



УДК 577.322.7

А.В. Сабанцев <sup>1</sup>, С.О. Федечкин <sup>2</sup>, М.А. Ходорковский <sup>1</sup>,  
Г.Е. Побегалов <sup>1</sup>, А.Д. Ведяйкин <sup>1</sup>, С.Л. Смирнов <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный политехнический университет

<sup>2</sup> Западный университет штата Вашингтон

## ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ КАЛЬЦИЙ-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ ДОМЕНА 6 ВИЛЛИНА

Методом спектроскопии собственной флуоресценции белка охарактеризованы кальций-связывающие свойства домена 6 актинрегулирующего белка виллина. Выдвинуто предположение о наличии в домене 6 виллина сайта связывания кальция, и получена оценка константы диссоциации для связывания данного домена с кальцием. Полученное значение  $K_d$  (32 мкМ) свидетельствует о том, что домен 6 виллина может отвечать за физиологически значимый переход этого белка от пучкования к диссоциации актиновых филаментов в ответ на рост концентрации внутриклеточного кальция.

ВИЛЛИН, СОБСТВЕННАЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ БЕЛКОВ, ЦИТОСКЕЛЕТ, МОДУЛЬНЫЕ БЕЛКИ.

### Введение

Виллин — модульный белок, состоящий из 826 аминокислотных остатков и относящийся к суперсемейству гельзолин-подобных актинсвязывающих белков [1], куда также входят, помимо прочих, северин [2], гельзолин [1], супервиллин [3] и архвиллин [4]. Виллин участвует в поддержании микроворсинок в клетках эпителия кишечника и почек [5]. Аминокислотную последовательность этого белка можно разделить на две части: гельзолин-подобное ядро на *N*-конце и небольшой домен (headpiece — НР) на *C*-конце, который соединен с ядром неструктурированным линкером длиной 40 аминокислотных остатков [1, 6] (рис. 1, б). Ядро виллина примерно на 50 % идентично гельзолину по аминокислотной последовательности и состоит из шести гомологичных повторов *V1–V6* (рис. 1, б), последний из которых, *V6*, соединен линкером с НР-доменом [1].

В регуляции активности виллина действует ряд факторов, в том числе уровень кальция [1], фосфорилирование [5] и другие. При физиологическом уровне кальция виллин способен пучковать (bundle) актиновые филаменты (*F*-актин), а в ответ на повышение уровня кальция [1] или фосфорилирование [7] — нуклеировать, разрезать

или блокировать их рост. Гельзолин также обладает способностью разрезать актиновые филаменты в ответ на повышение уровня ионов кальция, для чего требуется их концентрация около 10 мкМ [8]. Способность виллина разрезать *F*-актин, в свою очередь, активируется при концентрации ионов кальция 100 – 200 мкМ [9]; такие высокие концентрации достигаются в клетке только при клеточном стрессе и апоптозе. Фосфорилирование ядра виллина, в том числе домена *V6*, делает возможным разрезание актиновых филаментов этим белком уже при наномолярных концентрациях кальция [5, 7].

Механизм активации кальцием гельзолина изучен достаточно хорошо [8]. При низких концентрациях кальция домен *G6* гельзолина формирует контакт с доменом *G2*, содержащим сайт связывания актина, что предотвращает связывание белка с *F*-актином. При связывании кальция с доменом *G6* в последнем происходит конформационная перестройка, приводящая к потере контакта с доменом *G2* и открытием сайта связывания *F*-актина. Белок при этом переходит из неактивной закрытой в активную раскрытую конформацию [8, 10].

Одним из ключевых при изучении виллина является вопрос о том, имеет ли

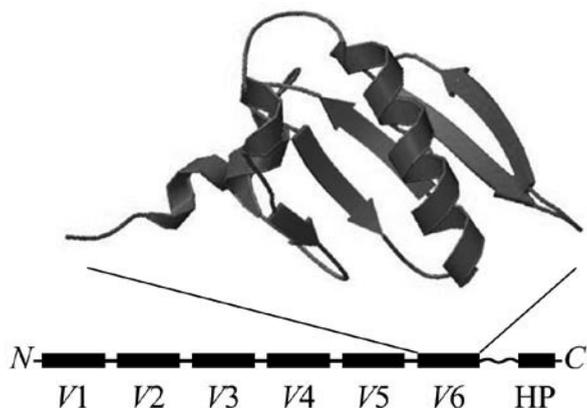


Рис. 1. Структура виллина и его домена 6 (V6): *a* – пространственная структура домена (определена методом ЯМР [11]), *б* – доменная структура виллина.

V1-V6 – гельзолин-подобное ядро виллина, состоящее из шести гомологичных доменов; NP (headpiece) – домен виллина; гибкий линкер между NP и V6 обозначен волнистой линией

этот белок механизм активации кальцием открытой конформации, сходный с гельзолином. Исследования участка V6 – NP виллина курицы, содержащего домены V6 и NP, соединенные гибким линкером, показали, что этот участок находится в состоянии мономера и способен пучковать актиновые филаменты при высоких концентрациях кальция, но при отсутствии кальция теряет эту способность и агрегирует [6]. В то же время домен NP виллина нечувствителен к кальцию и способен при любых его концентрациях связываться с актиновыми филаментами [12–14]. В связи с этим было выдвинуто предположение о наличии в домене V6 сайта связывания кальция. Пространственная структура домена V6, определенная методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР), представлена на рис. 1, *a*. Аминокислотная последовательность домена:

PRLFECSTKGRFLATEIVDFTQD  
 DLDENDVYLLDTWDQIFFWIGKGAN  
 SEKEAAETAQEYLRSHPGSRDLDTPII  
 VVKQGFEPPTFTGWFMWDPLCWSDR  
 KSY.

Целью данной работы являлось изучение кальций-связывающих свойств домена V6 виллина при помощи спектроскопии

собственной флуоресценции белка.

### Материалы и методы

#### Подготовка образца V6 домена виллина.

Процедура экспрессии и выделения домена 6 виллина была подробно описана ранее [10]. Все же приведем ее краткое описание.

Домен V6 сверхэкспрессировался в клетках *E.coli* клеточной линии BL21(DE3) (Novagen), после чего клетки лизировались и лизат подвергался двум этапам хроматографической очистки на колонках Sephadex G50 и GE Superdex 75 HP-SEC. Лизирование и хроматография осуществлялись в буфере А (150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотрейтол, 0,01% NaN<sub>3</sub>, 20 мМ PIPES; pH = 7,0).

Для перевода белка в буфер без кальция осуществлялся обмен буфера с использованием мембранных концентраторов Millipore (порог отсеивания 3 кДа), после чего к образцу добавлялся стократный избыток этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), которая затем также удалялась посредством обмена буфера.

**Флуориметрические исследования.** Для регистрации собственной флуоресценции остатков триптофана в белке использовался флуориметр Cary Eclipse (Varian). В ходе измерения образцы находились в кварцевых кюветах, за исключением эксперимента по регистрации динамики установления равновесия при добавлении кальция к домену V6 виллина.

Для исследования обратимости связывания домена V6 виллина с кальцием к образцу белка концентрации 10 мкМ в буфере А добавлялась EDTA до концентрации 5 мМ, что приводило к снижению концентрации кальция не менее, чем на два порядка. После этого концентрация кальция в растворе восстанавливалась до уровня 5 мМ добавлением раствора CaCl<sub>2</sub>. В ходе эксперимента регистрировались спектры флуоресценции образца в диапазоне от 290 до 500 нм при возбуждении на длине волны 280 нм.

Регистрация динамики установления равновесия при добавлении кальция к домену V6 виллина осуществлялась в акриловой УФ-прозрачной кювете при не-

прерывном перемешивании при помощи магнитной мешалки. В образец объемом 2,25 мл и концентрацией  $I\delta$  2,23 мкМ добавлялся раствор  $CaCl_2$  до концентрации 5,0 мМ. В ходе этого регистрировалась динамика интенсивности флуоресценции образца на длине волны 350 нм при возбуждении на длине волны 280 нм.

Титрование домена  $I\delta$  виллина кальцием осуществлялось посредством добавления к образцу в кювете (концентрация белка 17 мкМ, объем 600 мкл) по 1 мкл раствора  $CaCl_2$  соответствующих концентраций (от 0,6 мМ до 0,6 М). После каждого добавления кальция образец инкубировался 5 мин для установления равновесия, после чего осуществлялось измерение спектра собственной флуоресценции белка в диапазоне 290 – 500 нм при возбуждении на длине волны 280 нм. Время инкубации было выбрано с учетом данных о кинетике установления равновесия при добавлении кальция к домену  $I\delta$  виллина (рис. 2, б), демонстрирующих, что установление равновесия занимает менее 10 с. Для построения кривой титрования использовалась средняя интенсивность флуоресценции белка в диапазоне от 325 до 375 нм.

Обработка кривой титрования осуществлялась в рамках стандартного подхода для обратимого связывания белка с лигандом в эквимольных пропорциях. В качестве меры афинности использовалась

константа диссоциации  $K_d$  [15]. Для нелинейной регрессии данных использовалось уравнение, описывающее обратимое связывание белка с кальцием, вызывающее изменение интенсивности регистрируемого сигнала:

$$I = I_0 + (\Delta I / 2 \cdot [I\delta]) \cdot \{ [I\delta] + [Ca^{2+}] + K_d - (([I\delta] + [Ca^{2+}] + K_d)^2 - 4 \cdot [I\delta] \cdot [Ca^{2+}])^{1/2} \} \quad (1)$$

где  $I$  – регистрируемая интенсивность флуоресценции;  $I_0$  – интенсивность флуоресценции белка, свободного от кальция;  $\Delta I$  – разность между интенсивностями флуоресценции белка, связанного с кальцием и свободного от него;  $[I\delta]$ ,  $[Ca^{2+}]$  – концентрации белка и кальция;  $K_d$  – константа диссоциации для реакции связывания белка с кальцием.

### Результаты и их обсуждение

**Обратимое конформационное изменение домена  $I\delta$  виллина при связывании с кальцием.** Конформационные изменения белков вызывают в них трансформацию ближайшего окружения остатков триптофана, что отражается на интенсивности собственной флуоресценции. Было обнаружено, что при снижении концентрации кальция в растворе домена  $I\delta$  виллина посредством добавления 5 мМ EDTA интенсивность соб-

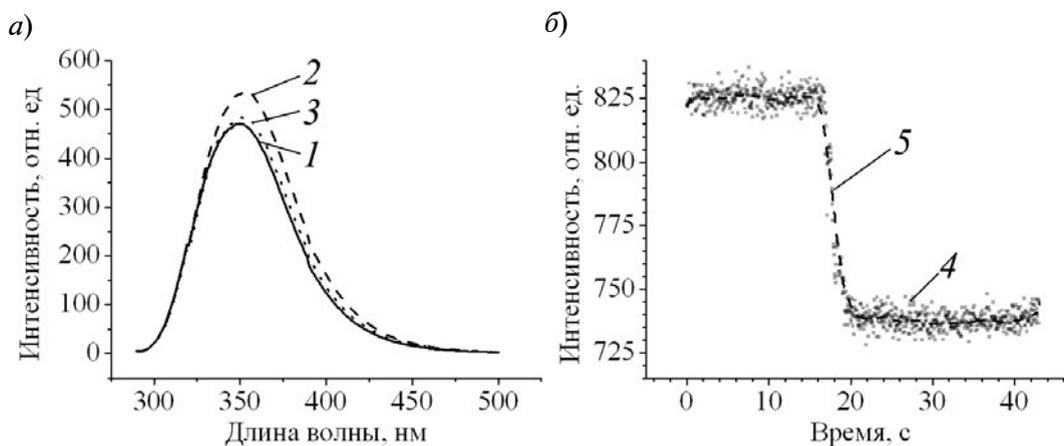


Рис. 2. Обратимость (а) и динамика (б) связывания домена  $I\delta$  виллина с кальцием: 1 – 3 – спектры флуоресценции  $I\delta$  в буфере А до (1) и после (2) добавления EDTA до концентрации 5 мМ, а также после повторного увеличения уровня  $Ca^{2+}$  до 5 мМ (3); на рис. (б) показаны исходный (4) и сглаженный (5) сигналы; окно сглаживания в 50 точек

ственной флуоресценции белка возрастала примерно на 10 %. Повторное добавление кальция к раствору белка возвращало интенсивность флуоресценции к исходным значениям (рис. 2, *a*).

Полученные данные позволяют заключить, что домен *I*6 виллина способен обратимо связывать ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , что приводит к конформационной перестройке в этом домене. Кинетические данные о процессе установления равновесия показывают, что интенсивность флуоресценции белка после добавления кальция выходит на насыщение менее, чем за 10 с (рис. 2, *b*). Эти данные указывают на лимитацию диффузией скорости связывания *I*6 с кальцием, что может иметь существенное значение для регуляции микроворсинок (толщина 0,2 мкм) виллином.

**Оценка константы диссоциации для связывания домена *I*6 виллина с кальцием.** Для дальнейшей характеристики кальций-связывающих свойств домена *I*6 виллина была проведена оценка константы диссоциации для связывания этого домена с кальцием. С этой целью осуществлялось титрование раствора домена *I*6 виллина кальцием в диапазоне от 0 до 2000 мкМ [ $\text{Ca}^{2+}$ ], в ходе которого регистрировались спектр и интенсивность собственной флуоресценции образца (рис. 3).

На рис. 3, *a* приведены спектры соб-

ственной флуоресценции домена *I*6 виллина при различных концентрациях кальция. При повышении концентрации кальция наблюдаются снижение интенсивности флуоресценции и небольшой сдвиг полосы испускания в коротковолновую область.

Кривая титрования домена *I*6 виллина кальцием (рис. 3, *b*) позволяет определить долю связанного с кальцием белка как функцию концентрации кальция. Нелинейная регрессия полученной зависимости с использованием модели (1) позволила оценить константу диссоциации для связывания данного домена с кальцием, которая составила  $32 \pm 5$  мкМ. Выбранная модель хорошо описывает экспериментальные данные ( $R^2 = 0,96$ ).

### Выводы

Полученные результаты подтверждают данные ЯМР [10] о способности домена *I*6 виллина связываться с кальцием. При этом процесс сопровождается изменением конформации этого домена.

Кривая титрования домена *I*6 кальцием хорошо описывается уравнением (1) для эквимольного связывания белка с лигандом при значении  $K_d = 32 \pm 5$  мкМ.

Найденное значение  $K_d$  лежит в физиологическом диапазоне концентраций кальция, связанных с переключением виллина

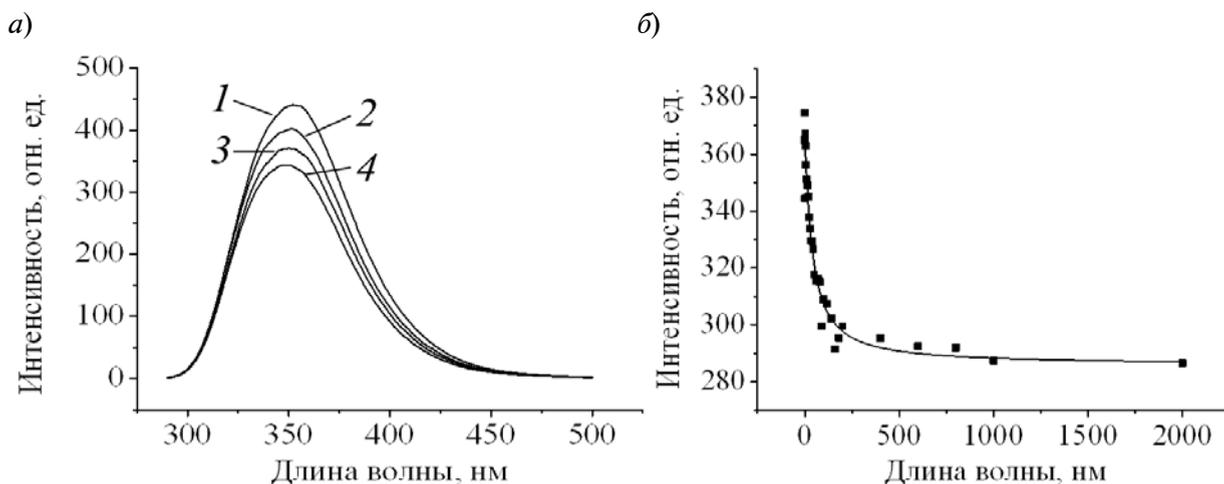


Рис. 3. Результаты титрования домена *I*6 виллина кальцием: *a* – спектры флуоресценции белка при концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , равной 0 (1), 30 (2), 100 (3), 2000 (4) мкМ; *b* – кривая титрования (символы – экспериментальные точки, линия – результат нелинейной регрессии данных)

из состояния пучкования филаментов актина в состояние разрыва *F*-актина. Это наблюдение позволяет предположить, что домен *И6* виллина может участвовать в изменении активности виллина в ответ на повышение концентрации кальция (порог активации – 200 мкМ) [1].

Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что виллин обладает аналогичным гельзолину механизмом активации разрыва актиновых филаментов при повышении концентрации кальция.

Дальнейшие исследования этого домена с использованием сайт-направленного мутагенеза помогут идентифицировать аминокислотные остатки, участвующие в формировании сайта связывания кальция в домене *И6*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение 14.В37.21.1230, с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий ГОУ СПбГПУ» на базе ФГБОУ ВПО «СПбГПУ».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Bretscher A., Weber K.** Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both *G* and *F* actin in a calcium-dependent manner // *Cell*. 1980. Vol. 20. No. 3. pp. 839-47.
2. **Andre E., Lottspeich F., Schleicher M., Noegel A.** Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain *F*-actin severing domains // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. No. 2. pp. 722-7.
3. **Pestonjamas K.N., Pope R.K., Wulfschlegel J.D., Luna E.J.** Supervillin (p205): A novel membrane-associated, *F*-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily // *J. Cell Biol.* 1997. Vol. 139. No. 5. pp. 1255-69.
4. **Gangopadhyay S.S., Takizawa N., Gallant C., Barber A.L., Je H.D., Smith T.C., Luna E.J., Morgan K.G.** Smooth muscle archvillin: a novel regulator of signaling and contractility in vascular smooth muscle // *J. Cell. Sci.* 2004. Vol. 117, Pt. 21. pp. 5043-57.
5. **Khurana S., George S.P.** Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective // *FEBS Lett.* 2008. Vol. 582. No. 14. pp. 2128-39.
6. **Smirnov S.L., Isern N.G., Jiang Z.G., Hoyt D.W., McKnight C.J.** The isolated sixth gelsolin repeat and headpiece domain of villin bundle *F*-actin in the presence of calcium and are linked by a 40-residue unstructured sequence // *Biochemistry*. 2007. Vol. 46. No. 25. pp. 7488-96.
7. **Kumar N., Khurana S.** Identification of a functional switch for actin severing by cytoskeletal proteins // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. No. 24. pp. 24915-8.
8. **McGough A.M., Staiger C.J., Min J.K., Simonetti K.D.** The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions // *FEBS Lett.* 2003. Vol. 552. No. 2-3. pp. 75-81.
9. **Walsh T.P., Weber A., Davis K., Bonder E., Mooseker M.** Calcium dependence of villin-induced actin depolymerization // *Biochemistry*. 1984. Vol. 23. No. 25. pp. 6099-102.
10. **Якимов А.П., Федечкин С.О., Неринский К.Б., Шабалин К.А., Смирнов С.Л.** Структурная стабильность домена 6 виллина в отсутствие ионов кальция // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. 2013. № 2 (170). С. 149–154.
11. **Fedechkin S.O., Brockerman J., Pfaff D.A., Burns L., Webb T., Nelson A., Zhang F., Sabantsev A.V., Melnikov A.S., McKnight C.J., Smirnov S.L.** Gelsolin-like activation of villin: calcium sensitivity of the long helix in domain 6 // *Biochemistry*. 2013. Vol. 52. No. 45. pp. 7890-900.
12. **Finidori J., Friederich E., Kwiatkowski D.J., Louvard D.** *In vivo* analysis of functional domains from villin and gelsolin // *J. Cell Biol.* 1992. Vol. 116. No. 5. pp. 1145-55.
13. **Meng J., Vardar D., Wang Y., Guo H.C., Head J.F., McKnight C.J.** High-resolution crystal structures of villin headpiece and mutants with reduced *F*-actin binding activity // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. No. 36. pp. 11963-73.
14. **Vardar D., Buckley D.A., Frank B.S., McKnight C.J.** NMR structure of an *F*-actin-binding «headpiece» motif from villin // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 294. No. 5. pp. 1299-310.
15. **Kumar N., Tomar A., Parrill A.L., Khurana S.** Functional dissection and molecular characterization of calcium-sensitive actin-capping and actin-depolymerizing sites in villin // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279. No. 43. pp. 45036-46.

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**САБАНЦЕВ Антон Владимирович** – аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
 sabantsev.a.v@gmail.com

**ФЕДЕЧКИН Станислав Олегович** – студент-магистрант факультета химии Западного университета штата Вашингтон.

Department of Chemistry, Western Washington University, Bellingham, WA, USA  
fedetcs@gmail.com

**ХОДОРКОВСКИЙ Михаил Алексеевич** – кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник ПНИЛ инженерно-строительного факультета Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
khodorkovskii@mail.ru

**ПОБЕГАЛОВ Георгий Евгеньевич** – аспирант кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
lwdrums@gmail.com

**ВЕДЯЙКИН Алексей Дмитриевич** – студент Санкт-Петербургского государственного политехнического университета.

195251, Россия, г. Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29  
god-fish@mail.ru

**СМИРНОВ Сергей Львович** – кандидат биологических наук, доцент факультета химии Западного университета штата Вашингтон.

Department of Chemistry, Western Washington University, Bellingham, WA, USA  
smirnov@chem.wvu.edu

---

*Sabantsev A.V., Fedechkin S.O., Khodorkovskii M.A., Pobegalov G.E., Vedyaykin A.D., Smirnov S.L.* CHARACTERISATION OF VILLIN DOMAIN 6 CALCIUM-BINDING PROPERTIES.

Using intrinsic protein fluorescence spectroscopy actin-regulating protein villin domain 6 calcium-binding properties were characterized. Acquired data suggests the presence of calcium-binding site in villin domain 6. The affinity of this calcium-binding site was estimated to be 32  $\mu\text{M}$ , which suggested that the domain could be responsible for physiological transition of villin from bundling to severing actin filaments in response to the increase of intercellular calcium concentration.

VILLIN, INTRINSIC PROTEIN FLUORESCENCE, CYTOSKELETON, MODULAR PROTEINS.

#### REFERENCES

1. **Bretscher A., Weber K.** Villin is a major protein of the microvillus cytoskeleton which binds both *G* and *F* actin in a calcium-dependent manner. *Cell*, 1980, Vol. 20, No. 3, pp. 839-47.
2. **Andre E., Lottspeich F., Schleicher M., Noegel A.** Severin, gelsolin, and villin share a homologous sequence in regions presumed to contain *F*-actin severing domains. *J. Biol. Chem*, 1988, Vol. 263, No. 2, pp. 722-7.
3. **Pestonjamas K.N., Pope R.K., Wulfschlegel J.D., Luna E.J.** Supervillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J. Cell Biol*, 1997, Vol. 139, No. 5, pp. 1255-69.
4. **Gangopadhyay S.S., Takizawa N., Gallant C., Barber A.L., Je H.D., Smith T.C., Luna E.J., Morgan K.G.** Smooth muscle archvillin: a novel regulator of signaling and contractility in vascular smooth muscle. *J. Cell. Sci*, 2004, Vol. 117, Pt. 21, pp. 5043-57.
5. **Khurana S., George S.P.** Regulation of cell structure and function by actin-binding proteins: villin's perspective. *FEBS Lett*, 2008, Vol. 582, No. 14, pp. 2128-39.
6. **Smirnov S.L., Isern N.G., Jiang Z.G., Hoyt D.W., McKnight C.J.** The isolated sixth gelsolin repeat and headpiece domain of villin bundle F-actin in the presence of calcium and are linked by a 40-residue unstructured sequence. *Biochemistry*, 2007, Vol. 46, No. 25, pp. 7488-96.

7. Kumar N., Khurana S. Identification of a functional switch for actin severing by cytoskeletal proteins. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, No. 24, pp. 24915-8.

8. McGough A.M., Staiger C.J., Min J.K., Simonetti K.D. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. *FEBS Lett.*, 2003, Vol. 552, No. 2-3, pp. 75-81.

9. Walsh T.P., Weber A., Davis K., Bonder E., Mooseker M. Calcium dependence of villin-induced actin depolymerization. *Biochemistry*, 1984, Vol. 23, No. 25, pp. 6099-102.

10. Yakimov A.P., Fedechkin S.O., Nerinovskiy K.B., Shabalin K.A., Smirnov S.L. Struktur-naya stabil'nost' domena 6 villina v otsutstvie ionov kal'tsiya. *St. Petersburg State Polytechnical University Journal: Physics and Mathematics*, 2013, No. 2 (170), pp. 149-154. (rus)

11. Fedechkin S.O., J. Brockerman, Pfaff D.A., L. Burns, T. Webb, A. Nelson, F. Zhang, Sabantsev A.V., Melnikov A.S., McKnight C.J., Smirnov S.L.

Gelsolin-like activation of villin: calcium sensitivity of the long helix in domain 6.. *Biochemistry*, 2013, Vol. 52, No. 45, pp. 7890-900.

12. Finidori J., Friederich E., Kwiatkowski D.J., Louvard D. In vivo analysis of functional domains from villin and gelsolin. *J. Cell Biol.*, 1992, Vol. 116, No. 5, pp. 1145-55.

13. Meng J., Vardar D., Wang Y., Guo H.C., Head J.F., McKnight C.J. High-resolution crystal structures of villin headpiece and mutants with reduced *F*-actin binding activity. *Biochemistry*, 2005, Vol. 44, No. 36, pp. 11963-73.

14. Vardar D., Buckley D.A., Frank B.S., McKnight C.J. NMR structure of an *F*-actin-binding «headpiece» motif from villin. *J. Mol. Biol.*, 1999, Vol. 294, No. 5, pp. 1299-310.

15. Kumar N., Tomar A., Parrill A.L., Khurana S. Functional dissection and molecular characterization of calcium-sensitive actin-capping and actin-depolymerizing sites in villin. *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, No. 43, pp. 45036-46.

#### THE AUTHORS

##### SABANTSEV Anton V.

*St. Petersburg State Polytechnical University,*  
29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
sabantsev.a.v@gmail.com

##### FEDECHKIN Stanislav O.

*Western Washington University*  
Bellingham, WA, USA  
fedetcs@gmail.com

##### KHODORKOVSKII Mikhail A.

*St. Petersburg State Polytechnical University,*  
29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
khodorkovskii@mail.ru

##### POBEGALOV George E.

*St. Petersburg State Polytechnical University,*  
29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
lwdrums@gmail.com

##### VEDYAYKIN Alexey D.

*St. Petersburg State Polytechnical University,*  
29 Politekhnikeskaya St., St. Petersburg, 195251, Russia  
god-fish@mail.ru

##### SMIRNOV Serge L.

*Western Washington University*  
Bellingham, WA, USA  
smirnov@chem.wvu.edu