, ДНК, состоящая из 5000 п. н., должна иметь длину ровно 1700 нм. Таким образом, мы можем утверждать, что ДНК в составе комплекса находится в расправ-

ленном состоянии и, следовательно, организация комплекса БО и ДНК в составе ДНП не соответствует структуре вириона.

Высота ДНП по данным АСМ оказалась неоднородна по длине частицы, что также говорит о нерегулярной структуре комплекса. Средняя высота ДНП составила $4{,}0 \pm 0{,}5$ нм, но высота отдельных участков некоторых частиц была еще меньше и соответствовала высоте ДНК — менее 2 нм. Этот эффект проявился в наибольшей степени в экспериментах по сборке ДНП при pH 8,0, когда взаимодействие БО с ДНК происходит малоэффективно, белок не полностью одевает ДНК и весь комплекс в целом представлял собой структуру типа бусин на нити.

Далее в работе была исследована возможность сборки аналогичных ДНП с использованием БО родственного вируса — ВМАльт. Оказалось, что БО ВМАльт не образует устойчивого комплекса с ДНК. Было показано, что при pH 8,0 идет активная ассоциация самого БО, на поверхности образца наблюдали разветвленную сеть волокон, собранных из белка, и несвязанные с этими волокнами молекулы ДНК (рис. 8). В контрольных образцах в отсутствии ДНК также наблюдали образование белковых ассоциатов.

В **разделе III.3** описываются результаты исследования структуры РНП и ДНП методами ферментного анализа, проведенные совместно с сотрудниками кафедры вирусологии Биологического факультета МГУ, которые полностью подтверждают выводы, сделанные на основе результатов микроскопии.

При сравнении данных АСМ и ПЭМ о морфологии нативного вируса ХВК с данными о морфологии РНП и ДНП на основе его БО было сделано предположение о том, что коэффициент механической жесткости ДНП комплекса должен быть существенно ниже, чем коэффициенты жесткости ХВК и РНП, которые должны быть примерно одинаковы. Для того чтобы в будущем была возможность прямо проверить эту гипотезу, были разработаны мето-

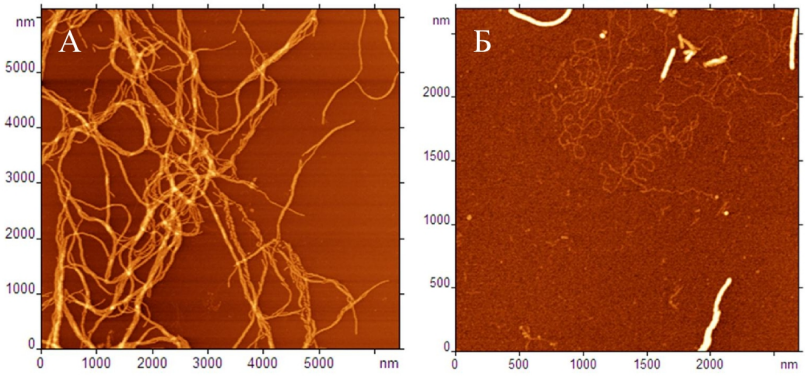

Рис. 8: АСМ-изображения полимеров БО ВМальт (А), на увеличенном изображении (Б) видны молекулы ДНК, не входящие в эти агрегаты.

ды экспериментов по силовому картированию вирусных частиц и алгоритм анализа полученных данных. Результаты работы в этом направлении описаны в **главе IV**. Детально описан алгоритм, разработанный для анализа данных экспериментов по силовому картированию, приведены результаты определения жесткости ВТМ.

Выводы

1. Методом АСМ показано, что на ранних стадиях ассоциации фибрина наряду с двутяжевыми протофибриллами существуют более тонкие ассоциаты — короткие однотяжевые профибриллы, образованные при связывании α-С-доменов соседних молекул друг с другом.

2. Методом АСМ показано, что молекулы фибриногена сильно деформируются при адсорбции на гидрофильную слюду и в меньшей степени деформируются при адсорбции на гидрофоб-

ную ГМДС-слюду. Результаты АСМ подтверждены методом МД.

3. Показана возможность формирования комплексов БО ХВК с ДНК, подобраны оптимальные условия для формирования ДНП. Показано, что укладка белка в ДНП не соответствует структуре оболочки нативного вируса.

4. Показано, что при использовании БО другого потексвируса — ВМАльт — ДНП не образуются. Вместо этого формируются длинные тяжи — ассоциаты БО, не содержащие ДНК.

5. Разработана методика для анализа механических свойств вирусных частиц методом силового картирования.

Список публикаций по теме диссертации

1. Zavyalova E. G., Protopopova A. D., Yaminsky I. V., Kopylov A. M., *Analytical Biochemistry*, 2012, 412, pp. 234–239.

2. Архипенко М. В., Петрова Е. К., Никитин Н. А., Протопопова А. Д., Дубровин Е. В., Яминский И. В., Родионова Н. П., Карпова О. В., Атабеков И. Г., *Acta Naturae*, 2011, 3 (10), стр. 47–53.

3. Zavyalova E. G., Protopopova A. D., Kopylov A. M., Yaminsky I. V., *Langmuir*, 2011, 27, pp. 4922–4927.

4. Никитин Н. А., Сушко А. Д., Архипенко М. В., Родионова Н. И., Карпова О. В., Яминский И. В., *Коллоидный журнал*, 2011, том 73, № 4, стр. 512–519.

5. Сушко А. Д., Завьялова Е. Г., Копылов А. М., Яминский И. В., *Наноиндустрия*, 2010, 6, стр. 26–27.

6. Никитин Н., Сушко А., Карпова О., Яминский И., *Наноиндустрия*, 2009, 6, стр. 16–17.

7. Архипенко М. В., Дубровин Е. В., Карпова О. В., Сушко А. Д., Яминский И. В., Атабеков И. Г., *Наноиндустрия*, 2009, 5, стр. 38.

8. Protopopova A. D., Tolstova A. P., Zavyalova E G., Kopylov A. M., Tverdislov V. A., Yaminsky I. V., Сборник тезисов 2nd International School on Surface Science "Technologies and Measurements on Atomic Scale — 2012 Sochi, Russia.

9. Петрова Е. К., Никитин Н. А., Савватеев М. Н., Протопопова А. Д., Карпова О. В., Шестая международная конференция «Современные достижения бионаноскопии — 2012», Москва, Россия.

10. Протопопова А. Д., Завьялова Е. Г., Толстова А. П., Оферкин И. В., Годзи М. Г., Ахмерова Д. Р., Копылов А. М., Яминский И. В., Сборник тезисов научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» 14–17 ноября 2011, стр. 54.

11. Protopopova A. D., Tolstova A. P., Oferkin I. V., Zavyalova E. G., Godsie M. G., Absracts book of 17th International Biophysics Congress, 31 October – 3 November 2011, p. 244.

12. Petrova E. K., Nikitin N. A., Protopopova A. D., Dubrovin E. V., 2nd International School “Nanomaterials and Nanotechnologies in Living Systems. Safety and Nanomedicine” September 19–24 2011, Moscow region, Russia, pp. 187.

13. Петрова Е. К., Архипенко М. В., Никитин Н. А., Протопопова А. Д., Дубровин Е. В., Яминский И. В., Карпова О. В., Атабеков И. Г., Сборник тезисов Пятой международной конференции «Современные достижения бионаноскопии», Москва, 15–17 июня 2011, стр. 38–40.

14. Толстова А. П., Протопопова А. Д., Оферкин И. В., Завьялова Е. Г., Годзи М. Г., Сборник тезисов Пятой международной конференции «Современные достижения бионаноскопии», Москва, 15–17 июня 2011, стр. 52–53.

15. Петрова Е. К., Никитин Н. А., Сушко А. Д., Архипенко М. В., Сборник тезисов 15 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология — Наука XXI века», Пущино, 18–22 апреля 2011, стр. 67.

16. Сушко А. Д., Завьялова Е. Г., Копылов А. М., Яминский И. В., XXIII Международная зимняя школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 2011, стр. 58.

17. Sushko A. D., Zavyalova E. G., Kopylov A. M., Yaminsky I. V., ESF-EMBO Research Conference «Molecular Perspectives on Protein-Protein Interactions», Spain, 2010, p. 75.

18. Sushko A. D., 20th Anniversary Korea-Russia Science & Technology Forum, Moscow, 2010, p. 42.

19. Завьялова Е. Г., Сушко А. Д., Копылов А. М., Яминский И. В., Сборник тезисов конференции «Современные достижения бионаноскопии», Москва, 2010, стр. 26.

20. Архипенко М. В., Никитин Н. А., Полозов В. М., Сушко А. Д., Дубровин Е. В., Сборник тезисов 1-й международной научной школы «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах», Москва, 2009, стр. 160–162.

21. Сушко А. Д., Никитин Н. А., Полозов В. М., Архипенко М. В., Яминский И. В., Сборник тезисов конференции «Современные достижения бионаноскопии», Москва, 2009, стр. 52–53.