

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРИСТАЛЛОГРАФИЯ И  
ФОТОНИКА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН

На правах рукописи

ДАДИНОВА ЛЮБОВЬ АЛЕКСАНДРОВНА

**МАЛОУГЛОВОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ РАССЕЙАНИЕ  
В ИССЛЕДОВАНИИ ТРЕХМЕРНЫХ СТРУКТУР  
БИОНАНОКОМПОЗИТОВ НА ОСНОВЕ ДНК И РЯДА  
БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В КАТАБОЛИЗМЕ *ESCHERICHIA COLI*  
В СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗЕ РОСТА**

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук  
по специальности 01.04.07 - физика конденсированного состояния

Научный руководитель:  
доктор химических наук  
Штыкова Элеонора Владимировна

Москва 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. Малоугловое рассеяние по литературным данным .....	13
1.1. История развития малоуглового рассеяния .....	13
1.2. Теория малоуглового рентгеновского рассеяния.....	14
1.2.1. Монодисперсные системы.....	16
1.2.2. Многокомпонентные системы .....	18
1.2.3. Частично упорядоченные системы.....	19
1.3. Эксперимент по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей.....	20
1.3.1. Лабораторная установка .....	21
1.3.2. Установки на источнике синхротронного излучения .....	23
1.4. Обработка данных МУРР .....	26
1.4.1. Первичная обработка данных .....	26
1.4.2. Структурный анализ частично упорядоченных образцов .....	27
1.4.3. <i>Ab initio</i> метод восстановления структуры .....	28
1.4.4. Гибридные методы. Метод молекулярной тектоники. Расчет кривой рассеяния от модели атомного разрешения. Дистраивание недостающих фрагментов.....	34
1.4.5. Анализ гибких и дисперсных по формам систем .....	42
1.5. Заключение к Главе 1 .....	45
ГЛАВА 2. Общие сведения о белках по литературным данным .....	47
2.1. Структура и функции белков .....	47
2.2. Белки-ферменты.....	49
2.3. Постановка задачи .....	52
ГЛАВА 3. Структурные исследования белков, участвующих в катаболизме <i>E. coli</i> в стационарной фазе роста клеток.....	54
3.1. Эксперимент по малоугловому рассеянию.....	54

3.2. Дополнительные методы, используемые для анализа структуры ферментов в растворе .....	54
3.2.1. Аналитическое ультрацентрифугирование .....	54
3.2.2. Эксклюзионная хроматография .....	55
3.2.3. Молекулярный докинг .....	55
3.3. Гомогенные растворы белков.....	59
3.3.1. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы (FbaB) из <i>Escherichia coli</i> , участвующей в катаболизме	59
3.3.2. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании неорганической пирофосфатазы (PPase) из <i>Escherichia coli</i> , участвующей в катаболизме .....	64
3.4. Гетерогенные растворы белков.....	68
3.4.1. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании 5-кето-4-дезоксигуанат изомеразы (KduI) из <i>Escherichia coli</i> , участвующей в катаболизме .....	68
3.4.2. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании глутамат декарбоксилазы (GadA) из <i>Escherichia coli</i> , участвующей в катаболизме .....	73
3.4.3. Малоугловое рентгеновское рассеяние и молекулярный докинг в исследовании дигидролипоилдегидрогеназы (LpD) из <i>Escherichia coli</i> , участвующей в катаболизме .....	80
3.5. Заключение.....	86
ГЛАВА 4. Холестерические жидкокристаллические дисперсии (по литературным данным) .....	88
4.1. Формирование жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных молекул ДНК .....	88
4.2. Пространственная организация молекул дц-ДНК в ХЖКД ДНК .....	92
4.3. Способы формирования наноконструкций на основе ХЖКД ДНК в условиях водно-солевого раствора ПЭГ с гостевыми включениями .....	93
4.4. ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота.....	95
4.5. Постановка задачи .....	98
ГЛАВА 5. Исследование пространственной структуры ХЖКД ДНК и зависимость взаимодействия их с наночастицами золота .....	100

5.1. Круговой дихроизм, как дополнительный метод исследования структуры ХЖКД ДНК.....	100
5.1. Пространственная структура ХЖКД ДНК.....	100
5.2. Исследование эффективности взаимодействия ХЖКД ДНК с наночастицами золота разного размера.....	107
5.3. Заключение к Главе 5 .....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	115
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ .....	118
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	120
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	137

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность

Сочетание молекулярной биологии и нанотехнологии привело к возможности использования многообразия биологических молекул (таких как липиды, белки и нуклеотиды) в качестве строительных блоков. Биомакромолекулы обладают способностью к образованию сложных пространственных структур. Этот процесс можно регулировать на молекулярном и надмолекулярном уровнях, благодаря чему открываются перспективы создания широкого ряда наноструктур с заданными свойствами. Одним из актуальных и перспективных с практической точки зрения направлений развития нанотехнологий, в котором используются биологические молекулы, является создание нанобиоустройств (молекулярных машин) и биосовместимых наноматериалов, которые находят широкое применение в медицине и биотехнологии. В качестве молекулярной машины можно рассматривать живую клетку, со всем многообразием ее биологических компонентов, в том числе белков. Наряду с множеством других функций, белки могут функционировать в качестве ферментов, которые являются движущей силой для различных биохимических реакций в организме. Так, регуляция метаболических процессов в клетке осуществляется за счет белок-белковых взаимодействий, и нарушение этих взаимодействий может иметь драматические последствия, вплоть до развития специфических заболеваний. Исследование интерактома всего организма, т.е. полной карты всех взаимодействий, невозможно без знания структуры и функций отдельных его компонентов на наноразмерном уровне. Последнее, во-первых, является критическим для понимания принципов организации живой материи и, во-вторых, необходимо для направленной модификации индивидуальных биологических объектов с целью управления процессами, происходящими в клетке.

В связи с этим первая часть нашей работы посвящена исследованиям пяти белков (фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза, неорганическая пирофосфатаза, 5-

кетогидроксиацетат-4-дезоксисульфат изомераза, глутамат декарбоксилаза, дигидролипоилдегидрогеназа), участвующих в катаболизме стационарной фазы роста клеток *Escherichia coli*. Несмотря на широкое использование *E. coli* в качестве модельной системы, ее интерактом до конца не определен. Исследование особенностей функционирования клетки в стационарной фазе интересно с практической и фундаментальной точек зрения. В этот период может происходить снижение метаболической активности в сочетании с повышением устойчивости к стрессовым эффектам, вызванным недостатком питательных веществ, при этом клетки становятся существенно более устойчивыми к воздействию антибактериальных препаратов. Многие клеточные процессы, претерпевают изменения в ходе стационарной фазы, чтобы обеспечить защитные механизмы против неблагоприятных условий окружающей среды. Определение структурных и функциональных особенностей отдельных белков, участвующих в обмене веществ, а также выяснение механизмов регуляции метаболических процессов является, таким образом, важной фундаментальной задачей, позволяющей понять природу различных взаимодействий в клетках и их ответа на стресс.

Вторая часть работы, также связанная с изучением структуры и функции биологических макромолекул, посвящена исследованию холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК и их комплексов с наночастицами золота. Технология наноконструирования на основе нуклеиновых кислот дает возможность использовать молекулы ДНК в качестве строительных блоков для создания биосовместимых наноматериалов, которые могут найти применение в качестве носителей для направленной доставки лекарственных препаратов.

Основным экспериментальным методом, использованным в данной работе, являлось малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР), которое занимает особое место среди структурных методов, так как с его помощью возможно изучение структуры вещества в условиях максимально приближенных к физиологическим, что особенно важно для медицинских и биологических исследований. МУРР - метод неразрушающей структурной диагностики, который благодаря

современным подходам к интерпретации экспериментальных данных хорошо сочетается с другими взаимодополняющими биофизическими и биоинформатическими методами. Примером такого метода может служить молекулярный докинг, который был использован в данной работе для предсказания структуры ассоциатов одного из исследуемых белков - дигидролипоилдегидрогеназы.

Таким образом, актуальность темы исследования определяется как выбором метода, так и актуальностью и практической значимостью исследуемых объектов, которые имеют потенциальное биомедицинское применение.

### **Цели и задачи работы**

#### **Цели:**

Определение с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния и других взаимодополняющих структурных методов свойств и поведения в растворе ряда белков, участвующих в катаболизме стационарной фазы роста клеток *Escherichia coli*, а также структуры комплексов холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК с инкорпорированными наночастицами золота разного размера.

Для достижения поставленных целей решались следующие **задачи**:

1. Восстановление формы низкого разрешения и моделирование четвертичной структуры фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы (FbaB) класса I в растворе.
2. Определение четвертичной структуры неорганической пирофосфатазы (PPase) в растворе и сравнение ее с кристаллографической моделью.
3. Исследование особенностей строения и поведения белков 5-кето-4-дезоксипуронат изомеразы (KduI), глутамат декарбоксилазы (GadA), дегидролипиддегидрогеназы (LpD) в растворе.
4. Определение макромолекулярных характеристик ферментов FbaB, PPase, KduI, GadA и LpD.

5. Изучение структурных характеристик холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК и их комплексов с инкорпорированными наночастицами золота разного размера.
6. Структурное моделирование ХЖКД ДНК при разных условиях их образования.
7. Выявление эффектов, вызываемых инкорпорацией наночастиц золота разного размера, на структуру ХЖКД ДНК.

#### **Научная новизна:**

1. Получены модели атомного разрешения третичной и четвертичной структуры белка бактериальной FbaV класса I.
2. Выявлены изменения в четвертичной структуре PPase в растворе по сравнению со структурой фермента в кристалле.
3. Показано, что в растворе белок KduI представляет собой набор олигомерных форм. Была предложена гипотеза, что причина такого поведения связана с купиновой природой белка и его аллостеричностью.
4. Анализ данных поведения GadA в растворе показал, что при pH 7.5 этот белок, представляющий собой гексамер при pH 4.6, частично диссоциирует на димеры. При этом форма, компактность и количество димеров зависит от концентрации соли в буфере.
5. Показано, что белок LpD в растворе частично олигомеризуется и представляет собой равновесную смесь димеров и тетрамеров. Обнаруженная гибкость тетрамеров обусловлена стехиометрическими и функциональными свойствами мультиферментных комплексов, в которых участвует LpD.
6. Для гетерогенных растворов белков KduI, GadA и LpD были определены объемные доли каждой компоненты в смеси.
7. Данные малоуглового рассеяния и полученные модели белков депонированы в биологическую базу данных малоуглового рассеяния (SASBDB: <http://www.sasbdb.org/>) с соответствующими кодами:



SASDBZ2 (FbaB), SASDBY2 (PPase), SASDB23 (KduI), SASDB33 и SASDBS4 (GadA).

8. С помощью МУРР и моделирования показано изменение структуры ХЖКД ДНК, сформированных в водно-солевом растворе полиэтиленгликоля (ПЭГ), при изменении концентрации ПЭГ.
9. Выявлена количественная зависимость взаимодействия ХЖКД ДНК с наночастицами золота от размера наночастиц.
10. Проанализированы структурные изменения, вызванные инкорпорацией наночастиц золота в структуру ХЖКД ДНК.

### **Научно-практическая значимость:**

При адаптации клетки к стрессу происходит замедление метаболических процессов и значительно увеличивается устойчивость бактерий к воздействию антибактериальных препаратов. Изучение приводящих к резистентности клеточных механизмов и ферментов, вовлеченных в них, является одной из важнейших проблем современной медицины. Результаты, полученные при исследовании структурных особенностей в растворе ферментов FbaB, PPase, KduI, GadA и LpD носят фундаментальный характер, так как относятся к строению живой материи, а также имеют практический интерес, поскольку позволяют понять функции данных ферментов в условиях стресса и могут служить платформой для направленного воздействия на процессы метаболизма в клетках.

Варьируя параметры образования ХЖКД ДНК, например, концентрацию ПЭГ, можно получать разные структуры с отличающимися свойствами и возможностями применения. Действие наночастиц золота на ХЖКД ДНК приводит к формированию нанобиоматериала, в котором между молекулами ДНК образованы упорядоченные кластеры из наночастиц Au. Такой нанобиоматериал может стать основой для создания противоракового препарата. Поскольку физико-химические свойства частиц ХЖКД ДНК отражают особенности пространственной организации этих молекул в составе хромосом,

взаимодействие наночастиц золота с молекулами ДНК может иметь важные биологические последствия.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты моделирования третичной и четвертичной структуры белка бактериальной FbaV класса I в растворе.
2. Конформационные различия структуры PPase в растворе и в кристалле.
3. Существование различных биологически значимых олигомерных форм KduI, GadA и LpD в растворе.
4. Результаты моделирования изменения структуры холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК (ХЖКД ДНК) при варьировании концентрации полиэтиленгликоля в растворе.
5. Зависимость структуры комплекса ХЖКД ДНК с наночастицами золота от размера инкорпорированных наночастиц.

#### **Личный вклад диссертанта:**

Личный вклад диссертанта заключается в проведении экспериментов по малоугловому рассеянию, первичной обработке и интерпретации полученных в ходе эксперимента данных, построении моделей исследованных объектов, как с помощью методов МУРР, так и с помощью молекулярного докинга. Автор принимал активное участие в обобщении полученных результатов и формировании научных выводов, а также в подготовке научных публикаций в журналах и докладов на национальных и международных конференциях, школах и симпозиумах.

#### **Апробация результатов работы:**

Материалы, представленные в диссертационной работе, дважды докладывались на молодежном конкурсе ИК РАН в 2014 и 2015 годах и дважды были удостоены второй премии, а также на национальных и международных конференциях, школах и симпозиумах:

1. RACIRI Summer school 2013: Advanced Materials Design at X-ray and

- Neutron Facilities: Soft Matter and Nano Composites, 17 - 25 August 2013, Petergof, Russia, 2013. **Удостоена премии за участие в конкурсе «Original Idea «What is...?»»**
2. 11<sup>th</sup> International Conference Biology and Synchrotron Radiation 2013 (BSR2013), 8-11 September 2013, Hamburg, Germany, 2013.
  3. Международная молодежная научная школа "Современная нейтронография", Объединенный институт ядерных исследований, 28 октября – 1 ноября 2013, г. Дубна, Россия, 2013.
  4. 11-я Курчатовская молодежная научная школа, 12 – 15 ноября 2013 года, НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия, 2013.
  5. XFEL workshop, 28 - 30 January, Hamburg, Germany, 2014.
  6. 12<sup>th</sup> International School and Symposium on Synchrotron Radiation in Natural Science (ISSRNS 2014), 15 - 20 June 2014, Warsaw, Poland, 2014.
  7. EMBO Practical Course on Solution Scattering from Biological Macromolecules, 27 October - 3 November 2014, Hamburg, Germany, 2014. **Победитель конкурса «Data analysis competition (SAXS Quest 2014)».**
  8. 49 Школа ПИЯФ по физике конденсированного состояния, 16-21 марта 2015, г. Санкт- Петербург, г. Зеленогорск, Россия, 2015. **Победитель конкурса стендовых докладов в секции «Биофизика и наука о жизни».**
  9. VII Российский симпозиум «Белки и Пептиды», 12-17 июля 2015, г. Новосибирск, Россия, 2015.
  10. 16th International conference on small-angle scattering (SAS-2015), 12-18 September 2015, Berlin, Germany, 2015.

#### **Публикации по теме диссертации:**

Результаты работы опубликованы в 6 статьях в рецензируемых отечественных и международных научных журналах, а также в материалах международных и национальных научных конференций, школ и симпозиумов (10).

### **Структура и объем диссертации:**

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы. Работы автора в тексте диссертации обозначены буквой А. Общий объем диссертации составляет 139 страниц, включая 42 рисунка, 7 таблиц и список литературы из 180 наименований.

### **Благодарности:**

Автор выражает огромную и искреннюю благодарность своему научному руководителю и наставнику доктору химических наук Элеоноре Владимировне Штыковой за научные идеи, помощь в постановке задачи и постижении методов интерпретации данных малоуглового рассеяния, за всестороннюю поддержку, взаимопонимание и терпение.

Автор выражает благодарность к.х.н. Е.В. Родиной, к.х.н. Н.Н. Воробьевой, к.х.н. С.А. Куриловой, к.х.н. Т.И. Назаровой (Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова), д.х.н., проф. Ю.М.Евдокимову, д.б.н. С.Г. Скуридину, к.х.н. В.И. Саянову (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН) за предоставление образцов и плодотворное сотрудничество.

Автор выражает благодарность сотрудникам лаборатории малоуглового рассеяния и рефлектометрии Института кристаллографии РАН д.х.н. В.В. Волкову и к.ф.-м.н. П.В. Конареву и сотрудникам Европейской лаборатории молекулярной биологии (EMBL, Гамбург) д.ф.-м.н. Д.И. Свергуну, PhD Су М. Jeffries и к.ф.-м.н. М.В. Петухову за постоянную помощь в применении программного обеспечения метода малоуглового рассеяния, конструктивное участие на разных стадиях работы.

Автор также благодарит всех сотрудников лаборатории малоуглового рассеяния и рефлектометрии и лаборатории биоорганических структур за постоянную помощь и поддержку.

Автор выражает огромную благодарность своей семье и Ивану Орлову за поддержку, терпение, понимание и всевозможную помощь.

## **ГЛАВА 1. Малоугловое рассеяние по литературным данным**

### **1.1. История развития малоуглового рассеяния**

Основные принципы метода малоуглового рассеяния были описаны в фундаментальных работах А. Гинье в конце 1930-ых годов [1]. В первой монографии по малоугловому рентгеновскому рассеянию (МУРР) физиками А. Гинье и Ж. Фурне [2] было показано, что метод дает не только информацию о размерах и формах частиц, но и о внутренней структуре неупорядоченных и частично упорядоченных систем.

В 1960-х годах метод стал играть важную роль в исследованиях биологических макромолекул в растворе, так как он позволяет получить информацию низкого разрешения об общей форме и внутренней структуре при отсутствии информации о кристаллических структурах исследуемых объектов. Прорыв в экспериментах по МУРР и малоугловому рассеянию нейтронов (МУРН) произошел в 1970-е годы, благодаря появлению источников синхротронного (СИ) и нейтронного излучения. Использование нейтронов в малоугловом эксперименте, помимо прочего, дает возможность исследования структуры с помощью вариации контраста, т.е. замены растворителя  $H_2O$  на  $D_2O$  [3] и специальных методов дейтерирования [4]. Стало понятно, что с помощью малоуглового рассеяния можно извлечь полезную информацию о структуре некристаллических биохимических систем при минимальных затратах времени и усилий. Кроме того, метод МУРР / МУРН также позволяет проводить исследования межмолекулярных взаимодействий в режиме реального времени, в том числе отслеживать конформационные изменения в макромолекулярных комплексах на нанометровом уровне [5-8].

Основной проблемой малоуглового рассеяния, как структурного метода, является получение информации о трехмерной (3D) структуре объекта из одномерных экспериментальных данных, то есть решение обратной задачи. С математической точки зрения решение обратных задач является некорректным и не имеет единственного решения. Поэтому при исследовании структуры с

помощью малоуглового рассеяния необходимо использовать данные альтернативных структурных методов, многократные восстановления структуры по данным МУРР с последующим усреднением, одновременное использование нескольких независимых подходов к интерпретации данных рассеяния и компьютерное моделирование.

В прошлом, непосредственно из экспериментальных данных определялись только общие параметры макромолекул (такие как объем, масса и радиус инерции), в то время как анализ с точки зрения трехмерных структур ограничивался моделированием простыми геометрическими телами (например, эллипсоидами, цилиндрами и другими) или выполнялся методом проб и ошибок [9,10].

В начале 1990-х годов произошел прорыв в методах анализа данных МУРР/МУРН, что позволило надежно *ab initio* восстанавливать форму, определять доменную структуру и детально моделировать надмолекулярные комплексы, используя метод молекулярной тектоники. Этот прогресс происходит и по сегодняшний день и сопровождается дальнейшим развитием программного обеспечения и приборной базы с временным разрешением вплоть до суб-миллисекунд на источниках СИ третьего поколения для исследования нуклеиновых кислот, белков и белковых комплексов [11].

## **1.2. Теория малоуглового рентгеновского рассеяния**

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния один из главных методов структурного анализа наноматериалов, включая биологические макромолекулы в растворе [10, 11]. Он применим к структурам различных размеров: от маленьких белков и полипептидов до макромолекулярных комплексов, которые могут быть изучены с помощью современного оборудования МУРР в условиях максимально приближенных к естественным [12]. Метод позволяет не только изучать структуру низкого разрешения, но также анализировать структурные изменения в ответ на изменение внешних условий (рН, температуры, света, добавление кофакторов и т.д.).

В эксперименте по МУРР, сколлимированный пучок рентгеновских фотонов (из синхротронного или лабораторного источника) попадает на раствор макромолекул, при этом интенсивность упругого рассеяния записывается как функция угла рассеяния. Рассеяние от разбавленных растворов белков, нуклеиновых кислот и других макромолекул изотропно и зависит от модуля передачи импульса  $s$  ( $s = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ , где  $2\theta$  угол между падающим и рассеянным лучом):

$$I(s) = \langle I(s) \rangle_{\Omega} = \langle A(s) A^*(s) \rangle_{\Omega}, \quad (1)$$

где амплитуда рассеяния  $A(s)$  есть фурье-преобразование электронной плотности частиц. Вектор рассеяния  $s = (s, \Omega) = k_I - k_0$ , где  $k_0$  and  $k_I$  волновые векторы падающей и рассеянной волн, соответственно, и интенсивность рассеяния, усредненные по всем ориентациям  $s = (s, \Omega)$ , где  $\Omega$ - телесный угол в обратном пространстве. После вычитания рассеяния растворителем, интенсивность  $I(s)$  пропорциональна рассеянию одной частицей усредненной по всем ориентациям [12]. Непосредственно по одномерной кривой изотропного рассеяния однозначно определяются некоторые общие интегральные характеристики исследуемых частиц, которые называются инвариантами. Эти параметры включают в себя молекулярную массу ( $M$ ), радиус инерции ( $R_g$ ), максимальный размер ( $D_{max}$ ) и исключенный объем частицы ( $V_p$ ) [12]. Кроме того, вычислительные методы, позволяющие получить трехмерные структурные модели низкого разрешения белков и комплексов, либо *ab initio* или же с помощью метода молекулярной тектоники, хорошо известны и в настоящее время широко используются в структурной биологии [13-15].

Важно отметить, что в отличие от большинства других структурных методов, МУРР применяется для исследования монодисперсных, многокомпонентных и частично упорядоченных систем. В частности, малоугловое рассеяние может быть использовано для исследования равновесных олигомерных смесей, а также для их количественной характеристики [16].

### 1.2.1. Монодисперсные системы

Монодисперсный раствор - раствор частиц одинакового размера, формы и массы. Биологические системы часто удовлетворяют требованиям монодисперсности.

Интенсивность рассеяния от такой системы описывается интегральным уравнением:

$$I(s) = 4\pi \int_0^{D_{max}} p(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr, \quad (2)$$

где

$$p(r) = \frac{r^2}{2\pi^2} \int_0^\infty s^2 I(s) \frac{\sin sr}{sr} ds \quad (3)$$

функция парных расстояний, которая является обратным фурье-преобразованием интенсивности рассеяния  $I(s)$ . Физически функция парных расстояний описывает количество всевозможных расстояний между двумя точками в частице в интервале от  $r$  до  $r+dr$ . Эта функция распространяется также на интервале  $[0, D_{max}]$ , где  $D_{max}$  - наибольшее расстояние между двумя точками внутри частицы, т.е. в случае гомогенной частицы – ее максимальный размер. Следовательно,  $p(0)=0$  и  $p(D_{max})=0$ . Однако на практике,  $p(r)$  невозможно определить напрямую, используя уравнение (2), поскольку  $I(s)$  неизвестна на всем интервале значений  $0 \leq s \leq \infty$ , и функция парных расстояний может быть определена только с учетом систематических и статистических ошибок. Во избежание этих ошибок О. Глаттер предложил использовать для расчетов метод косвенного фурье-преобразования [17]: функция распределения по расстояниям аппроксимируется ограниченной серией функций в реальном пространстве с помощью коэффициентов, которые определяются из подгонки теоретической кривой рассеяния, полученной с помощью уравнения (2), к экспериментальной кривой.

Для монодисперсных объектов определяются инварианты. Один из них радиус инерции  $R_g$ , который рассчитывается с использованием приближения Гинье, которое справедливо в области  $(sR_g) < 1.3$ :

$$I_{exp}(s) \approx I(0) \exp\left(-\frac{s^2 R_g^2}{3}\right), \quad (4)$$



где интенсивность рассеяния в нулевой угол  $I(0)$  определяется из экспериментальной кривой рассеяния  $I_{exp}(s)$  [1]. По радиусу инерции можно судить о компактности макромолекулы. При заданном объеме наименьший радиус будет иметь частица имеющая форму твердой сферы, более анизотричному телу соответствует больший радиус и в целом радиус частиц связан с геометрической формой рассеивающих объектов.

Молекулярная масса также является инвариантом и определяется из экспериментальных данных малоуглового рассеяния по формуле:

$$M = M_{ст} \frac{I(0)/c}{I(0)_{ст}/c_{ст}}, \quad (5)$$

где  $I(0)$  и  $I(0)_{ст}$  интенсивности рассеяния в нулевой угол,  $M$  и  $M_{ст}$  молекулярные массы, а  $c$  и  $c_{ст}$  концентрации исследуемого и стандартного белков, соответственно.

Инвариант Порода оценивается по общей интенсивности рассеяния, которая равна полной флуктуации плотности длины рассеяния. Интеграл

$$Q = \int_0^\infty I(q)q^2 dq = 2\pi^2 \int_V \Delta\rho(r)dr \quad (6)$$

дает константу  $Q$ , которая и называется инвариантом Порода, независимо от природы рассеивающего образца [18]. Для частиц в растворе  $Q$  непосредственно связано с исключенным объемом частиц и, используя соотношение

$$I(0) = 2\pi(\Delta\rho)^2V_p, \quad (7)$$

получим

$$Q = 2\pi^2(\Delta\rho)^2V_p \text{ и } V_p = 2\pi^2I(0)/Q. \quad (8)$$

Уравнение (8) дает объем частицы. Поскольку уравнение (6) представляет собой бесконечный интеграл, измеренная интенсивность может быть экстраполирована в нулевой угол и к бесконечности. Экстраполяция в нулевой угол может быть сделана, используя Гинье аппроксимацию, в то время как, используя асимптотику Порода, можно аппроксимировать поведение интенсивности рассеяния при больших значениях  $s$ .

График в координатах Кратки ( $s^2 I(s)$  от  $s$ ) позволяет на качественном уровне судить о свернутости белка. Интенсивность рассеяния от глобулярного белка спадает примерно как  $s^{-4}$ , при этом график Кратки выглядит в форме колокола, с хорошо выраженным максимумом. Рассеяние от развернутых белков имеет существенно меньший спад, примерно как  $s^{-2}$  [19], при этом вместо пика на графике оказывается плато в определенном диапазоне углов  $s$ , за которым следует монотонное увеличение. Рассеяние от частично развернутых или гибких макромолекул приводит к увеличению интенсивности в больших углах, что отображает промежуточное поведение между глобулярным и развернутым белками.

### 1.2.2. Многокомпонентные системы

Разбавленный монодисперсный раствор биологических макромолекул - это идеальный случай, на практике часто встречаются многокомпонентные системы, которые состоят из различных типов невзаимодействующих частиц с произвольной структурой. Если интерференционными эффектами пренебречь, все частицы рассеивают независимо и картина рассеяния от такой смеси может быть записана, как линейная комбинация

$$I(s) = \sum_{k=1}^K (v_k I_k(s)), \quad (9)$$

где  $v_k > 0$  и  $I_k(s)$  номер объемной фракции, и интенсивность рассеяния от  $k$ -ой компоненты, соответственно, а  $K$  общее число компонент.

Многокомпонентность может наблюдаться в системах, состоящих из частиц с различной формой и размером. Примером могут служить олигомерные смеси или слабосвязанные комплексы, которые диссоциируют на индивидуальные компоненты. Для описания таких систем рассеивающие объекты аппроксимируются сферами с разными размерами. В таком случае частица с размером  $R$  имеет объем  $V(R) = 4\pi R^3/3$  и форм-фактор  $i_0(sR) = 3[\sin sR - sR \cos sR]/(sR^3)$ . Структурные параметры, определенные из экспериментальных данных, соответствуют усредненной функции распределения. Таким образом, для

многокомпонентной системы твердых сфер значение радиуса инерции  $R_g$  определяется так называемой z-усредненной величиной  $R_g = (3 \langle R_g^2 \rangle_z / 5)^{1/2}$ , где усредненный радиус сферы выражен как:

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \int_0^\infty R_g^2(R) D_V(R) R^6 dR / \int_0^\infty D_V(R) R^6 dR = \int_0^\infty R_g^2(R) D_V(R) R^6 dR / \langle R^6 \rangle, \quad (11)$$

где  $D_V(R)$  представляет собой объемную функцию распределения по размерам.

### 1.2.3. Частично упорядоченные системы

Метод МУРР позволяет получать информацию не только о размере и форме частицы, но также и о внутренней структуре низкого разрешения разупорядоченной или частично упорядоченной системы. К частично упорядоченным системам можно отнести некоторые полимерные образцы, которые, не имея кристаллической структуры, могут образовывать структурированные области, которые называются квазикристаллическими. Для кристаллов брэгговское отражение является отражением от атомных плоскостей. По взаимному расположению брэгговских пиков можно судить о пространственной симметрии кристаллических решеток. Для частично упорядоченных образцов на картине рассеяния в малоугловой области могут появляться дифракционные максимумы, соответствующие отражениям от атомных плоскостей, при этом типы пространственной симметрии различны для разных направлений. Поскольку интенсивность малоуглового рассеяния  $I(s)$  пропорциональна числу фотонов, рассеянных в направлении  $s$ . В соответствии с уравнением Брэгга-Вульфа характерный размер рассеивающего объекта  $d=2\pi/s$ , где  $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$  — модуль вектора рассеяния, а  $2\theta$  - угол рассеяния. В том случае, если значение  $d$  повторяется в образце чаще других размеров, то интенсивность рассеяния в направлении  $s$ , соответствующем этому размеру (межплоскостному расстоянию), будет выше и на картине рассеяния появляются дифракционные максимумы, которые носят название брэгговских пиков.

Наиболее простым типом квазикристаллической упаковки является ламеллярная структура, которую имеют кристаллические полимеры, жидкие кристаллы и т.д. Ламеллярная (слоевая) структура на картине малоуглового

рассеяния отображается в виде равноотстоящих друг от друга брэгговских пиков. По положениям этих пиков можно определить период упорядоченных областей такой структуры из соответствующего уравнения:  $d=2\pi/s$ , где  $s$ -положение пика на кривой рассеяния.

Возможности малоуглового рассеяния в исследовании ламеллярных систем определяются степенью упорядоченности ламелл. Однако даже в случае полностью структурированных кристаллических полимеров не всегда возможно восстановить центросимметричный профиль плотности  $\rho(z)$  по толщине ламеллы, так как система не является строго периодической. Восстановление распределения электронной плотности возможно для ориентированных ламеллярных систем, рассеяние от которых имеет ряд рефлексов, отвечающих межплоскостному расстоянию.

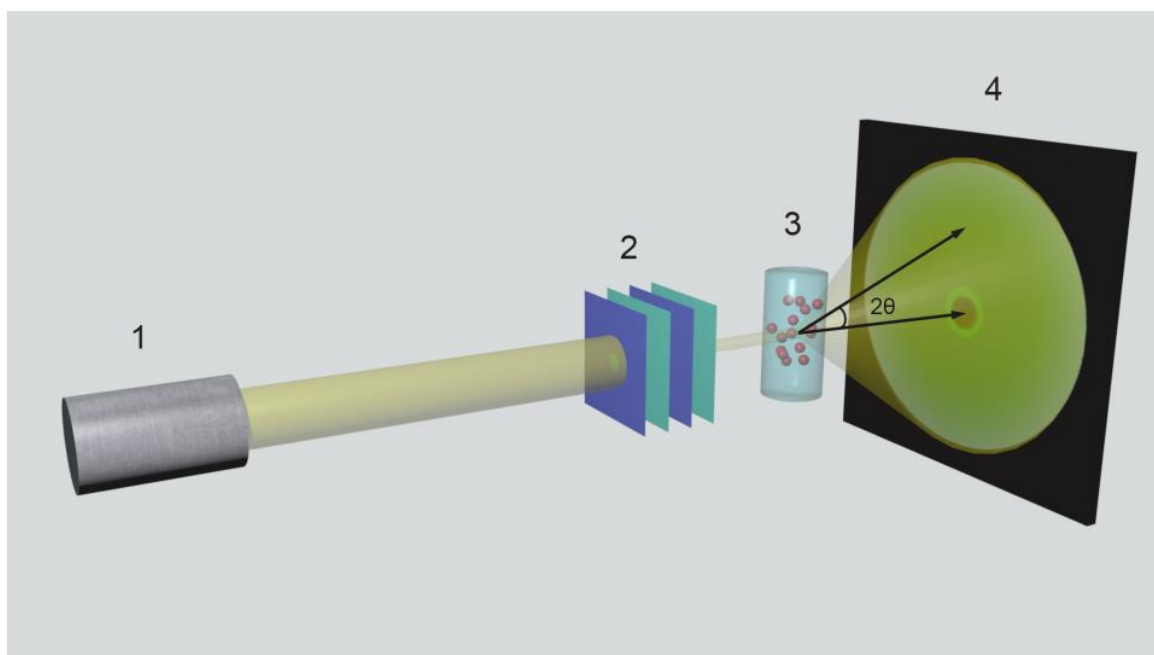
Еще одним примером квазикристаллической упаковки является гексагональная двумерная решетка, которая также определяется по положению пиков на кривой рассеяния:  $s_n = 2\pi(2/\sqrt{3}) \sqrt{n}/d$ ,  $n = (h^2 + k^2 - hk)$ , где  $h, k$  – индексы Миллера, а характерное межплоскостное расстояние в упорядоченной системе находится из уравнения  $d_{hex} = 2 d/\sqrt{3}$ .

Данные типы квазикристаллических упаковок являются наиболее распространенными, но не единственными для частично упорядоченных систем. При этом определение типа упаковки осложняется недостаточным для этого количеством пиков на кривой малоуглового рассеяния.

### **1.3. Эксперимент по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей**

Методом малоуглового рассеяния исследуются образцы размером от 1-100 нм, что соответствует типичным размерам различных наночастиц, нанокomпозитов и белков. Малоугловое рассеяние – когерентное и упругое рассеяние монохроматического излучения. Принципиальная схема малоуглового рассеяния представлена на рис. 1.1. По картине зависимости интенсивности излучения от угла рассеяния можно определить форму и размер исследуемых объектов, их фазовый состав и внутреннюю структуру.

В качестве источников излучения для исследований методом малоуглового рассеяния обычно используют станции синхротронных источников и рентгеновские трубки.



**Рис. 1.1.** Принципиальная схема установки малоуглового рассеяния, где 1- источник излучения, 2- система формирования пучка, 3- камера держателя образца, 4- детектор,  $2\theta$ - угол рассеяния.

Лабораторные установки имеют преимущество в своей доступности, однако недостатком является необходимость использования характеристического излучения, что не дает возможности оперативно изменять длину волны. Источники синхротронного излучения обладают несравнимо большей интенсивностью непрерывного рентгеновского спектра, что позволило совершить прорыв в малоугловом рассеянии.

### 1.3.1. Лабораторная установка

В лабораторных условиях рентгеновское излучение возникает при возбуждении атомов металлов электронами с энергией  $10^4 - 10^5$  эВ. Этот эффект реализован в рентгеновской трубке, которая представляет собой вакуумный сосуд с прямонакальным катодом и заземленным анодом. На катод подается высокое ускоряющее напряжение порядка нескольких десятков кэВ, а анод является

мишенью для ускоренных электронов. В результате торможения электронов об анод возникает тормозное рентгеновское излучение с характерным для материала анода энергетическим спектром (характеристическое излучение). Практически вся энергия потока электронов преобразуется в теплоту и расходуется на ионизацию атомов металла, из которого сделан анод. Чтобы избежать перегрева аноду обеспечивают водяное охлаждение. Характеристическое излучение по интенсивности полос может в сотни раз превосходить интенсивность тормозного излучения. Интервал длин волн такого излучения обычно варьируется от  $0.7 \text{ \AA}$  до нескольких ангстрем. Чаще всего рабочим является наиболее интенсивное  $K_\alpha$  – излучение, остальные характеристические линии и белый спектр не используются и отсекаются с помощью монохроматоров. Как правило, для экспериментов по малоугловому рассеянию используются рентгеновские трубки с анодами из Cu, Mo, Ni и некоторые другие.

Также рентгеновские трубки различаются по размеру фокусного пятна и по величине светящейся поверхности анода. Размеры фокусного пятна определяют геометрию коллимационных систем и могут варьироваться от 10 до 10-20 мм. Для формирования точечной или щелевой коллимационной системы используются разные виды фокусных пятен. Предельная рассеиваемая тепловая мощность рентгеновской трубки (от нескольких десятков Вт до десятков кВт) определяет ее интенсивность излучения. При этом при уменьшении размеров фокусного пятна удельная мощность излучения существенно возрастает [10].

Для исследования нанокompозитов на основе ДНК эксперименты по малоугловому рассеянию были проведены на лабораторном малоугловом дифрактометре АМУР-К (разработка СКБ ИК РАН [20]) с позиционно-чувствительным детектором. На рис. 1.2 представлена фотография этого дифрактометра.



**Рис. 1.2.** Установка малоуглового рассеяния АМУР-К (Институт кристаллографии РАН).

Данная установка с блочным коллиматором по схеме Кратки [9] позволяет проводить измерения при фиксированной длине волны  $\lambda=0.1542$  нм ( $\text{CuK}_\alpha$ - линия) в диапазоне значений волновых векторов  $0.12 < s < 10.0$  нм<sup>-1</sup>. Полученные экспериментальные данные подвергаются стандартной процедуре нормировки на интенсивность падающего пучка и введению коллимационной поправки [10].

### **1.3.2. Установки на источнике синхротронного излучения**

Источники синхротронного излучения установлены на кольцевых ускорителях, где медленно, экспоненциально убывает ток, создаваемый регулярными короткими импульсами или пучками электронов, которые могут с постоянной энергией циркулировать в течение многих часов в накопительном кольце. На некоторых кольцах, работающих в так называемом режиме пополнения, ток поддерживается почти постоянным благодаря инъекции электронов для компенсации потерь.

Основные свойства синхротронного излучения – это высокая интенсивность, линейная поляризация пучка в плоскости орбиты, периодическое

прерывание его во времени и широкий диапазон энергий или длин волн делают накопительные кольца идеальными источниками для рентгеновских исследований.

Устройства для генерации синхротронного излучения – вигглеры и ондуляторы – состоят из линейной структуры периодически расположенных  $N$  дипольных магнитов с переменной полярностью, с периодом  $\lambda_0$ , установленных в прямолинейном участке накопительного кольца. Вдоль оси таких устройств электроны движутся по траектории, близкой к синусоиде, излучая фотоны в узкий конус вдоль оси пучка. Характеристики этого излучения зависят от параметра напряженности поля  $K = 0.934B\lambda_0$ , где  $B$  – вектор магнитной индукции, и от угла между осью вигглера/ондулятора и направления наблюдения. Основная разница между свойствами вигглера/ондулятора заключается в силе магнитного поля, которое является слабым для ондуляторов ( $K \ll 1$ ) и сильным для вигглеров ( $K \gg 1$ ).

В ондуляторе амплитуда отклонения траектории электронов от его оси небольшая и, следовательно, существует когерентная суперпозиция излучения от  $N$  источников, которая приводит к увеличению яркости с коэффициентом до  $N^2$ . Электрон, движущийся вдоль оси ондулятора при той же скорости, что и отдельный электрон, имеющий синусоидальную траекторию, ускоряется электромагнитным полем, которое определяется переменным магнитным полем, с периодом  $\lambda_0/\gamma$  из-за сокращения Лоренца, где  $\gamma = 1/\sqrt{1 - v^2/c^2}$  является Лоренц-фактором, и соответствующего осциллирующего электрического поля, перпендикулярного к нему. Следовательно, электрон излучает резкую линию с длиной волны  $\lambda_0/\gamma$ , которая обнаруживается в лабораторной системе координат с длиной волны  $\lambda_0/2\gamma^2$  из-за эффекта Доплера, который также сужает ширину конуса излучения. На практике, электроны в пучке имеют определенный энергетический разброс, и результирующий спектр излучения имеет ширину, соответствующую огибающей всех слегка смещенных линий. Так как движение электронов становится более сложным при увеличении значения  $K$ , появляются высшие гармоники. На оси есть только нечетные гармоники, тогда как вне оси



появляются четные. При этом горизонтальная ширина конуса излучения значительно меньше, чем у поворотных магнитов или вигглеров.

С вигглерами ( $K \gg 1$ ) амплитуда смещения электрона от оси гораздо больше и поэтому существует когерентная суперпозиция излучения от  $N$  магнитов с увеличением яркости с коэффициентом  $N$ . Число гармоник становится очень большой, так что форма спектра излучения очень похожа на форму спектра, полученного с помощью поворотного магнита. Критическая энергия задается тем же выражением, что и для поворотного магнита, но горизонтальная ширина конуса излучения намного больше ( $\approx 10-100 \gamma^{-1}$ ).

На низкоэнергетических кольцах специальные короткие вигглеры с сильным полем (4-5 Тл) в центре и более слабыми полями на обоих концах для получения прямой средней траектории электронов используются для смещения спектра излучения в сторону большей энергии. В отличие от ситуации с поворотными магнитами, где поле и, следовательно, также критическая энергия, не фиксируются геометрией кольца.

Использование синхротронного излучения для МУРР требует более сложной оптической системы, чем для лабораторных приборов, из-за необходимости использовать монохроматоры, чтобы выбрать подходящий диапазон длин волн и зеркала, чтобы устранить высшие гармоники и / или сфокусировать пучок [11].

В данной работе для исследований белковых макромолекул методом малоуглового рентгеновского рассеяния использовалась синхротронная станция P12 накопительного кольца Petra III (синхротрон DESY, Гамбург, Германия). Изображение малоугловой станции P12 представлено на рис.1.3.

На этой станции используется сфокусированный монохроматический пучок рентгеновских лучей из источника ондулятора. Двойной кристалл Si (111) монохроматора позволяет осуществить выбор энергии между 4 и 20 кэВ ( $\lambda = 0.06-0.3$  нм), однако, для большинства измерений используется энергия в 10 кэВ ( $\lambda = 0,124$  нм).



**Рис. 1.3.** Малоугловая станция P12 накопительного кольца Petra III, синхротрон DESY (Гамбург, Германия).

Специальные зеркала в геометрии Киркпатрик-Баеца в сочетании с тремя парами щелевой коллимации обеспечивают низкую расходимость пучка, обеспечивая интенсивность  $10^{13}$  фотон/сек. Линия P12 оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M (фирма DECTRIS, Швейцария). Интенсивность рассеяния  $I(s)$  измерена в области значений волновых векторов  $0.08 < s < 4.5 \text{ nm}^{-1}$ . Весь путь прохождения пучка (расстояние источник-детектор 83 м), включая кювету с образцами в кварцевых капиллярах, находится под вакуумом в течение стандартных измерений. Диапазон температур, при которых могут проводиться измерения, варьируется от 7 до 55 °C [21].

## **1.4. Обработка данных МУРР**

### **1.4.1. Первичная обработка данных**

Первичная обработка данных малоуглового рассеяния осуществляется с помощью программы PRIMUS [22], которая разработана для подготовки экспериментальных данных с целью их дальнейшего анализа. Программа имеет

простой интерактивный графический интерфейс, с помощью которого можно выполнять различные манипуляции с данными и непосредственно наблюдать происходящие изменения. Первичная обработка заключается в статистическом анализе кривых малоуглового рассеяния, их усреднении, нормализации, калибровки, масштабировании данных, концентрационном анализе, вычитании рассеяния буфером из рассеяния образцом в буфере и определении инвариантов с помощью графиков в координатах Гинье и Кратки. Помимо первичной обработки, программа позволяет осуществлять количественный анализ многокомпонентных систем (если известно рассеяние от отдельных компонентов); определять характеристики брэгговских пиков для упорядоченных и частично упорядоченных объектов; рассчитывать функции распределения по расстояниям на основе косвенного фурье-преобразования и проводить моделирование рассеивающей частицы простыми геометрическими телами с помощью интегрированных в PRIMUS отдельных программных модулей.

Первичная обработка экспериментальных данных представляет собой очень важный шаг в анализе малоуглового рассеяния, от которого во многом зависит качество дальнейшего структурного анализа [23].

#### **1.4.2. Структурный анализ частично упорядоченных образцов**

Структурный анализ частично упорядоченных систем основывается на анализе брэгговских пиков на кривой малоуглового рассеяния. По взаимному расположению этих рефлексов можно определить тип квазикристаллической упаковки,  $a$ , следовательно, и межплоскостное расстояние  $d$ . Программа РЕАК [22] позволяет определять размер кристаллита  $L$ , т.е. размер упорядоченной области, используя формулу Шеррера:

$$L = \frac{\lambda}{\beta_s \cos \theta}, \quad (12)$$

а также степень разупорядоченности в системе  $\Delta/d$ :

$$\Delta/d = \frac{1}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{\beta_s \cdot d}{\lambda}}, \quad (13)$$

где  $\beta_s$  – полная ширина на полувысоте диффракционного максимума на кривой рассеяния,  $2\theta$  - угол рассеяния, соответствующий волновому вектору  $s$ , а  $\Delta$  - среднеквадратичное отклонение от расстояния между ближайшими регулярно упакованными структурными элементами.

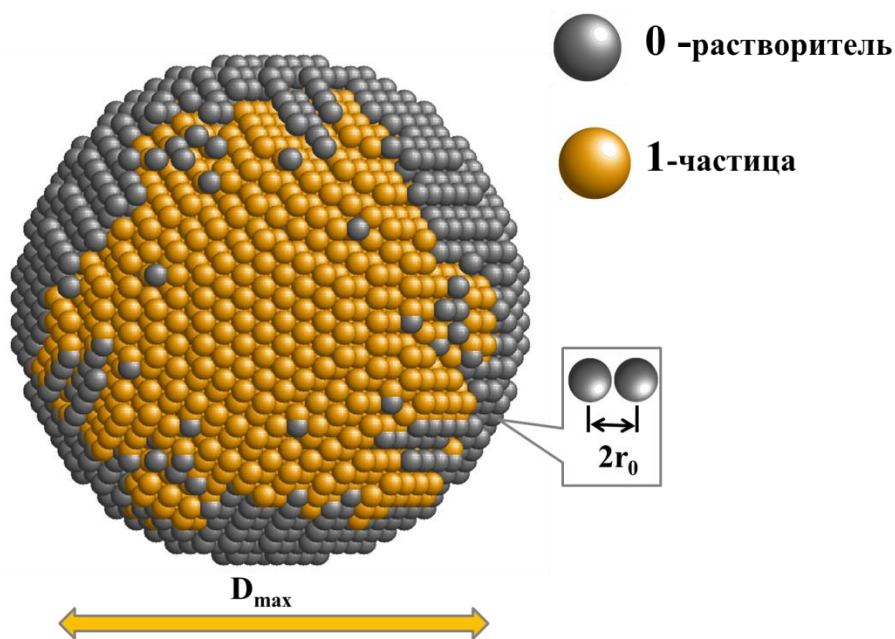
С помощью программы PEAK можно определить площадь под пиком, которая отражает общее количество структурированных областей в образце.

### **1.4.3. *Ab initio* метод восстановления структуры**

Основная цель структурных исследований в области молекулярной биологии - установление связи между структурой и функциями биологических макромолекул. За последние годы, огромное количество структурной информации было получено с использованием кристаллографии и ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Однако эти методы высокого разрешения требуют довольно специфических условий: не всегда возможно закристаллизовать белок или расшифровать его структуру, а применение ЯМР принципиально ограничено значением молекулярной массы исследуемого образца ( $< 50$  кДа). С помощью МУРР можно получить форму биологических макромолекул низкого разрешения, однако этот метод применим в большом диапазоне размеров белков и условий, позволяя наблюдать структурные изменения в ответ на изменения внешних условий.

Восстановление трехмерной формы частиц в растворе по одномерной кривой малоуглового рентгеновского рассеяния – довольно сложная задача, впервые за которую взялись 1960-х годах. В то время, экспериментальные кривые рассеяния сравнивались с рассчитанными кривыми от простых геометрических форм или шариковых моделей. В последующие десятилетия, этот эмпирический подход был заменен благодаря использованию сферических гармоник, введенных Штурманом [24]. Описание картины МУРР в виде суммы сферических гармоник позволяет быстро провести аналитическое вычисление кривой МУРР от известных структур и этот формализм до сих пор используется в современных методах.

Восстановление формы, используя концепцию моделирования набором конечных элементов (шариков), превратилась в *ab initio* метод определения формы, который впервые был предложен в работе [25]. Впоследствии в работе [26] была описана более общая процедура моделирования шариками, которая была с одной стороны близка к оригинальному подходу, но также позволяла построить модель неомогенных частиц, основанная на вариации контраста, а *ab initio* определение формы является частным случаем этого метода. Предполагая, что рассеивающий объект состоит из  $K$  компонент с разными электронными плотностями, например, система, состоящая из частицы и растворителя ( $K=2$ ). Объем поиска задается таким, чтобы искомая частица помещалась в этом объеме (например, радиус сферы  $R=D_{max}/2$ ), который заполнен  $N$  шариками, плотно упакованными в гексагональную структуру радиусом  $r_0 \ll R$  (рис. 1.4). Каждому шарикау присваивается индекс  $X_j$ , указывая на фазу, к которой принадлежит (диапазон  $X_j$  варьируется от 0 (растворитель) до  $K$ ). Задавая фиксированные позиции шариков, которые определяются сеткой упаковки, структура этой шариковой модели полностью описывается конфигурацией вектора  $X$  с  $N \approx (R/r_0)^3$  компонентами.



**Рис. 1.4.** Объем поиска и форма частицы, представленные в методе *ab initio* с помощью шарикового моделирования.

Предполагая, что шарики  $k$ -ой фазы имеют контраст (плотность рассеяния)  $\Delta\rho_k$ , интенсивность рассеяния от шариковой модели будет выглядеть, как:

$$I(s) = \langle \sum_{k=1}^K \Delta\rho_k A_k(s) \rangle_{\Omega}, \quad (14)$$

где  $A_k(s)$  амплитуда рассеяния от объема, занимаемого  $k$ -ой фазой. Используя сферические гармоники  $Y_{lm}(\Omega)$ , амплитуду можно представить следующим образом:

$$A_k(s) = \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l A_{lm}^{(k)}(s) Y_{lm}(\Omega). \quad (15)$$

Амплитуды  $A_{lm}(s)$  связаны с радиальными функциями преобразованием Ханкеля:

$$A_{lm}(s) = i^l \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^{\infty} j_l(sr) \rho_{lm}(r) r^2 dr, \quad (16)$$

где  $j_l(sr)$  – сферические функции Бесселя [24]. Подставляя уравнение (16) в уравнение (14), получаем выражение для интенсивности рассеяния:

$$I(s) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-l}^l \left\{ \sum_{k=1}^K [\Delta\rho_k A_{lm}^{(k)}(s)]^2 + 2 \sum_{n>k} \Delta\rho_k A_{lm}^{(k)}(s) \Delta\rho_n [A_{lm}^{(n)}(s)]^* \right\} \quad (17)$$

Парциальные амплитуды от объема, занимаемого  $k$ -ой фазой в шариковой модели, просто оцениваются из позиции шариков с помощью следующего уравнения:

$$A_{lm}^{(k)}(s) = i^l \sqrt{2/\pi} v_a \sum_{j=1}^{N_k} j_l(sr_j) Y_{lm}^*(\omega_j), \quad (18)$$

где сумма пробегает все атомы этой фазы, а  $(r_j, \omega_j) = \mathbf{r}_j$  их полярные координаты и  $v_a = (4\pi r_0^3/3)/0.74$  отображает объем, приходящийся на 1 шарик. Уравнения (14)-(18) позволяют быстро рассчитывать кривые рассеяния от многофазной шариковой модели для произвольной конфигурации  $\mathbf{X}$  и произвольных плотностей рассеяния  $\Delta\rho$ .

Этот формализм может быть использован для разработки алгоритма восстановления не только формы, но и внутренней организации многокомпонентных частиц путем одновременной подгонки нескольких наборов данных (например, полученных с помощью вариации контраста). Задавая набор  $M \geq 1$  кривых рассеяния  $I_{exp}^{(m)}(s)$ ,  $i=1, \dots, M$ , поиск конфигурации  $\mathbf{X}$  может

осуществляться путем минимизации расхождения между экспериментальной  $I_{exp}$  и теоретической  $I_{calc}$  кривыми:

$$\chi^2 = \frac{1}{M-1} \sum_{m=1}^M \frac{1}{N_m-1} \sum_{j=1}^{N_m} \left[ \frac{I_{exp}^{(m)}(c_j) - c_m I_{calc}^{(m)}(s_j)}{\sigma^{(m)}(s_j)} \right]^2, \quad (19)$$

где индекс  $m$  пробегает кривые рассеяния,  $N_m$  количество экспериментальных точек, необходимых для корректной оценки экспериментальных ошибок,  $\sigma(s_j)$ ,  $c_m$  масштабирующие коэффициенты, а  $I_{calc}(s_j)$  интенсивность, рассчитанная от наборов шариков, принадлежащих соответствующим фазам.

Для адекватного описания модели количество атомов (шариков) должно быть порядка  $N \approx 10^3$ . Значение  $\chi^2$  в случае хорошей подгонки к экспериментальным данным должно находиться в диапазоне  $0.9 \leq \chi^2 \leq 1.1$ . Однако даже в этом случае нельзя говорить о единственности найденного решения (формы макромолекулы).

По своей природе МУРР дает информацию с разрешением 5 - 10 Å, поэтому *ab initio* модель не может описать более мелкие детали и определяет, в основном, общую форму рассеивающего объекта. Требования для моделей низкого разрешения, построенных из одинаковых шариков размером  $r_0$ , могут быть определены из простых геометрических соображений. Во-первых, перечень соседей (атомы на расстоянии  $2r_0$ ) генерируется для каждого виртуального атома. Рыхлость рассеивающего объекта или степень изоляции каждого атома  $P(N_e)$ , не относящего к растворителю, рассчитывается, как  $P(N_e) = \exp(-0.5 N_e) - \exp(-0.5 N_c)$ , где  $N_e$  количество соседей, имеющих один и тот же индекс, и  $N_c = 12$  координационное число гексагональной упаковки. Рыхлость конфигурации  $X$  характеризуется средним значением  $P(X) = \langle P(N_e) \rangle$  по всем атомам, не относящимся к растворителю. Требование связности дает возможность соединения двух произвольно выбранных атомов, принадлежащих одной и той же фазе, с помощью соседних атомов, также относящихся к данной фазе. Количественная мера связанности  $k$ -ой фазы может быть оценена, как  $G_k(X) =$

$\ln(N_k/M_k) \geq 0$ , где  $N_k$  и  $M_k$  количество виртуальных атомов во всей фазе и в самом большом связанном фрагменте, соответственно.

Задача восстановления трехмерной модели частицы с помощью виртуальных атомов решается нахождением конфигурации  $X$  путем минимизации целевой функции:

$$f(X) = \chi^2(X) + \alpha \sum_k \|P_k(X) + G_k(X)\|, \quad (20)$$

где вес штрафа за рыхлость и взаимосвязанность модели  $\alpha$  должна быть больше 0. Обычно при использовании штрафов вес должен быть выбран таким образом, чтобы второй член уравнения (20) давал значительный (10-50%) вклад в функцию  $f(X)$  в конце процесса минимизации. Поскольку для корректного решения значение  $\chi^2$  должно быть около 1 и  $P(X)$  порядка  $10^{-2}$  для компактного тела, соответственно разумно выбрать  $\alpha \approx 10$ .

Задача нахождения конфигурации  $X$ , путем минимизации  $f(X)$  довольно сложна из-за большого числа переменных. Самый простой метод минимизации  $f(X)$  является поиск глобального минимума методом Монте-Карло, который, начиная со случайной конфигурации, шаг за шагом модифицирует ее (например, изменяет назначение отдельного шарика). Если изменения улучшают  $f(X)$ , изменение принимается, если нет, то отвергается. Далее, происходит другое случайное изменение, и процедура повторяется до тех пор, пока не будет найдена лучшая конфигурация. Чистый поиск Монте-Карло простой, но имеет тенденцию попасть в ловушку локальных минимумов  $f(X)$ , поэтому для поиска глобального минимума такой мультимодальной функции могут быть использованы только эвристические алгоритмы глобальной минимизации. Как было упомянуто ранее, в [25] использовали генетический алгоритм имитации отжига (SA), который является наиболее подходящим методом глобальной минимизации, учитывая большое количество переменных и комбинаторной характер проблемы [27]. Такой подход был реализован в программе DAMMIN. Основная идея заключается в случайной модификации системы (т.е., вектора  $X$ ). Как правило, поиск решения движется в сторону уменьшения  $f(X)$ , но иногда и в сторону увеличения. Вероятность принятия «худшего» изменения уменьшается в процессе



минимизации (система охлаждается). Первоначально, температура (параметр, регулирующий вероятность принятия «худшего» изменения) является высокой и изменяется почти случайным образом, в то время как в конце (при низкой температуре) прибегает к чистому поиску Монте-Карло.

Для ограничения поиска возможной структуры в программе DAMMIN [26] возможно введение симметрии, однако это следует делать при наличии дополнительных сведений о свойствах исследуемого объекта.

Для уменьшения неоднозначности решения обратной задачи МУРР модели, посчитанные несколько раз могут быть наложены друг на друга и усреднены для получения наиболее достоверного результата. Эта процедура автоматизирована в программе DAMAVER [28]. Наложение моделей осуществляется с помощью программы SUPCOMB [29], которая выравнивает две произвольные модели низкого или высокого разрешения, представленные ансамблем точек (например, виртуальными атомами) без информации о соответствии между этими точками. Разница в пространственной организации моделей определяется с помощью нормализованного пространственного отклонения (NSD). Как правило, значение NSD, близкое к 1.0, показывает, что модели схожи. Все модели попарно накладываются друг на друга. Эталонной моделью является модель с самым низким средним NSD, а возможные выбросы с высоким NSD отфильтровываются. После наложения всех моделей, кроме выбросов, создается карта заполняемости, а усредненная модель строится путем фильтрации низкой заполняемости узлов сетки. Кроме того, узлы сетки с ненулевым размещением могут быть использованы в качестве нового объема поиска для построения уточненной модели.

Восстановление формы с усреднением нескольких моделей реализует решение важной практической задачи по оценке единственности полученного решения.

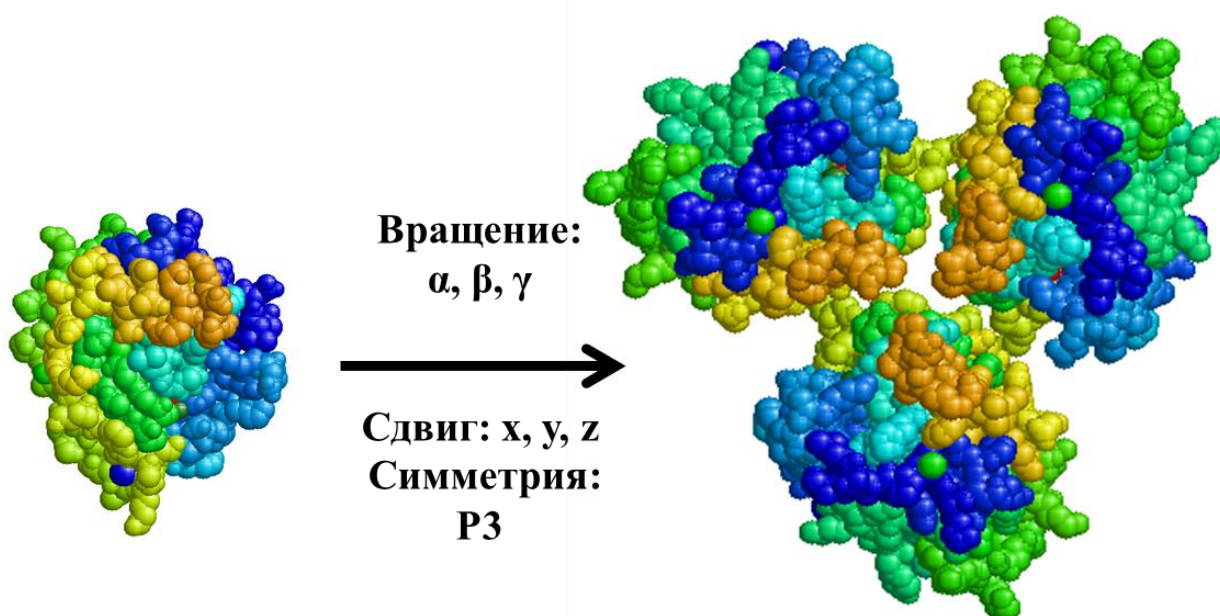
#### **1.4.4. Гибридные методы. Метод молекулярной тектоники. Расчет кривой рассеяния от модели атомного разрешения. Достаивание недостающих фрагментов.**

Большинство клеточных функций осуществляется с помощью макромолекулярных комплексов, и центр внимания современной структурной биологии сместился в значительной степени в сторону их изучения [30]. Макромолекулярные комплексы зачастую слишком велики для анализа методом ЯМР и могут обладать структурной гибкостью, что препятствует их кристаллизации. Поскольку МУРР чувствителен к изменениям четвертичной структуры макромолекул и, предполагая, что третичная структура доменов в значительной степени сохраняется при образовании комплекса, моделирование твердыми телами может быть использовано для анализа надмолекулярных структур [11]. Были разработаны многочисленные методы с использованием моделей с высоким разрешением, включая моделирование структур из отдельных доменов или субъединиц атомного разрешения, входящих в состав комплекса (метод моделирования твердыми телами или метод молекулярной тектоники [31, 32]), а также подходы учета недостающих участков, таких как линкеры, петли или целые домены (так называемые гибридные методы [33, 34]). Эти методы охватывают различные типы макромолекулярных комплексов, позволяя учитывать симметрию частицы, информацию о межсубъединичных контактах и одновременно подгонять несколько кривых рассеяния.

Наиболее простая и наглядная реализация метода молекулярной тектоники представлена в программе MASSHA [31]. Она сочетает в себе интерактивный и автоматизированный поиск взаимной ориентации субъединиц комплекса, оперируя ими, как твердыми телами. MASSHA работает с трехмерными моделями высокого и низкого разрешения, а интегрированный вычислительный модуль позволяет быстро рассчитывать кривую рассеяния от комплекса и подгонять ее к экспериментальным данным. В интерактивном режиме, пользователь может перемещать и вращать субъединицы относительно друг друга, наблюдая соответствующие изменения в подгонке к экспериментальным данным.

Уточнение найденной модели может производиться в автоматическом режиме, при этом поиск лучшей подгонки к экспериментальной кривой будет осуществляться в непосредственной близости от текущей конфигурации.

Интерактивная программа, безусловно, полезна для моделирования жесткими телами, особенно для понимания того, какой вид движения/ вращения влияет на картину рассеяния. Однако наиболее современной программой, в которой реализуется метод молекулярной тектоники, является программа SASREF [32], которая начинает работу с произвольной позиции субъединиц, а затем случайным образом двигает и вращает твердые тела друг относительно друга, используя метод имитации отжига для поиска наилучшего совпадения модельной кривой рассеяния от полученного комплекса с экспериментальными данными (рис. 1.5).



**Рис. 1.5.** Пример применения метода молекулярной тектоники: моделирование комплекса с помощью одной субъединицы белка с использованием симметрии  $P3$  и операций сдвига и вращения.

Техника имитации отжига, как было описано выше, применяется для поиска глобального минимума функции многих переменных и широко используется в МУРР [26, 33, 34]. Процедура минимизации начинается с произвольного расположения  $K$  субъединиц, например, от их расположения в предварительной

модели комплекса или просто из всех субъединиц с центром в нуле в их эталонных ориентациях. Есть возможность зафиксировать, выбранные субъединицы в их исходных позициях и ориентациях, чтобы сохранить уже известные подструктуры. Использование сферических гармоник для мультипольного разложения амплитуд рассеяния позволяют легко аналитически представить интенсивность рассеяния в виде:

$$I(s) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^l \left| \sum_{k=l}^K A_{lm}^{(k)}(s) \right|^2, \quad (21)$$

где  $A_{lm}^{(k)}(s)$ - парциальные амплитуды рассеяния  $k$ -ого твердого тела, которые зависят от их амплитуд рассеяния  $C_{lm}^{(k)}(s)$ , в исходном положении и ориентации. Эти исходные амплитуды  $C_{lm}^{(k)}(s)$  могут быть рассчитаны от моделей субъединиц комплекса атомного разрешения.

Последовательное изменение ансамбля выполняется посредством вращения, выбранной случайным образом субъединицы на произвольный угол  $\phi < \phi_{max}$  вокруг оси поворота с последующим случайным сдвигом  $r < r_{max}$  вдоль произвольного направления. На каждом шаге только одна субъединица может перемещаться/вращаться, чтобы пересчитывать только амплитуды этой субъединицы, используя уравнение (21), что значительно ускоряет расчет интенсивности рассеяния.

В некоторых случаях есть не только экспериментальная кривая рассеяния всего макромолекулярного комплекса, но и кривые рассеяния от отдельных подструктур. Предполагая одинаковое расположение субъединиц в субструктуре и в комплексе, все наборы данных могут быть использованы одновременно. Кривые рассеяния от подструктур вычисляются от соответствующих подмножеств, взятых из всего ансамбля. Использование нескольких наборов данных рассеяния, аналогично методу вариации контраста в рассеянии нейтронов, позволяет увеличить экспериментальную информативность и, таким образом, получить более достоверные результаты.

Техника имитации отжига используется в программе SASREF, чтобы построить взаимосвязанный ансамбль субъединиц без стерических столкновений, обеспечивая возможность подгонки одного или нескольких наборов данных, путем минимизации целевой функции:

$$E = \sum(\chi^2)_i + \alpha_{dis}P_{dis} + \alpha_{cross}P_{cross} + \alpha_{cont}P_{cont}. \quad (22)$$

Здесь сумма пробегает все значения несоответствий в имеющихся наборах данных. Штраф  $P_{dis} = \ln(K/K_G)$  обеспечивает взаимосвязанность модели, где  $K_G$  количество субъединиц в самом длинном взаимосвязанном подмножестве, и  $P_{cross}$  требует отсутствия перекрытий между субъединицами и ограничение на расстояние между аминокислотными остатками  $P_{cont}$ . Кроме того, диапазоны аминокислотных остатков, которые, как ожидается, будут контактировать, могут быть указаны, а программа выбирает минимальное расстояние между двумя группами, чтобы проверить критерий контакта.

Чистое моделирование с помощью метода молекулярной тектоники возможно только тогда, когда полная структура высокого разрешения всех субъединиц белка доступна (или доступны гомологичные модели). Однако гибкость и конформационная неоднородность присущая макромолекулам или комплексам может приводить к отсутствию петель и даже внутренних доменов в структурах, определенных, например, с помощью ЯМР. Кроме того, в исследованиях многодоменных или мультисубъединичных макромолекул, состоящих из глобулярных доменов/субъединиц соединенных гибкими петлями, структуры высокого разрешения или гомологичные модели могут быть доступны для отдельных доменов/субъединиц, но не для линкеров. Потенциально разупорядоченные области не могут быть увидены при высоком разрешении из-за их гибкости. Пропущенные области в моделях высокого разрешения вносят свой вклад в рассеяние от макромолекул в растворе и их приблизительные конфигурации могут быть смоделированы. При таком моделировании точные конформации пропущенных петель или линкеров не требуются, но приблизительное место расположения должно быть указано для качественного

расчета интенсивности рассеяния от всей молекулы. В этом очень важном практическом случае комбинирование методов молекулярной тектоники и *ab initio* может использоваться для определения общей структуры целого ансамбля.

Идея этого подхода заключается в том, что неизвестные участки структуры могут быть представлены в виде шариковых моделей недостающих фрагментов. Используя сферические гармоники, рассеяние от такой модели включает в себя два вклада:

$$I(s) = 2\pi^2 \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=-1}^l \left| \sum_k A_{lm}^{(k)}(s) + \sum_j D_{lm}^{(j)}(s) \right|^2, \quad (23)$$

где  $A_{lm}^{(k)}(s)$  и  $D_{lm}^{(j)}(s)$  парциальные амплитуды доменов с известной структурой и пропущенных частей, соответственно. Первый вклад изменяется при вращениях и сдвигах доменов, второй - при изменении фрагментов, представляющих пропущенные части.

В программе BUNCH [32] реализован подход, где пропущенные линкеры или домены белков с неизвестной атомной структурой представлены в виде гибких цепей взаимосвязанных виртуальных аминокислотных остатков. В данном случае метод имитации отжига используется таким образом, что на каждом шаге программы, модификация модели определяется двумя типами перемещений. Вначале виртуальные остатки выбираются при случайном разделении целой цепи на две части, затем наименьшая часть цепи поворачивается на случайный угол вокруг случайной оси, проведенной через этот виртуальный остаток. В качестве альтернативы случайное вращение части структуры выполняется между двумя случайно выбранными виртуальными остатками, которые всегда находятся на расстоянии около 0.4 нм от своих соседей, при этом назначаются соответствующие штрафы, чтобы состояние белка было максимально близкое к естественному.

Как и в SASREF, симметрия частицы учитывается так, чтобы изменялась только независимая от симметрии часть.

Несмотря на то, что BUNCH позволяет изменять модели твердых тел, достраивая пропущенные фрагменты, область применения этой программы

ограничена, поскольку алгоритм в первую очередь ориентирован на одноцепочечные белки или симметричные ансамбли, включающие в себя одну полипептидную цепь на асимметричную часть. На практике бывают случаи, например, когда комплекс состоит из множества субъединиц, где одна или более компонент имеют пропущенные фрагменты достаточно большого размера, с чем ни SASREF, ни BUNCH не могут справиться. В таком случае, необходим более общий подход, комбинирующий функциональность двух методов. Эта идея реализована в программе CORAL [23]. В данном случае атомные модели отдельных доменов, принадлежащих к нескольким компонентам комплекса, транслируются и вращаются подобно тому, как это происходит в SASREF. Эти передвижения, однако, не в полной мере случайны, поскольку расстояния между N и C концевыми участками последующих доменов, принадлежащих к одной цепи, ограничены максимальной длиной пропущенной части. Алгоритм использует предварительно созданную библиотеку (RANLOGS), которая содержит цепи виртуальных остатков с длиной линкера от 5 до 100 аминокислотных остатков с выборкой из 20 структур для каждого возможного расстояния для заданной длины петли с шагом выборки в 0.2 нм. Когда домен в CORAL транслируется/вращается, соответствующие случайные петли, соединяющие этот домен с предшествующим/последующим заполняют пространство недостающего линкера, и, в свою очередь, его вклад добавляется в рассеяние от всей системы. Расчеты, дающие конфигурации, где не может быть найдено ни одного линкера в библиотеке, отклоняются. В том случае, если C и N концевые участки субъединиц пропущены, они могут быть случайно выбраны из библиотеки, но при этом они не ограничивают движение доменов. В программе CORAL реализована возможность согласованного движения выбранных доменов, которые будут сохранять их взаимное расположение, при изменении позиции и ориентации по отношению к остальным доменам. Эта особенность полезна, например, когда в системе есть несколько известных интерфейсов олигомеризации. Моделирование осуществляется методом имитации отжига,

используя ограничения, как дополнения к минимизации целевой функции, аналогичные тому, что используются в SASREF.

Гибридные методы охватывают широкий диапазон возможностей применения, от многодоменных белков до комплексов. Дополнительная информация, полученная с помощью других источников, может быть использована для моделирования в МУРР. Учитывая неоднозначность решения структурных задач в малоугловом рассеянии, модели, полученные с помощью гибридных методов, должны подтверждаться с помощью независимых данных.

Расчет кривых интенсивности рассеяния от моделей атомного разрешения и сравнение их с экспериментальными данными используется для определения степени схожести между кристаллическими структурами и структурами в растворе, а также для проверки предсказанных моделей гомологов [35]. Точный расчет картины рассеяния от структур атомного разрешения не является тривиальной процедурой, так как еще должно быть учтено рассеяние растворителем. В целом интенсивность рассеяния от частицы в растворе может быть выражена, как

$$I(s) = \langle |A_a(s) - \rho_b A_{ex}(s) + \delta\rho_h A_h(s)|^2 \rangle_{\Omega}, \quad (24)$$

где  $A_a(s)$ ,  $A_{ex}(s)$  и  $A_h(s)$  амплитуды рассеяния от частицы в вакууме, от исключенного объема и от гидратной оболочки, соответственно. Последняя величина может появиться благодаря тому, что плотность рассеяния растворителя в объеме  $\rho_b$  может отличаться от плотности связанного растворителя (обозначенной, как  $\rho_h$ ) приводя к ненулевому контрасту для гидратной оболочки  $\delta\rho_h = \rho_h - \rho_b$  [36]. В более ранних исследованиях из-за присутствия связанного растворителя этой величиной обычно пренебрегали и наибольшее внимание уделяли расчетам рассеяния от исключенного объема (недоступного для растворителя). В эффективном методе расчета интенсивности рассеяния, исключенный объем может быть построен из виртуальных атомов, расположенных на позициях атомов макромолекул [35, 37]. Этот подход,



вероятно, является наиболее простым и быстрым способом расчета  $A_{ex}(s)$  и поэтому используется в нескольких методах [38 - 40].

Важность учета рассеяния связанного растворителя стала понятна в конце 1980-х годов, когда было обнаружено, что кривая рассеяния, рассчитанная от кристаллографических моделей белков, дает плохое совпадение с экспериментальными данными МУРР. Кристаллические структуры часто оказываются «слишком маленькими» и подгонка кривых может быть улучшена при добавлении молекул воды к поверхности белка [41]. Программа CRY SOL [36] была разработана с возможностью имитации первой сольватной оболочки, непрерывно окружающей частицу. Для этого рассчитывается угловая функция оболочки частицы и поверхностный гомогенный слой толщиной 0.3 нм [11] с плотностью рассеяния  $\rho_h$ . Зная координаты атомов,  $A_{ex}(s)$  рассчитываются, используя эффективный атомный фактор и  $A_h(s)$  от гидратной оболочки, используя мультипольное разложение. Программа рассчитывает профиль рассеяния или подгоночную кривую к экспериментальным данным, варьируя исключенный объем частицы и плотность гидратного слоя.

Сравнение с помощью программы CRY SOL экспериментальных и модельных кривых МУРР, полученных от множества белков с известной кристаллической структурой, показывает, что учет гидратной оболочки улучшает совпадение между экспериментальной и рассчитанной кривыми. Обычно плотность приграничного уровня в 1.05-1.25 раз больше, чем определенная в объеме, то есть гидратная оболочка вокруг белка плотнее, чем основная часть растворителя. Однако исследования только методом МУРР не в состоянии однозначно объяснить природу поверхностного слоя. Действительно, подобный эффект на кривых рассеяния может быть также результатом более высокой подвижности или беспорядочно расположенных боковых цепей на поверхности белка в растворе по сравнению с их средней структурой в кристалле, что также может увеличить видимый размер частиц. Эта двусмысленность была снята с развитием программы CRY SON [42], которая является аналогом CRY SOL, но используется для вычисления рассеяния нейтронов в  $H_2O/D_2O$  смесях (принимая в

расчет H/D обменные эффекты). Поскольку белок имеет отрицательный контраст в D<sub>2</sub>O, плотная гидратная оболочка должна приводить к противоположному эффекту по сравнению с рентгеновскими лучами; например, кристаллическая структура оказывается больше, чем предсказывают данные МУРН. Оказалось, что результаты МУРР / МУРН были в большей степени связаны с плотной гидратной оболочкой, чем с высокой подвижностью боковых цепей на поверхности белков [42].

#### 1.4.5. Анализ гибких и дисперсных по формам систем

Равновесное сосуществование различных конформаций ферментов является одним из случаев конформационной полидисперсности биологических макромолекул в растворе. Для анализа систем с конформационной полидисперсностью используется метод молекулярной тектоники (программа SASREF) в сочетании с оценкой объемных долей компонентов смеси. Данный подход реализован в программе SASREFMX [23]. В этом случае экспериментальные данные приближаются линейной комбинацией профилей рассеяния, рассчитанных от частицы и продуктов диссоциации.

Для количественного описания гибких систем в работе [43] была предложена общая методология учета сосуществования множества конформаций. Подход, называемый Ensemble Optimisation Method (EOM) заключается в представлении вещества находящегося в растворе в виде ансамбля, состоящего из  $K$  конформаций одной и той же молекулы. Количество конформаций не известно *a priori* и оно может быть либо фиксировано (около 20-50), либо уточняться во время процедуры оптимизации. В первую очередь создается случайная популяция, включающая  $M \gg K$  конформаций, которые, как предполагается, полностью покроют конформационное пространство, занимаемое гибкими молекулами в растворе. Интенсивности рассеяния  $I_k(s)$  от всех структур в популяции предварительно вычисляются программой CRY SOL. Рассеяние от любого заданного подмножества может быть рассчитано, как сумма выбранных  $I_k(s)$ , используя уравнение (9) и допуская, что конформации распределены

равномерно. С помощью генетического алгоритма (ГА) [44] происходит выбор оптимального ансамбля подмножества конфигураций, т.е. набор конфигураций, который после усреднения их отдельных профилей рассеяния осуществляет подгонку к экспериментальным данным. Этот алгоритм включает в себя «генетическую эволюцию» системы, которая обычно перебирает миллионы модификаций, чтобы улучшить так называемую «фитнес-функцию» (подгонка к экспериментальным данным в нашем случае). Важно, что интенсивности  $I_k(s)$ , определенные единожды для всех конформаций, не пересчитываются и это существенно ускоряет процесс расчетов.

Процедура генетического алгоритма работает следующим образом: каждое подмножество (называемое хромосомой в терминологии ГА) включает в себя  $K$  профилей рассеяния (гены) от конформаций. В первой генерации фиксированное количество хромосом  $C$  (обычно  $C=50$ ) создаются случайным образом, выбирая конформации из популяции. В каждой генерации  $G$  эти  $C$  хромосом подвергаются стандартным операциям ГА, т.е. мутациям и пересечениям. В первой операции гены каждой хромосомы случайным образом обмениваются на другие либо из пула, либо из хромосом той же генерации. В последней операции гены двух случайно выбранных хромосом обмениваются. Эти операции увеличивают популяцию до  $3C$  хромосом и для каждой хромосомы сумма отдельных рассчитанных из уравнения (9) профилей МУРР сравниваются с экспериментально полученным рассеянием, показывая между данными расхождение  $\chi^2$  и играя роль «фитнес-функции».

Лучшие  $C$  хромосомы, показывающие самое низкое значение  $\chi^2$ , выбираются для дальнейшей эволюции. Таким образом, создается элитная популяция (т.е. пул наиболее вероятных моделей) и процесс повторяется обычно от  $G = 1000$  до 5000 генераций, чтобы создать хромосому (т.е. ансамбль структур) с лучшим согласием с экспериментальными данными. Распределение параметров низкого разрешения, таких как  $R_g$  и  $D_{max}$  в выбранном ансамбле дает информацию о гибкости исследуемого объекта и множестве его конформаций в растворе.

Здесь важно подчеркнуть, что ЕОМ не предполагает предоставление информации об отдельных конформациях молекул в растворе - учитывая низкое разрешение метода МУРР, это давало бы серьезную переинтерпретацию экспериментальных данных. ЕОМ – это метод, который описывает распределение по размерам и формам частично или полностью развернутых молекул. Выбранный ансамбль в повторяющихся запусках ЕОМ обычно включает различные конформации, но они все дают похожие распределения  $R_g$  и  $D_{max}$ .

Полезно сравнивать распределения  $R_g$  и  $D_{max}$ , полученные с помощью ЕОМ, со случайными ансамблями, такими как исходный пул. Последнее обычно представляет собой широкое распределение. Если распределение, полученное с помощью ЕОМ, более узкое, чем исходная популяция, это указывает на то, что макромолекулы в растворе ведут себя как твердые тела. Положение главного пика в ансамбле ЕОМ (соответствует положению пика в популяции) позволяет судить о том, компактны ли макромолекулы или развернуты. Значительное улучшение результатов, полученных с помощью ЕОМ, по сравнению с более ранними подходами обусловлен тем, что этот метод описывает глобальные свойства макромолекул в терминах распределения по размерам и по форме, а не ограничивается определением отдельных усредненных структурных характеристик таких, например, как значение  $R_g$ .

Данный метод применим для различных типов систем, особенно для многодоменных белков и комплексов с гибкими линкерами и для внутренне неупорядоченных белков. Метод состоит из двух независимых модулей. Программа RANCH генерирует популяцию случайных конфигураций, использующих модели высокого разрешения для регионов с известной структурой, когда доступны виртуальные остатки для гибких сегментов (известна аминокислотная последовательность). Первоначально, эта программа генерирует отдельные  $C_\alpha$  цепи, рассчитывая  $C_\alpha$ - $C_\alpha$  карту Рамачандрана [45] и избегая стерических перекрытий. Далее RANCH генерирует случайную популяцию из олигомерных многоцепных конформаций, используя опции для введения симметрии и определения внутримолекулярных контактов [23]. Выбор оптимального

ансамбля представлен программой GAJOE, которая применяет процедуру генетического алгоритма [23]. Разделение на два модуля позволяет использовать структуры, отличные от тех, которые сгенерировал RANSH (например, модели, полученные с помощью молекулярной динамики), чтобы выбрать оптимальный ансамбль.

Концепция программы EOM расширяет возможности МУРР при изучении высоко динамических систем биомакромолекул, многодоменных белков и гибких систем, которые чрезвычайно трудно или невозможно охарактеризовать с использованием методов с высокой разрешающей способностью.

### **1.5. Заключение к Главе 1**

Метод малоуглового рассеяния является универсальным структурным методом исследования широкого спектра объектов, например, таких как макромолекулярные растворы, наноконпозиты, биополимеры и биоматериалы. МУРР позволяет проводить исследования в широком диапазоне молекулярных размеров от единиц кДа до ГДа в различных экспериментальных условиях. Современные подходы к интерпретации данных МУРР позволяют восстанавливать четвертичную структуру макромолекул без наличия априорной информации о структуре объектов. В современной структурной биологии упор делается на исследованиях сложных объектов, молекулярных машин и процессов [46, 47]. Для анализа взаимодействий внутри биологических систем, а также установления взаимосвязи между структурой и функциями объектов часто применяются гибридные методы, которые сочетают в себе различные биоинформатические и экспериментальные подходы. МУРР в сочетании с методами высокого разрешения (рентгеновская кристаллография и ЯМР) позволяет проводить гибридное моделирование для определения, например, конформации комплекса или организации субъединиц в белке, а также позволяет количественно охарактеризовать равновесные смеси и гибкие системы. Такие исследования стали возможны благодаря развитию приборов для проведения экспериментов, в первую очередь, благодаря высокой яркости источников

синхротронного излучения и постоянному развитию методов интерпретации экспериментальных данных МУРР. Возможности метода проиллюстрированы в настоящей работе применительно к двум типам биополимеров: гомогенным и гетерогенным растворам белков и наноккомпозитам на основе ДНК с наночастицами золота.

## ГЛАВА 2. Общие сведения о белках по литературным данным

### 2.1. Структура и функции белков

Белки являются наиболее распространенными биологическими макромолекулами, играющими важную роль в клеточных процессах. Структурная иерархия белков представлена на рис. 2.1А. Первичная структура белков представляет собой линейную цепь из 20 аминокислот, расположенных в определенной последовательности и соединенных между собой пептидными связями. Вторичная структура определяется способом укладки полипептидной цепи в упорядоченную структуру, стабилизированную водородными связями. Она может быть представлена в виде  $\alpha$ -спирали или  $\beta$ -листа. Третичная структура относится к полной трехмерной структуре полипептидной единицы конкретного белка. В данном описании это пространственное соотношение различных вторичных структур в полипептидной цепи, которые складываются в трехмерную форму белка. Вторичная структура белков часто представляет собой различные домены. Таким образом, третичная структура также описывает взаимосвязь различных областей друг с другом в белке. Это взаимодействие определяется несколькими силами, которые включают в себя образование водородных связей, гидрофобные взаимодействия, электростатические взаимодействия и силы Ван-дер-Ваальса. Многие белки состоят из двух или более различных полипептидных цепей (субъединиц), которые ассоциированы теми же нековалентными силами, стабилизирующими третичную структуру белков. Белки с множественными полипептидными цепями являются олигомерными белками. Структура, образованная взаимодействием мономеров в олигомерном белке называется четвертичной структурой. Олигомерные белки могут состоять из нескольких идентичных или различных полипептидных цепей. Белки с идентичными субъединицами называются гомо-олигомерами. Белки, содержащие несколько различных полипептидных цепей, являются гетеро-олигомерами. В зависимости от структуры белки могут выполнять различные функции (рис. 2.1Б).



**Рис. 2.1.** Структура (А) и функции белков (Б).

По типу четвертичной структуры белки можно разделить на две группы: фибриллярные, имеющие полипептидные цепи, организованные в длинные нити или листы, и глобулярные, имеющие полипептидные цепи, свернутые в сферическую или глобулярную форму. Эти две группы структурно различны. Если фибриллярные белки, как правило, состоят в основном из одного типа



вторичной структуры, то глобулярные - часто содержат оба типа. Эти две группы отличаются функционально тем, что фибриллярные белки ответственны за строительные и защитные функции организма, в то время как большинство ферментов и регуляторных белков являются глобулярными.

Знание трехмерной структуры белка - важная часть понимания того, какие функции белок выполняет, поскольку белки - динамические молекулы, чьи функции почти всегда зависят от взаимодействия с другими молекулами, и эти взаимодействия связаны с динамической структурой белка. У многосубъединичных белков конформационное изменение одной субъединицы часто оказывает влияние на конформацию остальных субъединиц.

## **2.2. Белки-ферменты**

Ферменты представляют собой особый случай функций белков. Ферменты катализируют реакции, связываясь с другой молекулой и химически трансформируя ее. Молекулы, преобразуемые в результате действия фермента, называют субстратом, а лиганд-связывающий сайт - каталитическим или активным сайтом. Каталитическая способность у ферментов часто много больше, чем у синтетических или неорганических катализаторов. Белки-ферменты имеют высокую степень специфичности в отношении субстратов, ускоряют химические реакции и функционируют в разбавленных водных растворах при физиологических значениях температуры и pH. Их каталитическая активность зависит от целостности исходной конформации белка. Если фермент денатурировал, диссоциировал на субъединицы или распался на составляющие его аминокислоты, то активность, как правило, теряется. Таким образом, первичные, вторичные, третичные и четвертичные структуры ферментов имеют значение для выполнения их функций. Для проявления своей активности одни ферменты не требуют химических групп, кроме их аминокислотных остатков, а другим нужен дополнительный компонент называемый кофактором. Им может стать один или более неорганических ионов, таких как  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , или

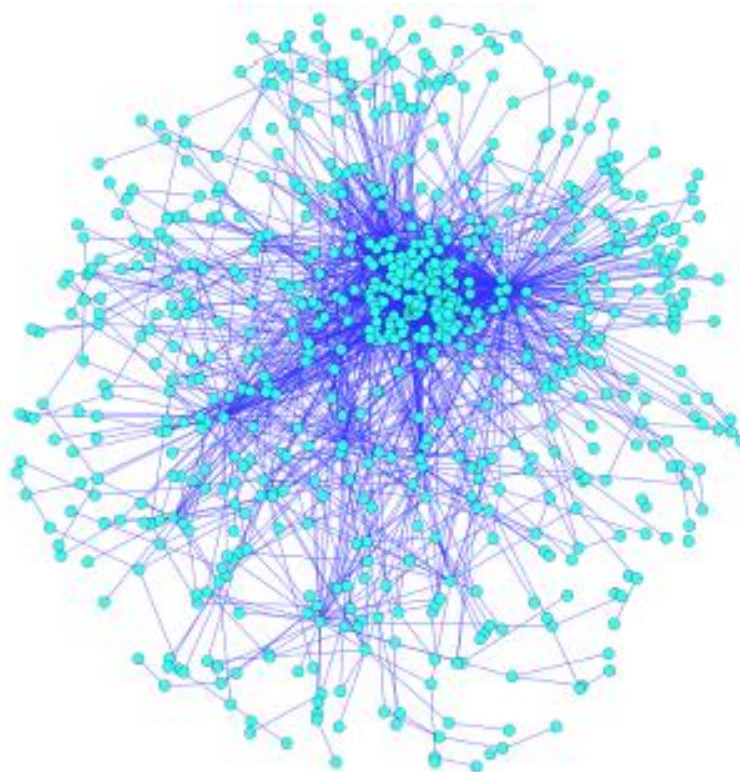
комплекс органических или металлоорганических молекул, называемый коферментом.

Ферменты делятся на шесть групп, в зависимости от типа реакций, которые они катализируют:

1. Оксидоредуктазы: окислительно-восстановительные реакции. Эти ферменты имеют большое значение, поскольку эти реакции отвечают за производство тепла и энергии.
2. Трансферазы: перенос химических групп с одной молекулы субстрата на другую.
3. Гидролазы: гидролиз углеводов, белков и сложных эфиров.
4. Лиазы: разрыв химических связей без гидролиза с образованием двойных связей.
5. Изомеразы катализируют реакции, при которых происходят структурные или геометрические изменения молекул субстрата.
6. Лигаза катализируют реакции, при которых образуются химические связи между молекулами за счет гидролиза АТФ.

В организме протекает множество ферментативных реакций, вся совокупность которых объединяется общим понятием «метаболизм». Питательное вещество, попадая в клетку, участвует во множестве последовательных химических реакций, катализируемых ферментами. Последовательности этих реакций протекают в строго определенном порядке и носят название «метаболические пути», а образующиеся в результате реакций промежуточные продукты называются метаболитами. Разделяют два типа метаболических путей: центральные и специальные. Центральные удивительно схожи у всех живых форм и представляют собой пути превращений основных питательных веществ в клетке [48]. Поскольку любая клетка представляет собой сложную адаптивную систему с множеством межмолекулярных взаимодействий, понимание работы в целом требует полного картирования и характеристики физических и функциональных отношений между отдельными участниками взаимодействий. Эта гигантская задача дополнительно осложняется

динамическим характером состава клетки и внутриклеточных взаимодействий, которые подвержены постоянному изменению в ответ на внешние сигналы или стадии развития. Хотя *Escherichia coli* часто рассматривается в качестве модельной системы для понимания процессов, происходящих в живых клетках, характеристика ее интерактома, т.е. полного набора всех взаимодействий в клетке, который представляет собой сложную разветвленную сеть (рис. 2.2) пока далека от завершения [49].



**Рис. 2.2.** Карта метаболических реакций *E.coli*, где метаболиты изображены в виде светло-голубых узлов, соединенных ребрами, представляющими собой реакции [50].

Обычное описание жизненного цикла *E. coli* включает в себя четыре фазы: лаг-фаза, логарифмическая, стационарная и фаза смерти клетки. При этом в природе бактерии редко находятся в благоприятных условиях и для защиты от агрессивного влияния окружающей среды они способны переходить в стационарную фазу. Переход бактериальных клеток к стационарной фазе роста, может привести к угнетению метаболической активности в сочетании с

повышением устойчивости к стрессовым эффектам, вызванных недостатком питательных веществ [48]. Многие клеточные процессы, претерпевают изменения в ходе стационарной фазы - индуцируются / активируются, чтобы обеспечить защитные механизмы против неблагоприятных условий окружающей среды [49]. Понимание механизмов регуляции отдельных белков, участвующих в обмене веществ, а также общие структурные характеристики этих белков имеют большое значение для понимания сложности регуляции клеточного метаболизма и стрессовых реакций [49]. Практическая и фундаментальная значимость таких исследований достаточно высока, поскольку в стационарной фазе клетки становятся существенно более устойчивыми к воздействию антибактериальных препаратов и могут выживать даже в очень агрессивных условиях [51].

### **2.3. Постановка задачи**

В работе [49] было показано, что в стационарной фазе *Escherichia coli* неорганическая пирофосфатаза (PPase) взаимодействует с четырьмя другими ферментами: фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза (FbaB), 5-кето-4-дезоксипуронат изомераза (KduI), глутамат декарбоксилаза (GadA) и дигидролипоилдегидрогеназа (LpD), участвующими в катаболизме. При этом только LpD выполняет свои основные функции, остальные же белки являются запасными и причины, а также роли этих ферментов и их взаимодействий не были до конца изучены.

На сегодняшний день известны кристаллографические структуры PPase, KduI, GadA и LpD, которые доступны в белковой базе данных (Protein Data Bank) (PDB коды белков 2AUU [52], 1XRU [53], 1XEY [54], 4JDR [55], соответственно). Тем не менее, общая организация этих ферментов в растворе остается не изученной. Поведение этих ферментов в растворе может отличаться от того, что наблюдается в кристаллической матрице, когда в растворе влияние сил кристаллографической упаковки снимается. Следовательно, результаты, полученные в ходе исследований белков в растворе, могут дать информацию о новых структурных деталях, которые более адекватно описывают состояние этих

веществ в условиях близких к естественным. Для решения такого рода задач среди методов анализа структуры наиболее подходящим является МУРР. Поскольку, во-первых, он позволяет проводить исследования структурной организации многодоменных и гибких белков в растворе [43, 56], а во-вторых, МУРР хорошо сочетается с другими биофизическими и биоинформатическими методами, такими как рентгеновская кристаллография, ЯМР, аналитическое ультрацентрифугирование, динамическое светорассеяние и молекулярный докинг [11]. Например, с помощью МУРР в сочетании с рентгеновской кристаллографией или ЯМР можно провести моделирование четвертичной структуры, используя субъединицы с полностью или частично известными атомными структурами [11, 23, 32, 57].

Таким образом, актуальность исследования ферментов и современные методы интерпретации данных МУРР определили постановку следующих задач:

1. Определить третичную и четвертичную структуру в растворе ранее неисследованного белка FbaV класса I.
2. Определить четвертичную структуру в растворе белка PPase и сравнить ее с известной кристаллической.
3. Исследовать поведение в растворе ферментов KduI, GadA и LpD, кристаллическая структура которых известна.

## **ГЛАВА 3. Структурные исследования белков, участвующих в катаболизме *E. coli* в стационарной фазе роста клеток**

### **3.1. Эксперимент по малоугловому рассеянию**

Эксперименты по малоугловому рассеянию на образцах белков были проведены на синхротронном источнике PETRAIII (DESY, Гамбург) на линии Европейской Молекулярной Биологической Лаборатории P12 (EMBL-P12). Измерения образцов проводились в стандартном 50 мМ Трис буфере при pH 7.5, при температуре 10° С. Растворы белков были измерены при 4-х концентрациях в диапазоне 1.4–10.8 мг/мл, чтобы исключить учет межчастичного взаимодействия. Образцы GadA до измерений хранились в 100 мМ Na-ацетат, 10 мМ NaCl, 1 мМ DTT pH 4.6 буфере, а непосредственно перед измерениями белок был переведен в стандартный Трис буфер при pH 7.5. Дополнительные данные рассеяния были получены для GadA при концентрации 5 мг/мл. Образец отличался условиями хранения: исходный буфер не содержал 10 мМ NaCl.

### **3.2. Дополнительные методы, используемые для анализа структуры ферментов в растворе**

Поскольку восстановление трехмерных структур по данным малоуглового рассеяния по своей природе неоднозначно, нами были использованы взаимодополняющие методы исследования структур белков в растворе.

#### **3.2.1. Аналитическое ультрацентрифугирование**

Аналитическое ультрацентрифугирование использовалось по двум основным причинам: (1) - оно позволяет определить массовые и геометрические характеристики, аналогично тем, что определяются с помощью МУРР, и (2) – этот метод дает возможность оценить является ли исследуемый образец монодисперсным или многокомпонентным [11].

Скоростную седиментацию проводили при 20°С с использованием аналитической центрифуги Spinco E (Beckman, USA), 260 000 × *g*, сканирование при 280 нм. Концентрация образцов составляла 0.4 мг/мл, состав буфера

аналогичен тому, что использовался для экспериментов МУРР. Коэффициенты седиментации были вычислены как среднее из трех независимых экспериментов с использованием компьютерной программы SEDFIT (sedfit12p52) и уравнения Ламма [58]. Для определения молекулярной массы  $M_w$  использовали уравнение Сведберга [59]:

$$s = M_w(1 - v\rho_0)/N_A f, \quad (25)$$

где  $s$  – коэффициент седиментации,  $f$  – поступательный фрикционный коэффициент,  $N_A$  – число Авогадро,  $\rho_0$  – плотность раствора,  $v$  – удельный парциальный объем.

### 3.2.2. Эксклюзионная хроматография

Так же, как и аналитическое ультрацентрифугирование, эксклюзионная хроматография использовалась как дополнительный метод для определения средних молекулярных масс компонентов смеси.

Эксклюзионная хроматография проводилась с использованием прибора Superdex 200 10/300 GL колонка (GE Healthcare) предварительно уравновешенной высоким, или низким уровнем pH буфера: 50 mM Трис-НСl, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7.5, или 100 mM Na-ацетат, 10 mM NaCl, 1 mM DTT pH 4.6. Во всех случаях концентрация нагрузки белка была 5 мг / мл. Оценки молекулярных масс компонентов образца были рассчитаны по отношению к миграции белковых стандартов через хроматографическую колонку в соответствующих буферах с высоким или низким уровнем pH. Калибровку хроматографической колонки проводили с использованием стандартного набора молекулярных масс белков для гель-фильтрационной хроматографии (GE Healthcare), который содержал 8 глобулярных белков с молекулярными массами от 1,35 до 669 кД.

### 3.2.3. Молекулярный докинг

Анализ данных в МУРР, как и в большинстве других физических экспериментов, в значительной степени зависит от развития различных вычислительных методов. Совместное использование МУРР с различными

подходами биоинформатики, например, молекулярным докинг в последнее время стало очень полезным дополнением к палитре инструментов анализа данных. Одной из очевидных областей применения является проверка предсказанных моделей многосубъединичных белков или белковых комплексов высокого разрешения, где 3D структуры отдельных компонент обычно определяются экспериментально с помощью рентгеновской кристаллографии или ЯМР спектроскопии [11]. Программы для вычисления теоретических профилей рассеяния от моделей высокого разрешения хорошо известны (например, CRY SOL [36]) и позволяют проводить валидацию полученных моделей.

Молекулярный докинг – метод моделирования, целью которого является поиск наиболее достоверного пространственного взаимного расположения различных молекул при образования устойчивого комплекса [60]. Несмотря на различия в программах докинга, можно сформулировать общие принципы их работы: для молекулы-рецептора рассчитывается поверхность; на этой поверхности определяется место возможной посадки молекулы-лиганда; рассчитывается множество конформационных взаимодействий и создаются структурные модели комплекса; далее оценивают и отбирают полученные модели, используя критические оценки прогнозируемых взаимодействий (CAPRI) [61, 62]. Примерами могут служить программы ZDOCK [63], ruDockSAXS [64], FoXSDock [65] и Patch-Dock [66], HADDOCK [67]. Все они включают в себя оценки функций энергии. В программе HADDOCK также заложена возможность использования экспериментальных или биоинформатических для компьютерного моделирования образования комплексов. Данные обоих типов используются для определения активных и пассивных остатков. Активные остатки - это те остатки, для которых было получены теоретическое или экспериментальное предсказание, указывающее на то, что они расположены в зоне взаимодействия. Пассивные остатки - это соседи активных, расположенные на поверхности молекулы. Все вместе они используются для определения сетки ограничений неоднозначных взаимодействий (AIRs) между молекулами, которые подвергаются процедуре докинга. AIRs указывает, что остаток на поверхности молекулы должен быть в



близкой окрестности от остатка или группы остатков молекулы-партнера, когда будет сформирован комплекс. По умолчанию это указывается как ограничение неоднозначных расстояний от всех атомов выбранного остатка до всех атомов взаимодействующего остатка (остатков), который (которые) предположительно располагаются во взаимодействующей части комплекса. AIRs определены для каждого активного остатка, как эффективное расстояние  $d_{iAB}^{eff}$ , которое рассчитывается как сумма всех индивидуальных расстояний от каждого атома выбранного активного остатка до всех атомов всех активных и пассивных остатков молекулы-партнера, или:

$$d_{iAB}^{eff} = \left( \sum_{m_{iA}=1}^{N_{Atom}} \sum_{k=1}^{N_{resB}} \sum_{n_{kB}=1}^{N_{Atom}} \frac{1}{d_{m_{iA}n_{kB}}^6} \right)^{-1/6}, \quad (26)$$

где  $N_{Atom}$  равняется числу всех атомов выбранного остатка молекулы А,  $N_{resB}$  обозначает все остатки в области взаимодействия молекулы В, и значение  $N_{Atom}$  равно числу всех атомов остатка молекулы В. Суммирование величины  $1/r^6$  напоминает часть потенциала Ленарда-Джонса, которая отвечает за притяжение и гарантирует, что AIRs выполняются сразу же, когда два атома молекул контактируют. AIRs вводятся как добавка к энергии, которая минимизируется в процессе докинга. Разнообразная природа этих ограничений позволяет использовать экспериментальные данные (которые часто представляют доказательства взаимодействия остатков) как основу для процесса докинга.

Таким образом, AIRs задают сетку ограничений для взаимодействующих частей молекул, при этом, не ограничивая взаимную ориентацию этих молекул, что минимизирует время поиска среди всех возможных конформаций, необходимых для создания данного взаимодействия.

Процесс докинга в HADDOCK разделён на 3 части:

- 1) минимизация энергии для жесткой структуры;
- 2) уточнение минимума в зависимости от углов поворота полу-гибкой структуры;

3) финальное уточнение, учитывающее взаимодействие с растворителем (водой).

В двух последних стадиях, гибкие сегменты обычно определяются автоматически, основываясь на определённых межмолекулярных взаимодействиях. В конце каждой стадии докинга варианты сортируются по рейтингу, который определяется с помощью следующих функций:

$$it0: 0.01 \cdot E_{vdW} + 1.0 \cdot E_{Elec} + 0.01 \cdot E_{AIR} - 0.01 \cdot BSA + 1.0 \cdot E_{Desolv} + 0.1 \cdot E_{Sym}$$

$$it1: 1.0 \cdot E_{vdW} + 1.0 \cdot E_{Elec} + 0.1 \cdot E_{AIR} - 0.01 \cdot BSA + 1.0 \cdot E_{Desolv} + 0.1 \cdot E_{Sym}$$

$$water: 1.0 \cdot E_{vdW} + 0.2 \cdot E_{Elec} + 0.1 \cdot E_{AIR} + 1.0 \cdot E_{Desolv} + 0.1 \cdot E_{Sym}$$

Взвешенные параметры, используемые для подсчёта рейтинга на разных этапах это: энергия, связанная с силами Ван-дер-Вальса ( $E_{vdW}$ ), электростатическая энергия ( $E_{Elec}$ ), энергия нарушения AIRs ( $E_{AIR}$ ), энергетическая добавка от десольватации ( $E_{Desolv}$ ), энергия ограничений на симметрию ( $E_{Sym}$ ), энергия углублённых областей (BSA). Финальные варианты кластеризуются, используя ограничения в 7.5 Å, которые наложены на их попарные среднеквадратичные отклонения. Ранг кластеров определяется в зависимости от средней энергии четырех лучших структур каждого кластера.

Модели докирования оцениваются в соответствии с критерием CAPRI. Чтобы комплекс был признан подходящим (1 звезда), его среднеквадратичное отклонение интерфейса (i-r.m.s.d.) взаимодействующей части комплекса должно быть меньше 4 Å, или среднеквадратичное отклонение его лиганда (l-r.m.s.d.) должно быть меньше 10 Å. В дополнение к этому, доля нативных контактов (fnat) должна быть  $\geq 0.1$ . Для хороших предсказаний (2 звезды), критерии следующие: среднеквадратичное отклонения i-r.m.s.d. (взаимодействующая часть)  $\leq 2$  Å или среднеквадратичное отклонение (лиганда)  $\leq 5$  Å доля нативных контактов  $\geq 0.3$ . Для высокоточных предсказаний  $i \leq 1$  Å,  $l \leq 1$  Å и fnat (доля нативных контактов)  $\geq 0.5$ . Кластер считался 1/2/3 звёздным если хотя бы 1 из 4 его самых высокоранговых структур имеет точность в 1/2/3 звезды или лучше.

### 3.3. Гомогенные растворы белков

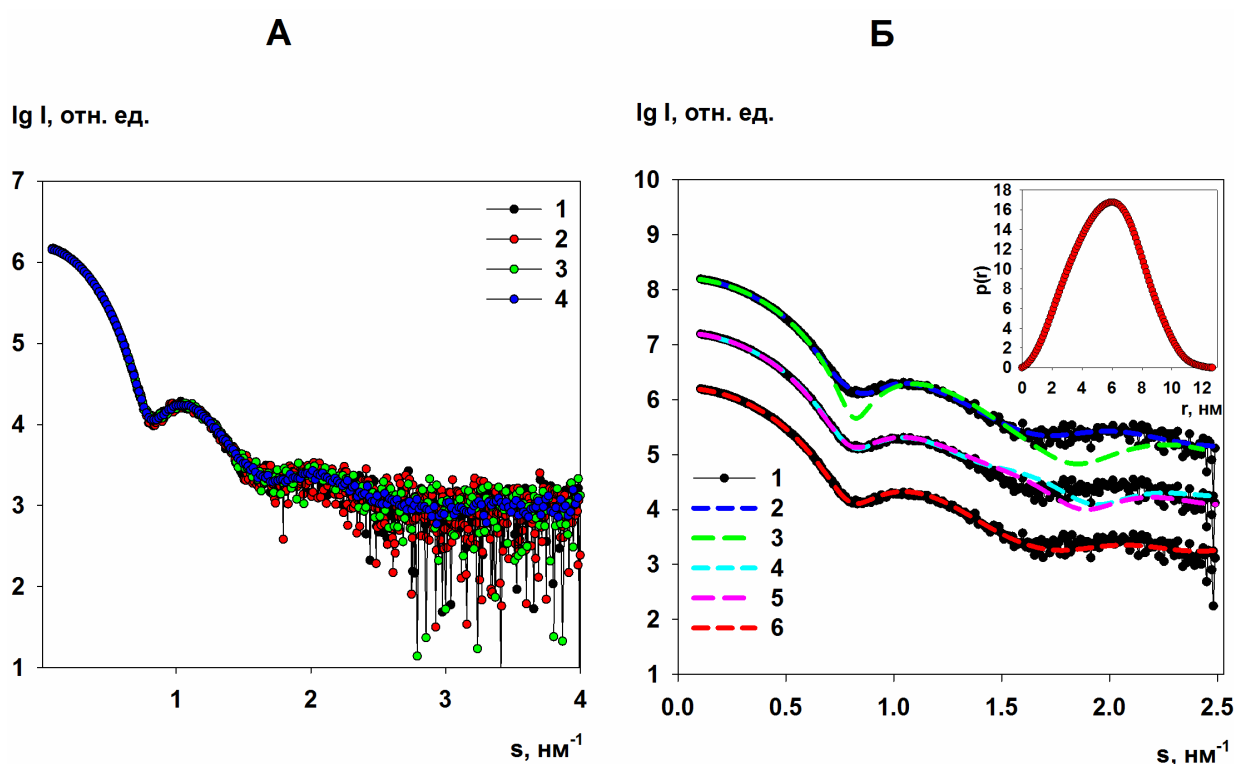
#### 3.3.1. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы (FbaB) из *Escherichia coli*, участвующей в катаболизме

Фруктозо-1,6- бисфосфат альдолаза (Fba) является ключевым ферментом, участвующим в регуляции гликолиза и глюконеогенеза, а также в регуляции метаболизма фруктозы [68, 69]. В эукариотах Fba также выполняет различные неэнзиматические функции, являясь посредником взаимодействий между различными белками [70-72]. Существует два класса альдолаз, которые различаются по своим каталитическим и структурным свойствам. Альдолазы класса I были обнаружены у высших эукариот и архей [73, 74], в то время как альдолазы II класса были обнаружены в эубактериях и некоторых эукариотах [75, 76]. Несколько бактерий, включая *E. coli*, могут продуцировать альдолазы обоих классов [77-79]. Было показано, что в *E. coli* Fba класса II (кодируется геном *fbaA*) представляет собой главный класс ферментов гликолитической активности, в то время как Fba I класса (кодируется геном *fbaB*) не основной фермент, экспрессированный в бактериях, выращенных на несугарных источниках углерода [77, 80]. Роль Fba класса I (обозначена как FbaB) плохо понятна и ее структура до сих пор неизвестна, но данные свидетельствуют о том, что этот фермент важен для адаптации бактерий к стрессу, включая обезвоживание, сахарный голод, и осмотическую регуляцию [77-81]. Учитывая низкую гомологию аминокислотной последовательности (26%) бактериальной FbaB к ближайшему гомологу из архей и эукариот [82], FbaB из *E. coli* может быть представлена как член нового структурного семейства этих альдолаз с неизвестными структурой и свойствами.

Исследование структуры белков в растворе, как правило, начинают с анализа инвариантов, т.е. геометрических и массовых характеристик образца, которые можно определить непосредственно из кривой малоуглового рассеяния [10]. Важнейшими инвариантами для монодисперсного раствора белка являются:

график в координатах Кратки; радиус инерции  $R_g$  и молекулярная масса белка (ММ), которые определяются по экстраполированной в нулевой угол интенсивности малоуглового рассеяния  $I(0)$ , т.е. начальному участку кривой в области Гинье; объем Порода ( $V_p$ ).

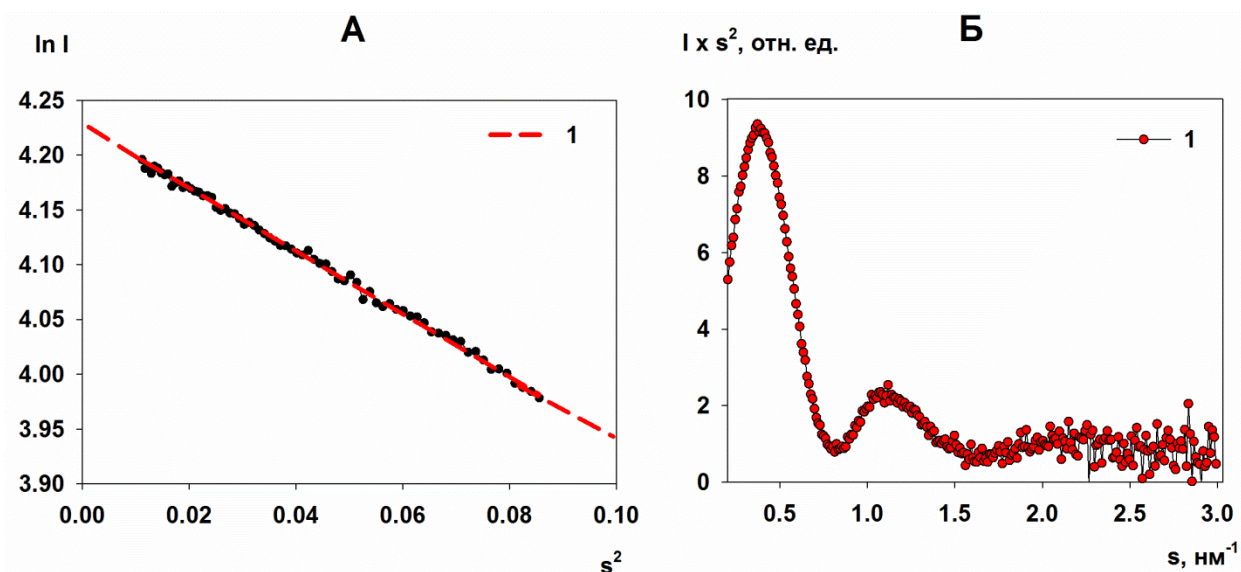
Экспериментальные кривые рассеяния, полученные при 4-х концентрациях, от растворов белка FbaV отображены на рис. 3.1А. Из рисунка видно, что все кривые совпадают между собой, что свидетельствует об отсутствии концентрационной зависимости. Поэтому для дальнейшего анализа использовалась кривая с наибольшей концентрацией (рис. 3.1Б, кривая 1).



**Рис. 3.1.** Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния от раствора FbaV. (А) Экспериментальные кривые рассеяния от растворов FbaV, взятых при концентрациях 1: 1.4; 2: 5.2; 3: 8.3 и; 4: 10.8 мг/мл. (Б) (1) Экспериментальная кривая рассеяния от раствора FbaV при максимальной концентрации. (2) Кривая, рассчитанная от *ab initio* модели, полученной с помощью программы DAMMIN и изображенной на рис. 3.4. (3) Кривая, рассчитанная с помощью программы CRY SOL от кристаллической структуры декамера FbaV (PDB: 1OJX) из семейства архей. (4) и (5) Кривые, рассчитанные от моделей октамера и декамера, соответственно, полученных с помощью метода молекулярной тектоники и

программы SASREF. (6) Кривая рассеяния от модели FbaB, полученной с помощью программы CORAL.

График в координатах Гинье показывает линейный участок в начальной части кривой малоуглового рассеяния (рис. 3.2А), что указывает на монодисперсность раствора, а график в координатах Кратки имеет характерную для глобулярного белка колоколообразную форму (рис. 3.2Б). [12, 83].



**Рис. 3.2.** Графики в координатах Гинье (А) и Кратки (Б) для белка FbaB.

Структурные параметры белка, такие как  $R_g$ ,  $D_{max}$ ,  $V_p$  и  $MM$  были определены по кривой малоуглового рассеяния и представлены в Таблице 1.

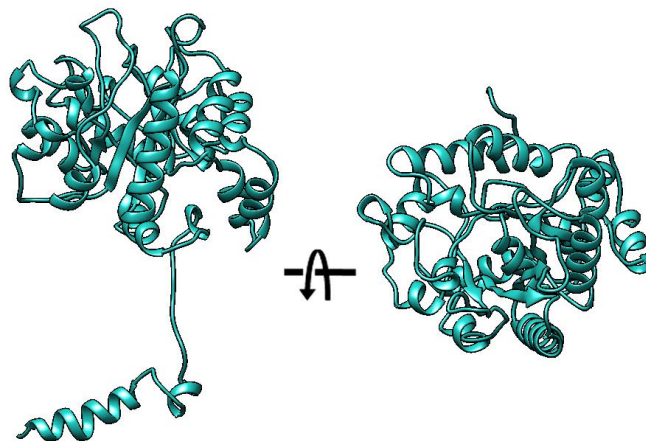
**Таблица 1.** Структурные параметры белка FbaB.

Образец	$R_g$ , нм	$V_p$ , нм <sup>3</sup>	$D_{max}$ , нм	$MM_{I(0)}$ , кДа	$MM_{Porod}$ , кДа	$R_{g\ cryst}$ , нм	$MM_{aa}$ , кДа
<b>FbaB</b>	4.4±0.1	570 ± 30	12.7±0.6	340±20	335±15	4.4*	381

\* $R_{g\ cryst}$  радиус инерции, рассчитанный от кристаллической структуры FbaB класс I из семейства архей (PDB:1OJX).

Используя функцию парных расстояний  $p(r)$  (Рис 3.1Б, вставка) был определен максимальный размер частицы  $D_{max}=12.7±0.6$  нм и восстановлена форма низкого разрешения с помощью программы DAMMIN. Кривая рассеяния, рассчитанная от полученной модели, хорошо совпадает с экспериментальной

( $\chi^2=1.2$ ; рис.3.1Б, кривая 2). Для определения четвертичной структуры белка методом молекулярной тектоники (SASREF) и гибридным методом (CORAL) была использована модель субъединицы FbaV (рис. 3.3). Для моделирования использовалась аминокислотная последовательность белка FbaV класса I из *E. coli*, которая была взята из базы данных UniProt (A0A037Y4V8) [84]. Белок содержит 350 аминокислот, что соответствует молекулярной массе мономера 38,1 кДа.

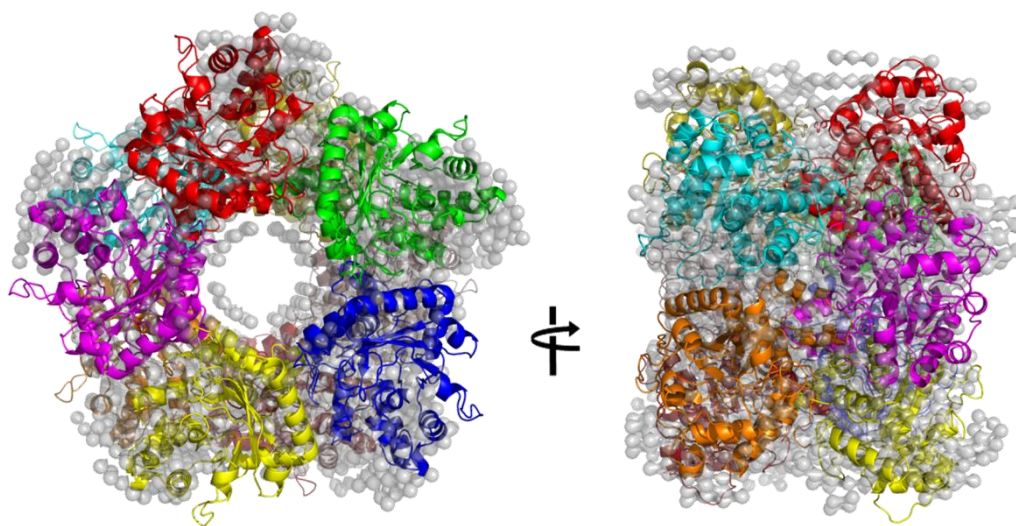


**Рис. 3.3.** Предсказанная структура субъединицы FbaV класс I из *E. coli* в двух ориентациях.

Предсказание вторичной структуры мономера происходило с помощью сервера PSIPRED [85] 3D-модель была получена с помощью I-Tasser [86]. Этот интернет-ресурс использует множественный потоковый алгоритм, чтобы определить структурно схожие шаблоны с библиотекой PDB фрагментов цепи. Затем строятся модели полной структуры итерационными методами и ранжируются на основе оценок: количественного показателя доверия (C-score), количественная оценка структурного сходства белка (TM-score) и среднеквадратичное отклонение (r.m.s.d.). Проверка структуры и контроль качества были сделаны с помощью модулей Procheck [87] и WhatCheck на сервере WhatIf [88].

Поскольку FbaV из семейства эукариот является тетрамером [68], а FbaV из семейства архей представляет собой декамер [89], можно предположить, что FbaV из *E. coli* является либо тетрамером, либо декамером. Молекулярная масса

FbaV, определенная по данным МУРР (Таблица 1) указывает на то, что количество субъединиц белка должно быть не менее восьми, поэтому мы попытались построить модели белка, состоящего 8 и 10 субъединиц. Модель октамера была получена с помощью программы SASREF, используя субъединица FbaV и симметрию P42. Кривая рассеяния от этой модели показала плохое совпадение с экспериментальными данными ( $\chi^2=4.8$ ; рис. 3.1Б, кривая 4). Увеличивая количество субъединиц до 10 и, используя симметрию P52, подгонка к экспериментальной кривой улучшается ( $\chi^2=3.7$ , рис. 3.1Б, кривая 5), подтверждая предположение о том, что четвертичная структура белка представляет собой декамер. Для дальнейшего уточнения модели декамера мы использовали программу CORAL. С ее помощью N-домен предсказанной третичной структуры FbaV (рис. 3.3.) был представлен в виде гибкой цепи, что позволило получить модель, рассеяние от которой, существенно улучшает подгонку к экспериментальной кривой ( $\chi^2=1.8$ , рис. 3.1Б, кривая 6), доказывая, что новый тип FbaV состоит из 10 субъединиц (рис. 3.4).



**Рис. 3.4.** Восстановление формы FbaV методами *ab initio* и молекулярной тектоники. Модель декамера FbaV, полученная с помощью DAMMIN (светло-серые шарики, симметрия P52) наложена на модель, полученную с помощью метода молекулярной тектоники (каждая субъединица показана отдельным цветом). Модели показаны в двух ориентациях.

Этот вывод также подтверждается оценкой молекулярной массы, сделанной по данным МУРР.  $MM_{aa}$  предсказанного мономера приблизительно равна 38 кДа, тогда как  $MM$ , полученная из  $MM_{L(0)}$  и  $MM_{Porod}$  равна 340 кДа и 335 кДа, соответственно. Эти значения с учетом ошибки определения молекулярных масс указывают на декамерную структуру фермента в растворе. Следует отметить, что FbaV класса I из семейства архей также является декамером (PDB: 1OJX; *Thermoproteus tenax*) [68], однако кривая рассеяния, рассчитанная от этой структуры плохо совпадает с экспериментальными данными, полученными от FbaV из *E. coli* ( $\chi^2=10.0$ , рис. 3.1Б, кривая 3), что свидетельствует о существенном различии четвертичной структуры двух структур.

Таким образом, нами была предсказана третичная структура фермента FbaV, с помощью которой впервые была построена модель атомного разрешения его четвертичной структуры. Эти данные помогут понять свойства и функции FbaV класса I, который является запасным белком для *E. coli* и присутствует только в клетках, выращенных на неглюкозных источниках углерода [90], где продукты пути с участием FbaV могут быть использованы для утилизации неглюкозных источников углерода (глюконеогенез) [49]. Полученная модель была депонирована в биологическую базу данных МУР (SASBDB; [www.sasbdb.org](http://www.sasbdb.org) [91]) с кодом SASDBZ2.

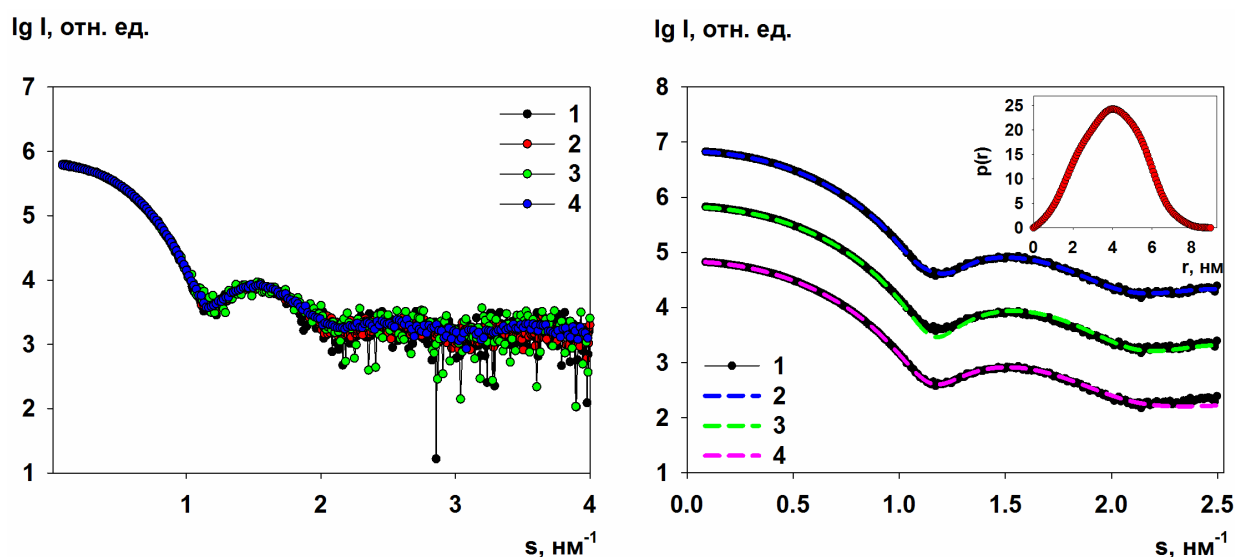
### **3.3.2. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании неорганической пирофосфатазы (PPase) из *Escherichia coli*, участвующей в катаболизме**

Неорганическая пирофосфатаза (PPase) катализирует обратимый гидролиз пирофосфата ( $PP_i$ ) и является ключевым фактором, определяющим внутриклеточный уровень  $PP_i$ . Пирофосфат является продуктом более чем 120 ферментативных реакций. Пирофосфатаза является металлозависимым ферментом. Три или четыре иона двухвалентного металла, например,  $Mg^{2+}$ , необходимо для проявления его каталитической активности. PPase также участвует в биосинтезе белков и нуклеиновых кислот [92], что делает ее возможным компонентом различных мультибелковых комплексов. Несмотря на



то, что этот белок уже охарактеризован структурно и кинетически [52, 92] до сих пор нет информации о структуре PPase в растворе, а также четкого понимания того, как фермент может быть вовлечен в регуляторную сеть.

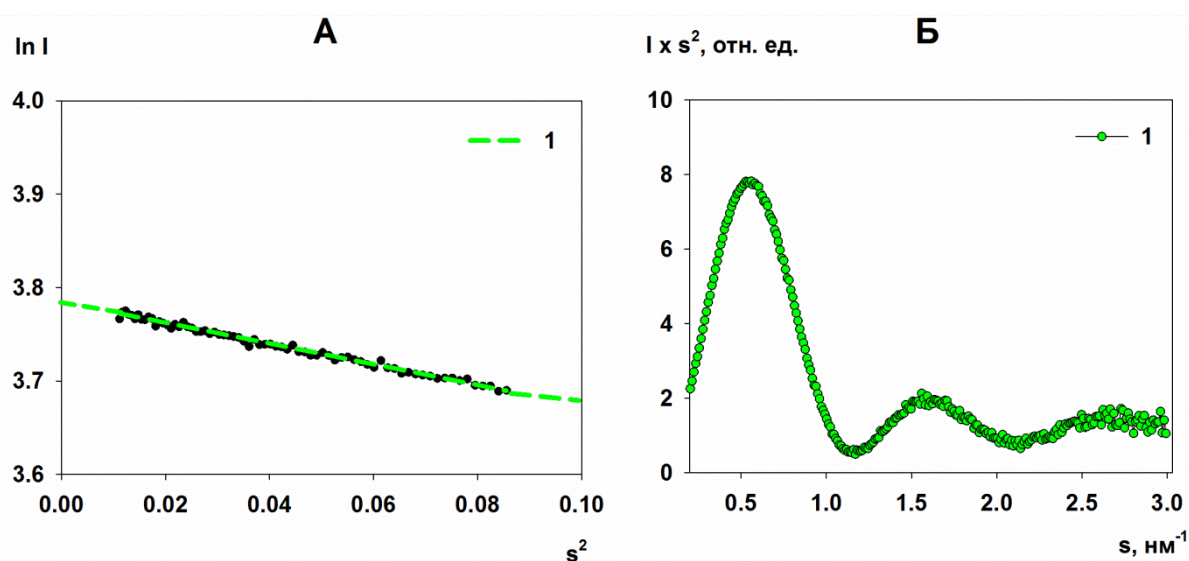
Экспериментальные кривые МУРР, полученные от 4-х концентраций образца PPase совпадают, указывая на отсутствие концентрационной зависимости (рис. 3.5А). Тем не менее, при увеличении концентрации от 2.8 до 10.9 мг/мл в самых малых углах ( $s < 0.54 \text{ нм}^{-1}$ ) была замечена незначительная межчастичная интерференция, при этом данные МУРР, полученные от всех образцов PPase статистически не отличаются в диапазоне углов  $s > 0.54 \text{ нм}^{-1}$  независимо от концентрации. Поэтому для обработки данных была использована кривая, созданная с помощью программы PRIMUS путем объединения двух кривых: начальной части кривой ( $s < 0.54 \text{ нм}^{-1}$ ), полученной от концентрации 2.8 мг/мл и части кривой при  $s > 0.54 \text{ нм}^{-1}$ , полученной от образца с самой высокой концентрацией (10.8 мг/мл) (рис. 3.5Б, кривая 1). Такая практика объединения участков кривых малоуглового рассеяния, измеренных при разных концентрациях широко используется при анализе данных МУРР [11].



**Рис. 3.5.** Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния от раствора PPase. **(А)** Экспериментальные кривые рассеяния от растворов PPase, взятых при концентрациях 1: 2.8; 2: 5.2; 3: 8.3 и; 4: 10.8 мг/мл. **(Б)** (1) Экспериментальная кривая рассеяния от раствора PPase, полученная с помощью сшивки кривых от минимальной и максимальной концентраций. (2) Кривая, рассчитанная от *ab initio*

модели, полученной с помощью программы DAMMIN и изображенной на рис. 3.8. (3) Кривая, рассчитанная с помощью программы CRY SOL от кристаллической структуры PPase (PDB: 2AUU). (4) Кривая, рассчитанная от модели гексамера, полученной с помощью метода молекулярной тектоники и программы SASREF.

Прямолинейный участок в области Гинье и форма графика Кратки свидетельствуют о монодисперсности раствора глобулярного белка (рис. 3.6).



**Рис. 3.6.** Графики в координатах Гинье (А) и Кратки (Б) для белка PPase.

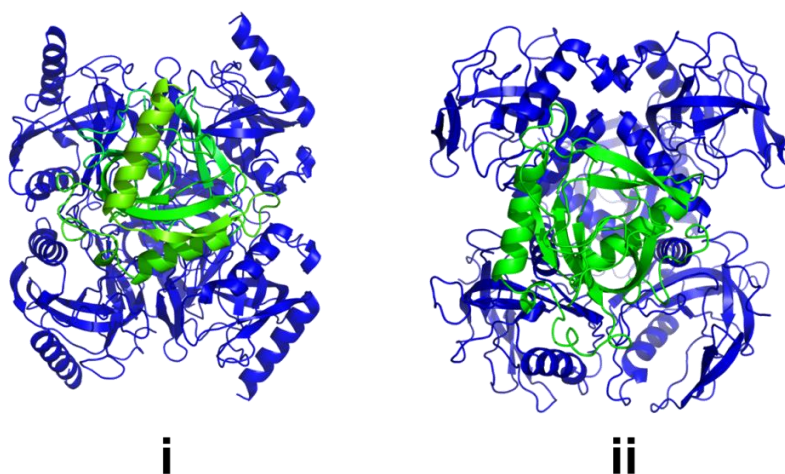
Функция парных расстояний  $p(r)$  (рис. 3.5Б, вставка) характерна для компактного белка и структурные параметры, определенные из данных МУРР находятся в разумном соответствии с параметрами, рассчитанными от кристаллографической модели PPase (Таблица 2).

**Таблица 2.** Структурные параметры белка PPase.

Образец	$R_g$ , нм	$V_p$ , нм <sup>3</sup>	$D_{max}$ , нм	$MM_{I(0)}$ , кДа	$MM_{Porod}$ , кДа	$R_{g\ cryst}$ , нм	$MM_{aa}$ , кДа
PPase	3.0±0.1	166 ± 20	9.0 ± 0.5	130±10	104±10	3.0	117

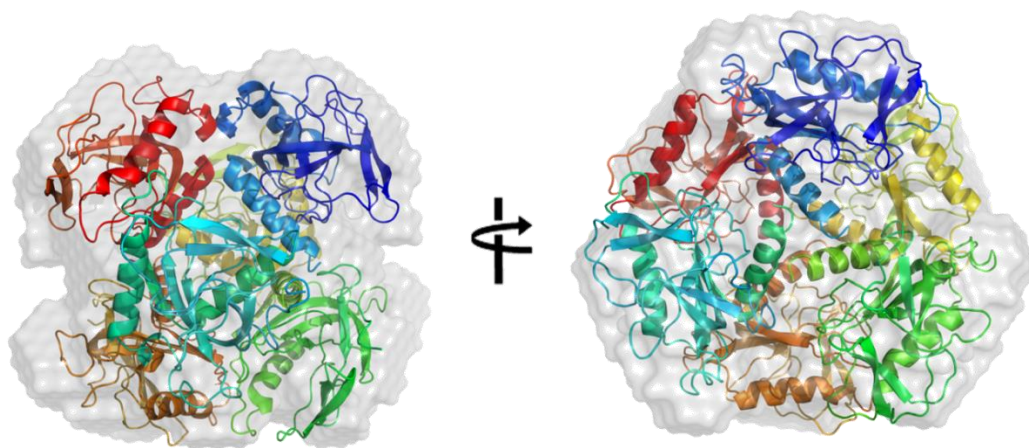
PPase образует компактный гексамер, как в кристалле, так и в растворе, однако, кривая, рассеяния, рассчитанная с помощью программы CRY SOL от кристаллической структуры (рис. 3.5Б, кривая 3) плохо совпадает с

экспериментальными данными ( $\chi^2 = 5.2$ ; рис. 3.5Б, кривая 1), указывая на разницу, которая вероятно присутствует между конформациями белка в растворе и в кристалле. С помощью метода молекулярной тектоники и программы SASREF, используя одну кристаллографическую субъединицу и применяя симметрию P32, была получена модель, рассеяние от которой уменьшает разницу с экспериментальной кривой до  $\chi^2 = 1.4$  (рис. 3.5Б, кривая 4). Главное различие между конформациями белка в кристалле и в растворе проявляется, таким образом, в разном взаимном расположении субъединиц PPase (рис. 3.7).



**Рис. 3.7.** Сравнение ориентации субъединиц PPase в кристаллической структуре (i) и структуре, полученной методом молекулярной тектоники (ii). Одна субъединица выделена зеленым цветом, чтобы подчеркнуть очевидную переорганизацию субъединиц, которая происходит в растворе.

Форма низкого разрешения была восстановлена с помощью программы DAMMIN. Совпадение кривой рассеяния от этой модели с экспериментальной кривой достаточно хорошее  $\chi^2 = 1.0$  (рис. 3.5Б, кривая 2). Пространственное наложение моделей DAMMIN и SASREF показано на рис. 3.8.



**Рис. 3.8.** Восстановление формы PPase методами *ab initio* и молекулярной тектоники. Модель гексамера PPase, полученная с помощью DAMMIN наложена на модель, полученную с помощью метода молекулярной тектоники и программы SASREF (каждая субъединица показана отдельным цветом).

Найденное различие структуры PPase в растворе и в кристалле является важным результатом, который может прояснить возможную роль PPase в интерактоме и в комплексе с другими белками [49]. Полученная модель была депонирована в биологическую базу данных МУР (SASBDB; [www.sasbdb.org](http://www.sasbdb.org) [91]) с кодом SASDBY2.

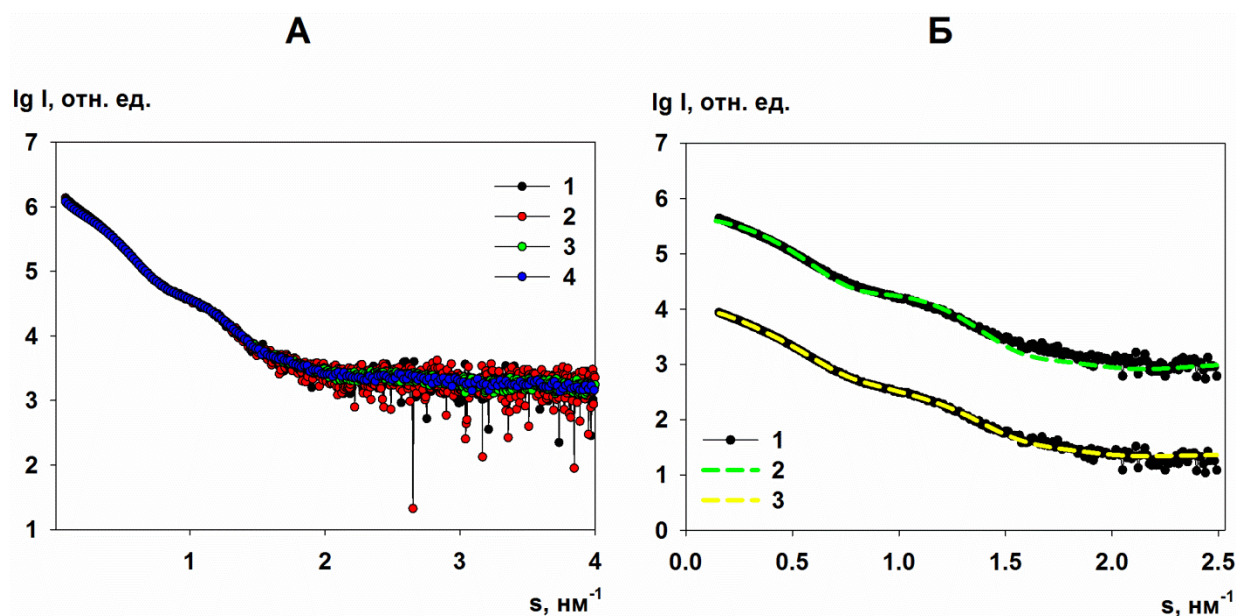
### 3.4. Гетерогенные растворы белков

#### 3.4.1. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании 5-кето-4-дезоксисуридинат изомеразы (KduI) из *Escherichia coli*, участвующей в катаболизме

5-кето-4-дезоксисуридинат изомераза (KduI) является сахарной изомеразой, которая в почвенных бактериях *Erwinia chrysanthemii* участвует в разложении пектина. *E. coli* не может преобразовать пектин и использовать его продукты в качестве источника питания, поскольку в ее геноме не хватает половины генов, выполняющих эту функцию [93, 94]. Тем не менее, в *E. coli* присутствует ген, кодирующий KduI, так что этот белок в *E. coli* должен иметь некоторые другие функции. Наиболее интересной каталитической особенностью KduI является его аллостерическое поведение. Кристаллическая структура KduI известна [53] - при

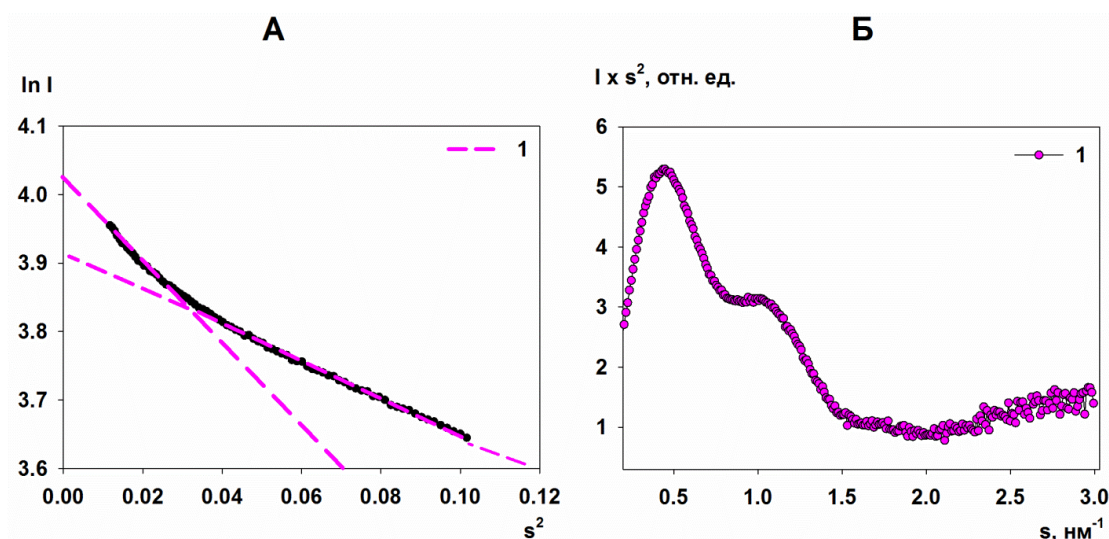
высоких концентрациях белка, используемых в эксперименте по кристаллизации, KduI является исключительно гексамером, в то время как в растворе его структура не была изучена.

Кривые МУРР, полученные от белка KduI также показывают отсутствие концентрационной зависимости (рис. 3.9А).



**Рис. 3.9.** Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния от раствора KduI. **(А)** Экспериментальные кривые рассеяния от растворов KduI, взятых при концентрациях 1: 2.8; 2: 5.2; 3: 8.3 и; 4: 10.8 мг/мл. **(Б)** (1) Экспериментальная кривая рассеяния от раствора KduI при максимальной концентрации. (2) Кривая, рассчитанная от кристаллической структуры KduI (PDB 1XRU). (3) Кривая, рассчитанная с помощью OLIGOMER от смеси двух типов додекамеров, гексамера и димера KduI, представленных на рис. 3.12.

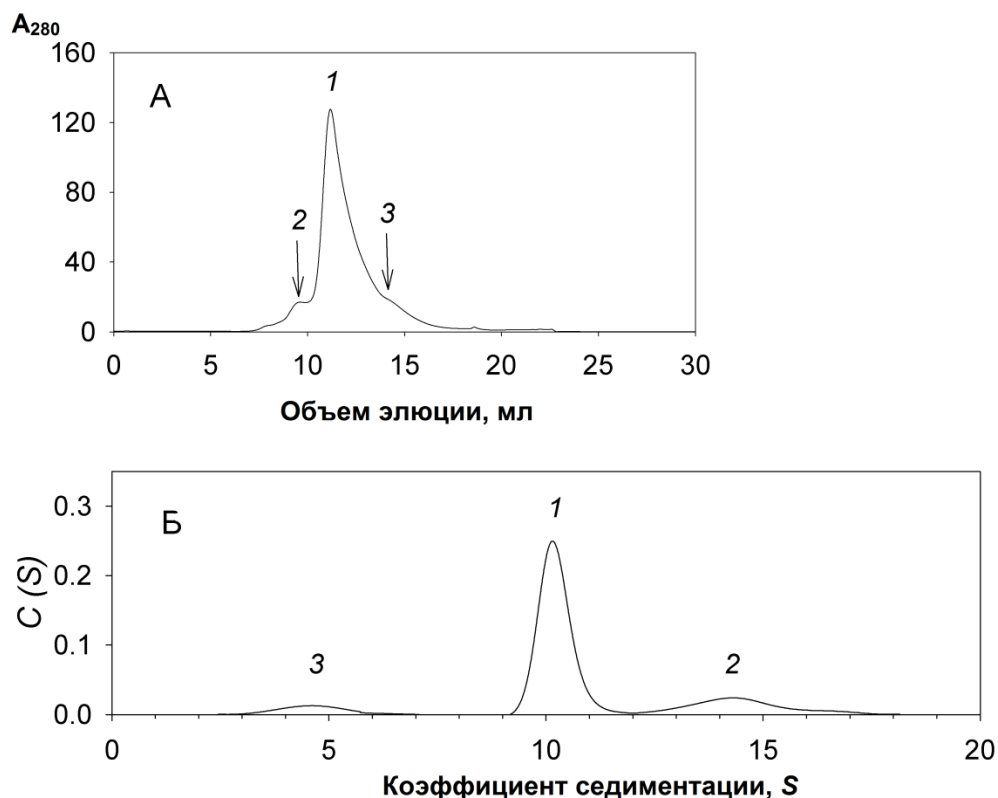
Однако в отличие от двух предыдущих белков, которые представляли собой монодисперсные растворы, график Гинье для KduI нелинейный (рис. 3.10А), что говорит о гетерогенности раствора. График Кратки показывает, что компоненты раствора достаточно компактны (рис. 3.10Б).



**Рис. 3.10.** Графики в координатах Гинье (А) и Кратки (Б) для белка KduI. График (А) показывает две области Гинье, которым соответствуют  $R_g = 6.2$  нм и  $R_g = 4.5$  нм.

Тем не менее, в пределах области Гинье можно выделить два прямолинейных участка ( $s^2$ ,  $0.01$ – $0.035$  и  $0.04$ – $0.11$   $\text{nm}^{-2}$ ), радиусы инерции  $R_g$  определяемые по этим участкам равны соответственно  $6.2$  нм и  $4.5$  нм, что еще раз подтверждает тот факт, что KduI может существовать в растворе в виде олигомерной смеси компонентов с высокой и низкой ММ. Кроме того, KduI из *E. coli* (PDB: 1XRU) [53] в кристалле представляет собой гомо-гексамер, состоящий из шести субъединиц с массой  $31$  кДа каждая. С помощью эксклюзионной хроматографии и аналитического центрифугирования нами было показано, что при коэффициенте седиментации  $s_{20,w} = 10.2 \pm 0.2$  S (рис. 3.11В, пик 1) доминирующая фракция имеет молекулярную массу  $188 \pm 15$  кДа и вероятно соответствует гомо-гексамеру KduI.

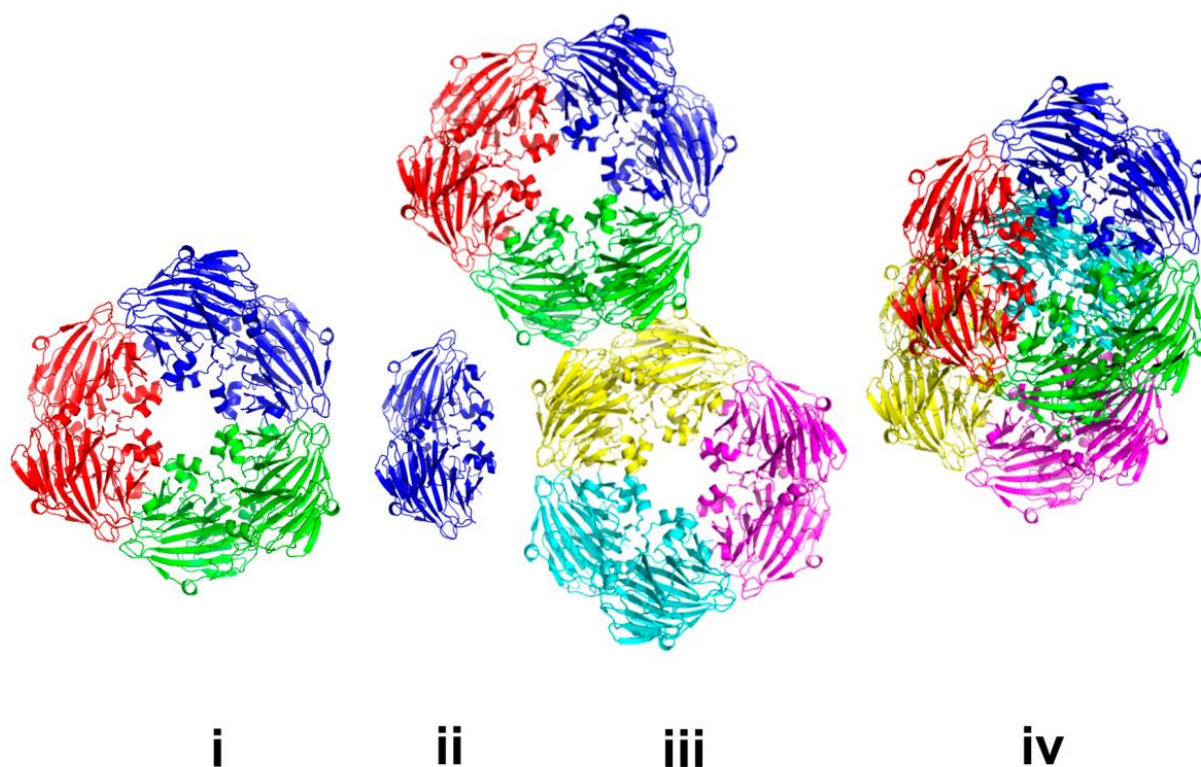
Однако в дополнении к гексамеру в растворе также присутствует некоторое количество олигомеров с высокой и низкой молекулярными массами  $75 \pm 20$  и  $290 \pm 20$  кДа, соответственно. Масса этих дополнительных компонентов близко соответствует ММ димера и додекамера. Кроме того, кривая рассеяния, рассчитанная от кристаллографического гексамера плохо совпадает с экспериментальной кривой ( $\chi^2 = 10.4$ ; рис. 3.9Б, кривая 2).



**Рис. 3.11.** Данные эксклюзионной хроматографии и аналитического ультрацентрифугирования для KduI. **(А)** Данные эксклюзионной хроматографии показывают, что в растворе присутствуют в большей степени гексамеры (пик 1) с дополнительными низкими концентрациями додекамеров (пик 2) и димеров (пик 3). **(Б)** Профили аналитического ультрацентрифугирования были определены с коэффициентами седиментации, которые соответствуют гексамерам KduI (пик 1), додекамерам (пик 2) и димерам (пик 3).

Наблюдаемая разница между кристаллографической структурой и данными МУРР, особенно в малых углах ( $s < 0.3 \text{ нм}^{-1}$ ), указывает на то, что олигомеры большой молекулярной массы присутствуют в образце, в то время как систематическое отклонение в больших углах ( $s > 0.7 \text{ нм}^{-1}$ ) подтверждает, что образец также содержит компоненты размера, который существенно меньше гексамера. Стоит отметить, что KduI является купиновым белком, а купиновые белки, как известно, образуют олигомеры высшего порядка [95]. С помощью программы MASSHA и моделей атомного разрешения KduI нами были созданы различные модели ассоциатов и диссоциатов (т.е. кристаллографические

гексамеры, димеры и додекамеры и тд.). С помощью программы OLIGOMER была найдена кривая от равновесной смеси гексамеров (объемная фракция  $v_i = 0.31$ ), сложенных додекамеров ( $v_i = 0.17$ ), расширенных додекамеров ( $v_i = 0.24$ ) и кристаллографических димеров ( $v_i = 0.28$ ), которая наилучшим образом совпадает с экспериментальными данными ( $\chi^2 = 1.77$ ; рис. 3.9, кривая 3). Структуры этих олигомерных компонентов представлены на рис.12 и депонированы в биологическую базу данных MYP (SASDBD; [www.sasbdb.org](http://www.sasbdb.org) [91]) с кодом SASDB23.



**Рис. 3.12.** Олигомерное состояние KduI в растворе. KduI состоит из гексамеров (i), димеров (ii), а также расширенных (iii) и сложенных додекамеров (iv). Соответствующая смеси кривая рассеяния, которая хорошо совпадает с экспериментальными данными, показана на рис. 3.9Б, кривая 3 (гексамеры  $v_i = 0.31$ ; сложенные додекамеры,  $v_i = 0.17$ ; расширенные додекамеры,  $v_i = 0.24$  и; димеры,  $v_i = 0.28$ ).

Средняя ММ, оцененная с помощью OLIGOMER аналогична оценкам ММ по  $I(0)$  и объему Порода, полученных по данным МУРР (180 кДа; Таблица 3), что



на самом деле соответствует ММ, рассчитанной по аминокислотной последовательности от гексамера KduI.

**Таблица 3.** Структурные параметры белка KduI.

Образец	$R_g$ , нм	$V_p$ , нм <sup>3</sup>	ММ <sub>I(0)</sub> , кДа	ММ <sub>Porod</sub> , кДа	$R_g$ <i>cryst</i> , нм	ММ <sub>aa</sub> , кДа
<b>KduI</b>	6.2±0.1 4.5±0.1*	310 ± 20	183±10	182±10	3.9	187

\*  $R_g$  для KduI был оценен по двум прямолинейным участкам в области Гинье в малых углах ( $s^2$ , 0.01–0.035 и 0.04–0.11 нм<sup>-2</sup>).

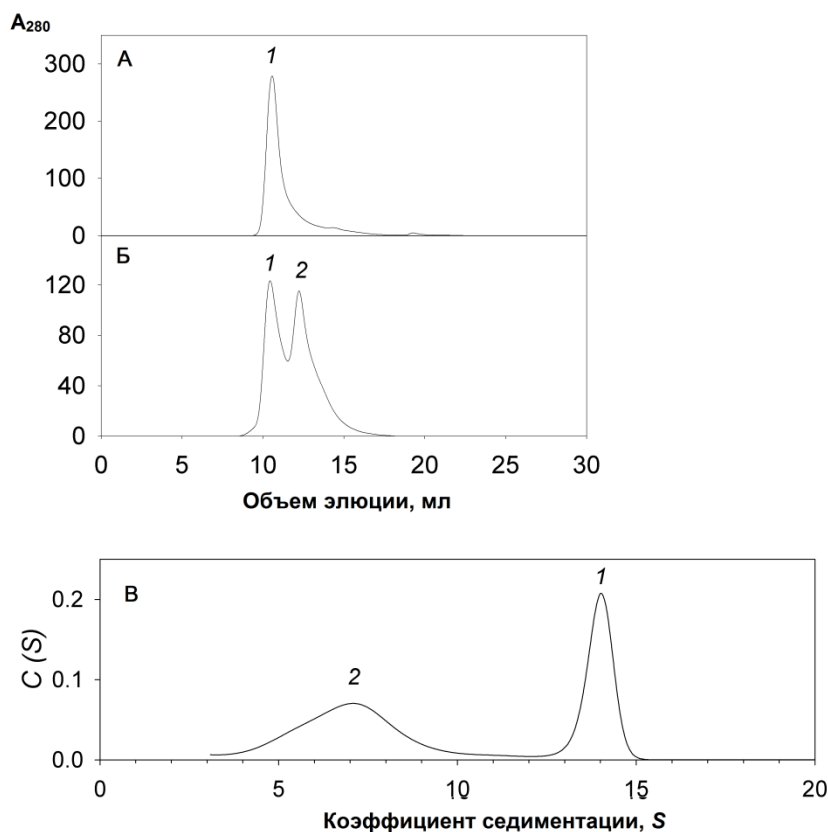
Однако результаты OLIGOMER демонстрируют, что определенные ММ просто совпадают с суммой взвешенных объемных фракций присутствующих в растворе ассоциатов и диссоциатов белка. Отметим, что ММ, определенная по данным МУРР, основана на оценке по начальной части кривой, в то время как OLIGOMER использует полные кривые рассеяния, что позволяет получить более достоверную оценку олигомерных состояний. Способность KduI образовывать смесь из различных олигомерных форм может быть важным свойством белка, которое способствует регуляции ферментативной активности. Различные олигомерные формы могут иметь различную каталитическую активность, как было установлено для ряда аллостерических ферментов [96].

### 3.4.2. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании глутамат

**декарбоксилазы (GadA) из *Escherichia coli*, участвующей в катаболизме**

Глутамат декарбоксилаза (GadA) представляет собой фермент, катализирующий реакцию декарбоксилирования глутамата в  $\gamma$ -аминобутират и выполняющий у бактерий защитные функции в ответ на кислотный стресс. Фермент локализован исключительно в цитоплазме при нейтральном значении рН, но потом оказывается около мембраны, когда рН падает. GadA широко распространен среди эукариот и прокариот, но его функция изменяется в различных организмах [54, 97].

Согласно предыдущим исследованиям, олигомерное состояние GadA зависит от pH. Электронная микроскопия и аналитическое ультрацентрифугирование показали, что при pH 4.5 GadA является гексамером с коэффициентом седиментации  $s_{20,w} = 12.72 \pm 0.35$  и молекулярной массой 310 кДа [98, 99]. Кристаллическая структура GadA, полученная при pH 4.6 (PDB: 1XEY) также представляет собой гексамер [54]. При увеличении pH изменяется состояние олигомера GadA. Инкубация белка при pH 6.0 приводит к диссоциации гексамера GadA предположительно на димеры [100]. В этой работе мы определили олигомерное состояние GadA при pH 4.6 и 7.5 в растворе, используя аналитическое ультрацентрифугирование и эксклюзионную хроматографию (рис. 3.13).



**Рис. 3.13.** Данные эксклюзионной хроматографии (А, Б) и аналитического ультрацентрифугирования (В) для GadA. (А) Данные эксклюзионной хроматографии для GadA при pH 4.6 показывают, что в растворе присутствуют только гексамеры, которым соответствует единственный пик. (Б) Данные эксклюзионной хроматографии для GadA при pH 7.5 показывают, что увеличение

pH способствует появлению второго пика, который соответствует димерам. (В) Профили аналитического ультрацентрифугирования были определены с коэффициентами седиментации, которые соответствуют гексамерам GadA (пик 1) и димерам (пик 2).

Оба метода показывают, что при pH 4.6 GadA является гексамером с ММ  $340 \pm 50$  кДа (данные эксклюзионной хроматографии) или  $320 \pm 20$  кДа (данные аналитического ультрацентрифугирования) с коэффициентом седиментации  $s_{20,w} = 14.0 \pm 0.2$  S. При pH 7.5 происходит диссоциация на димеры с  $s_{20,w} = 7 \pm 1$  S и ММ  $120 \pm 20$  кДа (рис. 3.13).

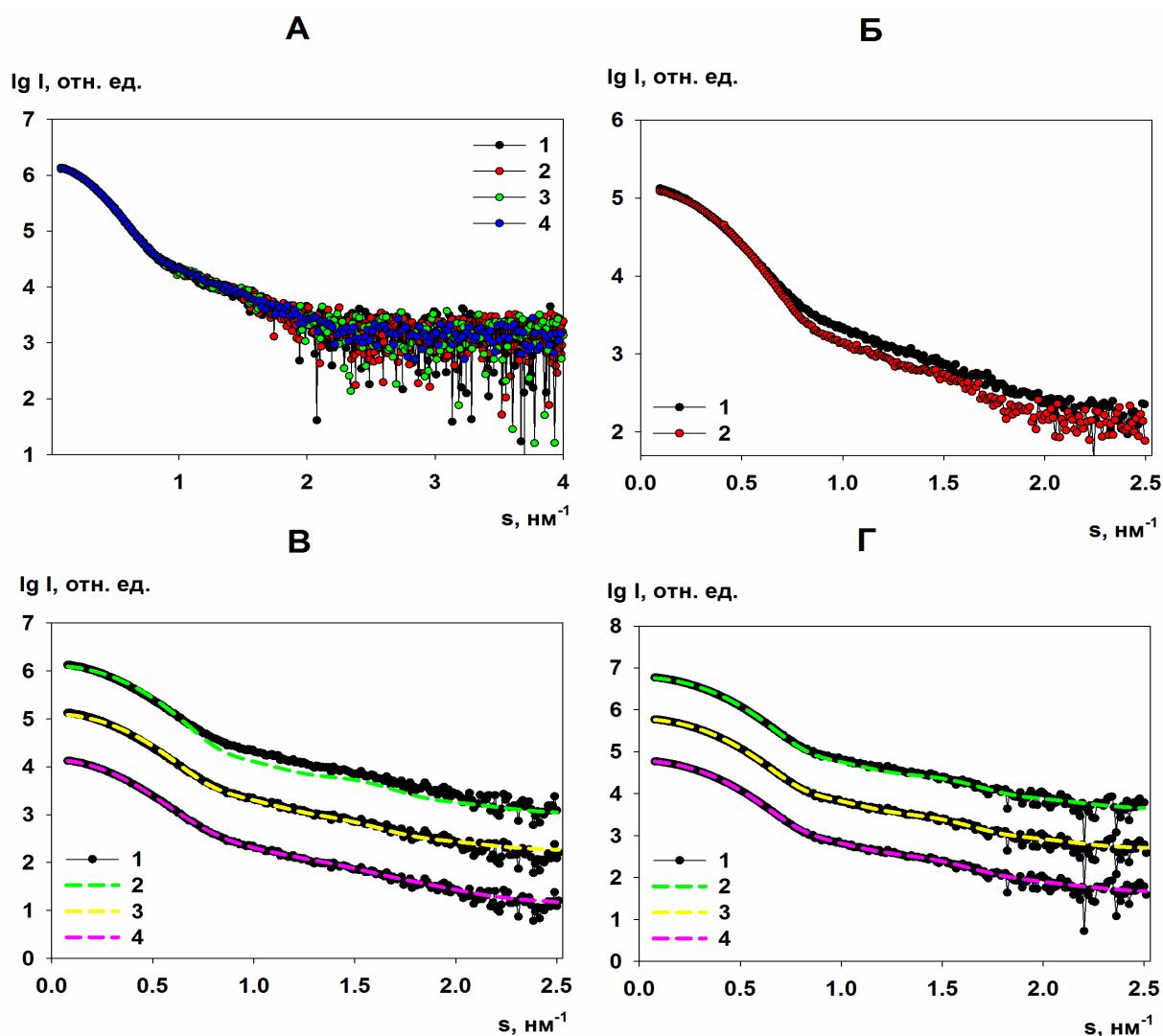
Несмотря на четко выраженный пик на профиле эксклюзионной хроматографии, на профиле аналитического ультрацентрифугирования димер представляет собой широкий асимметричный пик, что дает основание полагать, что димеры могут быть конформационно гетерогенными.

На рисунке 3.14А представлены кривые малоуглового рассеяния для 4-х концентраций белка. Поскольку у GadA концентрационная зависимость отсутствует, для анализа использовалась кривая с максимальной концентрацией (рис. 3.14В, кривая 1).

В подтверждение данным эксклюзионной хроматографии и аналитического ультрацентрифугирования, ММ GadA, определенная из данных МУРР при pH 7.5, меньше, чем ожидаемая для гексамера, как в обычном буфере, так и буфере с низкой ионной силой (Таблица 4).

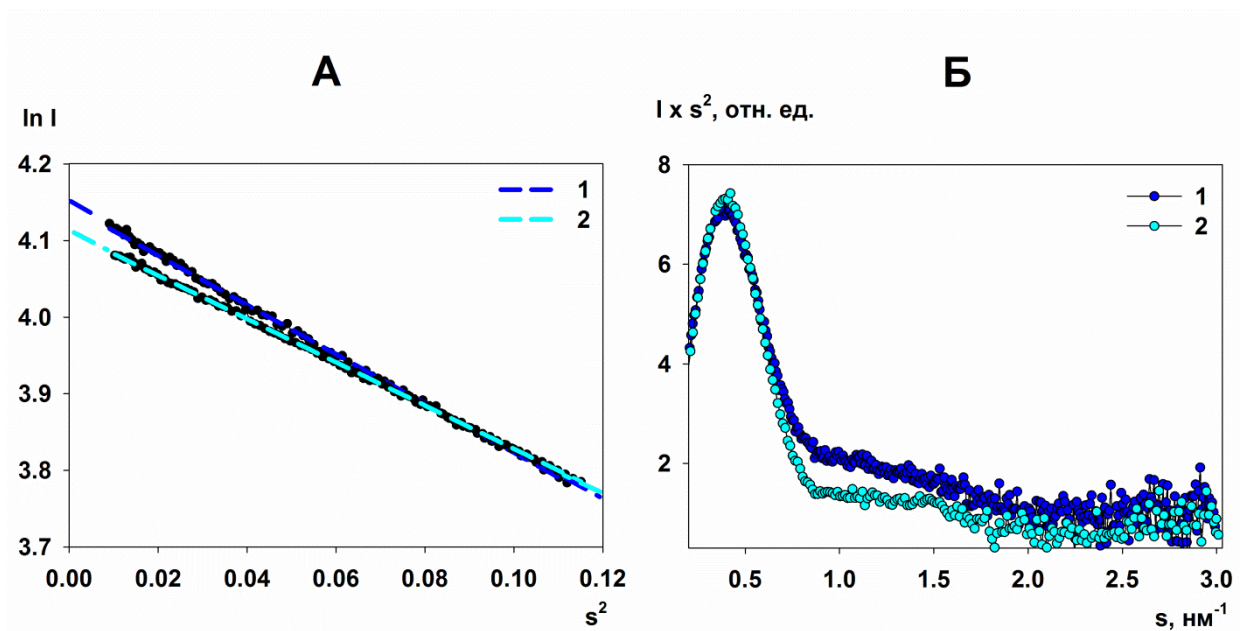
**Таблица 4.** Структурные параметры белка GadA.

Образец	$R_g$ , нм	$V_p$ , нм <sup>3</sup>	ММ <sub>I(0)</sub> , кДа	ММ <sub>Porod</sub> , кДа	$R_{g\ cryst}$ , нм	ММ <sub>aa</sub> , кДа
<b>GadA</b>	4.8±0.1	430 ± 20	249±15	252±15	4.2	316
<b>GadA низкая конц соли</b>	4.4±0.1	450 ± 20	260±15	265±15	4.2	316



**Рис. 3.14.** Кривые малоуглового рентгеновского рассеяния от раствора GadA. **(А)** Экспериментальные кривые рассеяния от растворов GadA, взятых при концентрациях 1: 2.8; 2: 5.2; 3: 8.3 и; 4: 10.8 мг/мл. **(Б)** Сравнение кривых рассеяния от растворов GadA с добавлением 10 мМ NaCl (черная кривая) и низким содержанием соли (GadA-низкая конц. соли), т.е. без 10 мМ NaCl (красная кривая). **(В)** и **(Г)** (1) Экспериментальная кривая рассеяния от раствора GadA (В) и GadA-низкая конц. соли (Г). (2) Кривая, рассчитанная от кристаллической структуры KduI (PDB 1XRU). (3) Кривая, рассчитанная с помощью OLIGOMER от смеси кристаллических гексамера и димера, в то время как кривая (4) отображает рассеяние от смеси гексамеров и димеров, полученных с помощью SASREFMX, которое наилучшим образом совпадает с экспериментальными данными. Соответствующие модели гексамеров и димеров показаны на рис. 3.16 А, Б.

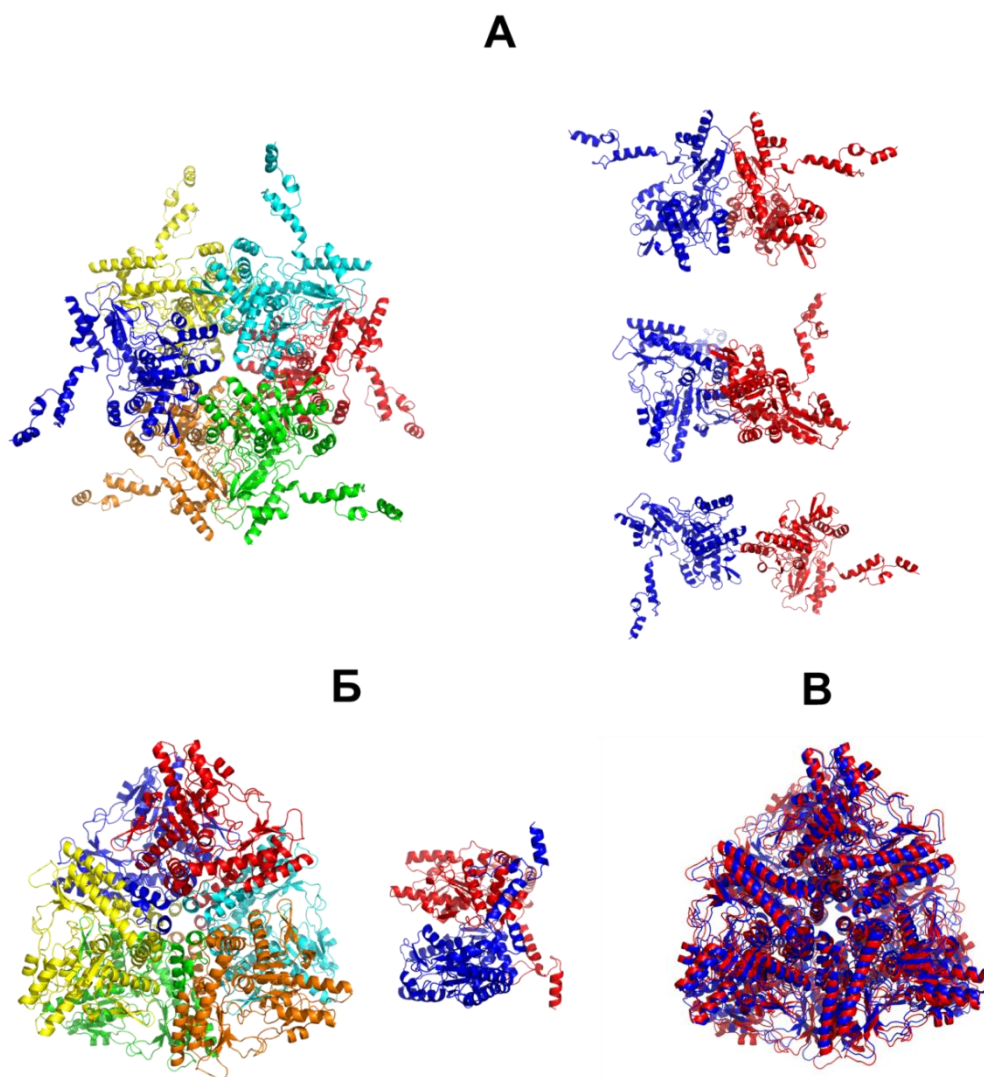
В свою очередь, кривая рассеяния, рассчитанная от кристаллической структуры гексамера не соответствует экспериментальной кривой МУРР (GadA,  $\chi^2 = 38$ ; рис. 3.14В, кривая 2). Однако, кривая, полученная от образца с низкой концентрацией соли гораздо лучше совпадает с кривой рассеяния от гексамера (GadA-низкая конц. соли  $\chi^2 = 5.6$ ; рис. 3.14Г, кривая 2).



**Рис. 3.15.** Графики в координатах Гинье (А) и Кратки (Б) для белка GadA. На обоих графиках: (1) GadA, (2) GadA - низкая концентрация соли.

Используя OLIGOMER, мы сравнили кривую рассеяния от смеси GadA, состоящей из кристаллографических гексамеров и димеров с экспериментальными данными (рис. 3.14В и Г, кривая 3). В обоих случаях, наблюдается улучшение подгонки к экспериментальным данным, что согласуется с результатами, полученными с помощью эксклюзионной хроматографии и аналитического ультрацентрифугирования, а именно с тем, что GadA существует в растворе, как смесь димеров и гексамеров (GadA,  $\chi^2 = 11$  и GadA-низкая конц. соли  $\chi^2 = 2.0$ ). Однако значение  $\chi^2$  и визуальный осмотр качества подгонки указывают на то, что дополнительные структурные несоответствия вероятно существуют в гексамерно-димерной смеси в растворе по сравнению с моделями гексамеров/димеров, полученными от кристаллографических структур. Кроме того, дальнейшее исследование структур компонентов GadA смеси было

проведено с помощью метода молекулярной тектоники и программы SASREFMX; для моделирования гексамера использовалась симметрия P32. Были созданы смеси из гексамеров и димеров, рассеяние от которых заметно улучшает подгонку к экспериментальным данным, особенно в случае GadA в стандартном буфере ( $\chi^2 = 1.4$ , рис. 3.14В, кривая 4), указывая на то, что существенные изменения в переориентации субъединиц могут происходить в белке при высокой концентрации рН и в присутствии 10 мМ NaCl (рис. 3.16А). Однако в условиях низкого содержания соли улучшение подгонки к экспериментальным данным менее существенно (GadA низкая конц соли  $\chi^2 = 1.8$ ; рис. 3.14Б, кривая 4), предполагая, что расположение субъединиц GadA в растворе находится в большем соответствии с соответствующим их расположением в гексамерах и димерах, наблюдаемых в кристаллической структуре (рис. 3.16Б и В). Помимо различий в расположении субъединиц в гексамере и димере, образец GadA с низким содержанием соли также имеет более высокую долю гексамеров в растворе. Анализ OLIGOMER указывает на то, что объемная фракция гексамеров увеличивается от  $v_i \approx 0.6$  до 0.8 и фракция димеров уменьшается от  $v_i \approx 0.4$  до 0.2 со снижением концентрации соли. Результаты программы OLIGOMER согласуются с оценкой  $MM_{(0)}$  по данным МУРР, полученным от образца с низким содержанием соли (Таблица 4), подтверждая, что снижение ионной силы способствует формированию гексамеров. Сравнивая результаты, полученные с помощью МУРР, эксклюзионной хроматографии и аналитического ультрацентрифугирования можно сделать вывод, что при рН 7.5 GadA существует в виде смеси гексамеров и димеров, а на ориентацию субъединиц GadA в ансамблях гексамеров-димеров скорее всего влияет изменения в окружающей среде образца.



**Рис. 3.16.** Олигомерное состояние GadA в растворе. GadA представляет собой в растворе смесь гексамеров и димеров, которые структурно чувствительны к условиям среды, в которой находится образец. **А.** Модели гексамера и набора димеров GadA, образующихся в присутствии в растворе 10 мМ NaCl, получены с помощью SASREFMX. **Б.** Модели гексамера и димера в условиях низкой ионной силы, полученные с помощью SASREFMX. **В.** Пространственное наложение кристаллической структуры (красный цвет) с гексамером GadA (синий цвет) из смеси гексамеров и димеров в условиях низкой ионной силы раствора. Соответствующие смесям кривые представлены на рис. 3.14 В, Г.

Полученные модели GadA в стандартном буфере и в буфере с низкой ионной силой депонированы в биологическую базу данных МУР (SASBDB;

www.sasbdb.org [91]) с кодами SASDB33 и SASDBS4, соответственно. Известно, что GadA взаимодействует с другими белками при нейтральном pH [49], а наблюдаемая диссоциация фермента в сочетании с присущей способностью гексамера претерпевать структурные перестройки, может иметь важное значение для выявления новых интерфейсов взаимодействия с другими белками для модулирования активности фермента в клетках.

### **3.4.3. Малоугловое рентгеновское рассеяние и молекулярный докинг в исследовании дигидролипоилдегидрогеназы (LpD) из *Escherichia coli*, участвующей в катаболизме**

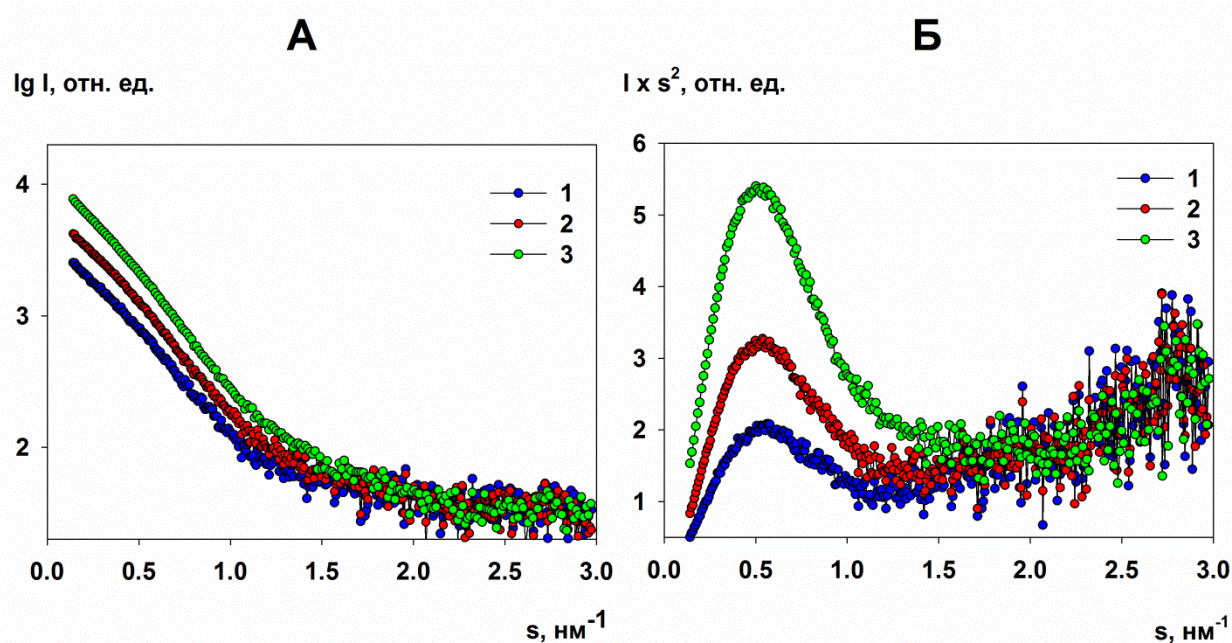
Дигидролипоилдегидрогеназа (LpD) – это флавиносодержащий белок, катализирующий реакцию окисления SH-группы липоамида в составе оксидоредуктаз с образованием S–S связи. LpD входит в состав трех различных мультиферментных комплексов, катализирующих сходные реакции декарбоксилирования  $\alpha$ -кетокислот. Подобные комплексы состоят из трех ферментов E1, E2 и E3, где LpD является элементом E3, а ее белковым липоамидсодержащим субстратом является субъединица E2. Субъединицы E1 и E2 имеют разное строение в разных комплексах, а белок E3 во всех комплексах один и тот же [101–104]. Метаболическая роль двух основных E3-содержащих комплексов крайне высока: они обеспечивают взаимосвязь утилизации углеводных субстратов с окислительным фосфорилированием. Пируватдегидрогеназный комплекс (ПДК) превращает пируват (продукт гликолиза) в Ac-CoA (основной субстрат цикла Кребса), а  $\alpha$ -кетоглутаратный комплекс катализирует одну из реакций цикла Кребса. Пируватдегидрогеназный комплекс грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, содержит по 24 субъединицы компонент E1 и E2, в то время как кратность E3 до сих пор точно не определена. По разным источникам их может быть 12 [105, 106] или 24 [107–109], т.е. E3 может состоять из шести димеров или шести тетрамеров. В то же время все ферменты E3 функционируют как димеры [55]. E3 может функционировать и вне рамок мультиферментных комплексов, например в организмах, которые не имеют



дегидрогеназы  $\alpha$ -кетокислоты [110, 111]. Указанные выше свойства свидетельствуют о многофункциональности LpD. Строение LpD из *E. coli* в кристалле было определено с разрешением 2.5 Å [55] и показано, что в кристаллической форме этот белок существует в виде димера (PDB ID: 4JDR). Однако структура этого белка в растворе до настоящего времени оставалась неизвестной.

Экспериментальные кривые рассеяния LpD при разных концентрациях представлены на рис. 3.17А. Образец показал явную зависимость от концентрации, о чем свидетельствует последовательное увеличение интенсивности рассеяния в самых малых углах с увеличением концентрации.

График в координатах Кратки для всех трех концентраций белка имеет форму, которая соответствует глобулярной структуре белка. Однако подъем графика при больших углах свидетельствует о гибкости или некоторой разупорядоченности структуры белка в растворе (рис. 3.17Б).



**Рис. 3.17.** Экспериментальные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния от растворов белка (А) и график в координатах Кратки (Б) LpD при трех концентрациях: 2 (1); 5 (2) и 10 мг/мл (3).

Для всех концентраций белка LpD не удалось найти прямолинейный участок интенсивности рассеяния в координатах Гинье, соответственно, определить  $R_g$  и молекулярную массу по интенсивности при нулевом угле  $I(0)$ . Отсутствие прямолинейного участка графика Гинье указывает на гетерогенность раствора белка.

Породовские объемы для концентраций LpD 2, 5, 10 мг/мл равны соответственно  $200 \pm 15$ ,  $200 \pm 15$ ,  $229 \pm 15$  нм<sup>3</sup>. Отсюда следует, что молекулярная масса  $MM_{\text{Porod}}$  в среднем равна приблизительно  $125 \pm 10$  кДа, тогда как масса мономера, рассчитанная по аминокислотной последовательности  $MM_{\text{aa}}$ , составляет 50.3 кДа, что еще раз подтверждает предположение о неоднородности раствора LpD и указывает на присутствие в нем более крупных образований.

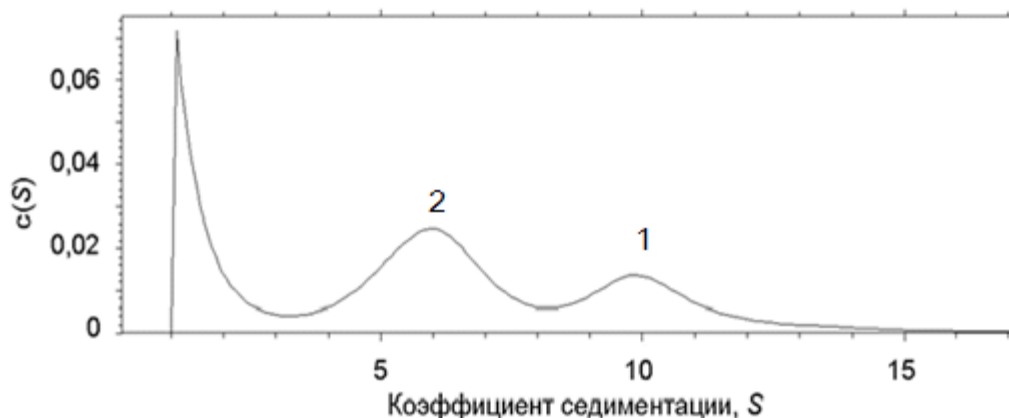
В случае полидисперсных систем средний радиус инерции определяется исходя из соотношения (11):

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \int_0^\infty R_g^2(R) D_V(R) R^6 dR / \int_0^\infty D_V(R) R^6 dR = \int_0^\infty R_g^2(R) D_V(R) R^6 dR / \langle R^6 \rangle \quad (11)$$

и определяется вкладом в малоугловое рассеяние присутствующих в образце образований всех размеров в соответствии с их объемной долей [9, 10].

В соответствии с приведенной формулой (11) средний радиус инерции смеси составляет 4.4 нм, в то время как  $R_g$ , рассчитанный для кристаллической структуры LpD, т.е. для димера, равен 3 нм. Таким образом, в очередной раз можно сделать вывод, что в растворе фермента присутствуют не только мономеры или димеры, но и более крупные ассоциаты.

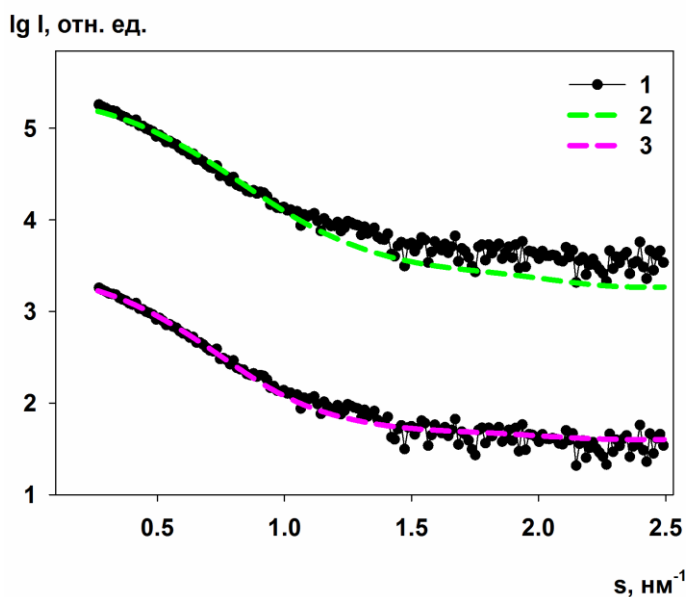
К такому же выводу приводит анализ данных седиментационного эксперимента. Методом аналитического ультрацентрифугирования получено распределение по коэффициентам седиментации (рис. 3.18), которое явно указывает на наличие в растворе двух фракций. Первый пик на рис. 3.18 с коэффициентом седиментации  $s_{20,w} = 10.61 \pm 1$  S соответствует фракции с массой, равной приблизительно 90 кДа, второй с  $s_{20,w} = 5.29 \pm 0.2$  S – с массой около 210 кДа. Такое распределение по массам соответствует димеру и тетрамеру LpD.



**Рис. 3.18.** Эксперимент по скоростной седиментации белка LpD.

Пик 1 соответствует тетрамеру, пик 2-димеру.

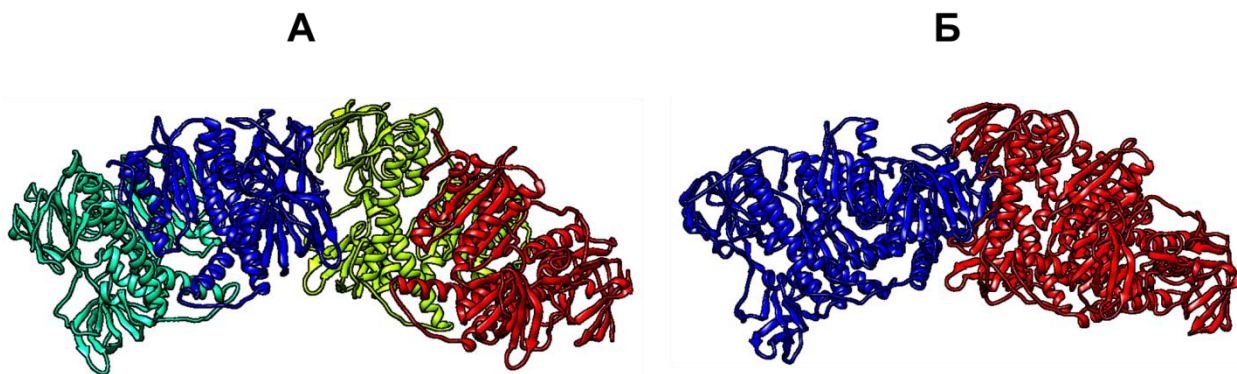
Для исключения влияния возможной межчастичной интерференции дальнейший анализ структуры LpD и структурное моделирование проводились по кривой малоуглового рассеяния, экстраполированной к бесконечному разведению (рис. 3.19, кривая 1).



**Рис. 3.19.** Экспериментальные и модельные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния: (1) экспериментальные данные, приведенные к нулевой концентрации; (2) рассеяние, рассчитанное с помощью программы CRY SOL для кристаллической структуры димера LpD; (3) рассеяние от смеси, полученное с помощью программы OLIGOMER для олигомерных форм LpD-димера и тетрамера, смоделированного программами HADDOCK и MASSHA.

Как видно из рис. 3.19, кривая рассеяния, полученная для димера LpD, дает плохое совпадение с экспериментальными данными ( $\chi^2 = 5.1$ ) (рис. 3.19, кривая 2), подтверждая вывод о присутствии в растворе более крупных, чем димер, рассеивающих объектов. Смоделированная программой CRY SOL кривая рассеяния для мономеров LpD дает еще большее расхождение с экспериментом. Кроме того, об отсутствии мономеров свидетельствуют результаты аналитического ультрацентрифугирования и поэтому в дальнейшем они были исключены из рассмотрения.

Для исследования присутствующих в растворе димеров и тетрамеров, а также для определения их количественного соотношения с помощью программы MASSHA были смоделированы тетрамеры белка в виде различных возможных комбинаций из двух кристаллических димеров LpD. Далее рассеяние от смесей, состоящих из димеров и смоделированных тетрамеров, сравнивали с помощью программы OLIGOMER с экспериментальными данными МУРР. Наилучшее совпадение с экспериментальной кривой ( $\chi^2 = 1.3$ ) получила кривая рассеяния для равновесной смеси димера и тетрамера, структура которого представлена на рис. 3.20А.



**Рис. 3.20.** Модели тетрамера LpD, полученные с помощью программ MASSHA (А) и HADDOCK (Б).

Программа OLIGOMER рассчитала объемные фракции  $v_i = 0.47$  и  $0.53$  для димера и тетрамера соответственно с  $\chi^2$ , равным  $1.4$ . Для подтверждения полученного результата независимым методом и для возможного уточнения модели тетрамера LpD использовалась программа HADDOCK. В качестве

наилучшего решения программа определила структуру, представленную на рис. 3.20Б, которая имеет видимое сходство с моделью, полученной программой MASSHA. С помощью программы SUPCOMB сравнили обе модели тетрамеров: NSD оказалось равным 1.1, что говорит о хорошем соответствии полученных структур.

Количество объемных долей димеров и тетрамеров в случае использования HADDOCK оказалось равным  $v_i = 0.45$  (димер) и 0.55 (тетрамер), что хорошо согласуется с результатом, описанным выше ( $\chi^2 = 1.4$ ) (рис. 3.19, кривая 3).

Построенные модели тетрамера представляют собой несколько вытянутую структуру, в которой последовательно соединены между собой димеры LpD. Важно отметить, что данная конструкция в растворе может быть достаточно гибкой, т.е. может изменяться угол между двумя димерами. Такое поведение, вероятно, связано с функциональными особенностями белка. Например, в мультиферментном комплексе ПДК LpD является структурной единицей E3, и в составе этого комплекса у *Azotobacter vinelandii* LpD представляет собой тетрамер [112]. Стехиометрия ПДК у грамотрицательных бактерий, таких как *E. coli*, схожа: соотношение субъединиц E1 и E2 в обоих случаях равна 24 [112]. Можно предположить, что LpD из *E. coli* также образует тетрамер в этом комплексе. Его структура компактна благодаря межмолекулярному взаимодействию и подвижности двух димеров. Поэтому особенно интересно отметить, что результаты проведенных исследований LpD в растворе демонстрируют одновременное присутствие димеров и тетрамеров этого белка. Как показано в [55], функциональной единицей LpD является димер, в то же время в ПДК белок образует компактную тетрамерную структуру. Таким образом, мультифункциональность у LpD проявляется, в том числе, в присутствии в растворе практически в равном количестве димеров и тетрамеров, что говорит о готовности белка к различным белок-белковым взаимодействиям.

### 3.5. Заключение

Для определения четвертичной структуры каждого белка FbaB, PPase, KduI, GadA и LpD в растворе мы использовали метод МУРР и дополнительные гибридные методы. Несмотря на различные функции, которые выполняют FbaB, KduI, GadA и LpD в клетке, они все вовлечены в катаболизм и, как было показано ранее, взаимодействуют с PPase.

Используя вторичную и третичную структуру вместе с экспериментальными данными МУРР мы продемонстрировали, что FbaB класс I – фермент с ранее неизвестной структурой - может образовывать декамерную структуру. PPase образует гексамер в растворе, похожий на тот, что был определен с помощью рентгеновской кристаллографии, но с важным различием, которое отражается во взаимном расположении субъединиц в белке. В то время как KduI, GadA и LpD, хотя он преимущественно образуют гексамеры (KduI и GadA) или димеры (LpD), в растворе они существуют в равновесной смеси дополнительных олигомерных форм. KduI описывается смесью гексамеров, диссоциированных димеров и додекамеров, LpD практически в равных долях находится в растворе в виде димеров и тетрамеров, в то время как GadA может диссоциировать на димеры. Интересно отметить, что для последнего белка, наблюдались заметные изменения в картине рассеяния и в олигомерном равновесии при понижении ионной силы буфера. При более высокой ионной силе, GadA продемонстрировал концентрационно независимую диссоциацию на димеры, в то время как в растворе с низкой ионной силой, белок был ближе к форме гексамера, наблюдаемой в кристаллической структуре. Эффект, вероятно, следует отнести к эффектам поверхностного заряда, влияющего на взаимодействие между субъединицами GadA.

Таким образом, все изученные белки [A1, A2] являются многофункциональными и их структуры, в частности которые подвергаются ассоциации / диссоциации могут свидетельствовать о том, как клетки проявляют множественные молекулярные реакции для адаптации клеточного стресса в рамках ограниченных ресурсов, доступных во время стационарной фазы. Анализ

структуры раствора отдельных белков обеспечивает лучшее понимание их возможной функции в клетке. В частности, равновесие между олигомерными формами, наблюдаемыми для KduI, LpD и GadA может зависеть от белков-партнеров, тем самым обеспечивая основу для регулирования их деятельности.

## **ГЛАВА 4. Холестерические жидкокристаллические дисперсии (по литературным данным)**

### **4.1. Формирование жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных молекул ДНК**

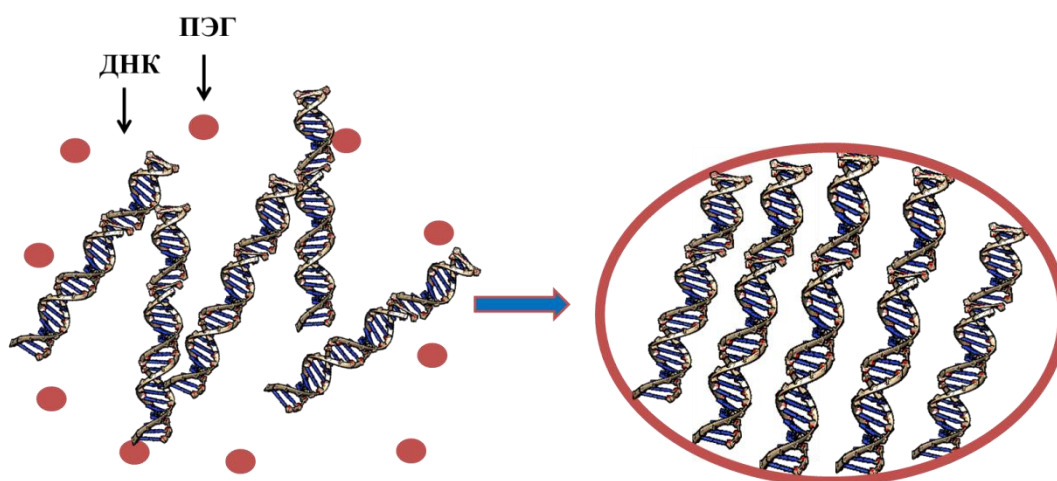
Полимерные композиционные наноматериалы являются одними из наиболее перспективных, благодаря уникальному сочетанию свойств и возможностью ими управлять. Они состоят из двух или более фаз, при этом, как правило, одна фаза является непрерывной средой (матрица), а другая-дисперсионной (наночастицы в виде порошка, суспензии или дисперсии). Полимерные композиты используются при создании биосенсоров, биоматериалов и лекарственных средств. С помощью химического синтеза или полимерной матрицы можно формировать наночастицы заданного размера, однако их стабилизация и контроль расстояния между наночастицами в матрице остается сложной задачей. В качестве полимерной матрицы-носителя наночастиц для направленной доставки лекарственных препаратов может рассматриваться матрица на основе молекул ДНК, поскольку они обладают хорошей биосовместимостью и способностью к биологическому разложению. Множество работ уже было посвящено созданию функциональных полимеров на основе линейных двухцепочечных (дц) молекул ДНК [113-180]. Основные аспекты этих работ будут рассмотрены ниже. Как правило, для практического применения используют не сами пространственные структуры, сформированные из дц-ДНК, а их гидрогели [115], которые представляют собой макроскопические ансамбли из неупорядоченных и нерегулярно сшитых двухцепочечных молекул ДНК. Они могут быть получены, например, путем создания химических сшивок между дц-молекулами [116], криополимеризации [117], а также под действием УФ-излучения. Благодаря тому, что в составе гидрогелей молекулы дц-ДНК сохраняют многие свои свойства, они используются в качестве носителей или сорбентов различных соединений [118, 119].



Формирование частиц дисперсий происходит в результате конденсации жестких спиральных молекул дц-ДНК низкой молекулярной массы ( $\sim 10^6$  Да) из концентрированного водно-солевого раствора умеренной ионной силы (0.1 М NaCl). Спонтанное упорядочение этих молекул приводит к образованию жидкокристаллических фаз разного типа, например, холестерической или орторомбической [120,121]. Наличие брэгговского пика на кривой малоуглового рассеяния свидетельствует о некотором упорядочении молекул ДНК в образованной фазе, однако трехмерный порядок отсутствует и фаза проявляет свойства характерные для одномерного кристалла. В то же время молекулы ДНК могут незначительно сдвигаться относительно друг друга, демонстрируя жидкостной характер. Сочетание этих двух свойств дает нам основание использовать термин «жидкокристаллическая» для описания образованной фазы. При этом молекулы ДНК упорядочиваются в квазинематические слои, которые в силу присущей молекулам ДНК геометрической и оптической анизотропии формируют пространственно закрученную, т.е. холестерическую структуру жидкокристаллической фазы.

Существуют два способа получения жидкокристаллических фаз на основе дц-ДНК. Первый способ называется  $\psi$ (psi)-конденсация (psi- Polymer-Salt-Induced) и возможен при фазовом исключении молекул дц-ДНК из концентрированного водно-солевого раствора при добавлении в него полиэтиленгликоля (ПЭГ) [122]. При определенных условиях (критическая концентрация ПЭГ-  $C_{\text{ПЭГ}}^{\text{кр}} = 170$  мг/мл;  $T = 20^\circ\text{C}$ ; молекулярная масса ПЭГ 4 кДа; 0.3 М NaCl) 100% жестких молекул ДНК упорядочиваются в пространстве, образуя жидкокристаллические дисперсии (ЖКД ДНК) (рис.4.1).

Частицы дисперсий представляют собой «капли» концентрированного раствора ДНК, которые нельзя иммобилизовать на подложке, не нарушая пространственную структуру. В их состав входит порядка  $10^4$  молекул ДНК, а теоретически предсказанный размер таких частиц составляет порядка 500 нм [123].



**Рис. 4.1.** Схематическое представление конденсации неупорядоченных в пространстве жестких молекул дц-ДНК из водно-солевого раствора при добавлении в него ПЭГ.

Второй способ формирования частиц ХЖКД ДНК состоит в нейтрализации поликатионами отрицательного заряда фосфатных групп ДНК. В качестве поликатионов, способствующих образованию ЖК дисперсий используются, например, линейный биосовместимый полиаминосахарид - хитозан, полиаминокислоты и др. [124-127]. По мере уменьшения плотности поверхностного заряда молекул электростатическое отталкивание подавляется дисперсионными силами, в результате чего происходит конденсация частиц, образованных ДНК и поликатионами, из водно-солевого раствора. Структура и свойства таких частиц зависят от концентрации поликатиона (она должна быть приблизительно равной концентрации молекул ДНК) и его молекулярной массы (чем больше, тем эффективнее связывание). Расстояние между соседними молекулами ДНК в частицах фиксировано и обычно составляет около 2.5 нм [128-131].

Структуры ХЖКД ДНК образованные двумя способами различаются по своим свойствам. Во-первых, поликатионы всегда входят в состав дисперсий, поскольку располагаются на поверхности молекул ДНК, при этом меняя характер взаимодействия между молекулами ДНК. Во-вторых, при взаимодействии ДНК с поликатионами формируется «твердая» структура с фиксированным расстоянием

между соседними молекулами ДНК. Такие частицы можно иммобилизовать на поверхности и использовать для создания, например, биодатчиков [132], однако использовать в качестве матрицы такую структуру невозможно.

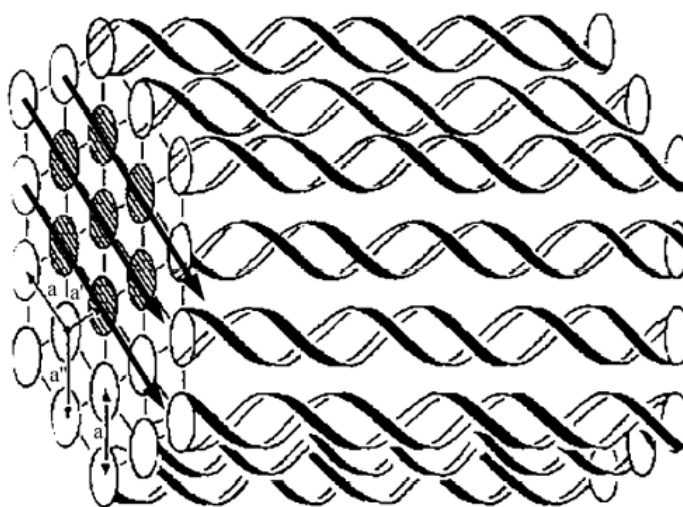
В свою очередь, ХЖКД ДНК, сформированные в результате добавления ПЭГ в водно-солевой раствор, обладают рядом важных свойств, позволяющих создавать наноконструкции на их основе [133]:

1. Молекулы полиэтиленгликоля не входят в состав частиц дисперсии.
2. Локальная концентрация молекул дц-ДНК достаточно высокая (160-600 мг/мл). Между соседними молекулами образуется «свободное» пространство от 2.5 до 5.0 нм в зависимости от осмотического давления, создаваемого ПЭГ, т.е. варьируя концентрацию ПЭГ можно изменять расстояние между соседними молекулами ДНК.
3. Расстояние между молекулами и «жидкостный» характер структуры обеспечивают быструю диффузию гостевых включений между молекулами дц-ДНК, расположенными как в одном слое, так и соседних слоях частиц ЖКД.
4. Для спирально закрученной структуры характерно появление интенсивной (аномальной) полосы в спектре кругового дихроизма в области поглощения хромофоров (азотистые основания, поглощающие ультрафиолетовое излучение). Отрицательный знак аномальной полосы свидетельствует о том, что правоспиральные молекулы дц-ДНК образуют частицы ХЖКД, имеющие левую закрутку пространственной структуры [134]. Следовательно, по аномальной оптической активности можно судить о том, является ли структура холестерической и какова степень сохранности спиральной закрутки структуры ХЖКД ДНК. Также важно отметить, что ХЖКД ДНК формируется при конденсации дц-молекул длиной более  $150\text{\AA}$ , т.е.  $\sim 50$  пар нуклеотидов, в отличие от обычной агрегации, которая может возникнуть при любой длине молекул ДНК и не сопровождается появлением аномальной оптической полосы в спектре кругового дихроизма.

Таким образом, наиболее перспективным подходом к формированию ХЖКД ДНК с точки зрения наноконструирования является конденсация молекул дц-ДНК из водно-солевого раствора ПЭГ.

#### 4.2. Пространственная организация молекул дц-ДНК в ХЖКД ДНК

Известно, что фаза, образованная при конденсации нуклеиновых кислот из водно-солевого раствора, как правило, имеет гексагональную упаковку [135-138], которая схематично показана на рис. 4.2.



**Рис. 4.2.** Схематическое изображение пространственной организации молекул дц-ДНК в гексагональной фазе. Толстыми стрелками показаны слои, образованные молекулами ДНК.

Из рис. 4.2 видно, что молекулы ДНК в такой упаковке упорядочены, тем не менее, структура не является кристаллической, но допускает существование слоев (рис. 4.2, выделены стрелками), которые образованы молекулами ДНК, лежащими в одной плоскости [139-141]. Толщина слоев соответствует расстоянию между молекулами ДНК и благодаря наличию свободного пространства между ними, эти молекулы могут незначительно вращаться вокруг своей длинной оси или сдвигаться относительно друг друга в плоскости слоя без нарушения пространственной упаковки в целом. Однако, вопрос о том, как именно молекулы дц-ДНК располагаются в рассматриваемых нами ХЖКД ДНК, до сих пор не

достаточно прояснен [140, 142-143], в отличие от низкомолекулярных соединений [144-147].

#### **4.3. Способы формирования наноконструкций на основе ХЖКД ДНК в условиях водно-солевого раствора ПЭГ с гостевыми включениями**

Поскольку расстояние между молекулами ДНК в частицах дисперсий достаточно для быстрой диффузии гостевых молекул, с теоретической точки зрения не существует ограничений для их размещения в свободном пространстве между молекулами в слое. Пользуясь этим свойством, можно создавать наноконструкции на основе упорядоченных в пространстве двухцепочечных молекул ДНК и гостевых включений.

Однако на практике оказывается более выгодным использование структуры, полученной путем перехода молекул дц-ДНК из «жидкого» в «твердое», гель-подобное [122]. В «твердом» состоянии соседние молекулы ДНК образуют упорядоченную регулярную пространственную структуру, которая обладает высокой реакционной способностью по отношению к соединениям различной природы.

При этом формирование «твердой» структуры ХЖКД ДНК будет основываться на двух подходах: жидкокристаллическом и нанотехнологическом [148]. Первый осуществляется двумя методами: на включении «гостей» в состав «сшивок» (наномостиков), которые соединят соседние молекулы или увеличение эффективности взаимодействия молекул ДНК в результате действия на них химического соединения, т.е. «гостя».

Задача первого метода жидкокристаллического подхода заключается в соединении наномостиками молекул ДНК в частицах дисперсий таким образом, чтобы характер упорядочения молекул ДНК не нарушался. В результате сшивания образуется структура с фиксированным расстоянием между квазинематическими слоями, которая благодаря высокой молекулярной массе уже не может быть совместима с раствором полиэтиленгликоля и может существовать вне осмотического давления, созданного ПЭГ. В работе [138] показано, что в

качестве сшивок могут быть использованы чередующиеся молекулы антрациклинового антибиотика дауномицина и ионов двухвалентной меди. В результате сшивания усиливается аномальная полоса в спектре кругового дихроизма, присущая хромофорам ДНК, а также появляется дополнительная полоса в области поглощения хромофоров молекул-сшивок, что свидетельствует о том, что полученная структура достаточно жесткая и имеет свойства отличные от свойств исходных частиц дисперсий ДНК. Таким образом, стабильность сшитых частиц зависит от свойств и числа конкретных молекул-сшивок.

Во втором методе вместо молекул-сшивок в пространство между молекулами дц-ДНК внедряются катионы редкоземельных элементов, которые нейтрализуют фосфатные группы ДНК, тем самым понижая растворимость [149]. В результате этих процессов образуется гель-подобная («твердая») структура частиц, которая также может существовать вне раствора ПЭГ. При этом частицы не агрегируют, поскольку их поверхностные заряды остаются некомпенсированными. Наибольший интерес представляют соли гадолиния  $GdCl_3$ , поскольку имеют широкое практическое применение [150, 151]. Например, было показано, что клетки разрушаются под действием вторичного излучения гадолиния, индуцированного действием тепловых нейтронов [152]. При взаимодействии  $GdCl_3$  с ХЖКД ДНК наблюдается существенное увеличение амплитуды отрицательной аномальной полосы в области поглощения азотистых оснований ДНК, также как и в случае использования молекул-сшивок.

В обоих случаях свойства «твердых» частиц дисперсий не зависят от осмотического давления, создаваемого ПЭГ, а определяются лишь числом и прочностью наномостиков в первом случае и от концентрации катионов во втором. При этом структура, полученная в результате применения второго метода, содержит высокую концентрацию гостевых молекул, например, гадолиния, что открывает широкие перспективы для практического применения таких структур.

Различие в подходах состоит в том, что в первом случае переход в «твердое» состояние частиц дисперсий происходит за счет химического сшивания

соседних молекул ДНК, а во втором за счет понижения растворимости молекул ДНК.

Таким образом, эти два метода демонстрируют возможность создания наноконструкций с заданными свойствами на основе «твердых» ХЖКД ДНК для разных областей применения, например, медицины, биотехнологий и др. [132].

#### **4.4. ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота**

С развитием нанотехнологий появилась еще одна возможность для создания «твердых» частиц дисперсий. Это связано с направлением, которое посвящено созданию композиционных наноматериалов. Внедрение в полимерную матрицу на основе ХЖКД ДНК наночастиц различного происхождения приводит к получению нового материала с заданными свойствами и возможностью управлять его характеристиками [148].

Ряд работ [153-155] посвящен исследованиям взаимодействия жидкокристаллических соединений низкой молекулярной массы с наночастицами разного происхождения, например золота. Они интересны тем, что имеют различные оптические, физические, химические, электрические и магнитные свойства в зависимости от своего размера и формы, которые в свою очередь определяются способом и условиями их синтеза [156]. Наночастицы золота (нано-Au) имеют большую площадь поверхности по сравнению с чрезвычайно малыми размерами (меньше 1 нм), что делает их более доступными для дальнейшей модификации химическими соединениями. Эти частицы биосовместимы, т.е. они могут быть использованы сопряженно с биомолекулами, такими как белки, карбоновые кислоты, ДНК и аминокислоты [157-158]. То есть потенциально ХЖКД ДНК, сформированные в водно-солевом растворе ПЭГ, могут быть использованы в качестве матрицы для нано-Au. С точки зрения медицинской химии и биотехнологии интерес к таким системам достаточно велик, поскольку на их основе можно создавать наноматериалы с заданными свойствами.

В таком случае гостевые молекулы, т.е. наночастицы золота могут взаимодействовать с парами азотистых оснований ДНК, располагаясь, например,

между молекулами или в бороздках на их поверхности. При этом вопрос о влиянии таких наночастиц на жидкокристаллические дисперсии биополимеров не достаточно освещен. Однако, было установлено, что по сравнению с частицами размера 15 нм nano-Au малого размера (2 нм) положительно или отрицательно заряженные имеют более высокую реакционную способность, вследствие чего обладают генотоксичностью [159]. В работах [160, 161] было высказано предположение о том, что биологический эффект от действия nano-Au на структуру молекул дц-ДНК аналогичен эффекту мутагенных молекул. Несмотря на попытки исследовать генотоксичность наночастиц золота [162-165], на данный момент адекватного объяснения этому эффекту нет, поскольку исследования проводились на различных системах. Следовательно, необходимо рассмотреть общую модель, которая бы описывала происходящие структурные изменения. Наиболее подходящей для решения этой задачи системой является ХЖКД ДНК, в том числе и из-за того, что свойства этих частиц отражают особенности организации макромолекул в составе хромосом Protozoa (например, хромосомы динофлагеллят) и ДНК-содержащим бактериофагам [139].

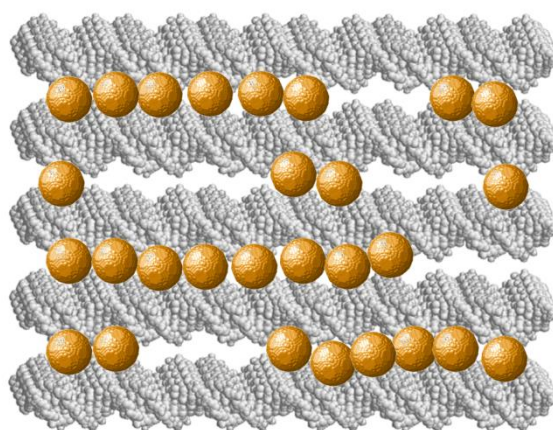
Исследования ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота проводились на примере наночастиц размером 2 и 15 нм. Отрицательно заряженные наночастицы золота размером ~15 нм получали методом Туркевича [165], золото меньшего размера (~2 нм) методом Даффа [166]. Модификация анионов на поверхности больших частиц цитратом стабилизирует их и предотвращает агрегацию в растворе [167-169].

Наночастицы любого размера взаимодействуют с молекулами ДНК: частицы малого размера (~ 2 нм) могут располагаться между молекулами, более крупные взаимодействуют с «поверхностными» молекулами, образуя с ними ансамбли или комплексы [170-175]. Формирование ансамблей из наночастиц оказывает влияние на взаимодействие соседних квазинематических слоев ХЖКД ДНК таким образом, что спиральная закрутка частиц дисперсий может исчезнуть. В работе [176] показано, что обработка ХЖКД ДНК наночастицами золота приводит к уменьшению аномальной отрицательной полосы, при этом



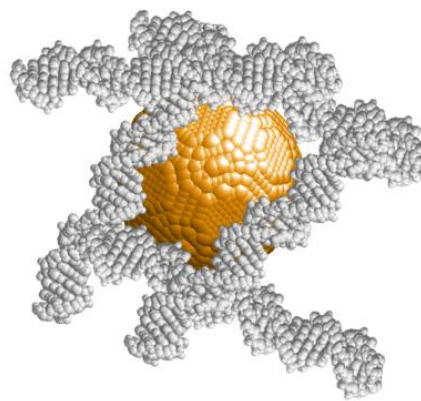
наблюдается зависимость от концентрации наночастиц, т.е. с увеличением их концентрации уменьшается амплитуда полосы, начиная с некоторого порогового значения. При этом быстрота исчезновения амплитуды полосы также зависит от размера наночастиц и температуры раствора, в котором находятся ХЖКД ДНК при обработке их нанозолотом [177].

Исследования ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота показали, что наночастицы размером 2 нм могут встраиваться между слоями молекул ДНК, образуя кластеры со средним размером 13-16 нм, как это схематично представлено на рис.4.3 [178].



**Рис. 4.3.** Гипотетическая модель расположения кластеров наночастиц золота размером 2 нм между молекулами ДНК в ХЖКД.

Совершенно другой эффект вызывают наночастицы размером 15 нм при взаимодействии с ХЖКД ДНК. Эти частицы полностью разрушают квазинематическую упаковку ДНК. При этом молекулы ДНК располагаются на отрицательно заряженной поверхности наночастиц, как схематично показано на рис. 4.4 [179].



**Рис. 4.4.** Гипотетическая модель взаимодействия молекул ДНК с большими наночастицами размером 15 нм.

Несмотря на большое количество работ в данном направлении, многие детали механизма, способа связывания и определение конформации дц-ДНК в местах связывания наночастиц золота с молекулами нуклеиновых кислот в составе ХЖКД ДНК до сих пор до конца не ясны. Эффект разрушения упорядоченной структуры ХЖКД ДНК с ростом концентрации инкорпорированных в них наночастиц золота может быть причиной генотоксичности нано-Au [180].

#### **4.5. Постановка задачи**

Предпринятые нами детальные структурные исследования степени упорядочения макромолекул ДНК в различных условиях формирования холестерических жидкокристаллических дисперсий, в том числе в присутствии наночастиц золота, являлись продолжением рассмотренных выше работ. Анализ литературы показал актуальность исследования структуры ХЖКД ДНК и их взаимодействия с металлическими наночастицами, что и определило постановку следующих задач:

1. Определить пространственную структуру и способ упаковки молекул дц-ДНК в частицах ХЖКД в зависимости от концентрации ПЭГ в растворе.
2. Сравнить зависимость взаимодействия наночастиц золота размера 2 и 15 нм с ХЖКД ДНК.

Для выполнения этих задач использовались взаимодополняющие методы (малоугловое рентгеновско рассеяние и круговой дихроизм), которые позволяют получать данные об объектах на разных структурных уровнях. Метод малоуглового рассеяния позволяет определить межплоскостное расстояние, размер кристаллитов и степень разупорядоченности системы, а с помощью кругового дихроизма можно судить об ориентационном порядке молекул ДНК.

## **ГЛАВА 5. Исследование пространственной структуры ХЖКД ДНК и зависимость взаимодействия их с наночастицами золота**

### **5.1. Круговой дихроизм, как дополнительный метод исследования структуры ХЖКД ДНК**

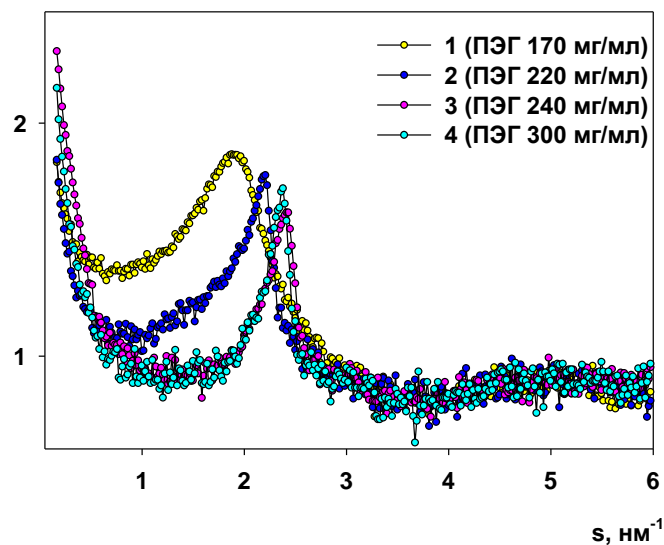
Круговой дихроизм использовался для исследования изменений пространственной структуры ХЖКД ДНК, сформированной при различных концентрациях ПЭГ и при взаимодействии ее с наночастицами золота разного размера.

Спектры поглощения регистрировали при помощи спектрофотометра Cary 100 Scan (Varian, США), а спектры кругового дихроизма (КД) – при помощи портативного дихрометра «СКД-2» (разработка Института спектроскопии РАН, г. Троицк). Спектры КД представляли в виде зависимости разности интенсивностей поглощения лево- и правополяризованного света ( $\Delta A$ ;  $\Delta A = (A_L - A_R)$ ) от длины волны ( $\lambda$ ).

### **5.1. Пространственная структура ХЖКД ДНК**

Для исследования пространственной структуры и способа упаковки молекул дц- ДНК в частицах ХЖКД в зависимости от концентрации ПЭГ в растворе нами методом МУРР была получена серия кривых от образцов ХЖКД ДНК с различным содержанием ПЭГ, которые изображены на рис. 5.1. Из данного рисунка видно, что характерной особенностью кривых малоуглового рассеяния является наличие брэгговских пиков, которые отражают наличие упорядоченных областей структуры. Можно заметить, что при увеличении концентрации ПЭГ пики становятся более узкими, а их положение смещается с 1.9 до 2.4  $\text{nm}^{-1}$ , что свидетельствует о повышении степени упорядоченности структуры. Другие структурные характеристики образцов, определяемые по пикам с помощью программы РЕАК, отображены в Таблице 5.

Ig I, отн. ед.



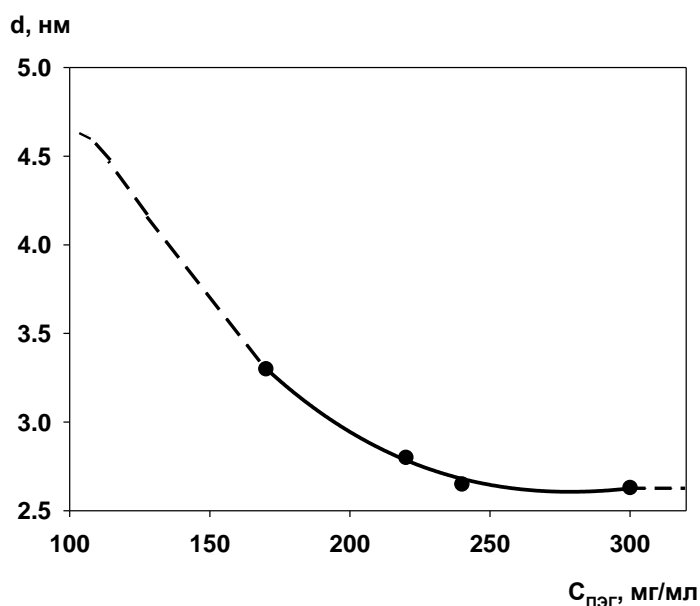
**Рис. 5.1.** Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от ХЖКД ДНК с различным содержанием ПЭГ: 1- ПЭГ 170 мг/мл; 2- ПЭГ 220 мг/мл; 3- ПЭГ 240 мг/мл; 4- ПЭГ 300 мг/мл.

Сравнивая и анализируя соответствующие параметры в Таблице 5, можно отметить, что межплоскостные расстояния, определяемые из выражения  $d=2\pi/s$ , где  $s=4\pi\sin\vartheta/\lambda$ , в образцах с содержанием ПЭГ 170, 240 и 300 мг/мл не совпадают между собой, что свидетельствует о разнице в структурах дисперсий. Она отражена в уменьшении степени разупорядоченности систем ( $\Delta/\bar{d}$ ), а также увеличении размеров кристаллитов ( $L$ ) с ростом концентрации ПЭГ в растворе.

**Таблица 5.** Структурные характеристики образцов с различным содержанием ПЭГ

Название образца	$s_{max}$ , нм <sup>-1</sup> ( $\pm 0.1$ нм <sup>-1</sup> )	$\bar{d}$ , нм ( $\pm 0.1$ нм)	$L$ , нм ( $\pm 3.0$ нм)	$\Delta/\bar{d}$ , ( $\pm 0.01$ )
ПЭГ_170	1.9	3.3	21	0.12
ПЭГ_220	2.2	2.8	37	0.07
ПЭГ_240	2.4	2.6	71	0.07
ПЭГ_300	2.4	2.6	74	0.07

По плавному изменению структурных характеристик образцов в измеренном диапазоне концентраций ПЭГ можно предположить, что зависимость межплоскостного расстояния ( $d$ ) от концентрации ПЭГ является непрерывной. Однако можно сказать, что эта зависимость не линейна, поскольку существенные изменения в упаковке частиц дисперсий, как видно из рис. 5.1 и Таблицы 5, происходят только в интервале концентраций ПЭГ 170-220 мг/мл. Для исследования характера изменения межплоскостного расстояния от концентрации ПЭГ была построена зависимость, показанная на рис. 5.2.



**Рис. 5.2.** Зависимость межплоскостных расстояний от концентрации ПЭГ в образцах ХЖКД ДНК.

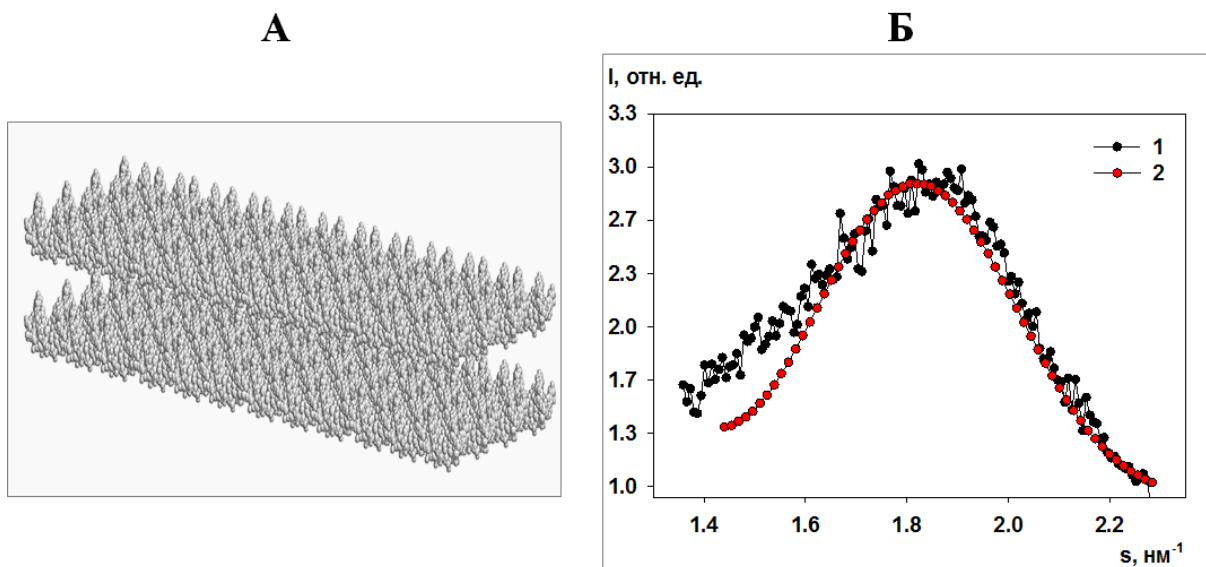
Из рис. 5.2 наглядно видно, что с концентрации ПЭГ 240 мг/мл межплоскостное расстояние перестает изменяться, что свидетельствует об образовании наиболее плотной упаковки молекул дц-ДНК.

Поскольку после конденсации молекул ДНК упаковка частиц дисперсий, главным образом, зависит от осмотического давления, создаваемого полимером ПЭГ, то варьируя концентрацию последнего можно изменять расстояние между соседними молекулами ДНК в частицах дисперсий в пределах от 2.6 до 3.3 нм. Несмотря на то, что структура дисперсий в ПЭГ - содержащих растворах является

фиксированной, некоторые степени свободы молекул ДНК за счет их диффузии сохраняются, что и определяет «жидкостной» характер упаковки.

Одним из наиболее адекватных и наглядных способов подтверждения наблюдаемых структурных изменений является компьютерное моделирование. На основе реальной структуры ДНК В-формы, взятой из банка данных RCSB Protein Data Bank (PDB: 1bna), нами с помощью программы MASSHA были построены две модели отражающие структуры ХЖКД ДНК, сформированные при крайних концентрациях ПЭГ в растворе – 170 и 300 мг/мл. Модели представляют собой слои из параллельно уложенных молекул ДНК, причем расстояния между соседними молекулами соответствовали межплоскостным расстояниям, определяемым по пикам на кривых рассеяния, т.е. 3.3 и 2.6 нм, соответственно. Первая модель упаковки молекул ДНК в ХЖКД представлена на рисунке 5.3А. От этой модели была рассчитана кривая рассеяния (рис. 5.3Б, кривая 2), положение максимума которой соответствует пику Брэгга на кривой рассеяния от реальной структуры с концентрацией ПЭГ 170 мг/мл (рис. 5.3Б, кривая 1). Поскольку положение пиков совпадает (рис. 5.3Б), совпадает и величина межплоскостного расстояния, что, в свою очередь, говорит о том, что наша модель хорошо отражает упаковку молекул ДНК в ХЖКД ДНК.

Для лучшей визуализации мы показываем только область пика в линейной шкале. Отличия кривых рассеяния вне области максимума пиков обусловлены рассеянием от идеальной структуры, т.е. модели.

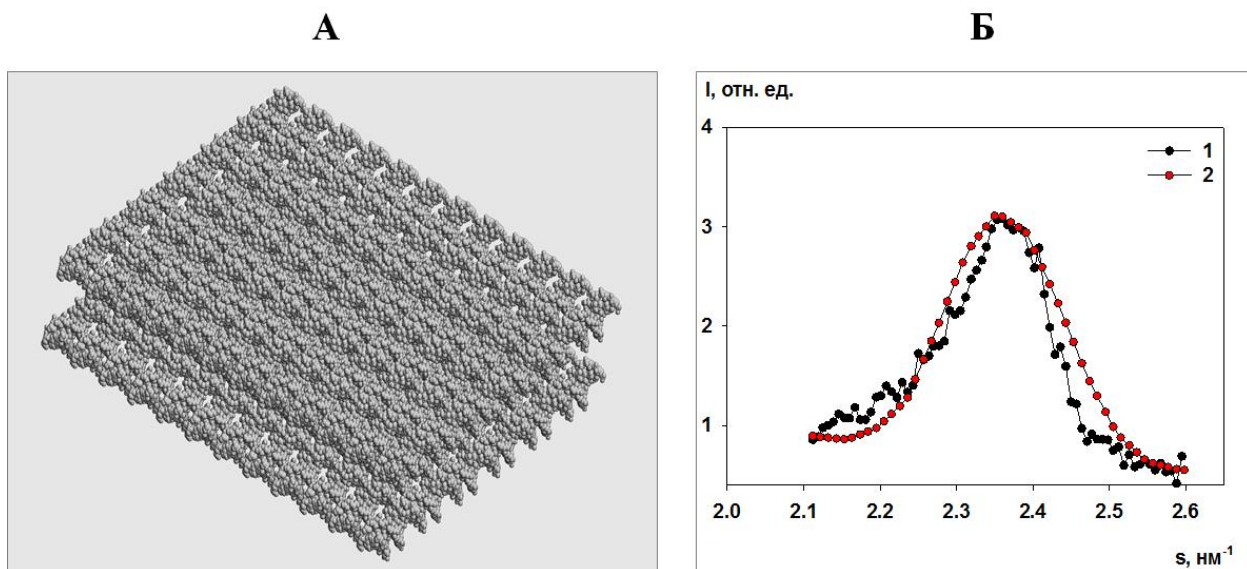


**Рис. 5.3.** (А) Модель упаковки молекул ДНК, отражающая реальную структуру ХЖКД, сформированных при концентрации ПЭГ 170 мг/мл. (Б) Сравнение областей брэгговских пиков на кривых рассеяния полученной экспериментально от структуры ХЖКД ДНК с концентрацией ПЭГ 170 мг/мл (кривая 1) и рассчитанной от модели (кривая 2) .

Вторая, построенная нами модель, отображает упорядоченную структуру молекул ДНК в ХЖКД, сформированных при концентрации ПЭГ 300 мг/мл (рис. 5.4А), имеет гораздо больший размер кристаллитов и более плотно упакованные слои, расстояние между которыми равно 2.6 нм.

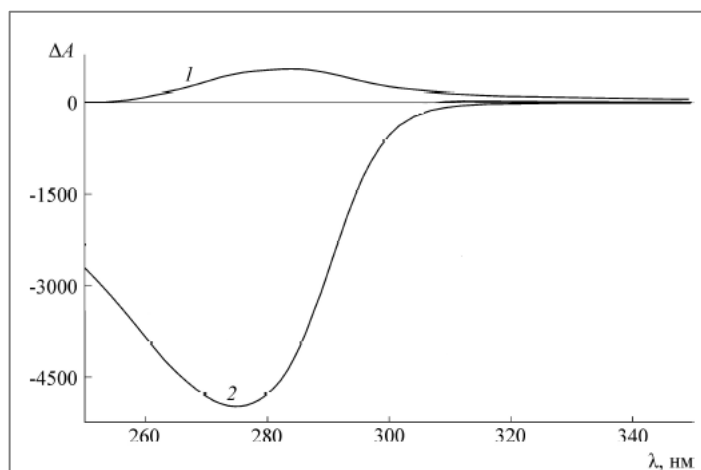
Проведенное нами моделирование по данным малоуглового рассеяния подтвердило вывод об изменении структуры при изменении ПЭГ. Нами показано, что при повышении концентрации ПЭГ в растворе увеличивается степень упорядоченности молекул ДНК и размер кристаллитов, а также уменьшается расстояние между слоями, что свидетельствует об уплотнении упаковки ДНК в ХЖКД.





**Рис. 5.4.** (А) Модель упаковки молекул ДНК, отражающая реальную структуру ХЖКД, сформированных при концентрации ПЭГ 300 мг/мл. (Б) Сравнение областей брэгговских пиков на кривых рассеяния полученной экспериментально от структуры ХЖКД ДНК с концентрацией ПЭГ 300 мг/мл (кривая 1) и рассчитанной от модели (кривая 2).

Спектры кругового дихроизма для ХЖКД ДНК, сформированных при концентрации ПЭГ в растворе 170 и 300 мг/мл, представлены на рис. 5.5.

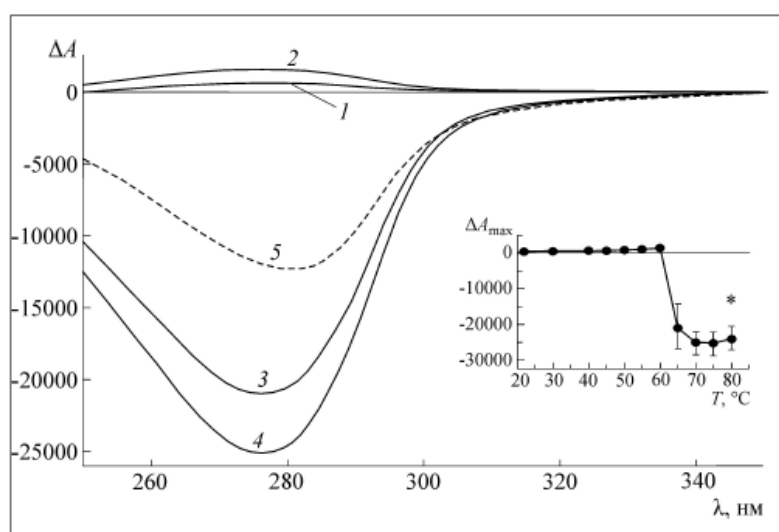


**Рис. 5.5.** Спектры кругового дихроизма для частиц дисперсий ДНК, сформированных при концентрации ПЭГ 300 мг/мл (кривая 1) и 170 мг/мл (кривая 2).

Из этого рисунка видно, что при большой концентрации ПЭГ (300 мг/мл) частицы дисперсии не обладают аномальной оптической активностью, что может

указывать на то, что при комнатной температуре упаковка дисперсии ДНК стремится стать наиболее плотной, но при этом закрутка соседних слоев молекул ДНК не наблюдается [А3, А4].

Также с помощью кругового дихроизма была выявлена температурная зависимость аномальной оптической активности для частиц дисперсий, сформированных при концентрации ПЭГ 300 мг/мл, которая представлена на рис. 5.6. Анализ зависимости максимальной амплитуды полосы в спектре КД ХЖКД ДНК от температуры показан на вставке рис. 5.6.



**Рис. 5.6.** Спектры кругового дихроизма ХЖКД ДНК, сформированные при  $C_{\text{ПЭГ}} = 300$  мг/мл, зарегистрированные при разной температуре. 1- 22 °С, 2- 60 °С, 3- 65 °С, 4- 75 °С, 5- после охлаждения образца от 80 до 22 °С. На вставке: зависимость максимальной амплитуды полосы в спектре КД ХЖКД ДНК от температуры. \*- амплитуда полосы в спектре дисперсии ДНК после охлаждения раствора от 80 до 22 °С.

Из рисунка 5.6 видно, что при комнатной температуре (кривая 1) спектр аномальной полосы отсутствует. Увеличение температуры от 22 до 60 °С дает незначительные изменения в спектрах КД (кривая 2). При этом резкое изменение амплитуды аномальной полосы наблюдается в узком интервале температур от 60 до 75 °С (кривые 3, 4). Появление аномальной полосы с большой амплитудой

можно объяснить тем, что при увеличении температуры увеличивается и подвижность молекул ДНК в частицах дисперсий, что делает возможным поворот соседних слоев из молекул ДНК. При этом, температурно-индуцированная аномальная оптическая активность ХЖКД ДНК, сформированных при концентрации ПЭГ 300 мг/мл, при охлаждении раствора с 80 до 22 °С приводит лишь к незначительному уменьшению амплитуды спектра КД. Это может свидетельствовать о том, что при высоком осмотическом давлении, созданном высокой концентрацией ПЭГ, структура не может избежать спиральной закрутки, т.е. остается как бы «замороженной».

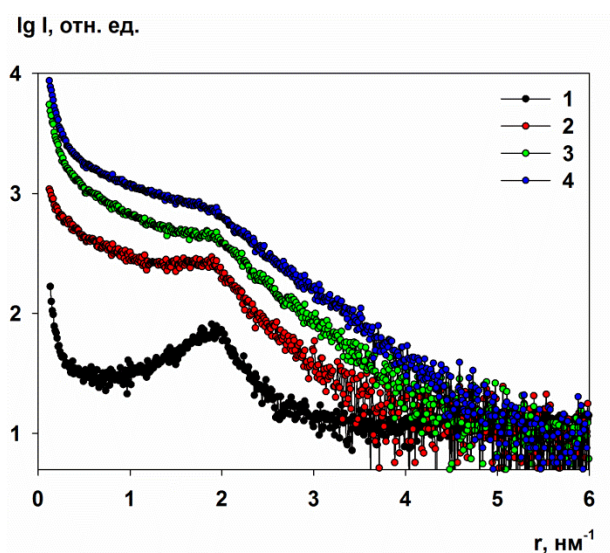
Таким образом, сопоставление результатов, характеризующих пространственную структуру и способ упаковки молекул дц- ДНК в частицах ХЖКД в зависимости от концентрации ПЭГ в растворе дает основание утверждать следующее: при увеличении концентрации ПЭГ ( $C_{\text{ПЭГ}} > C_{\text{ПЭГ}}^{\text{кр}}$ ) изменяется структура ХЖКД ДНК, она становится более упорядоченной. Следовательно, варьируя концентрацию ПЭГ можно изменять межплоскостное расстояние, что особенно важно для создания наноконструктов на основе ХЖКД ДНК. Кроме того, аномальная оптическая активность исчезает, что говорит об исчезновении закрутки слоев при высокой концентрации ПЭГ. Однако, при повышении температуры от 65 до 80 °С спектр КД вновь появляется, что вероятно связано с высокой подвижностью молекул ДНК в данном диапазоне температур.

## **5.2. Исследование эффективности взаимодействия ХЖКД ДНК с наночастицами золота разного размера**

Мы показали, что структура ХЖКД ДНК, сформированная в водно-солевом растворе ПЭГ, может служить матрицей для инкорпорирования в нее гостевых молекул. Для наших исследований взаимодействия наночастиц с ХЖКД ДНК мы использовали структуру частиц дисперсий, которые образованы при критической концентрации ПЭГ 170 мг/мл, поскольку она имеет наибольшее межплоскостное расстояние порядка 3.3 нм.

С целью сравнения зависимости взаимодействия ХЖКД ДНК с наночастицами золота методом МУРР была измерена серия образцов ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота размером 2 и 15 нм при 3-х концентрациях, а также для контроля образец чистой ХЖКД ДНК.

На рисунке 5.7 отображены кривые рассеяния с инкорпорированными наночастицами золота размером 2 нм.



**Рис. 5.7.** Экспериментальные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния от образцов ХЖКД ДНК (кривая 1, контроль) и ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота размером 2 нм (кривые 2-4).

(1)  $-C_{\text{Нано-Au}} = 0$ ; (2)  $-C_{\text{Нано-Au}} = 0.57 \times 10^{-8}$  М; (3)  $-C_{\text{Нано-Au}} = 1.72 \times 10^{-8}$  М; (4)  $-C_{\text{Нано-Au}} = 3.59 \times 10^{-8}$  М.

Все кривые МУРР характеризуются наличием характеристических брегговских пиков с максимумами, расположенными на  $s = 1.9 \text{ нм}^{-1}$ , что соответствует межплоскостному расстоянию 3.3 нм. В таблице 6 показаны все структурные параметры образцов, определенные по брегговским пикам на кривых малоуглового рассеяния.

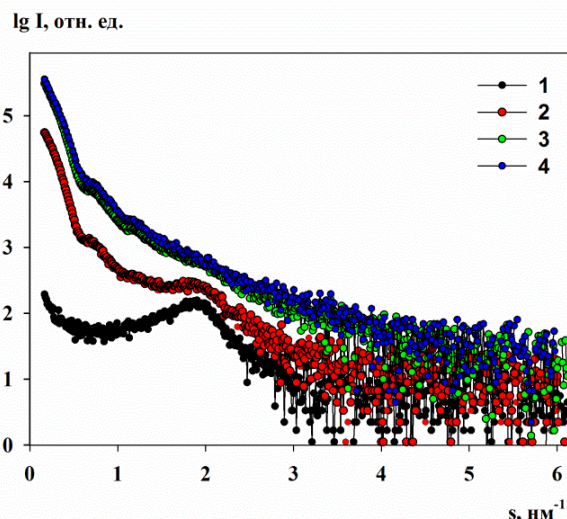
**Таблица 6.** Структурные характеристики образцов ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота с размером 2 нм.

Наименование кривых рассеяния	$s_{\max}$ нм <sup>-1</sup> (±0.1)	$\bar{d}$ нм (±0.1)	$L$ нм (±3.0)	$\Delta/\bar{d}$ (±0.01)	Площадь под пиком, отн.ед.	Нормированная площадь под пиком, отн.ед.
ДНК	1.9	3.3	20.0	0.14	0.0070	1.0
ДНК-Au1	1.9	3.3	23.0	0.12	0.0047	0.67
ДНК-Au2	1.9	3.2	23.0	0.12	0.0034	0.49
ДНК-Au3	1.9	3.3	21.0	0.13	0.0027	0.39

Обращает на себя внимание то, что структурные характеристики всех образцов совпадают в пределах ошибки измерения. Исключением является площадь под характеристическими брегговскими пиками. Это означает, что инкорпорация наночастиц золота с размером 2 нм не меняет структуру квазикристаллических областей ХЖКД ДНК, поскольку положение пиков не смещается, а как это было уже показано в работе [178], наночастицы металла встраиваются в архитектуру ХЖКД: они располагаются между макромолекулами полинуклеотида, контрастируя их и воспроизводя таким образом структуру жидкокристаллической дисперсии. С другой стороны, последовательное уменьшение площади под пиками говорит об уменьшении общего количества структурированных областей в образцах по мере роста концентрации наночастиц металла. Это происходит из-за того, что агрегация металлических наночастиц растет с увеличением их концентрации. Именно об этом свидетельствует последовательное увеличение амплитуды интенсивности малоуглового рассеяния в самых малых углах в образцах, содержащих золото. Крупные наночастицы, которые не могут встроиться в квазикристаллическую структуру, разрушают ее [A5, A6].

Разрушение структуры ХЖКД ДНК хорошо демонстрирует инкорпорация наночастиц размером 15 нм. На рисунке 5.8 отображены кривые рассеяния от образцов ХЖКД ДНК с наночастицами золота размером 15 нм. Частицы размером 15 нм не могут встроиться между слоями ДНК без изменения их межплоскостного расстояния и, следовательно, количество упорядоченных

областей должно резко уменьшаться с увеличением концентрации золота в системе ХЖКД ДНК, о чем свидетельствуют исчезновение пика уже при концентрации наночастиц в образце  $C_{\text{Нано-Au}} = 0.0614 \times 10^{-8} \text{ М}$  и структурные характеристики образцов, приведенные в Таблице 7.



**Рис. 5.8.** Экспериментальные кривые малоуглового рентгеновского рассеяния от образцов ХЖКД ДНК (кривая 1, контроль) и ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота размером 15 нм (кривые 2-4).

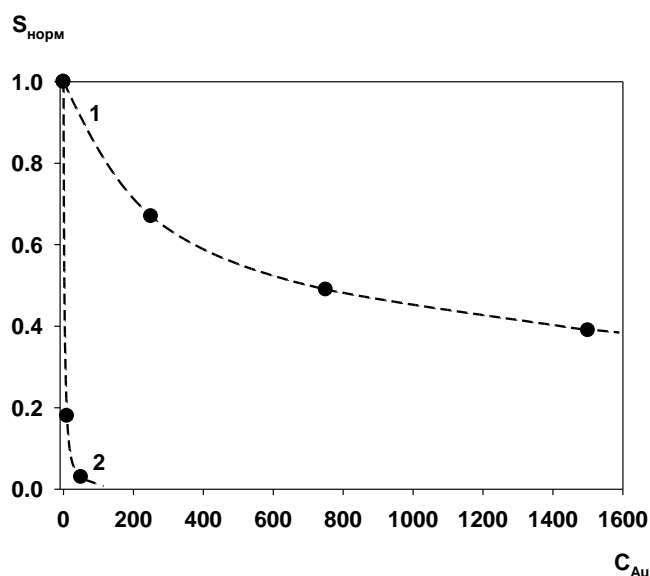
(1) –  $C_{\text{Нано-Au}} = 0$ , (2) –  $C_{\text{Нано-Au}} = 0.0125 \times 10^{-8} \text{ М}$ , (3) –  $C_{\text{Нано-Au}} = 0.0614 \times 10^{-8} \text{ М}$ , (4) –  $C_{\text{Нано-Au}} = 0.127 \times 10^{-8} \text{ М}$ .

**Таблица 7.** Структурные характеристики образцов ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота с размером 15 нм.

Наименование кривых рассеяния	$s_{\text{max}}$ нм <sup>-1</sup> ( $\pm 0.1 \text{ нм}^{-1}$ )	$\bar{d}$ нм ( $\pm 0.1 \text{ нм}$ )	$L$ нм ( $\pm 3.0 \text{ нм}$ )	$\Delta/\bar{d}$ ( $\pm 0.01$ )	Площадь под пиком, отн.ед.	Нормированная площадь под пиком, отн.ед.
ДНК	1.9	3.3	17	0.14	0.0074	1.0
ДНК-Au1	1.9	3.3	-	0.10	0.0013	0.18
ДНК-Au2	1.9	-	-	-	0.0002	0.03
ДНК-Au3	-	-	-	-	-	-

Для того чтобы сравнить зависимость взаимодействия наночастиц размером 2 и 15 нм со структурой ХЖКД ДНК, наблюдаемую с помощью МУРР нами был проведен анализ изменения площади под характеристическими брегговскими пиками. Для этого мы использовали нормированную площадь ( $S_{\text{норм}}$ ), то есть

площадь, соотнесенную с таковой—под пиком для исходной ХЖКД ДНК. На рисунке 5.9 показано сравнение графиков зависимости  $S_{\text{норм}}$  от концентрации наночастиц золота  $C_{\text{Au}}$  для наночастиц золота с размерами 2 нм и 15 нм. Структурные характеристики образцов ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота с размером 2 и 15 нм, на основании которых были построены кривые 1 и 2, показаны в Таблицах 6 и 7.



**Рис. 5.9.** Графики зависимости  $S_{\text{норм}}$  от концентрации наночастиц золота  $C_{\text{Au}}$  в ХЖКД ДНК для наночастиц с размерами 2 нм (кривая 1) и 15 нм (кривая 2).

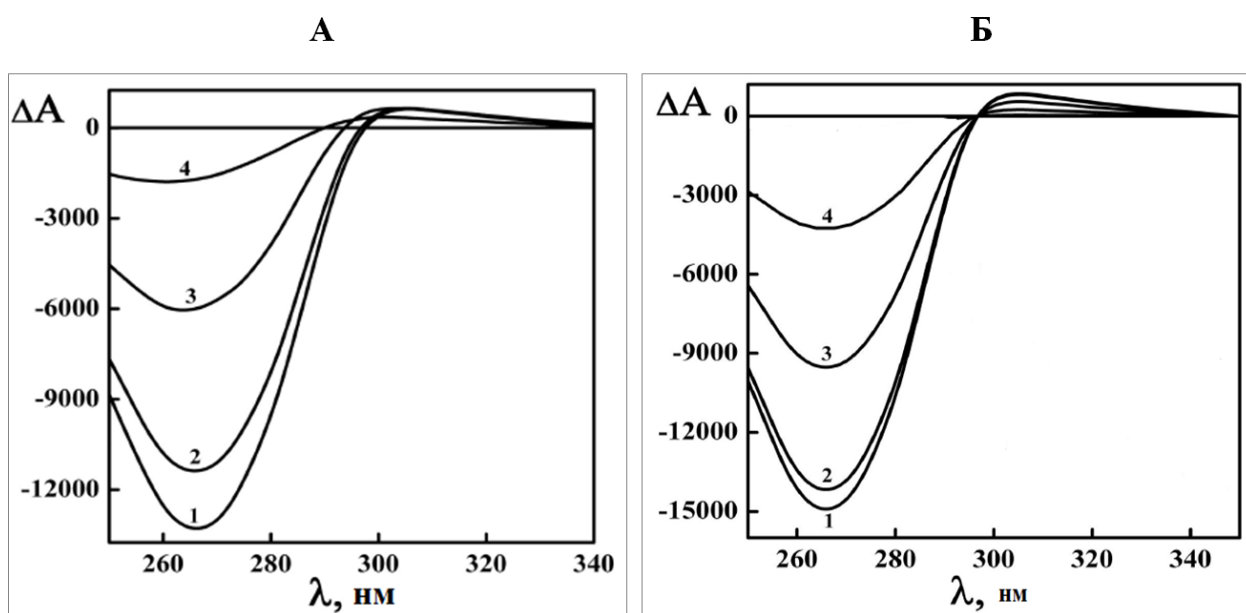
Оказалось, что падение значения  $S_{\text{норм}}$  в зависимости от концентрации наночастиц золота в образцах хорошо аппроксимируется экспоненциальным уравнением:

$$y = y_0 + ae^{(-bx)}.$$

Экспериментальные точки (черные кружочки) практически идеально ложатся на аппроксимирующую кривую. Величину спада определяет коэффициент  $b$  в показателе степени, который для наночастиц размером 2 нм оказался равным 0.003, другие показатели уравнения равны:  $y_0 = 0.39$ ,  $a = 0.61$ . При этом кривая 2 также описывается уравнением  $y = y_0 + ae^{(-bx)}$ , однако коэффициент  $b$  в показателе степени оказывается значительно выше:  $b = 0.187$ . Другие показатели уравнения для кривой 2 равны:  $y_0 = 0.03$ ,  $a = 0.97$ .

Как хорошо видно из рисунка 5.9, при инкорпорации наночастиц золота с размером 15 нм происходит резкое уменьшение количества упорядоченных областей в ХЖКД ДНК, общий объем которых пропорционален площади под характеристическими брэгговскими пиками.

Полученная закономерность хорошо коррелирует с наблюдаемым изменением амплитуды отрицательной полосы кругового дихроизма для этих образцов (рис. 5.10) [A5].

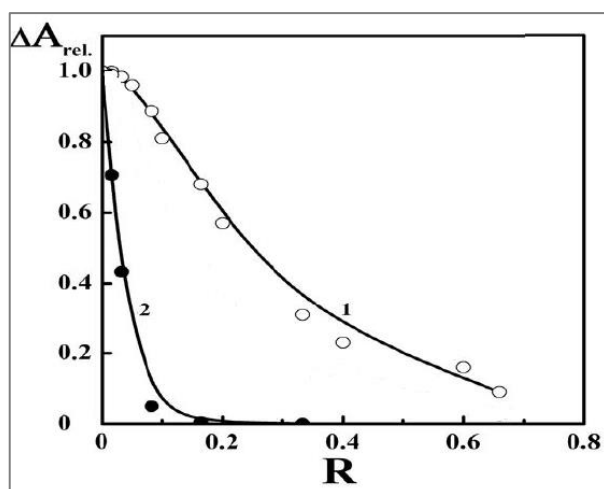


**Рис. 5.10.** Спектры кругового дихроизма для частиц ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота размером 2 нм (А) и 15 нм (Б).

Поскольку концентрации наночастиц размером 2 нм примерно в 10 раз больше, соответствующих концентраций частиц размером 15 нм, а падение аномальной полосы оптической активности имеет примерно тот же характер, то из этого можно сделать вывод, что разрушение структуры ХЖКД ДНК происходит примерно в 10 раз быстрее в случае обработки их наночастицами размером 15 нм. Процесс связывания наночастиц с молекулами ДНК зависит, безусловно, от размера наночастиц. А именно, чем больше их размер, тем эффективнее изменения в аномальной оптической активности частиц ХЖКД. Это подтверждает рисунок 5.11, на котором показано, что эффективность падения



амплитуды аномальной полосы в спектрах КД для частиц дисперсий больше для частиц большего размера.



**Рис. 5.11.** Зависимость полосы относительной амплитуды ( $\lambda = 270$  нм) в спектрах КД ХЖКД ДНК с инкорпорированными наночастицами золота различных размеров от величины R. Где R представляет собой отношение количества нано-Au к количеству молекул ДНК в растворе. 1 - ДНК + 2 нм нано-Au; 2 - ДНК + 15 нм нано-Au.

Таким образом, можно утверждать, что эффективность взаимодействия наночастиц золота с молекулами ДНК падает с уменьшением размера наночастиц. Следовательно, наночастицы размером 15 нм по сравнению с частицами 2 нм взаимодействуют с большим количеством ДНК, тем самым быстрее разрушая упорядоченную структуру ХЖКД ДНК.

### 5.3. Заключение к Главе 5

Впервые с помощью малоуглового рассеяния и моделирования показано изменение структуры холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК, сформированных в водно-солевом растворе ПЭГ, при изменении концентрации ПЭГ. Варьируя концентрацию ПЭГ можно изменять степень упорядоченности структуры и межплоскостное расстояние, что дает возможность использовать такую структуру для инкорпорирования различных гостевых молекул. Методом малоуглового рассеяния и кругового дихроизма проанализирована зависимость

взаимодействия ХЖКД ДНК с наночастицами золота от размера наночастиц. Показано, что наночастицы золота большего размера примерно в 10 раз более эффективно связываются с молекулами ДНК, что сопровождается резким уменьшением количества упорядоченных областей в частицах дисперсий.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью диссертационной работы было исследование трехмерных структур бионаноконструктов на основе ДНК и ряда белков, участвующих в катаболизме стационарной фазы роста *Escherichia coli*. Результаты исследований имеют потенциальное биомедицинское применение.

Методом малоуглового рассеяния и компьютерного моделирования определены структуры гомогенных в растворе белков фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы (FbaV) и неорганической пирофосфатазы (PPase). С помощью *ab initio* моделирования была получена форма каждого белка в растворе. Метод молекулярной тектоники, использующий данные МУРР и модели атомного разрешения, был применен для определения количества и взаимного расположения субъединиц, составляющих четвертичную структуру FbaV и PPase. Для моделирования PPase использовалась ранее определенная кристаллическая структура одной субъединицы белка. В случае FbaV кристаллическая модель третичной структуры отсутствовала, поэтому использовалась модель одной субъединицы, которая была нами предсказана с помощью биоинформатических методов. Результаты, полученные с применением разных подходов, хорошо согласуются между собой. FbaV класса I из *E. coli* представляет собой декамер, так же как и FbaV класса I у архей, однако, как показывают данные МУРР четвертичные структуры их различаются. PPase в растворе, так же как и в кристалле представляет собой гексамер. Однако сравнение этих структур выявило конформационные различия, состоящие во взаимной ориентации субъединиц в макромолекуле фермента. Изменение четвертичной структуры может влиять на ферментативную активность белка и способность его к образованию комплексов с другими компонентами клетки.

Анализ данных МУРР, аналитического ультрацентрифугирования и эксклюзионной хроматографии белков 5-кето-4-дезоксисуридинат изомеразы (KduI), глутамат декарбоксилазы (GadA) и дигидролипиддегидрогеназы (LpD) показал, что эти ферменты в растворе представляют собой равновесную смесь различных

олигомерных форм. В частности, нами показано, что KduI в кристалле является гексамером, тогда как в растворе он частично диссоциирует на димеры и образует ассоциаты в виде додекамеров. При этом образуются два вида додекамеров, структурно отличающиеся друг от друга. KduI является купиновым белком, которому свойственно образовывать ассоциаты, в то время как наблюдаемая диссоциация белка связана с аллостерическим способом регуляции его ферментативной активности.

В свою очередь, GadA представляющий собой в кристалле и в растворе при pH 4.6 гексамер, при повышении уровня pH до 7.5 частично диссоциирует на димеры. Используя метод молекулярной тектоники для смесей и кристаллическую модель GadA, нами было показано, что форма гексамеров и димеров, а также их доля зависит от ионной силы раствора. Диссоциация белка связана с участием GadA в системе отклика бактерий на кислотный стресс.

LpD существует в растворе в виде почти равного количества димеров и тетрамеров. Форма тетрамера LpD была получена двумя независимыми способами, с помощью методов МУРР и молекулярного докинга, результаты которых хорошо согласуются. Наличие двух олигомерных форм белка связано с его многофункциональностью, а структура тетрамера зависит от стехиометрических и функциональных свойств мультиферментных комплексов, в которых участвует LpD.

Исследования с помощью МУРР и компьютерного моделирования бионаноконструкций на основе ДНК показали, что образование холестерических жидкокристаллических дисперсий (ХЖКД) ДНК в результате их фазового исключения из водно-солевого раствора полиэтиленгликоля зависит от концентрации ПЭГ. Варьируя ее, можно создавать структуры с различными межплоскостным расстоянием и степенью упорядоченности молекул ДНК в слоях частиц дисперсий. Такую структуру можно использовать, например, в качестве матрицы для наночастиц. В ходе работы методами МУРР и кругового дихроизма нами была выявлена зависимость взаимодействия ХЖКД ДНК с наночастицами золота от размера последних. Нами было подтверждено, что золотые наночастицы

размером 2 нм частично инкорпорируются в пространство между соседними молекулами упорядоченных слоев ДНК в структуре ХЖКД ДНК, формируя линейные кластеры. Детальный структурный анализ и компьютерное моделирование позволили нам количественно описать происходящие при формировании нанокмозитов на основе ДНК процессы. В том числе было показано различие в скоростях разрушения упорядоченной упаковки нанокмозитов при инкорпорации наночастиц золота в зависимости от их размеров. Та часть частиц с размером 2 нм, которая не встроилась между слоями ДНК, образует агрегаты, которые в свою очередь взаимодействуют с реакционными группами ДНК, тем самым разрушая упорядоченную упаковку ХЖКД. Наночастицы золота большего размера (15 нм) по стерическим ограничениям не могут встраиваться между слоями ДНК и полностью разрушают структуру ХЖКД ДНК, начиная с таких низких концентраций, как  $0.13 \times 10^{-8}$  М. Обнаруженные нами структурные нарушения, происходящие в результате взаимодействия молекул ДНК с наночастицами золота в частицах дисперсий, позволяют сделать вывод, что аналогичные структурные изменения могут произойти и во взаимном расположении макромолекул ДНК в хромосомах, вызывая генотоксический эффект.

В результате комплекса работ, проведенных в процессе выполнения диссертации, были получены данные, которые являются важными с теоретической и практической точек зрения и которые могут быть использованы как при дальнейшем анализе интерактома клеток, так и при создании различных бионаноустройств с целью применения их в медицине и биотехнологии.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. С помощью метода малоуглового рассеяния и компьютерного моделирования определена третичная и четвертичная структуры фруктозо-1,6-бисфосфат альдолазы (FbaB) класса I из *E.coli*.
2. Методом малоуглового рассеяния была получена модель гексамера неорганической пирофосфатазы (PPase) и выявлены конформационные отличия этого белка в растворе и в кристалле.
3. Анализ данных МУРР совместно с аналитическим ультрацентрифугированием и эксклюзионной хроматографией белка 5-кето-4-дезоксиронат изомеразы (KduI) показал, что фермент олигомеризуется в растворе, образуя равновесную смесь гексамеров, димеров и двух типов додекамеров.
4. Методами МУРР, аналитического ультрацентрифугирования и эксклюзионной хроматографии показано, что гексамер глутамат декарбоксилазы (GadA) в растворе при pH 7.5 частично диссоциирует на димеры с образованием гетерогенной смеси, где форма гексамеров и димеров, а также их доля в растворе зависит от ионной силы.
5. Методами МУРР, молекулярного докинга и аналитического ультрацентрифугирования продемонстрировано, что дигидролипоилдегидрогеназа (LpD) в растворе образует равновесную смесь димеров и тетрамеров.
6. С помощью МУРР и компьютерного моделирования показано, что изменение структуры холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК зависит от концентрации полиэтиленгликоля с изменением межплоскостного расстояния в частицах дисперсий от 3.3 до 2.6 нм.
7. Было показано, что, благодаря поверхностным зарядовым эффектам, золотые наночастицы размером 15 нм в 10 раз более активно взаимодействуют с макромолекулами ДНК по сравнению с наночастицами золота размером 2 нм, что позволяет последним встраиваться между слоями ДНК, образуя упорядоченные кластеры.

8. На основе анализа структурных перестроек в ХЖКД ДНК была выдвинута гипотеза, что аналогичные изменения структуры могут произойти также во взаимном расположении макромолекул ДНК в хромосомах, вызывая генотоксический эффект.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Guinier. Basic discussion of X-ray scattering at small angles by small discrete particles. // Ann. Phys. 1939, 12, 161-237.
2. A. Guinier, G. Fournet. In: Small-angle scattering of X-rays. // John Wiley and Sons, New York, 1955, 269 p.
3. K. Ibel, H.B. Stuhrmann. Comparison of neutron and X-ray scattering of dilute myoglobin solutions. // J Mol. Biol. 1975, 93(2), 255-265.
4. D.M. Engelman, P.B. Moore, et al. In: Neutron scattering measurements of separation and shape of proteins in 30S ribosomal subunit of Escherichia coli: S2-S5, S5-S8, S3-S7. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72(10), 3888-3892.
5. S. Akiyama, S. Takahashi, et al. Conformational landscape of cytochrome c folding studied by microsecond-resolved small-angle x-ray scattering. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99(3), 1329-1334.
6. T. Oka, K. Inoue, et al. Structural transition of bacteriorhodopsin is preceded by deprotonation of Schiff base: Microsecond time-resolved X-ray diffraction study of purple membrane. // Biophysical Journal, 2005, 88(1), 436-442.
7. B. Vestergaard, M. Groenning, et al. A helical structural nucleus is the primary elongating unit of insulin amyloid fibrils. // Plos Biology, 2007, 5(5), 1089-1097.
8. T. Matsuo, H. Iwamoto, et al. In: Monitoring the structural behavior of troponin and myoplasmic free Ca<sup>2+</sup> concentration during twitch of frog skeletal muscle. // Biophys, 2010, J 99(1), 193-200.
9. O. Glatter, O. Kratky. In: Small-angle X-ray scattering. // Acad. Press., London, 1982, 515 p.
10. Д.И. Свергун, Л.А. Фейгин. В книге: Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. // Москва, Наука, 1986, 279 с.
11. D.I. Svergun, M.H.J. Koch, P.A. Timmins, R.P. May. In: Small-angle X-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules. // International Union of Crystallography monographs on crystallography, 19, Oxford University Press, 368 p. ISBN: 978-0-19-963953-3.



12. H.D. Mertens, D.I. Svergun. Structural characterization of proteins and complexes using small-angle X-ray solution scattering. // *J Struct Biol.*, 2010, 172(1), 128- 141.
13. D.I. Svergun, M.H.J. Koch In: *Advances in structure analysis using small-angle scattering in solution.* // *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12(5), 654-660.
14. M.V. Petoukhov, P.V. Konarev, et al. ATSAS 2.1 - towards automated and websupported small-angle scattering data analysis. // *J. Appl. Cryst.*, 2007, 40(s1), 223-228.
15. C.D. Putnam, M. Hammel, et al. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. // *Q Rev Biophys*, 2007, 40(3), 191-285.
16. M.V. Petoukhov, I.M. Billas, M. Takacs, M.A. Graewert, D. Moras, D.I. Svergun. Reconstruction of quaternary structure from X-ray scattering by equilibrium mixtures of biological macromolecules. // *Biochemistry*, 2013, 52(39), 6844-6855. doi:10.1021/bi400731u
17. O. Glatter. Data evaluation in small-angle scattering: calculation of radial electron-density distribution by means of indirect Fourier transformation. // *Acta Physica Austriaca*, 1977, 47, 83-102.
18. G. Porod. Die Rontgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloidalen Systemen. // 1. Teil, *Kolloid Z.*, 1951, 124, 83-114.
19. P. Debye. Molecular-weight determination by light scattering. // *J. Phys. Colloid. Chem.*, 1947, 51, 18-32.
20. И.Ю. Могилевский, А.Т. Дембо, Д.И. Свергун, Л.А. Фейгин. В книге: Малоугловой рентгеновский дифрактометр с однокоординатным детектором. // *Кристаллография*, 1984, 20 (3), 587-591.
21. С.Е. Blanchet, A. Spilotros, F. Schwemmer, M.A. Graewert, A.G. Kikhney, С.М. Jeffries, D. Franke, D. Mark, R. Zengerle, F. Cipriani, S. Fiedler, M. Roessle, and D.I. Svergun. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). // *J. Appl. Cryst.*, 2015, 48(2), 431-433.

22. P.V. Konarev, V.V. Volkov, A.V. Sokolova, M.H.J. Koch, D.I. Svergun. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. // *J. Appl. Crystallogr.*, 2003, 36, 1277-1282.
23. M.V. Petoukhov, D. Franke, A.V. Shkumatov, G. Tria, A.G. Kikhney, M. Gajda, C. Gorba, H.T.D. Mertens, P.V. Konarev, D.I. Svergun. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. // *J. Appl. Cryst.*, 2012, 45, 342-350.
24. H.B. Stuhrmann. Interpretation of small-angle scattering of dilute solutions and gases. A representation of the structures related to a one-particle scattering functions. // *Acta Crystallogr. A*, 1970, 26, 297-306.
25. P. Chacon, F. Moran, J.F. Diaz, E. Pantos and J. M.Andreu. Low-resolution structures of proteins in solution retrieved from X-ray scattering with a genetic algorithm. // *Biophys.J.*, 1998, 74, 2760-75.
26. D.I. Svergun. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. // *Biophys.J.*, 1999, 76, 2879-86.
27. S. Kirkpatrick, C.D. Gelatt, Jr. and M.P. Vecchi. Optimization by simulated annealing. // *Science*, 1983, 220, 671-80.
28. V.V. Volkov, D.I. Svergun. Uniqueness of ab initio shape determination in small angle scattering. // *J. Appl. Crystallogr.*, 2003, 36, 860-864.
29. M.B. Kozin, D.I. Svergun. Automated matching of high- and low-resolution structural models. // *J. Appl. Crystallogr.*, 2001, 34, 33-41.
30. P. Aloy, R.B. Russel. Structural systems biology: Modeling protein interactions. // *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, 2006, 7, 188-197.
31. P.V. Konarev, M.V. Petoukhov, D.I. Svergun. MASSHA - a graphic system for rigid body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data. // *J Appl Cryst.*, 2001, 34, 527-532.
32. M.V. Petoukhov, D.I. Svergun. Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. // *Biophys J.*, 2005, 89, 1237-1250.
33. D.I. Svergun, M.V. Petoukhov, M.H.J. Koch. Determination of domain structure of proteins from x-ray solution scattering. // *Biophys.*, 2001, J. 80, 2946–2953.

34. M.V. Petoukhov, N.A. Eady, K.A. Brown, D.I. Svergun. Addition of missing loops and domains to protein models by x-ray solution scattering. // *Biophys. J.*, 2002, 83, 3113–3125.
35. R. Langridge, D.A. Marvin, W.E. Seeds, et al. The molecular configuration of deoxyribonucleic acid: Molecular models and their Fourier transforms. // *J. Mol. Biol.*, 1960, 2, 38-62.
36. D.I. Svergun, C. Barberato, M.H.J. Koch. CRY SOL: a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. // *J. Appl. Crystallogr.*, 1995, 28, 768-73.
37. R.D.B. Fraser, T.P. Macrae, E. Suzuki. An improved method for calculating the contribution of solvent to the X-ray diffraction pattern of biological molecules. // *J. Appl. Crystallogr.*, 1978, 11, 693-694.
38. B. Schmidt, S. König, D.I. Svergun, V.V. Volkov, G. Fischer, M.H.J. Koch. Small-angle X-ray solution scattering study on the dimerization of the FKBP25mem from *Legionella pneumophila*. // *FEBS Lett.*, 1995, 372, 169-172.
39. F. Poitevin, H. Orland, S. Doniach, P. Koehl, M. Delarue. AquaSAXS: A web server for computation and fitting SAXS profiles with non-uniformly hydrated atomic models. // *Nucleic Acids Res.*, 2011, 39, 184-189.
40. B. Lee, F.M. Richards. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. // *J. Mol. Biol.*, 1971, 55, 379-400.
41. S.R. Hubbard, K.O. Hodgson, S. Doniach. Small-angle x-ray scattering investigation of the solution structure of troponin C. // *J. Biochem.*, 1988, 263, 4151-4158.
42. D.I. Svergun, S. Richard, M.H.J. Koch, Z. Sayers, S. Kuprin, G. Zaccai. Protein hydration in solution: Experimental observation by X-ray and neutron scattering. // *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 2267-2272.
43. P. Bernado, E. Mylonas, M.V. Petoukhov, M. Backledge, D.I. Svergun. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering. // *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129, 5656-5664.

44. G. Jones. Genetic and Evolutionary Algorithms. // Encyclopedia of Computational Chemistry, Chichester: Wiley, 1998.
45. G.J. Kleywegt. Validation of protein models from Calpha coordinates alone. // J. Mol. Biol., 1997, 273, 371-376.
46. A.C. Gavin, P. Aloy, P. Grandi, R. Krause, M. Boesche, M. Marzioch, C. Rau, L.J. Jensen, S. Bastuck, B. Dumpelfeld, A. Edelmann, M.A. Heurtier, V. Hoffman, C. Hoefert, K. Klein, M. Hudak, A.M. Michon, M. Schelder, M. Schirle, M. Remor, T. Rudi, S. Hooper, A. Bauer, T. Bouwmeester, G. Casari, G. Drewes, G. Neubauer, J.M. Rick, B. Kuster, P. Bork, R.B. Russell, G. Superti-Furga. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. // Nature, 2006, 440, 631–636.
47. J.P. Abrahams, R. Apweiler, R. Balling, M.G. Bertero, J.M. Bujnicki, N.E. Chayen, P. Chene, G.L. Corthals, T. Dylag, F. Forster, A.J. Heck, P.J. Henderson, R. Herwig, P. Jehenson, S.J. Kokalj, E. Laue, P. Legrain, L. Martens, C. Migliorini, A. Musacchio, M. Podobnik, G.F. Schertler, G. Schreiber, T.K. Sixma, A.B. Smit, D. Stuart, D.I. Svergun, M.J. Taussig. 4D Biology for health and disease. // Workshop report, New Biotechnology, 2011, 28, 291–293.
48. D.L. Nelson, A.L. Lehninger, M.M. Cox. Lehninger principles of biochemistry. // New York, W.H. Freeman, 2008.
49. E. Rodina, N. Vorobieva, S. Kurilova, J. Mikulovich, J. Vainonen, et al. Identification of new protein complexes of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase using pull-down assay. // Biochimie, 2011, 93, 1576-1583.
50. P. Carbonell, A.-G. Planson, D. Fichera and J.-L. Faulon. A retrosynthetic biology approach to metabolic pathway design for therapeutic production. // BMC Systems Biology, 2011, 5, 122.
51. Ф.И. Плетнёв, И.А. Остерман, А.А. Богданов, О.А. Донцова, П.В. Сергиев. В книге: Правила выживания: Escherichia coli в стационарной фазе. // АСТА NATURAE, 2015, 7(3(26)), 55-67.
52. V.R. Samygina, V.M. Moiseev, E.V. Rodina, N.N. Vorobyeva, A.N. Popov et al. Reversible inhibition of Escherichia coli inorganic pyrophosphatase by fluoride:

- trapped catalytic intermediates in cryo-crystallographic studies. // *J Mol Biol.*, 2007, 366, 1305-1317.
53. R.L. Crowther, M.M. Georgiadis. The crystal structure of 5-keto-4-deoxyuronate isomerase from *Escherichia coli*. // *Proteins.*, 2005, 61, 680-684.
54. G. Capitani, D. De Biase, C. Aurizi, H. Gut, F. Bossa, M.G. Grütter. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. // *Embo J.*, 2003, 22, 4027–4037.
55. K. Chandrasekhar, J. Wang, P. Arjunan, M. Sax et al. Insight to the Interaction of the Dihydrolipoamide Acetyltransferase (E2) Core with the Peripheral Components in the *Escherichia coli* Pyruvate Dehydrogenase Complex via Multifaceted Structural Approaches// *J. Biolog. Chem.*, 2013, 288, 15402.
56. G. Tria, H.D.T. Mertens, M. Kachala, D.I. Svergun. Advanced ensemble modelling of flexible macromolecules using X-ray solution scattering. // *IUCrJ.*, 2015, 2, 207-217.
57. C.E. Blanchet, D.I. Svergun. Small-angle X-ray scattering on biological macromolecules and nanocomposites in solution. // *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2013, 64, 37-54.
58. P. Schuck. Size-Distribution Analysis of Macromolecules by Sedimentation Velocity Ultracentrifugation and Lamm Equation Modeling. // *Biophys. J.*, 2000, 78, 1606.
59. I.N. Serdyuk, N.R. Zaccai, J. Zaccai. In: *Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function.* // Cambridge: Cambridge University Press, 2007, 1120.
60. Т.В. Пырков, И.В. Озеров, Е.Д. Балицкая, Р.Г. Ефремов // *Биоорган. Химия*, 2010, 36(4), 482.
61. J. Janin, K. Henrick, J. Moult, E.L. Ten, M.J.E. Sternberg, S. Vajda, I. Vasker & S.J. Wodak. CAPRI: a Critical Assessment of PRedicted Interactions. // *Proteins*, 2003, 52, 2–9.
62. J.P.G.L.M. Rodrigues, A.M.J.J. Bonvin. Integrative computational modeling of protein interactions. // *FEBS J.*, 2014, 281, 1988-2003.

63. R. Chen, L. Li, Z. Weng. ZDOCK: an initialstage protein-docking algorithm. // *Proteins*, 2003, 52, 80–87.
64. C. Pons, M. D'Abramo, D.I. Svergun, M. Orozco, P. Bernado, J. Fernandez-Recio. Structural characterization of protein–protein complexes by integrating computational docking with small-angle cattering data. // *J Mol Biol*, 2010,403, 217–230.
65. D. Schneidman-Duhovny, Y. Inbar, R. Nussinov, H.J. Wolfson. Geometry-based flexible and symmetric protein docking. // *Proteins*, 2005, 60, 224–231.
66. TM-K. Cheng, T.L. Blundell, J. Fernandez-Recio. pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein–protein docking. // *Proteins*, 2007, 68, 503–515.
67. C. Dominguez, R. Boelens, A.M.J.J. Bonvin. HADDOCK: a protein–protein docking approach based on biochemical or biophysical information. // *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 1731–1737.
68. E. Lorentzen, E. Pohl, P. Zwart, A. Stark, R.B. Russell, T. Knura, R. Hensel, B. Siebers. Crystal structure of an archaeal class I aldolase and the evolution of (betaalpha)<sub>8</sub> barrel proteins. // *J Biol Chem.*, 2013, 278, 47253–47260.
69. E.G. Brunngraber, J. Iannantuoni. The rate-determining nature of aldolase in glycolysis by rat-brain preparations. // *Biochem J.*, 1963, 87, 624-631.
70. A. Gopher, N. Vaisman, H. Mandel, A. Lapidot. Determination of fructose metabolic pathways in normal and fructose-intolerant children: a C-13 NMR study using C-13 fructose. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, 87, 5449-5453.
71. A.W. Kao, Y. Noda, J.H. Johnson, J.E. Pessin, A.R. Saltiel. Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. // *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 17742-17747.
72. T.J. Jewett, L.D. Sibley. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. // *Mol Cell.*, 2003, 11, 885-894.
73. M. Lu, L.S. Holliday, L. Zhang, W.A. Dunn, S.L. Gluck. Interaction between aldolase and vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase: evidence for direct coupling of glycolysis to the ATP-hydrolyzing proton pump. // *J Biol Chem.*, 2001, 276, 30407-30413.

74. M. St-Jean, J. Lafrance-Vanasse, B. Liotard, J. Sygusch. High resolution reaction intermediates of rabbit muscle Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase. Substrate cleavage and induced fit. // *J Biol Chem.*, 2005, 280, 27262-27270.
75. M.Y. Galperin, L. Aravind, E.V. Koonin. Aldolases of the DhnA family: a possible solution to the problem of pentose and hexose biosynthesis in archaea. // *FEMS Microbiol Lett.*, 2000, 183, 259-264.
76. F. Shams, N.J. Oldfield, K.G. Wooldridge, D.P. Turner. Fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA)-a conserved glycolytic enzyme with virulence functions in bacteria: 'ill met by moonlight'. // *Biochem. Soc. Trans.*, 2014, 42, 1792-1795.
77. A.E. Allen, A. Moustafa, A. Montsant, A. Eckert, P.G. Kroth, C. Bowler. Evolution and functional diversification of fructose bisphosphate aldolase genes in photosynthetic marine diatoms. // *Mol. Biol. Evol.*, 2012, 29, 367-79.
78. D. Stribling, R.N. Perham. Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from *Escherichia coli* (Crookes' strain). // *Biochem J.*, 1973, 131, 833-841.
79. N. Jayanthi Bai, M. Ramachandra Pai, P. Suryanarayan. In: Fructose diphosphate aldolase-Class I (Schiff base) from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. // *J Biosc.*, 1981, 3, 323-332.
80. F. Gotz, S. Fischer, K.H. Schleifer. Purification and characterisation of an unusually heat-stable and acid/base-stable Class I fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Staphylococcus aureus*. // *Eur J Biochem.*, 1980, 108, 295-301.
81. G.J. Thomson, G.J. Howlett, A.E. Ashcroft, A. Berry. The DhnA gene of *Escherichia coli* encodes a Class I fructose bisphosphate aldolase. // *Biochem J.*, 1998, 331, 437-445.
82. B. Siebers, H. Brinkmann, C. Dörr, B. Tjaden, H. Lilie, J. van der Oost, C.H. Verhees. Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type Class I aldolase. // *J Biol Chem.*, 2001, 276, 28710-28718.
83. D.A. Jacques, J.M. Guss, D.I. Svergun, J. Trehwella. Publication guidelines for structural modeling of small-angle scattering data from biomolecules in solution. // *Acta Cryst D.*, 2012, 68, 620–626.

84. UniProt Consortium. UniProt: a hub for protein information. // *Nucleic Acids Res.*, 2015,43, 204–212.
85. D.W.A. Buchan, F. Minneci, T.C.O. Nugent, K. Bryson, D.T. Jones. Scalable web services for the PSIPRED protein analysis workbench. // *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41, 340-348.
86. Y. Zhang. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. // *BMC Bioinformatics*, 2008, 9, 40.
87. R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss and J.M. Thornton. PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. // *J. App. Cryst.*, 1993, 26, 283-291.
88. G. Vriend. WHAT IF: a molecular modelling and drug design program. // *J. Mol. Graph.*, 1990, 8, 52-56.
89. K.H. Choi, J. Shi, C.E. Hopkins, D.R. Tolan, K.N. Allen. Snapshots of catalysis: the structure of fructose-1,6-(bis)phosphate aldolase covalently bound to the substrate dihydroxyacetone phosphate. // *Biochemistry.*, 2001,40, 13868-13875.
90. M.D. Scamuffa, R.M. Caprioli. Comparison of the mechanisms of two distinct aldolases from *Escherichia coli* grown on gluconeogenic substrates. // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1980, 614, 583-590.
91. E. Valentini, A.G. Kikhney, G. Previtali, C.M. Jeffries, D.I. Svergun. In: SASBDB, a repository for biological small-angle scattering data. // *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43, 357-363.
92. J.K. Heinonen. Biological role of inorganic pyrophosphate. // Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001.
93. G. Condemine, J. Robert-Baudouy. Analysis of an *Erwinia chrysanthemi* gene cluster involved in pectin degradation. // *Mol Microbiol.*, 1991, 5, 2191–2202.
94. D.A. Rodionov, M.S. Gelfand, N. Hugouvieux-Cotte-Pattat. Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria. // *Microbiology.*, 2004, 150, 3571-3590.



95. R. Uberto, E.W. Moomaw. Protein similarity networks reveal relationships among sequence, structure, and function within the Cupin Superfamily. // PLoS ONE., 2013, 8:e74477. doi:10.1371/journal.pone.0074477.
96. T.W. Traut. Dissociation of enzyme oligomers: a mechanism for allosteric regulation. // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 1994, 29, 125-163.
97. M.P. Castanié-Cornet, K. Cam, B. Bastiat, A. Cros, P. Bordes, C. Gutierrez. Acid stress response in *Escherichia coli*: mechanism of regulation of *gadA* transcription by RcsB and GadE. // Nucleic Acids Res., 2010, 38, 3546-3554.
98. C.M. To. Quaternary structure of glutamate decarboxylase of *Escherichia coli* as revealed by electron microscopy. // J. Mol. Biol., 1971, 59, 215-217.
99. P.H. Strausbauch, E.H. Fischer. Chemical and physical properties of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. Biochemistry., 1970, 9, 226-233.
100. A.S.Tikhonenko, B.S.Sukhareva, A.E.Braunstein. In: Electron-microscopic investigation of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. // Biochim Biophys Acta., 1968, 167, 476-479.
101. R.H. Behall, M.S. De Buysere, B. Demeler et al. Pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. Characterization of assembly intermediates by sedimentation velocity analysis. // J. Biol. Chem., 1994, 269, 31372-31377.
102. H. Lindsay, E. Beaumont, S.D. Richards et al. FAD Insertion Is Essential for Attaining the Assembly Competence of the Dihydrolipoamide Dehydrogenase (E3) Monomer from *Escherichia coli*. // J. Biol. Chem., 2000, 275, 36665-36670.
103. W. Wei, H. Li, N. Nemeria, F. Jordan. Expression and purification of the dihydrolipoamide dehydrogenase subunits of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase multienzyme complex: a mass spectrometric assay for reductive acetylation of dihydrolipoamide acetyltransferase. // Protein Expr. Purif., 2003, 28, 140-150.
104. M.A. Moxley, D.A. Beard, J.N. Bazil. A pH-Dependent Kinetic Model of Dihydrolipoamide Dehydrogenase from Multiple Organisms. // Biophys. J., 2014, 107, 2993-3007.

105. R.N. Perham. Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. // *Biochem.* 1991, 30, 8501-8512.
106. A. Mattevi, G. Obmolova, E. Schulze et al. Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. // *Science.* 1992, 255, 1544-1550.
107. O. Vogel, B. Hoehn, U. Henning. Molecular structure of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli* K-12. // *Proceed. Natl. Acad. Sci.*, 1972, 69(6), 1615-1619.
108. G. Hale, R.N. Perham. Polypeptide-chain stoichiometry and lipoic acid content of the pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli*. // *Biochem. J.*, 1979, 177, 129-136.
109. D.L. Bates, R.A. Harrison, R.N. Perham. The stoichiometry of polypeptide chains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *E. coli* determined by a simple novel method. // *FEBS Lett.*, 1975, 60, 427-430.
110. M.J. Danson, R. Eiseenthal, S.Hall et al. Dihydrolipoamide dehydrogenase from halophilic archaeobacterial. // *Biochem. J.*, 1984, 218, 811-818.
111. M.J. Danson, K. Conroy, A. McQuattie, K.J. Stevenson. Dihydrolipoamide dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. Characterization and cellular location. // *Biochem. J.*, 1987, 243, 661-665.
112. G. Raddatz, H. Bisswanger. A tetrameric model of the dihydrolipoamide dehydrogenase component of the pyruvate dehydrogenase complex: construction and evaluation by molecular modeling techniques. // *J. Mol. Model.*, 1997, 3, 423-433.
113. C.K. McLaughlin, G.D. Hamblin, H.F. Sleiman. Supramolecular DNA assembly. // *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 5647-5656.
114. K.M.M. Carneiro, N. Avakyan, H.F. Sleiman. Long-range assembly of DNA into nanofibers and highly ordered networks. // *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.*, 2013, 5, 266-285.
115. O. Okay. DNA hydrogels: New functional soft materials. // *J. Polym. Sci., Part B:*

- Polym. Phys., 2011, 49, 551-556.
116. T.Amiya, T.Tanaka. Phase Transitions in Cross-Linked Gels of Natural Polymers. // *Macromolecules*, 1987, 20, 1162-1164.
117. N. Orakdogan, P. Karacan, O. Okay. Macroporous, responsive DNA cryogel beads. // *React. Funct. Polym.*, 2011, 71, 782-790.
118. T. Dobashi, K. Furusawa, E. Kita, Y. Minamisawa, T. Yamamoto. DNA liquid-crystalline gel as adsorbent of carcinogenic agent. // *Langmuir*, 2007, 23, 1303-1306.
119. P. Karacan, O.Okay. Ethidium bromide binding to DNA cryogels. // *React. Funct. Polym.*, 2013, 73, 442-450.
120. F. Livolant, A. Leforestier. Condensed phases of DNA: Structures and phase transitions. // *Prog. Polym. Sci.*, 1996, 21, 1115-1164.
121. Ю.М. Евдокимов. Жидкокристаллические формы нуклеиновых кислот. // *Вестн. РАН*, 2003, 73, 712-721.
122. L. Onsager. The effects of shape on the interaction of colloidal particles. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1949, 51, 627-659.
123. Ю.М. Евдокимов, В.И. Салянов, С.В. Семенов, С.Г. Скуридин. Жидкокристаллические дисперсии и наноконструкции ДНК. // *Радиотехника*, 2008, 296.
124. Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa. Diaminoalkanes with an odd number of carbon atoms induce compaction of a single double-stranded DNA chain. // *FEBS Lett.* 1995, 361, 277-281.
125. E. Raspaud, M. Olivera de la Cruz, J.-L. Sikorav, F. Livolant. Precipitation of DNA by polyamines: a polyelectrolyte behavior. // *Biophys. J.* 1998, 74, 381-393.
126. M. Saminathan, T. Antony, A. Shirahata, L. H. Sigal, T. Thomas, T.J. Thomas. Ionic and structural specificity effect of natural and synthetic polyamines on the aggregation and resolubilization of single-, double-, and triple-stranded DNA. // *Biochemistry*, 1999, 38, 3821-3830.
127. С.Г. Скуридин, В.А. Кадыков, В.С. Шашков. Образование компактной формы ДНК в растворе при взаимодействии со спермидином. // *Молекулярная*

- биология. 1978, 12, 413-420.
128. J.Pelta, D.Durand, J.Doucet, F.Livolant. DNA mesophases induced by spermidine – structural-properties and biological implications. // *Biophys. J.*, 1996, 71, 48-63.
  129. M.Saminathan, A.Thomas, A.Shirahata, L.H.Sigal, T.Thomas, T.J.Thomas. Ionic and structural specificity effects of natural and synthetic polyamines on the aggregation and resolubilization of Single-, Double-, and Triple-Stranded DNA. // *Biochemistry*, 1999, 38, 3821-3830.
  130. Yu. M. Evdokimov, V. V. Sytchev. Principles of the design of nanostructures with nucleic acid molecules as building blocks. // *Usp. Khim.*, 2008, 7(2), 194–206.
  131. S.G. Skuridin, A.T. Dembo, V.S. Efimov, Yu.M. Evdokimov. Liquid-crystalline phases of DNA complexes with synthetic polycations. // *Dokl. Akad. Nauk.*, 1999, 365(3), 400-402.
  132. Ю.М. Евдокимов, В.И. Салянов, С.Г. Скуридин. Наноструктуры и наноконструкции на основе ДНК. // *САЙНС-ПРЕСС*, 2010, 256.
  133. Ю.М.Евдокимов. Жидкокристаллические дисперсии нуклеиновых кислот. // *Известия АН СССР. Сер. физ.*, 1991, 55, 1804-1816.
  134. Yu.M.Yevdokimov, V.I.Salyanov, S.G.Skuridin, S.V.Semenov, O.N.Kompanets. In: *The CD Spectra of Double-Stranded DNA Liquid-Crystalline Dispersions*. // New York: Nova Science Publishers Inc. 2011.
  135. Y. Bouligand, *Liquid crystals and their analogs in biological systems*. // *Solid State Physics Supplement*, 1978, 14, 259–294.
  136. F. Livolant, A.M. Levelut, J. Doucet, and J.P. Benoit. The highly concentrated liquid-crystalline phase of DNA is columnar hexagonal. // *Nature*, 1989, 339, 724.
  137. F. Livolant. Supramolecular organization of double-stranded DNA molecules in the columnar hexagonal liquid crystalline phase: An electron microscopic analysis using freeze-fracture methods. // *J. Mol. Biol.*, 1991, 218, 165-181.
  138. Yu.M. Yevdokimov, V.V. Sytchev. *Nanotechnology and Nucleic Acids*. // *The Open Nanoscience J.*, 2007, 1, 19-31.
  139. F. Livolant, A. Leforestier. Condensed phases of DNA: Structures and phase transitions. // *Prog. Polym. Sci.*, 1996, 21, 1115–1164.

140. С.П. Папков и В.Г. Куличихин. В книге: Жидкокристаллическое состояние полимеров. // Химия, Москва, 1977.
141. R.D. Kamien and J.V. Selinger. Order and frustration in chiral liquid crystals. *J. Phys.: Condens. Matter*, 2001, 13, R1.
142. E. Senechal, G. Maret, and K. Dransfeld. Long-range order of nucleic acids in aqueous solutions. // *Int. J. Biol. Macromol.*, 1980, 2, 256-262.
143. A. Gautier, L. Michel-Salamin, E. Tosi-Couture, et al. Electron microscopy of the chromosome of dinoflagellates in situ: confirmation of Bouligand's liquid crystal hypothesis. // *J. Ultrastr. Mol. Str. Res.*, 1986, 97, 10.
144. A. Saupe. Recent results in the field of liquid Crystals. // *Chem. Int. Ed. Engl.*, 1968, 7, 97-112.
145. П. де Жен. Физика жидких кристаллов. // Мир, М., 1977.
146. С. Чандрасекар. Жидкие кристаллы. // Мир, М., 1980.
147. А. С. Сонин. Введение в физику жидких кристаллов. // Наука, М., 1983.
148. Ю.М.Евдокимов, В.И.Салянов, С.Г.Скуридин, Э.В.Штыкова, Н.Г.Хлебцов, Е.И.Кац. Физико-химический и нанотехнологический подходы к созданию "твердых" пространственных структур ДНК. // *Успехи химии*, 2015, 84, 27-42.
149. Yu.M.Yevdokimov, V.I.Salyanov, S.V.Semenov, S.G.Skuridin. DNA Liquid-Crystalline Dispersions and Nanoconstructions. // CRC Press (Taylor Francis Group), Boca Raton; London; New York, 2011, 258.
150. J.-L. A. Shin, R.M. Brugger. Gadolinium as a neutron capture therapy agent. // *Med. Phys.* 1992, 19, 733-744.
151. R. F. Martin, G. D'Cunha, M. Pardee, B. J. Allen. Induction of double-strand breaks following neutron capture by DNA-bound  $^{157}\text{Gd}$ . // *Int. J. Radiat. Res.* 1988, 54, 205-208.
152. С.В. Акулиничев, В.М. Скоркин, В.Н. Никифоров, В.И. Салянов, А.И. Евсеев, О.В. Кондрашина, Ю.М. Евдокимов. Новый нанобиоматериал на основе комплекса (ДНК-Gd). Определение концентрации гадолиния в частицах. // *Медицинская физика*, 2006, 3, 64-49.
153. T. Hegmann, H. Qi, V.M. Marx. Nanoparticles in Liquid Crystals: Synthesis,

- Self-Assembly, Defect Formation and Potential Applications. // *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, 2007, 17, 483-508.
154. G.L. Nealon, R. Greget, C. Dominguez, Z.T. Nagy, D. Guillon, J-L. Gallani, B. Donnio. Liquid-crystalline nanoparticles: Hybrid design and mesophase structures. // *Beilstein J. Org. Chem.*, 2012, 8, 349-370.
155. O. Stamatoiu, J. Mirzaei, X. Feng, T. Hegmann. Nanoparticles in liquid crystals and liquid crystalline nanoparticles. // *Top. Curr. Chem.*, 2012, 318, 331-303. doi: 10.1007/128\_2011\_233.
156. K. Quester, M. Avalos-Borja, A.R. Vilchis-Nestor, M.A. Camacho-López, E. Castro-Longoria. SERS Properties of Different Sized and Shaped Gold Nanoparticles Biosynthesized under Different Environmental Conditions by *Neurospora crassa* Extract. // *PLoS ONE*, 2013, 8: e77486. doi:10.1371/journal.pone.0077486
157. Z. Heidari, R. Sariri, M. Salouti. Gold nanorods-bombesin conjugate as a potential targeted imaging agent for detection of breast cancer. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 2014, 130, 40-46.
158. D. Pissuwan, T. Niidome, M.B. Cortie. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems. // *J. Control Release*, 2011, 149, 65-71.
159. S.Y. Clarence. The toxicity of Gold Nanoparticles in relation to their physiochemical properties. // *Biomedical Research*, 2013, 24, 400-413.
160. B. Kang, M.A. Mackey, M.A. El-Sayed. Nuclear Targeting of Gold Nanoparticles in Cancer Cells Induces DNA Damage, Causing Cytokinesis Arrest and Apoptosis. // *J. Am. Chem.Soc.*, 2010, 132, 1517–1519.
161. V. Wiwanitkit, A. Sereemasapun, and R. Rojanathanes. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report. // *Fertil.Steril.*, 2009, 91, e7–e8.
162. M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, E. Helmut, S. Gunter. Cellular Uptake and Toxicity of Au<sub>55</sub> Clusters. // *Small*, 2005, 1, 841–844.
163. Y. Pan, S. Neuss, A. Leifert, et al. Size-Dependent Cytotoxicity of gold

- nanoparticles. // *Small*, 2007, 3, 1941 – 1949.
164. E.Boisselier, D.Astruc. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. // *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 1759–1782.
165. X.D. Zhang, M.L. Guo, H.Y. Wu, et al. Irradiation stability and cytotoxicity of gold nanoparticles for radiotherapy. // *Int. J. Nanomedicine*, 2009, 4, 165–173.
166. D.G. Duff, A. Baiker, P.P. Edwards. A new hydrosol of gold clusters. 1. Formation and particle size variation. // *Langmuir*, 1993, 9, 2301-2309.
167. D.A. Weitz, M.Y. Lin, C.J. Sandroff. Colloidal aggregation revisited: new insights based on fractal structure and surface-enhanced Raman scattering. // *Surf. Sci.*, 1985, 158, 147-164.
168. Z. Zhong, S. Patskovskyy, P. Bouvrette, J.H. T.Luong, A. Gedanken. The surface chemistry of Au colloids and their interactions with functional amino acids. // *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 4046-4052.
169. L. Sun, Z. Zhang, S. Wang, J. Zhang, H. Li, L. Ren, J. Weng, Q. Zhang. Effect of pH on the Interaction of gold nanoparticles with DNA and application in the detection of human p53 gene mutation. // *Nanoscale Res. Lett.*, 2009, 4, 216-220.
170. Y. Liu, W. Meyer-Zaika, S. Franzka, G. Schmid, M. Tsoi, H. Kuhn Gold-cluster degradation by the transition of B-DNA into A-DNA and the formation of nanowires. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003, 42(25), 2853–2857.
171. Жеренкова Л.В., Комаров П.В., Халатур П.Г. Моделирование процесса металлизации фрагмента молекулы дезорибонуклеиновой кислоты наночастицами золота. // *Коллоид. журн.*, 2007, 69(5), 753–765.
172. T.M. Herne, M.J. Tarlov. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. // *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119(38), 8916–8920.
173. D.Y. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L.J. Whitman, M.J. Tarlov. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold. // *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125(17), 5219–5226.
174. W. J. Parak, T. Pellegrino, C. M. Micheel, D. Gerion, S. C. Williams, A. P. Alivisatos. Conformation of oligonucleotides attached to gold nanocrystals probed

- by gel electrophoresis. // *Nano Letters*, 2003, 3(1), 33-36.
175. A.Kira, H.Kim and K. Yasuda. Contribution of nanoscale curvature to number density of immobilized DNA on gold nanoparticles// *Langmuir.*, 2009, 25(3), 1285-1288, doi: 10.1021/la803385x.
176. Ю.М.Евдокимов, В.И.Салянов, Е.И.Кац, С.Г.Скуридин. Кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий двухцепочечных нуклеиновых кислот // *Acta Naturae*, 2012, 4(15), 80-93.
177. С.Г. Скуридин, В.А. Дубинская, В.М. Рудой, О.В. Дементьева, С.Т. Захидов, Т.Л. Маршак, В.А. Кузьмин, В.И. Попенко, Ю.М. Евдокимов. // *Докл. АН*, 2010, 432(6), 838–841.
178. Ю.М. Евдокимов, Э.В. Штыкова, С.Г. Скуридин, В.И. Салянов. Линейные кластеры из наночастиц золота в квазинематических слоях частиц жидкокристаллических дисперсий ДНК. // *Биофизика*, 2013, 58(2), 210-220.
179. Y.M. Yevdokimov, S.G. Skuridin, V.I. Salyanov, V.I. Popenko, E.V. Shtykova, N.G. Khlebtsov, G.A. Shafeev, E.I. Kats. The gold nanoparticles influence double-stranded dann molecules «recognition» and prevent formation of their cholesteric structure. // *Жидкие кристаллы и их практическое использование*, 2014, 14(4), 5-21.
180. С.Т. Захидов, Т.Л. Маршак, Е.А. Малолина, А.Ю. Кулибин, И.А. Зеленина, С.М. Павлюченкова, В.М. Рудой, О.В. Дементьева, С.Г. Скуридин, Ю.М. Евдокимов. // *Наночастицы золота нарушают процесс деконденсации ядерного хроматина в спермиях мышей в условиях in vitro* // *Биол.мембраны*, 2010, 27(4), 349-353.



## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи:

- A1. **L.A. Dadinova**, E.V. Shtykova, P.V. Konarev, E.V. Rodina, N.E. Snalina, N.N. Vorobyeva, S.A. Kurilova, T.I. Nazarova, C.M. Jeffries and D.I. Svergun. X-ray solution scattering study of four *Escherichia coli* enzymes involved in stationary-phase metabolism. // PLoS ONE, 2016, 11(5): e0156105. doi:10.1371/journal.pone.0156105.
- A2. **Л.А. Дадинава**, Е.В. Родина, Н.Н. Воробьева, С.А. Курилова, Т.И. Назарова, Э.В. Штыкова. Структурные исследования дигидролипоилдегидрогеназы из *E. coli* в растворе: малоугловое рентгеновское рассеяние и молекулярный докинг. // Кристаллография, 2016, 61(3), 406-412.
- A3. Ю.М. Евдокимов, С. Г. Скуридин, В. И. Салянов, **Л. А. Дадинава**, О. Н. Компанец, Е. И. Кац. О пространственной организации двухцепочечных молекул ДНК в холестерической жидкокристаллической фазе. // Жидк. крист. и их практич. использ., 2016, 16 (1), 71–82.
- A4. Ю.М. Евдокимов, С.Г. Скуридин, В.И. Салянов, В.В. Волков, **Л.А. Дадинава**, О.Н. Компанец, Е.И. Кац. О пространственной организации двухцепочечных молекул ДНК в холестерической жидкокристаллической фазе и частицах дисперсии этой фазы. // Биофизика, 2015, 60(5), 861–876.
- A5. Yu. M. Yevdokimov, S.G. Skuridin, V.I. Salyanov, E.V. Shtykova, **L.A. Dadinova**, V.V. Volkov, N.G. Khlebtsov, P.V. Komarov. Negatively charged gold nanoparticles “control” double-stranded DNAs spatial packing. // Journal of Materials Science & Nanotechnology, 2015, 1(6), 1-12.
- A6. Ю.М. Евдокимов, С.Г. Скуридин, В.И. Салянов, В.И. Попенко, Э.В. Штыкова, **Л.А. Дадинава**, В.В. Волков, Н.Г. Хлебцов, Б.Н. Хлебцов, Е.И. Кац. Новый нанобиоматериал – частицы жидкокристаллических дисперсий ДНК со встроенными кластерами из наночастиц золота. // Российские нанотехнологии, 2014, 9, 82-89.

## Тезисы докладов

1. **L.A.Dadinova**, E.V.Rodina, N. N. Vorobyeva, V.V.Volkov, E.V.Shtykova. SAXS-derived 3D models of novel bacterial fructose-1,6-bisphosphate aldolase. // 11<sup>th</sup> International Conference Biology and Synchrotron Radiation 2013 (BSR2013), Hamburg, Germany, Sept. 8-11 2013, Book of abstracts, p. 111.
2. E. Shtykova, **L. Dadinova**, V. Volkov, S. Skuridin, Yu. Evdokimov. Linear clusters of gold nanoparticles in quasinematic layers of DNA liquid-crystalline dispersion particles at different temperatures: morphology and structural transition. 11<sup>th</sup> International Conference Biology and Synchrotron Radiation 2013 (BSR2013), Hamburg, Germany, Sept. 8-11, 2013, Book of abstracts, p. 155.
3. **L.A. Dadinova**, E.V. Rodina, N.N. Vorobyeva, E.V. Shtykova. SAXS derived 3D-model of the novel bacterial fructose-1,6-bisphosphate aldolase. // RACIRI Summer school 2013: Advanced Materials Design at X-ray and Neutron Facilities: Soft Matter and Nano Composites, Petergof, Russia, August 17 – 25, 2013, Book of abstracts, p. 28-29.
4. **Л. А. Дадинава**, Е.В.Родина, Н.Н. Воробьева, Э.В. Штыкова. Определение трехмерных структур белков-партнеров PPase и их комплексов как важный шаг к пониманию регуляции. // Международная молодежная научная школа "Современная нейтронография", Объединенный институт ядерных исследований, Дубна, Россия, 28 октября – 1 ноября 2013, Сборник тезисов, с. 29.
5. **Л. А. Дадинава**, Е.В. Родина, Н.Н. Воробьева, Э.В. Штыкова. Малоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании пирофосфатазы в комплексе с белками, участвующими в регуляции метаболизма. // 11-я Курчатовская молодежная научная школа, НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия, 12 – 15 ноября, 2013, Сборник тезисов, с. 106.
6. **L.A. Dadinova**, E.V. Rodina, N.N. Vorobieva, E.V. Shtykova. Complex formation of pyrophosphatase with protein-partners investigated by small-angle X-ray scattering in solution. // 12<sup>th</sup> International School and Symposium on Synchrotron

Radiation in Natural Science (ISSRNS 2014), Warsaw, Poland, June 15 – 20, 2014, Abstracts / Synchrotron Radiation in Natural Science, 13 (1-2), p. 55.

7. **Л. А. Дадина**, Е.В.Родина, Н.Н. Воробьева, С.А. Курилова, Т.И. Назарова, Э.В. Штыкова. Синхротронное рассеяние в исследовании структуры белков-партнеров неорганической пирофосфатазы. // 49 Школа ПИЯФ по физике конденсированного состояния, Санкт-Петербург, г. Зеленогорск, Россия, 16-21 марта, 2015, Сборник тезисов, с. 132.
8. **Л.А. Дадина**, Ю.М. Евдокимов, С.Г. Скуридин, В.И. Саянов, В.В. Волков, Э.В. Штыкова. Маулоугловое рентгеновское рассеяние в исследовании влияния инкорпорированных наночастиц золота на структуру холестерических жидкокристаллических дисперсий ДНК. // VII Российский симпозиум «Белки и Пептиды», Новосибирск, Россия, 12-17 июля 2015, Материалы симпозиума, с. 284.
9. **L. Dadinova**, Yu. Yevdokimov, S. Skuridin, V. Salyanov, V. Volkov, E. Shtykova. Influence of embedded gold nanoparticles on structure of DNA cholesteric liquid-crystalline dispersion revealed by SAXS. // 16<sup>th</sup> International conference on small-angle scattering (SAS-2015), Berlin, Germany, Sept. 12-18, 2015, Book of abstracts, p.108.
10. **L. Dadinova**, E. Rodina, N. Vorobyeva, S. Kurilova, T. Nazarova, P. Konarev, E. Shtykova. // Structure of inorganic pyrophosphatase and of its protein partners in solution studied by SAXS. 16<sup>th</sup> International conference on small-angle scattering (SAS-2015), Berlin, Germany, Sept. 12-18, 2015, Book of abstracts, p. 156.