

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи

Дьякова Юлия Алексеевна

САМООРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
КРИСТАЛЛОВ И ПЛЕНОК

01.04.18 – кристаллография, физика кристаллов

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Научный консультант:

член-корреспондент РАН, профессор,

доктор физико-математических наук

Ковальчук Михаил Валентинович

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. Обзор литературы	17
1.1.Аннотация к Главе 1	17
1.2.Белки и СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ.....	19
1.2.1. Белки и их функции	19
1.2.2. Исследования структуры белков.....	23
<i>Белковая кристаллография</i>	<i>27</i>
<i>Серийная рентгеновская кристаллография</i>	<i>30</i>
<i>ЯМР-спектроскопия</i>	<i>31</i>
<i>Электронная микроскопия (ЭМ), крио-ЭМ</i>	<i>33</i>
1.2.3. Генная инженерия белков	37
1.2.4. Драг-дизайн на основе структуры мишени.....	40
1.2.5. Гибридные системы.....	43
1.3.КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ.....	47
1.3.1. Проблемы кристаллизации белков.....	47
1.3.2. Методы кристаллизации белков.....	55
1.4.ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ И РОСТА КРИСТАЛЛА БЕЛКА НА ПРИМЕРЕ ЛИЗОЦИМА	60
1.4.1. Исследования растворов лизоцима. Процессы агрегации и кристаллизации	62
1.4.2. Исследования процесса роста кристалла лизоцима	69
1.5.ПОЛУЧЕНИЕ ПЛЕНОК И ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ	77
1.5.1. Методы получения.....	77
<i>Адсорбция на границах раздела</i>	<i>77</i>
<i>Технология Ленгмюра-Блоджетт.....</i>	<i>79</i>
<i>Методы: послойное формирование; самоорганизующиеся монослои; иммобилизация, основанная на ковалентном связывании</i>	<i>82</i>
1.5.2. Исследования структуры органических пленок	85
<i>Рентгеновская рефлектометрия</i>	<i>85</i>
<i>Стоячие рентгеновские волны, CPV в ПВО.....</i>	<i>88</i>
<i>Исследование тонких пленок и монослоев на основе белка лизоцима</i>	<i>92</i>

1.6.ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 1	96
ГЛАВА 2. Методы и подходы к исследованию взаимодействия белков в растворах и тонких пленках	99
2.1.Аннотация к ГЛАВЕ 2	99
2.2.КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ, КРИСТАЛЛОВ И ТОНКИХ ПЛЕНОК	101
2.3.МАТЕРИАЛЫ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ РАСТВОРОВ – ЛИЗОЦИМ, ПРОТЕИНАЗА К, ТЕРМОЛИЗИН	103
2.4.МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ	107
2.4.1. Малоугловое рассеяние рентгеновского излучения и нейтронов	107
<i>Метод МУРР/МУРН</i>	<i>108</i>
<i>Дифрактометр АМУР-К.....</i>	<i>114</i>
<i>Синхротронная станция ДИКСИ.....</i>	<i>116</i>
<i>Синхротронная станция БиомУР</i>	<i>120</i>
<i>Синхротронная станция BM29 BioSAXS.....</i>	<i>122</i>
<i>Станция ЮМО, нейтронный реактор ИБР-2</i>	<i>124</i>
<i>Анализ экспериментальных данных МУРР/МУРН.....</i>	<i>125</i>
2.4.2. Динамическое рассеяние света.....	128
2.4.3. Молекулярная динамика	131
2.5.ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ОКРУЖЕНИЯ ОБРАЗЦА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ СИСТЕМ В НАТИВНОМ СОСТОЯНИИ	135
2.6.АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВЫХ КРИСТАЛЛОВ.....	141
2.6.1. Получение кристаллов белков.....	141
2.6.2. Белковая кристаллография. Станции СИ «БЕЛОК», «РСА» (КИСИ-Курчатов).....	145
2.7.ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ СЛАБОУПОРЯДОЧЕННЫХ СИСТЕМ	150
2.7.1. Ленгмюровская технология получения органических пленок	151
<i>ЛБ-технология. Метод ЛШ. π/А-изотерма</i>	<i>151</i>
<i>Создание белково-липидных монослоев как моделей клеточных мембран</i>	<i>156</i>
<i>Получение монослоев лизоцима с осадителем</i>	<i>162</i>

2.7.2. Методики исследования структуры планарных белковых систем на основе методов СРВ в ПВО, рентгеновская рефлектометрия, АСМ	165
<i>Дифрактометр SmartLab Rigaku</i>	166
<i>Синхротронная станция РКФМ</i>	168
<i>Синхротронная станция «Ленгмюр»</i>	170
<i>Атомно-силовая микроскопия</i>	173
2.8.ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 2	174
ГЛАВА 3. Определение структуры растворов в условиях кристаллизации на примере белка лизоцима, выявление механизма влияния термодинамических параметров на процесс кристаллизации	177
3.1.Аннотация к ГЛАВЕ 3	177
3.2.ОБ ОБРАЗОВАНИИ «ЕДИНИЦ РОСТА» КРИСТАЛЛА В КРИСТАЛЛИЗАЦИОННОМ РАСТВОРЕ БЕЛКА. МОДЕЛИРОВАНИЕ ОЛИГОМЕРОВ	178
3.3.ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ В РАСТВОРЕ. СОСТАВ КРИСТАЛЛИЗАЦИОННОГО РАСТВОРА ЛИЗОЦИМА	182
3.3.1. Предварительные исследования МУРР / АМУР-К	182
3.3.2. Исследования МУРР / ДИКСИ.....	187
3.3.3. Олигомерный состав кристаллизационного раствора	194
3.4.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ДОЛИ ОКТАМЕРОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА И ТЕМПЕРАТУРЫ	196
3.4.1. Зависимость в H ₂ O. Исследования методом МУРР	197
3.4.2. Зависимость в D ₂ O. Исследования методом МУРН.....	204
3.4.3. Влияние замены H ₂ O на D ₂ O. Исследования методом МУРР. Сравнение результатов	217
3.5.ЗАВИСИМОСТЬ ДОЛИ ОКТАМЕРОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ОСАДИТЕЛЯ NaCl ...	225
3.6.ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ОЛИГОМЕРОВ БЕЛКА ЛИЗОЦИМА В РАСТВОРАХ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ОКТАМЕРА	226
3.7.НОВЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ УСЛОВИЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ.....	230

3.8.ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 3	231
ГЛАВА 4. Определение роли ионов осадителя в механизме кристаллизации белков по результатам исследований структуры растворов, кристаллов лизоцима и моделирования молекулярной динамики.....	234
4.1.Аннотация к Главе 4	234
4.2.ЗАВИСИМОСТЬ ДОЛИ ОКТАМЕРОВ И ДИМЕРОВ ОТ КАТИОНА ОСАДИТЕЛЯ	235
4.3.ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ (МЕТАЛЛОВ И ХЛОРА) С МОЛЕКУЛАМИ ЛИЗОЦИМА И ИХ РОЛЬ В ОБРАЗОВАНИИ КРИСТАЛЛА ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ	245
4.4.МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ОЛИГОМЕРОВ В РАСТВОРЕ ЛИЗОЦИМА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ NaCl В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ	267
4.5.ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 4	277
ГЛАВА 5. Формирование ленгмюровских пленок на основе растворов лизоцима в условиях кристаллизации	280
5.1.Аннотация к Главе 5	280
5.2.МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ОСАДИТЕЛЯ С БЕЛКАМИ.....	281
5.2.1. Получение ленгмюровских пленок лизоцима	281
5.2.2. Определение толщины пленок лизоцима методом рентгеновской рефлектометрии.....	284
5.2.3. Определение толщин пленок лизоцима методом атомно-силовой микроскопии	287
5.2.4. Результаты исследования пленки лизоцима с добавлением NaCl методом СРВ в ПВО	289
5.3.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛЕНКИ ЛИЗОЦИМА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ KI	295
5.4.РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОНОСЛОЯ ЛИЗОЦИМА С ДОБАВЛЕНИЕМ	

ОСАДИТЕЛЯ <i>KCl</i> НА ПОВЕРХНОСТИ ВОДЫ	301
5.5.ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 5	312
ГЛАВА 6. Структура предкристаллизационной фазы для белков	
Протеиназа К и Термолизин	314
6.1.Аннотация к Главе 6	314
6.2.БЕЛОК ПРОТЕИНАЗА К.....	314
6.2.1. Моделирование структуры олигомеров протеиназы К	316
6.2.2. Образование димеров в кристаллизационном растворе протеиназы К	317
6.2.3. Моделирование механизма роста кристалла протеиназы К	322
6.3.БЕЛОК ТЕРМОЛИЗИН	325
6.3.1. Моделирование структуры олигомеров термолизина	327
6.3.2. Олигомеры в кристаллизационных растворах термолизина при различных условиях.....	329
6.4.ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 6	341
ВЫВОДЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ	343
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	346
Благодарности	351
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	352

ВВЕДЕНИЕ

Особенностью живых организмов является то, что их жизненный цикл, функционирование полностью основаны на взаимодействии друг с другом и с внешними факторами (температура, электромагнитное излучение, звук, ионы, малые молекулы и макромолекулы, гравитация и др.) биологических молекул, из которых они состоят. Хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов выполняют ДНК и РНК, которые содержат информацию о структуре белков и обеспечивают их синтез. Если в ДНК содержится «программный код», то основной функциональной молекулой в организме является молекула белка, которая представляет собой наномашину, способную обеспечивать перенос заряда, веществ или сигнала, выполнять функции датчика, хранить вещества и многое другое.

Белки играют ключевую роль во всех жизненно важных физиологических процессах организмов: функционировании органов чувств, метаболизме клеток, передаче информации, формировании иммунного ответа, а также являются строительным материалом клетки и пр.

Функционирование белковых молекул основано на их специфическом взаимодействии с субстратом (от молекул воды и ионов до макромолекул – белков, ДНК, РНК и пр.), детерминированном их трехмерной структурой и реализующимся по принципу «ключ-замок» [1]. Даже небольшие вариации структуры белков, вызванные как мутациями в самой полипептидной цепи, так и изменением ее пространственного строения, обусловленного взаимодействием с молекулярным и ионным окружением, ведут к резкому изменению активности и функционала.

Таким образом, знание механизмов взаимодействия белков с компонентами растворов крайне важно для понимания функционирования белков в нативной среде, а также разработки технологий использования белков как функциональных элементов природоподобных технических систем.

Сегодня знание трехмерной структуры белков и их комплексов с целевыми молекулами не только имеет фундаментальное значение для исследования механизмов функционирования живых организмов и вирусов, но и уже является неотъемлемой частью технологических процессов - дизайна и ускоренной разработки терапевтических препаратов и диагностических систем, технологий для сельского хозяйства и промышленной биотехнологии, биоэнергетики; а также новых биоподобных материалов.

В настоящее время наиболее эффективным методом определения трехмерной структуры биомолекул с высоким разрешением является метод рентгеноструктурного анализа (РСА) - более 85% структур в международной базе данных. При этом доля белков, для которых определена трехмерная структура, составляет проценты от количества известных белков.

Метод РСА основан на получении дифракционной картины от кристалла белка. С развитием технологий генерации синхротронного излучения - появлением источников 4-ого поколения и рентгеновских лазеров на свободных электронах, требования к размеру кристалла снижаются. Для определения структуры макромолекулы с атомарным разрешением достаточно получить кристаллы субмикронного размера.

Основным «узким» местом определения структуры белков методом РСА остается поиск условий кристаллизации, необходимый даже для получения нанокристаллов, который сегодня производится методом проб и ошибок. При этом для оценки результата - образования кристалла может потребоваться от нескольких часов до нескольких месяцев. Нерешенным также остается вопрос соответствия структуры белков и их комплексов с молекулами субстрата в физиологических условиях функционирования, структуре белков в кристалле.

Решение вышеуказанных проблем требует разработки новых методов и подходов к исследованию взаимодействия белковых молекул и механизмов их самоорганизации в упорядоченные системы.

Такие подходы и методы должны обеспечить определение с высоким пространственным разрешением структуры не только кристаллов, но и

слабоупорядоченных систем, включая растворы, в условиях, максимально приближенных к естественным.

Для эффективного решения данной задачи необходимо применение комплекса взаимодополняющих современных экспериментальных методик определения структуры белков и их комплексов в нативном состоянии с атомарной точностью – синхротронные и нейтронные методы исследования структуры, молекулярное моделирование и пр.

Таким образом, знание фундаментальных основ взаимодействия белковых молекул и механизмов их самоорганизации в упорядоченные системы, основанное на применении вышеуказанного инструментария, необходимо как для решения технологических задач сегодняшнего дня – ускоренного дизайна лекарственных препаратов и методов диагностики, разработки новых биотехнологий, подходов к обеспечению биобезопасности, так и для формирования базиса, необходимого для создания принципиально новых природоподобных технологий.

Цель работы: установить фундаментальные закономерности взаимодействия белковых молекул и их самоорганизации при формировании упорядоченных систем на основе применения нового подхода к многомасштабному исследованию механизмов организации и структуры белковых систем в растворах, основанного на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования.

В соответствии с поставленной целью в работе решались **следующие задачи:**

1. Экспериментальная верификация гипотезы о том, что в процессе кристаллизации формируется промежуточная фаза из специфических 3D-фрагментов структуры кристалла белка в кристаллизационном растворе;
2. Разработка подходов, выбор и адаптация экспериментальных и вычислительных методов для изучения самоорганизации белковых молекул в упорядоченные системы, включая разработку методик и измерительных ячеек для обеспечения исследования структуры и ее динамики растворов, пленок и

кристаллов с применением синхротронных и нейтронных методов, а также вычислительного эксперимента и моделированию взаимодействия белковых молекул;

3. Установление термодинамических параметров образования промежуточной фазы из упорядоченных олигомеров на всех стадиях образования упорядоченных белковых систем в широком диапазоне условий на примере лизоцима;

4. Определение роли ионов осадителя и механизмов взаимодействия белковых молекул лизоцима при самоорганизации в кристаллическую структуру;

5. Определение особенностей структуры и динамики промежуточной фазы в ленгмюровских монослоях и пленках;

6. Экспериментальное подтверждение выявленных принципов самоорганизации белковых молекул в кристалл для других белков: протеиназы К и термолизина.

Научная новизна работы

В работе впервые:

- экспериментально подтверждена и уточнена гипотеза о механизмах формирования белковых кристаллов: зарождению и росту кристалла предшествует образование в растворе его строительных элементов – олигомеров определенного типа – 3D-фрагментов кристаллической структуры исследуемого белка;

- для широкого диапазона условий установлено, что при кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии в растворе кроме мономеров присутствуют только димеры и октамеры;

- определены термодинамические параметры промежуточной фазы кристаллизации лизоцима. Показано, что количество октамеров (элементов будущего кристалла) растет при понижении температуры, повышении концентрации белка и осадителя, а также при замене протонированной воды на дейтерированную;

- выявлены особенности расположения ионов осадителя (хлоридов Li, Na, K, Ni, Cu) в кристаллах лизоцима и его строительных элементах (октамерах и димерах) в растворе. Смоделировано влияние ионов, связанных с молекулами белка на стабильность октамеров и димеров;

- определена структура ленгмюровских слоев, сформированных из кристаллизационного раствора лизоцима, определены принципы взаимодействия таких монослоев с ионами осадителя на границе раздела с водной субфазой. Показана термодинамическая стабильность связи между слоем белковых олигомеров и слоями ионов осадителя (не происходит существенной диффузии ионов осадителя в объем деионизованной воды как минимум в течение суток);

- экспериментально подтверждено предположение о механизме формирования упорядоченных белковых систем, включающем образование промежуточной фазы, на примере других (кроме лизоцима) водорастворимых белков протеиназы К и термолизина.

Базовый инструментарий получения вышеуказанных результатов составил разработанный новый комплексный подход к исследованию структуры и механизмов формирования белковых систем, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования. Разработанный и созданный в рамках работы инструментарий включает:

- измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре специализированные измерительные ячейки, позволяющий проводить исследования с применением рентгеновского и синхротронного излучения, а также оптических методов;

- новый подход к анализу данных по исследованию промежуточной фазы кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов, основанный на использовании моделей олигомеров – элементов кристалла для обработки экспериментальных кривых рассеяния;

- новый подход к моделированию механизмов формирования кристаллов, основанный на проведении методом молекулярной динамики вычислительного эксперимента по определению стабильности белковых комплексов с определенной структурой, представляющих собой элемент белкового кристалла, при различных условиях, а также подход к исследованию роли ионов осадителя в образовании и стабильности таких комплексов;

- новый подход к исследованию роли осадителя и механизмов взаимодействия белковых молекул с ионами осадителя при формировании кристаллов, основанный на анализе расположения ионов в кристалле белка, структура которого была решена с высоким разрешением;

- новый подход к формированию упорядоченных белковых пленок и исследованию роли ионов осадителя в формировании планарных белковых систем.

Практическая значимость работы

Полученные в работе фундаментальные знания о механизмах самоорганизации белковых молекул позволят разработать принципиально новые подходы к управляемому получению белковых кристаллов и упорядоченных систем.

На основе полученных в работе фундаментальных результатов по изучению процессов самоорганизации белков предложен новый подход к формированию упорядоченных белковых пленок, как основы для создания биоподобных устройств – как биосенсоров (основанных на биохимических процессах в живых организмах), так и элементов биоэлектроники, принцип действия которых приближен к нервной системе.

Предложенный в работе метода ускоренного подбора условий кристаллизации и полученные результаты, составляют основу для формирования технологических процессов дизайна и создания новых лекарственных средств, а также ферментов и других макромолекул для

сельского хозяйства, промышленной биотехнологии, создания новых материалов.

Предложенный в работе новый комплексный подход, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов, а также молекулярного моделирования, к исследованию механизмов формирования упорядоченных белковых систем позволит сформировать методическую базу метрологии принципиально новых природоподобных технологических процессов.

Разработанный инструментарий и результаты диссертационной работы доведены до уровня, позволяющего использовать их в практике проектных и технологических организаций.

Личный вклад диссертанта

Все результаты, представленные в работе, получены лично автором или при ее непосредственном участии.

Автор непосредственно принимала участие в разработке и изготовлении всех элементов измерительного комплекса, включая создание специальных измерительных ячеек и разработку экспериментальных методик.

Автор лично принимала участие в изготовлении всех изученных образцов – растворов, кристаллов, пленок, а также их исследованию оптическими методами и методом атомно-силовой микроскопии.

Автор непосредственно участвовала в проведении рентгеновских экспериментов в лабораторных условиях и на источнике нейтронов и источниках синхротронного излучения методами малоуглового рассеяния, рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, рентгеноструктурного анализа и обработке полученных данных. Автор принимала участие в работах по моделированию молекул, их комплексов, а также проведении численных экспериментов методом молекулярной динамики.

Обсуждение результатов и их интерпретация проводились совместно с научным консультантом и соавторами публикаций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Подтверждение гипотезы об образовании в белковом растворе при кристаллизации промежуточной фазы, включающей олигомеры строго определенного типа представляющих собой кластеры-прекурсоры, из которых впоследствии строится соответствующий кристалл (фрагменты будущей кристаллической структуры). При кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии кластеры-прекурсоры, образующиеся в растворе, представляют собой октамеры, для протеиназы К и термолизина – димеры и гексамеры, соответственно.

2. Термодинамика образования олигомеров в кристаллизационном растворе: рост концентрации октамеров и димеров лизоцима при увеличении концентраций белка и осадителя, уменьшении температуры, а также при замене обычной воды на тяжелую в качестве растворителя.

3. Новый комплексный подход, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов, а также молекулярного моделирования, к исследованию механизмов формирования упорядоченных белковых систем.

4. Роль ионов осадителя при кристаллизации белка: увеличение концентрации октамеров в кристаллизационных растворах лизоцима с хлоридами в качестве осадителя при изменении катиона в соответствии с лиотропными рядами: $Co > Ni > Cu$; $K > Na > Li$; положение ионов осадителей ($LiCl$, $NaCl$, KCl , $NiCl_2$, $CuCl_2$) в структуре кристалла, а также результаты моделирования поведения белковых молекул и олигомеров в кристаллизационном растворе с учетом образования их связи с ионами указанных осадителей.

5. Структура стабильной многослойной системы (октамеры лизоцима/катион/анион), сформированной из кристаллизационных растворов лизоцима, на поверхности ленгмюровской ванны, а также при ее переносе на подложку.

6. Образование в кристаллизационном растворе лизоцима новой фазы, состоящей из мономеров, димеров и октамеров лизоцима, включающих

ионы осадителя, связанные с молекулами белка определенным образом, подтверждённое результатами исследования структуры растворов лизоцима методами МУРР и МУРН, определения структуры кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии (включая позиции ионов осадителя в кристалле), а также численного моделирования и исследования структуры ленгмюровских пленок, сформированных из кристаллизационных растворов, методом СРВ в ПВО.

Апробация работы

Результаты работы были представлены в виде приглашенных, устных и стендовых докладов на международных и российских научных конференциях. Основные мероприятия, на которых представлялись результаты работы:

VIII Международная конференция «Фотоника и информационная оптика» (23 – 25 января 2019, Москва, Россия); International conference and satellite school «Biomembranes 2018» (1 – 5 октября 2018, Долгопрудный, Россия); 14th Biennial Conference of High-Resolution X-ray Diffraction and Imaging (ХТОР-2018) (3 – 7 сентября 2018, Бари, Италия); VII Международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий» (16 – 21 апреля 2018, Москва, Россия).; V международная молодёжная летняя школа RACIRI-2017 (19 – 26 августа 2017, Роннебю, Швеция); ECS4 - 4th European Crystallography School (2 – 7 июля 2017, Варшава, Польша); International Conference on Electron, Positron, Neutron and X-Ray Scattering under the External Influences (16 – 22 октября 2017, Ереван, Армения); Совещание пользователей Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований (20 – 23 ноября 2017, Москва, Россия); 24th Congress & General Assembly of the International Union of Crystallography (21 – 27 августа 2017, Хайдарабад, Индия); Семинар BioSoft: The future of biology and soft matter research on reactor PIK (14 – 16 мая 2017, Петергоф, Россия); 30th Meeting of the European Crystallographic Association (28 августа – 1 сентября 2016, Базель, Швейцария); Первый Российский кристаллографический конгресс (21 – 26

ноября 2016, Москва, Россия); IV международная молодёжная летняя школа RACIRI-2016 (21 – 28 августа 2016, Репино, Санкт-Петербург, Россия); Восьмой международный научный семинар и шестая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики» (22 июня – 2 июля 2016, Великий Новгород, Россия); XIII Курчатовская молодежная научная школа (27 – 30 октября 2015, Москва, Россия); Седьмой международный научный семинар и пятая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики» (24 – 30 августа 2015, Великий Новгород, Россия); Международная летняя школа для молодых ученых «Исследования материалов с высоким разрешением: основы и приложения» (RACIRI-2015) (22 – 28 августа 2015, Зеллин, Германия); V Международная конференция «Фотоника и информационная оптика» (3 – 5 февраля 2015, Москва, Россия); Совещание российских пользователей источников синхротронного и нейтронного излучений (2 – 3 июля 2015, Москва, Россия); Совещание по использованию рассеяния нейтронов и синхротронного излучения в конденсированных средах (27 – 31 октября 2014, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Россия); 12th Biennial Conference on High-Resolution X-Ray Diffraction and Imaging (ХТОР 2014) (14 – 19 сентября, 2014, Гренобль и Виллар-де-Ланс, Франция); VIII международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация как форма самоорганизации вещества» (24 – 27 июня 2014, Иваново, Россия).

Публикации: По результатам исследований, включенным в диссертацию, имеется более 40 публикаций, из которых 19 статей опубликованы в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК.

Структура и объем диссертации: Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 403 страницы, включая 133 рисунка, 30 таблиц и список литературы из 505 наименований.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. АННОТАЦИЯ К ГЛАВЕ 1

В настоящей главе представлен обзор работ, посвященных описанию задач структурной биологии (Раздел 1.2), методов и подходов к исследованию структуры макромолекул с атомарным разрешением (Разделы 1.2.2, 1.3), а также работ, посвященных исследованию взаимодействия белковых молекул в растворах на начальной стадии кристаллизации (Раздел 1.4).

В Разделе 1.4 приводится описание результатов исследований, посвященных влиянию температуры, концентрации белка и осадителя, добавления различных ионов на процесс кристаллизации белковых молекул, и проведенных с целью изучения механизмов кристаллизации, что представляется актуальным как с точки зрения разработки методики осознанного (прогнозируемого) поиска параметров и условий кристаллизации, так и разработки новых методов кристаллизации.

Ранее разными авторами было показано, что добавление осадителя к раствору белка приводит к увеличению среднего радиуса частиц, сформированных из молекул белка, в растворе [2 – 4]. При этом структура указанных частиц и механизм их образования установлены не были. Было сделано несколько предположений об их структуре, которые не нашли однозначного экспериментального подтверждения.

Большая часть работ, направленных на исследование механизмов начальной стадии кристаллизации, была выполнена с использованием лизоцима из куриного яйца (Hen Egg-White Lysozyme, HEWL) [5]. В связи с этим большая часть исследований в настоящей работе была проведена с использованием лизоцима в качестве модельного белка.

На процесс кристаллизации оказывают влияние не только параметры белкового раствора, но и окружение белка в том случае, если оно имеет, например, наноструктурированную поверхность. Таким образом, важно не только исследовать и описывать феноменологические изменения в растворе

белков при кристаллизации, но и описать механизм кристаллизации с использованием квантово-механической модели. Это позволит целенаправленно и осознанно разработать принципиально новые методы получения упорядоченных белковых систем. В работе в качестве одного из таких подходов – исследования влияния окружения раствора на процесс организации упорядоченных белковых систем – было реализовано получение белковых пленок с использованием ленгмюровской технологии (как в ленгмюровской ванне на жидкости, так и при переносе на подложку).

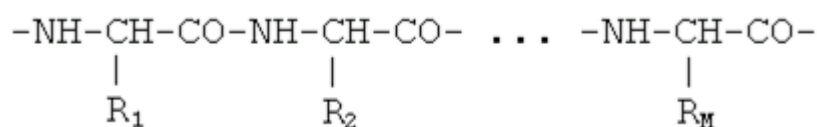
В Разделе 1.5 дан обзор работ, посвященных методам получения упорядоченных белковых пленок и исследованию их структуры. При этом особое внимание уделено работам, посвященным получению ленгмюровских монослоев и исследованию их структуры рентгеновскими методами.

1.2. БЕЛКИ И СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ

1.2.1. Белки и их функции

Белки выполняют большинство задач, необходимых для поддержания жизнеспособности клеток, обеспечивают процессы метаболизма, воспроизводства клеток, передачи информации, а также являются оружием и строительным материалом клетки.

Молекула белка представляет собой полимер, состоящий из аминокислотных остатков, так называемую полипептидную цепь. «Белковая цепь имеет уникальную последовательность звеньев – аминокислотных остатков. Эта цепь имеет химически регулярный остов (главную цепь), от которого отходят разнообразные боковые группы аминокислот – радикалы R_1 , R_2 , ..., R_M .



Существует 20 основных аминокислотных остатков. Их положение в белковой цепи кодируется генами. Однако последующая модификация белка иногда увеличивает разнообразие аминокислот. Кроме того, в некоторые белки включаются разные кофакторы – малые молекулы, ионы, сахара, нуклеотиды, фрагменты нуклеиновых кислот и т.д. В ряде случаев они ковалентно присоединяются к определенным точкам цепи белка, но зачастую и просто специфически «прилипают» к белку» [1], (Лекция 1).

Цепь белка в его функциональном состоянии свернута строго заданным образом. Заданная определенность строения белковых молекул фактически впервые была доказана при получении кристаллов гемоглобина, поскольку в кристаллах каждый атом каждой молекулы имеет «свое место», свои координаты.

Белки могут «жить» в различном окружении, что явным образом отражается на их структуре: «Например, чем меньше воды вокруг белка, – тем

невосполнимее разрыв мощных водородных связей, стягивающих его цепь, тем ценнее для белка эти связи (а именно они крепят структуру остова белковой молекулы), тем регулярнее вынуждена быть стабильная структура белка» [1].

Таким образом, по «жизненным условиям» и соответствующему типу структуры белки можно разделить на три класса: *фибриллярные, мембранные и водорастворимые*.

«Фибриллярные белки образуют огромные агрегаты; их структура высоко регулярна и поддерживается в основном взаимодействиями между разными цепями.

Мембранные белки «живут» в мембране, где нет воды, но части их выступают из мембраны в воду. Внутримембранные части таких белков – как и фибриллярные белки – высоко регулярны и прошиты водородными связями, но размер этих регулярных частей ограничен толщиной мембраны.

Водорастворимые, живущие в воде глобулярные белки наименее регулярны (особенно небольшие); их структура держится взаимодействиями белковой цепи с самой собой, причем особенно важны взаимодействия далеких по цепи, но сблизившихся в пространстве углеводородных (гидрофобных) групп, а также взаимодействиями белковой цепи с кофакторами» [1].

Приведенное деление очень грубо, поскольку, зачастую, белок может состоять из глобулярной «головки» и фибриллярного «хвоста» (например, миозин [6]) и т.д.

Функции молекул белка напрямую зависят от их трехмерной структуры. В связи с чем, изучение структуры белков является ключевым звеном, как в изучении функционирования биологических макромолекул, так и в создании белков с заданными свойствами для различных приложений биотехнологий и медицины, разработки гибридных органо-неорганических систем, в том числе, для создания новых устройств микро- и наноэлектроники.

Действие всех лекарственных препаратов основано на взаимодействии лекарства с биологическими макромолекулами, поэтому разработка лекарственных препаратов требует исследования структуры молекулы-мишени, моделирование молекулы-лекарства, исследования структуры молекулы-мишени, связанной с молекулой-лекарством. Знание пространственной структуры белка позволяет моделировать низкомолекулярные соединения, которые идеально стерически подходят к молекуле и использовать их в качестве высокоэффективных ингибиторов (либо активаторов), делая эти соединения прекурсорами лекарственных препаратов.

Кроме фармацевтики исследования структуры белков важны для развития средств защиты сельскохозяйственных культур, развития биотехнологий (как определения структуры ферментов, так и развития новых технологий, позволяющих существенно ускорить разработку промышленных микроорганизмов, обладающих наибольшей эффективностью).

Исследования структуры макромолекул необходимы для развития технологий геномного редактирования, разработки принципиально новых средств диагностики заболеваний человека, животных, растений. Еще одна область применения – разработка методов хранения продуктов питания на основе исследования воздействия внешних условий на их молекулярный состав, разработка средств стерилизации продукции.

Таким образом, развитие методов ускоренного определения структуры биологических молекул является одним из необходимых условий для обеспечения лидерства в области развития природоподобных технологий:

- знания о структуре макромолекул важны для разработки гибридных устройств, биосенсоров, систем биокомпьютинга, мемристоров и других устройств, в которых функциональным элементом являются биомолекулы;
- результаты исследований потенциально интересны для промышленности: фармацевтики, медицины, сельского хозяйства, биотехнологий и др.

Полагается, что в человеческом организме существуют не менее 20 000 белков, выполняющих различные функции [7]. Белки, так же, можно разделить по биологическим функциям, которые чрезвычайно многообразны.

Белки, обеспечивающие возможность клетки передвигаться или изменять форму, образуют группу *сократительных и двигательных белков*. К их числу относятся, например, актин и миозин, участвующие в сокращении мышц [6, 8], эластомерный белок ризелин [9]. Механические свойства ризелина позволяют некоторым насекомым совершать прыжки на расстояния, значительно превышающие их собственный размер.

Структурные белки – другой важный класс белков, к которому относятся белки, придающие прочность биологическим объектам, например, фибриллярный белок коллаген [10]. Также, к ним относятся защитные белки, антитела, регуляторные (рецепторные) белки, участвующие в регуляции клеточной, физиологической активности, некоторая часть гормонов человека и другие.

Особый интерес представляют *сигнальные белки*, к которым относятся *цитокины* [11 – 14] и *транспортные белки*, к числу которых относится, например, гемоглобин, связывающий кислород и доставляющий его к периферическим тканям [15], а также *белки, транспортирующие липиды* [16].

Один из интересных объектов изучения является белок гликолипидного транспорта человека, который наряду с белком HET-C2, FAPP2 и CERT переносит гликолипиды от мембраны к мембране [17]. Изучение путей регуляции его работы может иметь практическое значение, т.к. нарушение трафика гликосфинголипидов приводит к различным нейродегенеративным заболеваниям.

Самый многообразный и наиболее высокоспециализированный класс составляют белки, которые обладают каталитической активностью, так называемые ферменты (или энзимы) [18 – 20].

1.2.2. Исследования структуры белков

Благодаря открытию в начале XX века возможностей рентгеновского излучения кристаллография в настоящее время играет важнейшую роль в развитии современной структурной биологии. К наиболее эффективным и широко распространенным методам изучения структуры биологических макромолекул и систем на их основе относится рентгеноструктурный анализ (РСА).

Активно применять метод РСА в исследованиях структуры белка начали в 1930 – 40-х гг.

- 1934 г. – Первую рентгенограмму белкового кристалла, *пепсина* (одного из протеолитических ферментов), закристаллизованного в 1929 г. американским биохимиком Джоном Нортропом, получили британские ученые Джон Бернал и Дороти Ходжкин [21, 22];

- 1941 г. – Первая рентгенограмма ДНК (Уильям Эстбери) [23, 24]; 1953 – предложена модель двойной спирали ДНК.

- 1958 г. – Расшифрованы первые структуры глобулярных белков — миоглобина и гемоглобина (Джон Кендрию [25 – 29], Макс Перутц [30 – 34]).

В Советском Союзе огромный вклад в кристаллографию вообще и разработку метода РСА в частности внес академик Борис Константинович Вайнштейн, многие годы возглавлявший Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова АН СССР. В его лаборатории работы по кристаллографии биомacroмолекул были инициированы еще в 50-х годах XX в. [35 – 41], впервые получены кристаллы ряда важнейших белков и изучена их атомная структура. Под его руководством расшифрованы структуры леггемоглобина (1975 г.) – кислородсвязывающего белка растений (Protein Data Bank: <https://www.rcsb.org/>; PDB ID: 1LH1–3, 1LH5–7, 2LH1–3, 2LH5–7 [42]), аспаргатаминотрансферазы (1978 г.) – фермента, широко используемого в медицинской практике для лабораторной диагностики, и каталазы (1981 г.) – белка с рекордным на то время молекулярным весом более 200 кДа (PDB ID: 1HBZ [43], 2XF2, 1GWH, 1GWF, 1GWE). Для своего

времени это были достижения высшего мирового уровня. Его же лаборатория стала одним из пионеров применения метода РСА к изучению таких крупных биологических объектов, как вирусы.

Школа Вайнштейна заложила прочный фундамент развития структурной биологии и оказала решающее влияние на становление РСА биомакромолекул в нашей стране. Отдел белковой кристаллографии в Институте кристаллографии (ИК РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) остается одним из лидеров соответствующих исследований, а ученики и последователи Бориса Вайнштейна ныне активно работают в НИЦ «Курчатовский институт» и учреждениях РАН — Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Институте белка, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институте биохимии им. А.Н. Баха.

Значителен вклад российской научной школы и в становление другого направления в использовании рентгеновского излучения для изучения макромолекул — малоуглового рентгеновского рассеяния. Работы Льва Абрамовича Фейгина (ИК РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) и его ученика Дмитрия Свергуна заложили теоретические основы метода, позволили значительно расширить его применение [44].

Кристаллизация белков и установление их структуры является одним из перспективных и весьма актуальных направлений современной биологии, медицины и генетики. В настоящее время лаборатории разных стран мира занимаются либо исключительно кристаллизацией и установлением структур белков, либо используют рентгеноструктурный анализ в качестве дополнения и доказательства правильности тех или иных теорий и моделей, основанных на биохимических данных [45].

Знания о расположении атомов и работе активных центров лежат в основе всей современной молекулярной биологии и протеомики, необходимы в драг-дизайне, белковой и генной инженерии [46] (Разделы 1.2.3, 1.2.4).

Тысячи структур публикуются каждый год в престижных биологических журналах мира и депонируются в открытую компьютерную базу белковых данных (Protein Data Bank, PDB, <https://www.rcsb.org/>) (Рис. 1.1). За последние несколько лет это направление значительно прогрессировало и к началу 2021 года в PDB насчитывалось более 175000 структур биологических макромолекул.

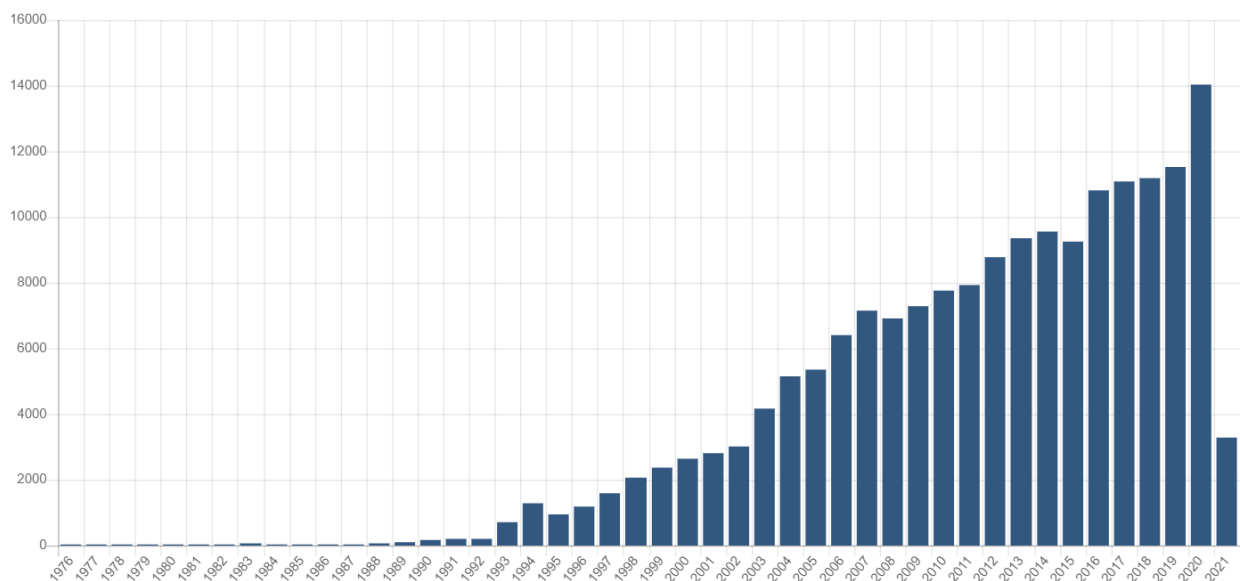


Рис. 1.1 – Статистика PDB¹: общий рост депонированных структур в год.

Под руководством Михаила Валентиновича Ковальчука В НИЦ «Курчатовский институт» было создано специализированное подразделение – Центр Нано-, Био-, Информационных, Когнитивных, Социогуманитарных наук и Природоподобных Технологий (НБИКС-ПТ). «Цель его создания – формирование инфраструктурной базы для конвергентного развития различных областей наук и технологий и достижения прорывных результатов при их взаимодействии» [47]. В инфраструктуру Центра входят «Белковая фабрика», такие установки класса мегасайенс, как источник СИ «КИСИ-Курчатов», исследовательский источник нейтронов ИР-8, а также отделы ЯМР-спектроскопии [48] и крио-ПЭМ на основе Titan Krios 60-300 [49].

¹ по данным (март 2021) <https://www.rcsb.org/>

Специализированное подразделение НБИКС-ПТ «Белковая фабрика» обеспечивает получение, наработку, очистку и структурно-функциональную характеристику исследуемых объектов с использованием источника СИ «КИСИ-Курчатов».

В 2010 году в НИЦ "Курчатовский институт" был создан Центр обработки данных (ЦОД) Курчатовского комплекса НБИКС-природоподобных технологий нового поколения, преобразованный в 2018 г. в Объединенный вычислительный кластер (ОВК). ОVK включает в себя многофункциональный вычислительный комплекс, состоящий из нескольких суперкомпьютеров, многоцелевой аппаратно-программный комплекс для моделирования, хранения, обработки и анализа данных и Грид-центр [50].

В настоящее время для определения структуры белка широко применяются следующие методы:

- Рентгеноструктурный анализ или белковая кристаллография (РСА, *Macromolecular X-ray Crystallography*, *MX*) [51], серийная кристаллография (Serial Crystallography [52]);
- Ядерный магнитный резонанс (ЯМР), ЯМР-спектроскопия [53];
- Электронная микроскопия (ЭМ), криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ, cryoEM) [54].

На Рис. 1.2 представлено распределение структур биомакромолекул, определенных вышеуказанными методами.

Каждый из указанных выше методов имеет свои преимущества и недостатки. И в каждом из этих методов исследователи используют большое число фрагментов данных для воссоздания окончательной атомной модели. Прежде всего, получают соответствующие экспериментальные данные, несущие информацию о строении молекулы. Для РСА это рентгеновские данные (картины дифракции, дифрактограммы). Для ЯМР-спектроскопии это информация о локальной конформации и расстоянии между атомами, которые находятся вблизи друг друга. В электронной микроскопии это изображения общей формы молекулы.

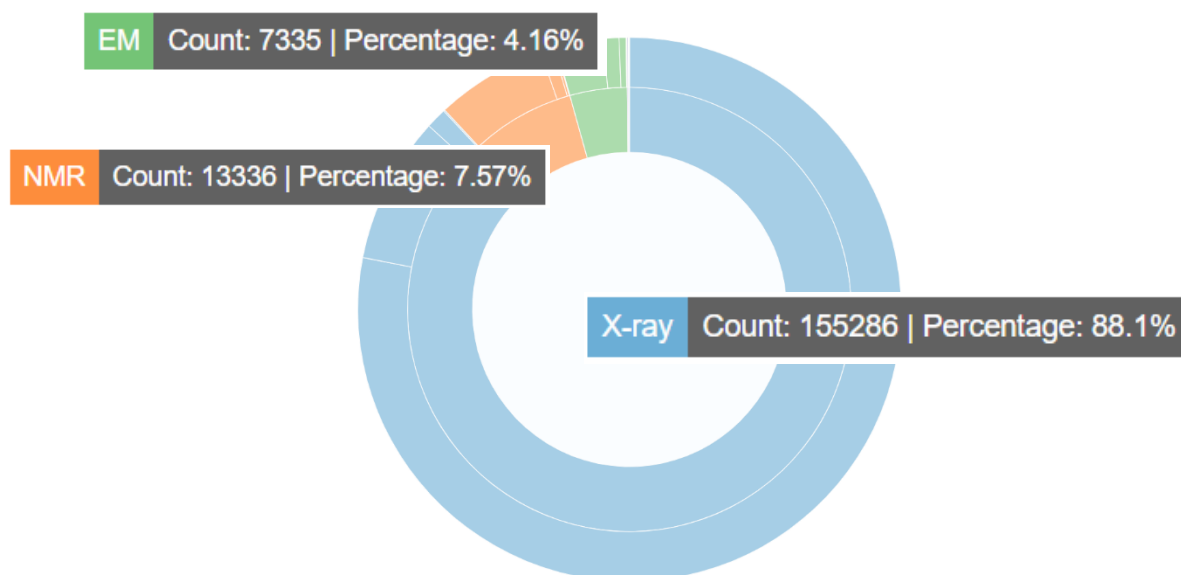


Рис. 1.2 – Круговая диаграмма², демонстрирующая количество структур, определенных экспериментально методами рентгеноструктурного анализа, ЯМР-спектроскопии и электронной микроскопии (по данным PDB на начало 2021 года).

В большинстве случаев указанной экспериментальной информации недостаточно для построения атомной модели «с нуля». Требуются дополнительные знания о молекулярной структуре. Например, зачастую уже известна последовательность аминокислот в белке и предпочтительная геометрия расположения атомов в типичном белке (например, длину связи и углы связи). Эта информация позволяет построить модель, которая будет соответствовать как экспериментальным данным, так и ожидаемым составу и геометрии молекулы. В связи с этим критически важным является априорная информация об исследуемом белке для создания адекватной модели и точного восстановления, расшифровки атомной структуры.

Белковая кристаллография

Большинство структур, включенных в международный архив PDB (Банк Белковых Структур, Protein Data Bank [55]), около 88%, были получены

² по данным (март 2021) <https://www.rcsb.org/>

методом белковой (макромолекулярной) рентгеновской кристаллографии или РСА.

Для метода РСА белок очищается и кристаллизуется, затем полученный кристалл белка исследуется с использованием рентгеновского излучения [56, 57], а также синхротронного излучения (СИ) и нейтронов [58, 59]. В результате взаимодействия рентгеновского излучения с атомами кристалла белка формируется дифракционная картина, которая затем анализируется с целью получения распределения электронной плотности в молекуле белка. Полученная карта электронной плотности затем интерпретируется для определения координат каждого атома.

Стоит отметить, что использование нейтронной кристаллографии белков находит все более широкое применение, и большинство структур, определенных этим методом, были решены именно в последнее десятилетие [60]. Этот рост стимулируется рядом разработок, начиная от строительства новых каналов и современных станций на нейтронных источниках и заканчивая доступностью улучшенного программного обеспечения для уточнения структуры. Основным узким местом, мешающим структурным биологам добавить нейтронную белковую кристаллографию к числу регулярно используемых методов, является сравнительно большой размер отдельных кристаллов, необходимых для успешного эксперимента. В [60] объясняются основные принципы используемых методов кристаллизации (диффузии паров, в объеме и методы на основе диализа) и приводятся практические примеры, которые могут помочь успешно подготовить большие кристаллы для их исследования с помощью нейтронов.

Архив PDB содержит два типа данных о кристаллических структурах. Файлы координат содержат атомные позиции для окончательной модели структуры, а файлы данных содержат величины структурных факторов (интенсивность и фазу дифракционных отражений), что позволяет построить соответствующую карту электронной плотности и визуализировать структуру молекулы белка (Рис. 1.3).

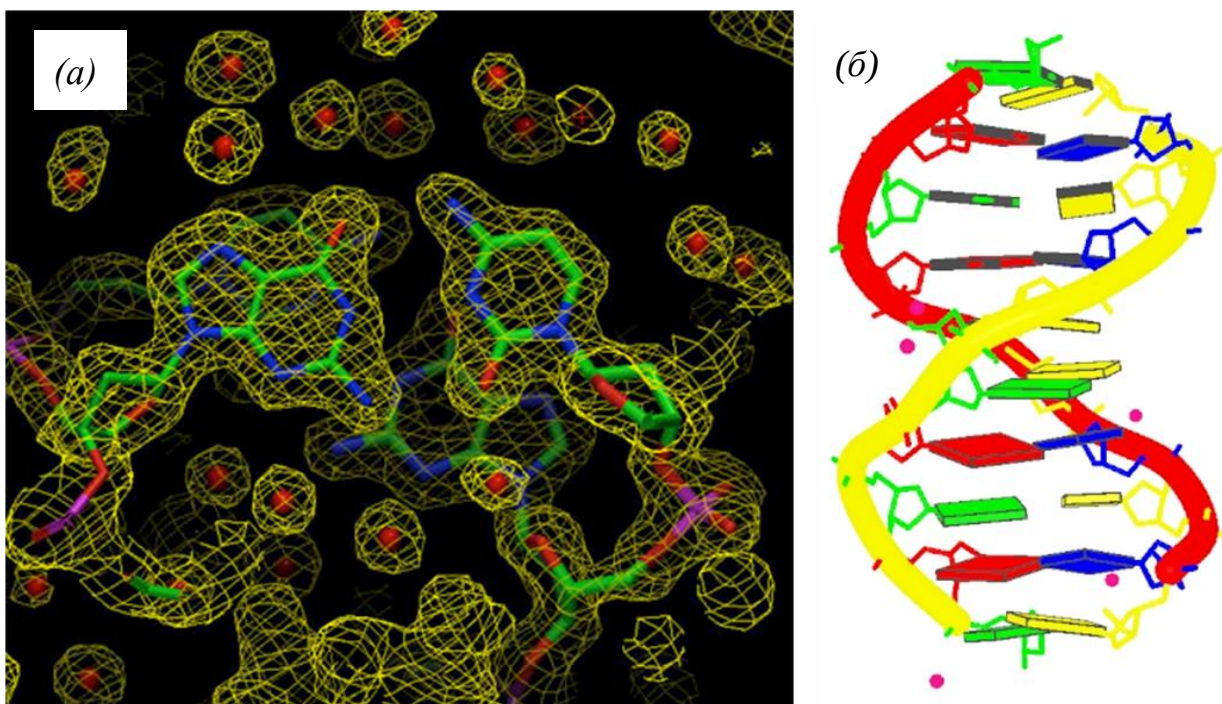


Рис. 1.3 – а) Экспериментальная электронная плотность структуры ДНК (PDB 196D) вместе с атомной моделью, которая была сгенерирована на основе РСА данных. Контуры окружают области с высокой плотностью электронов, которые соответствуют атомам в молекуле. б) соответствующая структура ДНК. Разрешение 1.7 Å [61].

Белковая кристаллография позволяет получить очень подробную информацию о структуре, определить положение каждого атома как в белке или нуклеиновой кислоте, так и в структуре лигандов, ингибиторов, ионов и других молекул, входящих в состав кристалла. Однако кристаллы биологических молекул «привередливы»: одни белки образуют совершенные, структурно упорядоченные кристаллы, а другие – только кристаллы низкого качества, с несовершенной кристаллической структурой. От качества кристаллов зависит точность определения их атомарной структуры, и кристаллы белка высокого, дифракционного качества позволяют определить структуру белка с разрешением $< 1 \text{ Å}$. Также, процесс кристаллизации зачастую весьма сложен, в связи с большим количеством параметров, влияющих на процесс кристаллизации и роста кристалла белка (Раздел 1.3).

Серийная рентгеновская кристаллография

Новый подход, называемый серийной кристаллографией, произвел революцию в белковой кристаллографии. С использованием рентгеновского лазера на свободных электронах (РЛСЭ) генерируются импульсы излучения сверхвысокой яркости и длительностью до фемтосекунд [62–64]. Поток (струя) кристаллов малых размеров (от нанометров до микрометров) пропускается через рентгеновский пучок, каждый рентгеновский импульс создает дифракционную картину от кристалла, который после этого, обычно, сгорает при воздействии на него высокоинтенсивного излучения. Полный набор данных составляется из десятков тысяч отдельных дифракционных картин. Метод представляет собой мощный инструмент определения структуры белков [65–67], поскольку он позволяет так же изучать молекулярные процессы, которые происходят за очень короткие промежутки времени, с пико- и фемтосекундным временным разрешением, такие процессы как поглощение света биологическими хромофорами (Рис. 1.4).

Для большинства такого рода исследований желаемый размер кристаллов ограничен несколькими микрометрами, и создание больших количеств нанокристаллов или микрокристаллов определенного размера стало специфической задачей для более широкого внедрения серийных методов. Несмотря на востребованность, методы контролируемого получения микрокристаллов и регулировки их размера в настоящее время мало изучены.

Например, в [68] при работе с тремя различными ферментами, L-аспартат-альфа-декарбоксилазой, нитритредуктазой меди и аминоксидазой меди, в качестве осадителя был использован сульфат аммония для быстрого перехода от известных условий методом диффузии паров к воспроизводимой крупномасштабной кристаллизации в объеме, минуя трудоемкую работу по определению фазовых диаграмм. Кроме того, конкретная концентрация сульфата аммония использовалась для управления размерами кристаллов и распределения по размерам. Сульфат аммония является обычным осадителем в кристаллографии белков, что делает эти методики применимыми ко многим

системам кристаллизации для упрощения процедуры получения больших количеств микрокристаллов для серийных экспериментов по макромолекулярной кристаллографии.

ЯМР-спектроскопия

Структура белка может быть определена методом ЯМР-спектроскопии. Белок очищается, помещается в сильное магнитное поле, затем проводится исследование с использованием радиоволн. Соответствующий набор наблюдаемых резонансов анализируется с целью определения списка атомных ядер вблизи друг друга, что позволяет характеризовать локальную конформацию связанных между собой атомов. Полученный список связей интерпретируется для построения модели структуры белка, которая содержит координаты каждого атома.

По данным базы PDB метод ЯМР-спектроскопии находится на втором месте по количеству белковых структур, которое составляет около 7.6 % на начало 2021 г. Применимость методики в настоящее время ограничена исследованиями белков маленьких или средних размеров, поскольку в исследованиях больших белков имеется ряд проблем, связанных с перекрытием пиков в спектрах ЯМР. Примеры структур, полученных по данным ЯМР, приведены в (Рис. 1.5), [69, 70].

Основным преимуществом ЯМР-спектроскопии является то, что она позволяет получить структуру белка непосредственно в растворе, в отличие от молекул белка, «зафиксированных» в кристалле (белковая кристаллография) или «прикрепленных» к решетке микроскопа (электронная микроскопия). *«Вопрос о том, одинакова ли структура белка в кристалле и в растворе, обсуждался долгие годы, пока об этом свидетельствовали только косвенные данные, однако в конце концов методом ЯМР-спектроскопии было показано, что обычно она практически одна и та же»* [1].

За последние примерно три десятилетия изотопно-направленная ЯМР-спектроскопия стала мощным методом определения трехмерных структур биологических макромолекул и их комплексов в растворах [71].

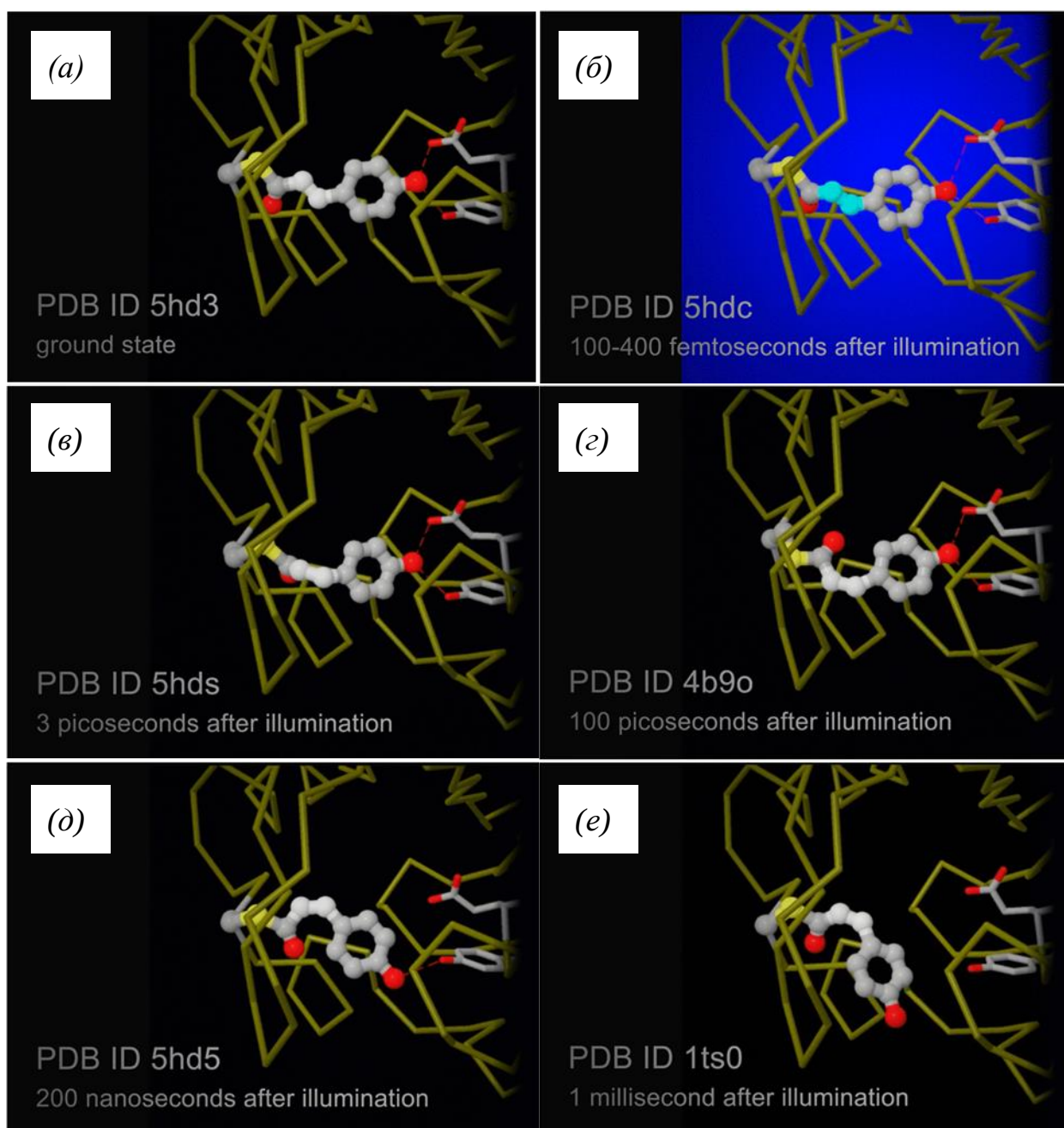


Рис. 1.4 – Структуры фотоактивного желтого белка, полученные методом серийной фемтосекундной кристаллографии после освещения. Зафиксирована изомеризация хромофора после поглощения света. Показаны структуры, полученные с разной временной задержкой: а) основное состояние; б) 100 – 400 фемтосекунд после освещения; в) 3 пикосекунды; г) 100 пикосекунд; д) 200 наносекунд; е) 1 миллисекунда. Указаны номера в базе PDB. Разрешение 1.6 Å [72].

Со структурной точки зрения ЯМР представляет собой уникальный инструмент для изучения систем, которые не поддаются кристаллизации. В отличие от рентгеновской кристаллографии и криоэлектронной микроскопии, которые позволяют получить в основном статическое представление о рассматриваемых системах, преимущество метода ЯМР заключается в его способности количественно исследовать динамику обмена между взаимопревращающимися состояниями, а также обнаруживать и характеризовать с атомарным разрешением существование переходных состояний с заселением на уровне всего 1%.

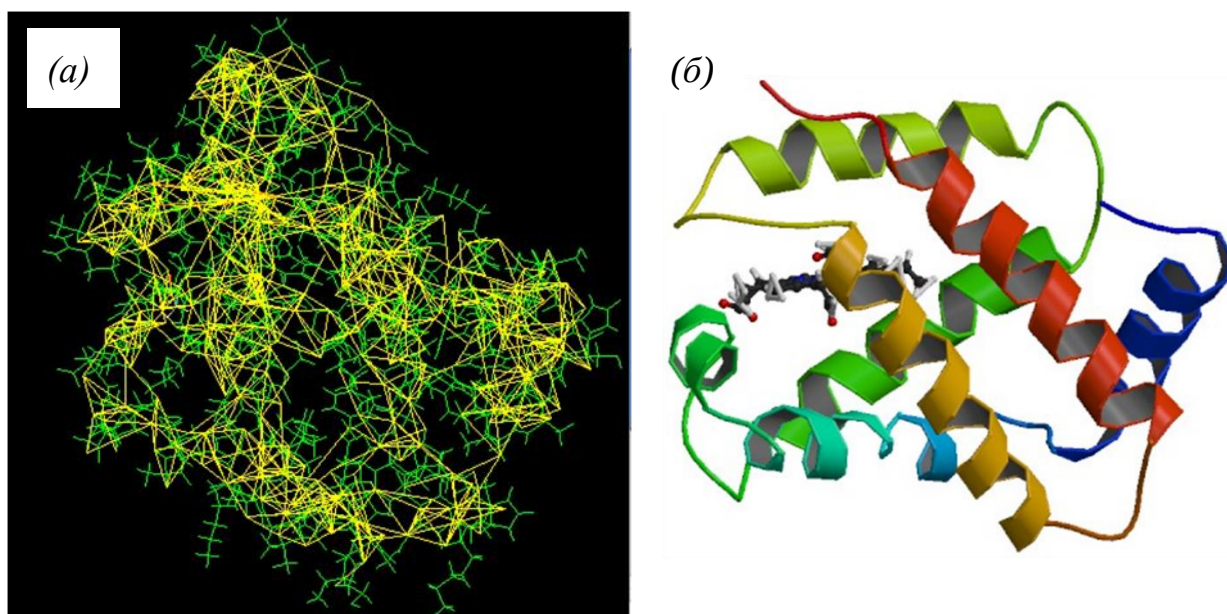


Рис. 1.5 – Структура мономера гемоглобина (PDB ID: 1VRE, 1VRF), полученная методом ЯМР-спектроскопии. а) – Белок показан зеленым цветом, связи показаны желтым. б) – визуализация структуры гемоглобина PDB ID: 1VRF [73].

Электронная микроскопия (ЭМ), крио-ЭМ

Электронная микроскопия, часто называемая 3D Электронная микроскопия (3D ЭМ), также используется для определения трехмерных структур больших макромолекулярных частиц (агрегатов) [74]. С использованием пучка электронов и системы электронных линз регистрируется прямое изображение биомолекулы. Для получения трехмерной структуры из двухмерных проекций, полученных методом

просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), применяется несколько подходов. Наиболее распространенный и активно развивающийся в настоящее время подход включает в себя визуализацию множества ($\sim 10^3 - 10^5$) различных отдельных частиц, помещенных в тонком слое некристаллического льда (крио-ЭМ) [75, 76]. При условии наличия множества изображений молекулы в различных ориентациях, вычислительный подход, похожий на тот, который используется для компьютерной осевой томографии или компьютерной томографии в медицине, позволяет получить трехмерную карту массовой плотности. При достаточном количестве отдельных частиц карты 3D ЭМ можно интерпретировать ее путем подгонки атомарной модели макромолекулы к экспериментальной карте аналогично тому, как это реализуется в макромолекулярной кристаллографии при интерпретации карт электронной плотности.

В ограниченном числе случаев электронная дифракция от 2D или 3D кристаллов биомолекул может использоваться для определения трехмерной структуры с помощью ЭМ с использованием подхода, очень похожего на метод рентгеновской кристаллографии.

Методы 3D ЭМ приобретают все большее значение при изучении биологических объектов внутри криоконсервированных клеток и тканей с помощью электронной томографии. Этот метод включает запись изображений под разными углами наклона и усреднение изображений по нескольким копиям биологического объекта *in situ*.

С точки зрения молекулярной и атомарной детализации структуры, как одночастичный 3D ЭМ подход, так и методы электронной дифракции в настоящее время позволяют получить структуры с разрешением, сравнимым с макромолекулярной кристаллографией (т.е. позволяют визуализировать боковые цепи аминокислот, молекулы на водной поверхности и нековалентно связанные лиганды). Криоэлектронная томография позволяет получить структурную информацию с разрешением несколько ниже (т.е. белковые домены и вторичные структурные элементы). В 2016 году количество

структур, полученных с помощью 3D ЭМ, впервые превзошло количество структур, определенных методом ЯМР-спектроскопии.

В [77] приводятся преимущества метода электронной микроскопии в сравнении с другими методами исследований в структурной биологии, в особенности при изучении случайно ориентированных биологических макромолекул, 2D- и малых 3D-кристаллов с использованием крио-ЭМ, обеспечивающие получение дополнительной ценной информации для решения конкретных задач. Снижены требования к размеру и форме, возможно стабилизировать и исследовать целые или частично гибкие молекулы. Разрешение выше 2 Å, а для трехмерных кристаллов возможно субангстремное разрешение, что позволяет детально исследовать химические свойства. Доза электронов может быть низкой, что снижает радиационное повреждение чувствительных образцов. В отличие от рентгеновской кристаллографии, рассеяние электронов напрямую связано с кулоновским потенциалом и, таким образом, дает информацию о распределении заряда в биомолекулах.

Современные достижения в области 3D ЭМ [78 – 80] (Рис. 1.6) обусловлены развитием и конвергенцией ряда технологий, включая подготовку/сохранение образцов в стекловидном льду, улучшенную электронную оптику, фазовые пластинки для повышения контрастности электронного изображения, прямые электронные детекторы, улучшенное программное обеспечение для обработки данных и более производительные компьютеры.

В исследованиях очень больших макромолекулярных комплексов, в которых невысокое разрешение является вполне допустимым, анализ данных 3D ЭМ все чаще проводится в сочетании с информацией, полученной комплементарными методами белковой кристаллографии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, химического кросс-линкинга [81] и различными вычислительными методами, позволяющими изучать особенности атомарного строения макромолекул. Эту практику сочетания

ряда экспериментальных подходов часто называют интегративными или гибридными методами (Integrative/Hybrid Methods, I/HM [82]).

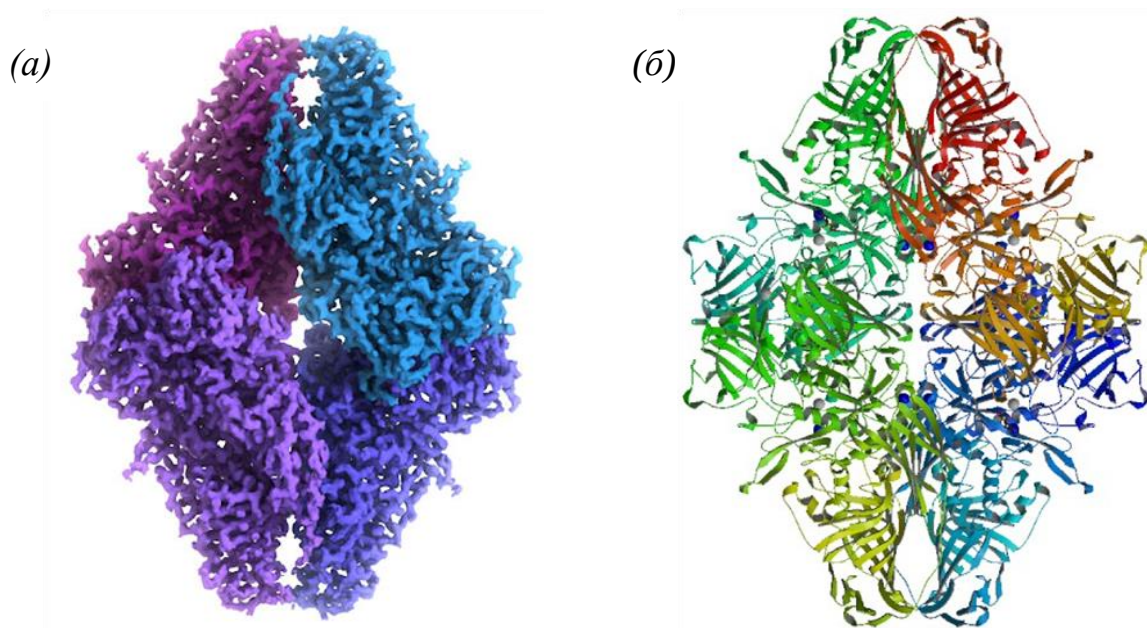


Рис. 1.6 – а) Показана крио-ЭМ карта бета-галактозидазы, полученная из более чем 90 000 изображений молекулы, замороженной во льду, что было достаточно для построения атомной модели. Карта криоЭМ находится в EMDDataBank, код EMD-2984; б) визуализация структуры по данным PDB ID: 5A1A [79].

1.2.3. Генная инженерия белков

Особый интерес представляет модулирование свойств белка путем генно-инженерных мутаций [83]. Белки, полученные путем генной инженерии, очень перспективны с точки зрения улучшения их свойств, однако информацию о том, как именно следует изменить белок можно извлечь практически только из трехмерной структуры.

Предсказание природы мутаций, необходимых для направленного изменения специфичности фермента является одной из актуальных задач современной молекулярной биологии (энзимологии). В настоящее время субстратная специфичность объясняется теорией Кошланда, которая состоит в том, что топология активного центра соответствует топологии субстрата по принципу «ключ-замок». Соответственно, влиять на субстратную специфичность можно, изменяя активный центр с помощью направленного мутагенеза. Таким образом, был получен ряд мутантов ферментов с измененной специфичностью (например, цитохром Р-450, глюкозоизомераза [84], оксидаза D-аминокислот [85] и другие), имеющих промышленное или медицинское значение.

Для изменения субстратной специфичности ферментов наряду со стохастическими методами (так называемой направленной эволюцией) активно разрабатываются *методы рационального дизайна*, основанные на использовании информации о структуре, применении методов биоинформатики и молекулярного моделирования.

Потенциальные точки для мутаций в ферменте определяют, сравнивая структуры комплексов с аналогами разных субстратов. Для количественного определения роли того или иного аминокислотного остатка в селективности действия ферментов и вычисления теоретического профиля свободной энергии взаимодействия мутантов с субстратом применяется компьютерное моделирование – молекулярная динамика и молекулярная механика/квантовая механика. Мутации реализуются методом сайт-направленного мутагенеза, их эффективность проверяется с помощью методов ферментативной кинетики с

использованием специфических субстратов. Примером рационального конструирования ферментов могут быть работы по увеличению активности и стабильности лакказы, где для компьютерного моделирования и выбора мест мутации были использованы методы молекулярной динамики и квантовой/молекулярной механики [86].

Методом рационального дизайна с использованием рентгеноструктурного анализа, масс-спектропии, сайт-направленного мутагенеза, аланинового скана, молекулярной динамики получена эпоксигидролаза из *B. Megaterium*, более активная к нафтилглицидиловым субстратам, чем дикий фермент [87].

Компьютерное моделирование, структурные и кинетические исследования, а также сайт-направленный мутагенез были использованы для изменения субстратной специфичности человеческой 2-дезоксцитидинкиназы, которая стала лучше превращать неприродные L-нуклеозиды по сравнению с природными D-нуклеозидами. Полученный мутантный фермент стал более пригодным для выявления измененных клеток методом позитронной эмиссионной томографии [88].

Компьютерное моделирование было использовано для рационального дизайна кокаинэстеразы, применяемой для лечения от наркомании [89].

Рациональный дизайн с применением рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования, наряду со стохастическими методами, применялся для улучшения селективности альдозаз к промышленно важным субстратам [90], а также для улучшения стереоселективности. При этом анализировались структуры альдозаз в комплексе с L- и D- изомерами аналогов субстратов и проводились мутации в прохиральных точках [91].

Методы молекулярной динамики и молекулярной / квантовой механики применялись для определения 5-ти точек мутаций при рациональном дизайне сиалидазы с измененной селективностью [92].

Рациональным дизайном получен протрипсин, не активируемый трипсином, но активируемый энтерокиназой, что важно для получения и очистки рекомбинантного трипсина [93].

Оксиметилтрансфераза серина с улучшенной активностью получена методом рационального дизайна с помощью биоинформатического подхода [94].

Однако, анализируя в целом ситуацию в области белковой инженерии, совершенно ясно, что в настоящее время нельзя выделить универсального подхода для создания идеального биокатализатора [95].

Для выбора точек мутагенеза так же используются современные подходы молекулярного докинга [96]. В указанной работе была последовательно проанализирована библиотека по 6-ти горячим точкам и найдены мутации, приводящие к увеличению стереоселективности моноаминоксидазы *A.niger* в 13 раз по отношению к энантиомерам мексилетина.

Еще более осмысленный подход к выбору горячих точек мутагенеза предлагает молекулярная динамика и QM/MM, что может сделать данный комбинированный подход еще более перспективным [97].

В настоящее время понимание механизмов реализации специфичности является в высшей степени актуальной научной проблемой. Понять эти механизмы – значит научиться создавать ферменты с новыми, заранее заданными свойствами, используя систему разработанных приёмов.

1.2.4. Драг-дизайн на основе структуры мишени

Разработка научно обоснованных подходов для создания лекарственных препаратов, в том числе эффективных против таких распространённых и опасных заболеваний, как рак, СПИД, туберкулёз, нервно-дегенеративные заболевания – является одной из приоритетных задач мирового научного сообщества.

Одним из перспективных и интенсивно развивающихся подходов, позволяющих решать эту задачу, является драг-дизайн на основе структуры мишени (Structure-Based Drug Design, SBDD).

SBDD – метод, основанный на использовании данных о пространственной структуре молекулы-мишени, играющей ключевую роль в развитии изучаемого патологического процесса для конструирования химических соединений, способных избирательно ингибировать активность целевой молекулы, что и приводит к медицинскому эффекту.

В отличие от прежних методов поиска лекарственных препаратов, сводящихся к перебору и испытанию неограниченного числа химических соединений, SBDD основан на рациональном выборе целевой молекулы, на которую нужно воздействовать, чтобы прекратить определённый патологический процесс. Такими целевыми молекулами, как правило, являются белки.

Возможности приготовления лекарственных средств, с использования метода SBDD расширяются по мере того, как углубляются наши знания о молекулярных механизмах биохимических процессов, протекающих в живых организмах.

На первом этапе, после выбора целевого белка, блокирование или увеличение активности которого даёт желаемый медицинский эффект, необходимо определить пространственную структуру белка-мишени. Пространственную структуру белков, выбранных в качестве мишени, как было указано ранее (Раздел 1.2.2), определяют в большинстве случаев методом белковой (макромолекулярной) кристаллографии. Иногда

применяют метод ЯМР или молекулярное моделирование на основе структуры гомологичного белка.

Следующий этап – поиск лигандов, блокирующего активность целевого белка, проводят методом виртуального скрининга. Степень и селективность взаимодействия лиганда и мишени оценивают по значению свободной энергии взаимодействия. Соединения, обладающие наибольшим сродством к мишени вследствие комплементарности поверхностей лиганд-белок, электростатических взаимодействий и водородных связей, или ковалентно связывающиеся с мишенью, отбираются в качестве кандидатов для разработки лекарственного препарата. Такие лиганды называют соединениями-лидерами. Оптимизация структуры соединений-лидеров, увеличивающая их сродство к белку мишени, превращает их в потенциальное лекарственное средство, подлежащее последующим испытаниям на токсичность, эффективность, избирательность [98].

Первые этапы метода SBDD – поиск белков мишеней и соединений-лидеров проводятся как в научных исследовательских учреждениях, так и в фармацевтических и биотехнологических компаниях. С использованием SBDD были разработаны и введены в медицинскую практику ряд препаратов для терапии СПИДа, рака и других опасных заболеваний. Одним из первых примеров приложения данного метода была разработка препарата дорзоламида – ингибитора карбоангидразы, применяемого для понижения внутриглазного давления [99].

SBDD методом был создан ряд препаратов для лечения СПИДа и некоторых видов рака. Например, препарат нелфинавир, успешно применяемый при терапии приобретённого иммунодефицита человека, разработанный на основе пространственной структуры одной из протеаз ретровируса [100].

Ряд антираковых препаратов разработан на основе структуры тирозинкиназ [101].

SBDD метод применяется и для дизайна противотуберкулёзных лекарств. Необходимость в создании новых антибиотиков для лечения туберкулёза вызвана не только высокой устойчивостью микобактерии к действию препаратов, но и высокой степенью её адаптации к лекарственным препаратам. Поэтому актуальным остаются как поиск новых целевых белков, так и разработка новых антибиотиков на их основе. Возможности применения метода SBDD расширились после расшифровки последовательности генома микобактерии.

В геноме микобактерии было идентифицировано более четырёх тысяч белков, при этом оказалось, что белки микобактерии заметно отличаются по аминокислотному составу от других бактериальных белков. В белках микобактерий увеличено доля аминокислот Ala, Glu, Pro, Arg, Trp и уменьшено количество таких аминокислот как Asp, Ile, Leu, Thr, Tyr.

Этим же методом был создан ряд препаратов против туберкулёза на основе структуры некоторых белков микобактерии. Учитывая важную роль, которую играет синтез триптофана для выживания бактерии, в [102] использовали структуру индол-3-глицерофосфат синтазы *M. tuberculosis* для конструирования ингибитора, пригодного для разработки антитуберкулёзных лекарств. Также, в качестве целевого белка использовали дигидрофолатредуктазу *Mycobacterium Tuberculosis*. Методом компьютерного моделирования были смоделированы пептиды, избирательно ингибирующие этот белок.

Пиримидинфосфорилазы – уридинфосфорилаза и тимидинфосфорилаза – широко распространённые в природе ферменты, принимающие активное участие в реакциях катаболизма ферментов. Эти белки катализируют обратимый фосфоролиз уридина и тимидина до рибозо-1'-фосфата (дезоксирибозо-1'-фосфата) и урацила (тимина), соответственно.

С медицинской точки зрения нуклеозидфосфорилазы привлекают пристальное внимание исследователей вследствие их участия в метаболизме противораковых и противовирусных препаратов – аналогов нуклеозидов.

Известно, что в тканях злокачественных опухолей концентрации уридин- и тимидинфосфорилаз повышены по сравнению с нормальными тканями. Высказано мнение, что тимидинфосфорилаза играет важную роль в пролиферации и дифференциации лейкоцитов, а также в пролиферации опухолевых клеток. Кроме того, было обнаружено участие тимидинфосфорилазы в процессах ангиогенеза и показано, что функционирование этого фермента необходимо для прорастания кровеносных сосудов в опухолях.

1.2.5. Гибридные системы

Рост интереса к гибридным системам основан на возможности управления их оптическими, электрическими и функциональными свойствами путем дизайна и контроля структуры и молекулярного состава [103–108].

Различные комбинации неорганических полупроводников и органических проводящих полимеров могут стать перспективными материалами и структурами при создании гибридных фотовольтаических элементов [109]. Экспериментальные измерения и теоретические вычисления были проведены для нескольких комбинаций, таких как гибридные нанокомпозиты полимер-электрод [110].

Для создания твердотельных источников света используют OLED-структуры совместно с неорганическими светодиодами. Системы на основе органо-неорганических структур позволяют использовать достоинства органических и неорганических материалов, в том числе высокий коэффициент люминесценции органических структур и высокую плотность носителей заряда, подвижность носителей, устойчивые химические свойства, а также механическую стойкость неорганических структур [111 – 114].

В настоящее время развивается создание гибридных систем перспективных для хранения энергии [115]. Также, к перспективным гибридным системам относятся неорганические наночастицы (квантовые

точки), связанные с органическим лигандом. Такие системы представляются перспективными для метода флуоресцентной микроскопии, в качестве компонентов систем обработки и хранения информации, оптоэлектроники, светотехники и солнечных батарей [116, 117].

При введении в полость углеродных нанотрубок различных атомов или молекул проявляется многообразные физических и химических свойств такого рода систем, так называемых пиподов (от англ. «peapods» – стручки с горошинами). Отмечается их потенциал как перспективных материалов для микро- и нанoeлектроники (нанодиодов, транзисторов, элементов памяти, логических систем и т.д.) и для эффективного аккумуляирования водорода [118].

Гибридные системы, органо-неорганические наноматериалы так же применяются в медицине при создании нанороботов, которые используются в качестве «агентов» для целевой доставки лекарств [119].

Особый интерес представляет изучение структуры и свойств белково-липидных пленок. Во-первых, указанные объекты интересны в качестве модели биологической мембраны, исследование которых позволяет получить новую информацию как о структуре клеточных мембран, так и о механизмах процессов в них в условиях воздействия внешних факторов [120].

Во-вторых, актуальной представляется возможность «проектирования» и создания белково-липидных структур и планарных систем на их основе с заранее заданными свойствами, обеспечивающими широкий функционал таких пленок. Например, органические тонкие пленки используются в качестве диэлектрических покрытий. Также, тонкие органические пленки могут быть «оснащены» функциональными молекулами, благодаря чему такие пленки перспективны для создания различного рода сенсоров и катализаторов, в частности, для детектирования биологических объектов, что представляется важным в развитии методов диагностики и биомедицинских технологий [121].

В-третьих, использование биомолекул, в том числе белков, в качестве элементной базы для создания гибридных систем вызывает интерес,

поскольку биомолекулы обладают способностью к самоорганизации, что позволяет конструировать системы с заданной архитектурой [122].

С точки зрения использования белков в биосенсорных технологиях, особо привлекательными представляются функции, связанные с передачей и обработкой сигналов клеточной коммуникации. Рецепторные белки, способны специфически связывать молекулы, передающие сигналы клетке, они так же могут реагировать на изменения внешних факторов посредством конформационных изменений, индуцируемых внешним сигналом. К числу таких белков можно отнести зрительный белок хромопротеин родопсин, что делает его возможным кандидатом для использования в сенсорных устройствах, имитирующих зрительные процессы [123].

С использованием нанотехнологий и обонятельных клеток или рецепторов может быть создано устройство «биоэлектронный нос», которое выполняет функции, аналогичные системе восприятия запахов человеком [124]. При использовании обонятельных рецепторов в качестве первичного сенсорного материала устройства могут точно различать целевую молекулу среди смеси различных веществ. Кроме того, сенсоры на основе обонятельных рецепторов более чувствительны, чем электронные датчики. Благодаря таким характеристикам «биоэлектронный нос» представляется перспективным устройством для использования в различных областях жизни, таких как диагностика заболеваний, оценка безопасности пищевых продуктов и мониторинг окружающей среды [125].

В развитии технологий создания биосенсорных устройств на основе белков и ферментов основные усилия исследовательских групп сфокусированы на обеспечении возможностей сохранения конформации молекул и контроля их каталитической активности, большое влияние на которые оказывает граница раздела (интерфейс) между твердотельной подложкой и биомакромолекулами. Эффективным способом организации интерфейса представляется организация молекул белков в виде двумерного

слоя, что позволяет увеличивать площадь контакта с внешней средой и воздействующими факторами [126].

На примере низкомолекулярных органических соединений было показано, что использование полимерных упорядоченных двумерных структур для создания ряда фотовольтаических материалов способно значительно повысить их эффективность [127]. Это позволяет сделать предположение, что применение структурно-упорядоченных белковых пленок, планарных систем, также позволит повысить эффективность биосенсорных устройств, созданных на их основе.

Свойства тонких пленок принципиальным образом зависят от организации молекул относительно поверхности подложки; а также самой структуры поверхности, ее физико-химические свойства оказывают непосредственное влияние на структуру нанесенной органической системы. Область интерфейса между органическим слоем и подложкой может иметь первостепенное значение для структуры и функционирования гибридных систем и устройств на их основе.

1.3. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

1.3.1. Проблемы кристаллизации белков

Определение пространственных структур биологических макромолекул является чрезвычайно важным для понимания молекулярных механизмов работы клетки и ее отдельных компонентов (Раздел 1.2.1).

Установление пространственной структуры белков (Раздел 1.2.2), в частности, имеет практическое значение для медицинского применения, знание структуры белка-мишени весьма важно и при поиске новых перспективных молекул, которые могут стать основой лекарственных препаратов [128, 129] (Раздел 1.2.4).

Также такие исследования востребованы в биотехнологиях, поскольку знание структуры используемого в биотехнологии белка позволяет изменить его генноинженерно так, чтобы его свойства изменились определенным образом [130] (Раздел 1.2.3).

Выбор белков для кристаллизации и последующего изучения структуры определяется их ролью в живых системах (Раздел 1.2.1) и функциональными свойствами, имеющими практическое значение, в том числе, для создания различных датчиков и сенсоров (Раздел 1.2.5).

В связи с вышесказанным, кристаллизация белков – актуальная проблема структурной биологии, биотехнологий и медицины, и представляет собой важное направление научных исследований. Одним из ключевых вопросов указанной проблемы является весьма трудоемкий поиск условий кристаллизации.

Получение кристалла белка – ключевая задача в определении его структуры с высоким пространственным разрешением $<1 \text{ \AA}$. Подбор условий кристаллизации проводится методом «проб и ошибок», в связи с чем сложно прогнозировать рост кристаллов высокого качества. Для решения структуры белка с высоким разрешением необходимо вырастить кристалл дифракционного качества [131] – кристалл, который будет иметь «хорошую»

дифракционную картину, с отчетливыми рефlekсами в достаточном для количестве.

Качество кристаллов белка зависит от ряда условий: метод кристаллизации, концентрация белка и осадителя, тип осадителя, температура кристаллизации [132], параметры пересыщенного раствора [133 – 136] (Рис.1.7) и др.



Рис.1.7 – а) Иллюстрация того, что на процесс кристаллизации неизвестным образом влияет большое число параметров; б) Статистический анализ процесса роста в широком диапазоне начальных условий.

Наиболее распространенные методы кристаллизации белков основаны на переборе условий кристаллизации и статистическом анализе процессов роста – проведении экспериментов по кристаллизации в выбранном диапазоне начальных условий [137], так называемый *скрининг условий кристаллизации*.

Данный подход к поиску условий кристаллизации широко распространен, и проблема его оптимизации весьма актуальна. Например, в [138] исследуются химические компоненты, используемые в 86 типичных коммерчески доступных наборах для скрининга, и сравниваются с используемыми в базе данных кристаллизации биологических макромолекул (BMCD). 86 комплектов для скрининга систематически анализируются с точки зрения методов разработки, классификации, применимого объема и компании-производителя. Химические компоненты, применяемые в этих наборах для

скрининга, подробно исследуются с точки зрения классификации и частоты использования, которые сравниваются с таковыми в BMCD. Подробно анализируются четыре основных химических реагента наборов для скрининга, включая соли, буферы, осадители и добавки. Обобщаются новые достижения и дальнейшие инновации в практике скрининга условий кристаллизации и разработке наборов для скрининга.

Изучение механизмов кристаллизации важно как с точки зрения построения эффективной схемы выбора начальных условий, так и поисковых исследований в области формирования гибридных структур на основе молекул белка, используемых в качестве функционального компонента. Изучение процессов на ранней стадии кристаллизации белков, процессов нуклеации, может позволить разработать методы, позволяющие предсказывать условия кристаллизации и осуществлять контролируемый рост белковых кристаллов.

Наиболее широко распространенный метод определения структуры белков – метод белковой кристаллографии или рентгеноструктурного анализа. Рост кристаллов белка дифракционного качества, т.е. соответствующего качества, достаточного для определения структуры, без сомнения, является ограничивающим фактором в большинстве кристаллографических работ, и при этом является наименее понятным.

Принципы кристаллизации макромолекул или солей (к сожалению!) состоят лишь в том, что необходимо воздействовать на раствор образца в высокой концентрации таким образом, чтобы заставить его «выйти» из раствора; если это произойдет слишком быстро, то он выпадет в осадок, но при правильных условиях – вырастут кристаллы [139 – 141].

Выявление условий кристаллизации определяет вышеуказанный ограничивающий фактор и, соответственно, определяет возможность успешной реализации исследований. Многие проекты оказываются нереализованными из-за невозможности кристаллизовать белок. Масштабы проблемы можно понять, если принять во внимание все переменные

[142, 143]: выбор осадителя, его концентрация, буфер, его pH, концентрация белка, температура, метод кристаллизации и возможное наличие примесей.

На начальном этапе кристаллизации эксперименты будут проводиться методом «проб и ошибок», который обычно охватывает максимально широкий диапазон указанных переменных, насколько это возможно на практике. На данном этапе часто используются коммерчески доступные решения типа «скрининг условий кристаллизации» («crystal screen» packages), набор для скрининга, скрининговых машин. Каждый из наборов обычно состоит примерно из 50 растворов, в которых в широком диапазоне варьируются параметры осадителя, буфера, pH и соли, известных как матрица решетчатого скрининга [144].

Под руководством Михаила Валентиновича Ковальчука В НИЦ «Курчатовский институт» было создано специализированное подразделение – НБИКС-ПТ «Белковая фабрика», нацеленное на обеспечение получения, наработки, очистки и структурно-функциональную характеристику исследуемых объектов (Раздел 1.2.2).

«Фабрика» (РЦ «Молбиотех») располагает уникальными возможностями скрининга и оптимизации условий кристаллизации белков (Рис.1.8). Для решения таких задач здесь помимо традиционных методов имеются два мощных инструмента – система *роботизированной кристаллизации* и *кристаллизация в условиях микрогравитации* [145 – 149]. Первый из них предназначен для поиска первоначальных условий кристаллизации образцов. Все операции (за исключением стадий переноса образцов между отдельными модулями комплекса, которые производятся оператором), начиная от приготовления исходных растворов и заканчивая фотомониторингом и документированием процесса кристаллизации, осуществляются в автоматическом режиме. Второй инструмент открывает дополнительные перспективы улучшить качество кристаллов, получаемых стандартными (наземными) методами. В условиях микрогравитации отсутствие конвекции и

седиментации обеспечивает равномерный доступ вещества ко всем растущим граням кристалла и в ряде случаев повышает его качество.



Рис.1.8 – «Белковая фабрика» (РЦ «Молбиотех», Комплекс структурной биологии белков, НИЦ «Курчатовский институт», Москва) [150]. Система кристаллизации макромолекул полуавтоматическая Rigaku.

Под научным руководством Михаила Валентиновича Ковальчука соответствующие космические эксперименты по кристаллизации белков проводились на борту МКС [146] в рамках международного сотрудничества Роскосмоса с Японским космическим агентством JAXA [151]. Также, ряд работ проводится на российском спутнике "Фотон" [145].

В [152] излагаются оценка качества белка, условия и методы кристаллизации, защита кристалла от мгновенного охлаждения, основанные на многолетнем опыте, особенно в отношении кристаллизации белков, проведенной в условиях микрогравитации (JAXA PCG, Japan Aerospace Exploration Agency's High-Quality Protein Crystal Growth Experiment).

Найденные условия кристаллизации белков затем оптимизируются и применяются методы кристаллизации – метод сидячей/висячей капли при диффузии паров [153] и, возможно, диализ [154], обычно при комнатной

температуре и при 4 °C. Подробнее о методах кристаллизации белков в следующем разделе.

С целью увеличения размера кристаллов могут быть применены различные методы. К ним относятся сидинг (рост затравочного кристалла) [155], изменение концентрации белка или изменение температуры. Для рентгенодифракционного анализа методом белковой кристаллографии (рентгеноструктурного анализа) кристаллы белка, обычно, должны иметь минимальный размер около 0,1 мм по одному из измерений.

В обзоре [156] приводятся исследования различных аспектов воздействия электрических полей, в частности, контролирующих кристаллизацию, особое внимание при этом уделяется сильным электрическим полям. Обсуждаются применение как внутренних, так и внешних электрических полей, а также использование переменного и постоянного тока в кристаллизации белков. Обращается внимание на сходства и противоположные результаты в статьях. Продемонстрирована возможность значительного ускорения процесса кристаллизации за счет приложения электрических полей. С помощью электрического поля можно сокращать время зародышеобразования, контролировать местоположение зародышеобразования, контролировать размер кристаллов, увеличивать их общее качество, управлять ориентацией кристаллов и контролировать полиморфизм.

В [157] описывается усовершенствованная автоматизированная система кристаллизации и мониторинга белков (PXS2) после разработанной в 2003 году прежней модели. В новой системе для уменьшения объема образца сокращен минимальный объем дозатора до 0,1 мкл, повышено разрешение фотосъемки, в дополнение к 20°C установлен инкубатор на 4°C, а также добавлены процедуры, позволяющие кристаллизовать мембранные белки.

Стоит отметить, что с развитием серийной кристаллографии допустимые размеры кристаллов в настоящее время могут составлять от 1 мкм до десятков нанометров (Раздел 1.2.2).

Таким образом, можно охватить множество вариантов и один из них или даже несколько могут позволить получить кристаллы достаточного качества, чтобы перейти к следующему этапу работы. Однако на данной стадии кристаллизации исследователи обычно получают один из следующих результатов: ничего, осадок, россыпь микрокристаллов (которые часто напоминают осадок) или несколько крайне малых кристаллов. Получение любого из двух последних результатов весьма обнадеживает, поскольку это указывает на то, что макромолекулярная субъединица может обладать достаточным внутренним структурным порядком или симметрией, чтобы реализовать кристаллизацию.

В целом, гликозилированные белки [158] или белки, содержащие гибкие домены или менее конформационно-ограниченные области, трудно кристаллизовать, в то время как даже очень большие комплексы высокой симметрии, такие как многие вирусы, будут кристаллизоваться [159, 160].

Выяснение трехмерных структур мембранных белков важно для понимания их функций, т.к. они играют важную физиологическую роль во всех организмах. Успех рентгеновской кристаллографии, ставшей наиболее широко используемым методом для определения трехмерных структур мембранных белков с высоким разрешением, зависит от эффективной экстракции белка, сольюбилизации, стабилизации и образования дифрагирующих кристаллов. В обзоре [161] обсуждается процесс получения кристаллов мембранного белка от экстракции и сольюбилизации белка до определения структуры. Кроме того, представлены текущие методы прекристаллизационного скрининга и несколько стратегий для увеличения вероятности кристаллизации сложных мембранных белков.

В основе механизма кристаллизации белка лежит эффект высаливания.

Ионы осадителя оттягивают на себя молекулы воды из гидратной оболочки, открывая возможность взаимодействия аминокислотных остатков отдельных молекул [1] (Рис. 1.9).

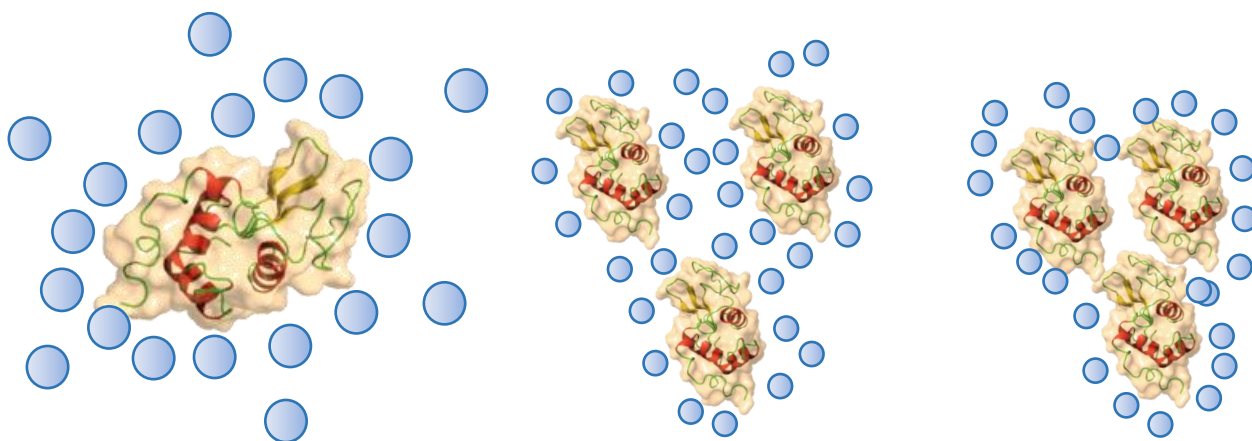


Рис. 1.9 – *Иллюстрация эффекта высаливания белковой молекулы. Ионы осадителя оттягивают на себя молекулы воды из гидратной оболочки, открывая возможность взаимодействия аминокислотных остатков отдельных молекул [1].*

Несмотря на то, что попытки построения теории кристаллизации белков предпринимаются, к настоящему моменту физико-химические основы эффекта высаливания не изучены в полной мере. Стоит отметить работу [162], в которой представлена обобщенная теория зарождения и роста кристаллов в метастабильной (переохлажденной или пересыщенной) жидкости с учетом двух основных эффектов: диффузионного механизма функции распределения частиц по размерам в пространстве радиусов частиц и нестационарных скоростей роста отдельных кристаллов, вызванных флуктуациями внешней температуры или концентрационного поля. Система интегро-дифференциальных уравнений Фоккера-Планка и баланса сформулирована и аналитически решена в параметрической форме для произвольной кинетики зародышеобразования и произвольных скоростей роста отдельных кристаллов. В явном виде найдены функция распределения частиц по размерам и метастабильность системы. Кинетические механизмы Вебера-Фольмера-Френкеля-Зельдовича и Мейрса, а также скорости нестационарного роста ядер рассматриваются как частные случаи. Обсуждаются некоторые потенциальные биомедицинские приложения настоящей теории для роста кристаллов из пересыщенных растворов. Теория сравнивается с экспериментальными данными по кристаллизации белков и инсулина

(рассматривается динамика роста белков лизоцима и канавалина, а также инсулина крупного рогатого скота и свиньи).

В связи с вышесказанным можно сделать заключение, что рост белковых кристаллов реализуется в пересыщенных растворах, при этом пересыщение достигается путем добавления в раствор веществ, понижающих растворимость белка, – осадителей. Обычно, в качестве осадителей используются неорганические соли, высокомолекулярные полимеры и органические растворители.

1.3.2. Методы кристаллизации белков

На Рис.1.10 представлена фазовая диаграмма растворимости как иллюстрация роста кристаллов белка [163 – 165].

Рассмотрим диаграмму на Рис.1.10. При добавлении осадителя раствор из ненасыщенного состояния (область «ненасыщенный раствор», расположенная ниже кривой 1) переходит в состояние нуклеации («зона нуклеации», расположенная выше кривой 2 и локализованная в «зоне осаждения»). Указанный переход показан пунктирной стрелкой. Затем осуществляется переход раствора в метастабильное состояние («метастабильная зона», расположенная между кривыми 1 и 2), и происходит рост кристаллов. Данный переход показан вертикальными сплошными стрелками вниз.

Количество осадителя должно соответствовать каждому конкретному случаю кристаллизации. Так, при добавлении недостаточного количества осадителя раствор может остаться ненасыщенным и переход в метастабильное состояние не осуществится, и кристаллы не образуются. Напротив, при добавлении избыточного количества осадителя, раствор перейдет в состояние высокого пересыщения в «зоне осаждения» (Рис.1.10), затем может образоваться осадок, и в таком растворе образование кристаллов также маловероятно.

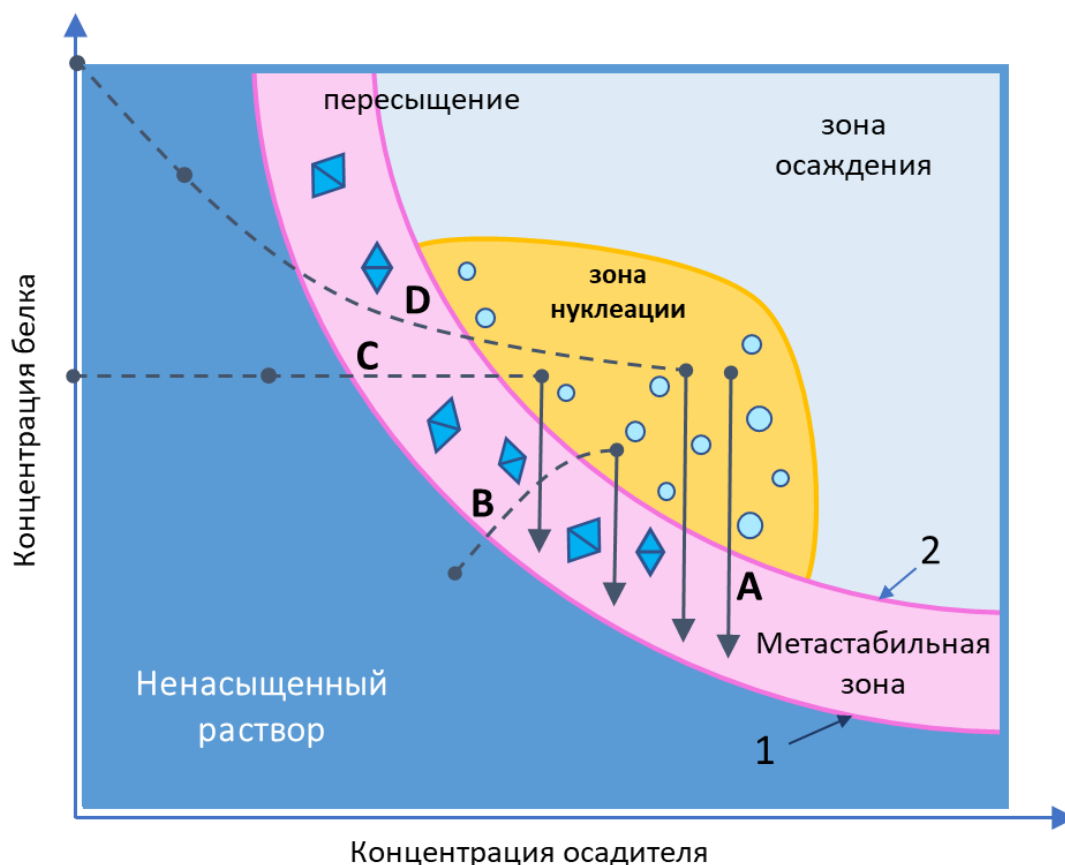


Рис.1.10 – Схематичное изображение фазовой диаграммы кристаллизации белка. Показаны зоны: ненасыщенный раствор, нуклеации, осаждения, метастабильная зона между кривыми растворимости (1) и критического пересыщения (2). Представлены четыре основных метода кристаллизации: (А) объемная кристаллизация, (В) диффузия паров, (С) диализ и (D) свободная диффузия. Каждый из них имеет свой путь достижения зон зарождения и метастабильности, предполагая, что регулируемым параметром является концентрация осадителя. Сплошными серыми кружками отмечены начальные условия [164].

Были разработаны различные методы кристаллизации белков. К доступным и часто применяемым методам относятся: методы на основе диффузии паров, свободной диффузии, объемная кристаллизация и диализ. Описание указанных методов приведено списком ниже.

Также, на практике применяются более сложные методы, такие как кристаллизация с использованием «затравки» [166], графоэпитаксии [167] и белковых пленок (слоев) в качестве «темплейтов» [168, 169]. Весьма эффективным методом, как упоминалось ранее, представляется

кристаллизация в условиях микрогравитации на международной космической станции [170].

1. Объемная кристаллизация (случай А, Рис.1.10), как и предыдущий метод, так же относится к наиболее простым и доступным методам кристаллизации белков. Суть метода состоит в том, что в кристаллизационной ячейке смешиваются равные объёмы раствора белка и осадителя. Затем ячейка герметично закрывается. В таком случае кристаллизационный раствор находится в состоянии нуклеации и при кристаллизации переходит в метастабильное состояние. В процессе кристаллизации изменяется только концентрация белка, поскольку часть молекул белка переходит в кристалл, а концентрация осадителя не изменяется [163].

2. Метод диффузии из паров. Процесс кристаллизации данным методом проиллюстрирован на Рис.1.10, случай В. Метод относится к наиболее простым и удобным методам кристаллизации белков. В резервуар кристаллизационной ячейки помещается раствор осадителя, на поверхность подложки (предметное стекло, кристаллическая подложка и пр.) наносятся равные объёмы (капля) растворов белка и осадителя, при этом используется концентрация осадителя в примерно два раза ниже, чем в резервуаре. Затем резервуар с подложкой герметично накрывают (куполом, крышкой и т.д., в зависимости от конструкции ячейки) таким образом, чтобы капля с белком и осадителем оказалась внутри кристаллизационной ячейки. С целью герметизации ячейки края ее крышки должны быть заранее покрыты веществом, обеспечивающим герметичность, например, вакуумной смазкой, парафиновой лентой и т.п.

При испарении воды из капли с белком концентрация осадителя будет расти пока не станет равна концентрации осадителя в резервуаре. Таким образом, в процессе испарения воды из капли с белком кристаллизационный раствор переходит из состояния ненасыщенного раствора в состояние нуклеации (Рис.1.10), а затем – в метастабильное состояние, в котором реализуется рост кристаллов [163].

3. Диализ (случай *C* на Рис.1.10). При кристаллизации белков данным методом используется полупроницаемая мембрана, которая обеспечивает поступление молекул осадителя, препятствуя при этом прохождению белка. Диализная мембрана помещается в раствор осадителя. Молекулы осадителя диффундируют за границу мембраны и смешиваются с раствором белка. С сохранением концентрации белка раствор постепенно переходит из ненасыщенного состояния в пересыщенное, в зону нуклеации, затем в метастабильную зону, где реализуется рост кристаллов.

Преимущество метода состоит в том, что степень насыщения белкового раствора можно контролировать и изменять. Уже образовавшиеся кристаллы могут быть растворены путем изменения состава раствора осадителя за пределами мембраны. Это позволяет проводить большое количество кристаллизаций с разными условиями на одном образце [163].

4. Метод свободной диффузии (случай *D* на Рис.1.10). Растворы белка и осадителя последовательно размещаются в капилляре так, чтобы один раствор располагался над другим. При медленной диффузии одного раствора в другой устанавливается градиент концентраций, который изменяется со временем. Постепенное изменение концентрации белка приводит к тому, что раствор переходит из ненасыщенного состояния в состояние пересыщения.

В капилляре подбираются разные условия, различное соотношение концентраций белка и осадителя, вследствие чего становится возможным определить оптимальные условия роста кристаллов [163].

Как отмечалось ранее, один из эффективных способов, позволяющих увеличить размер и улучшить дифракционное качество кристаллов белка, – рост в условиях микрогравитации, невесомости [145, 164].

Причина указанного явления состоит в том, что величина гравитации влияет на транспорт веществ к кристаллической структуре в процессе роста кристалла, что в свою очередь определяет степень упорядоченности, совершенства кристаллической решетки, и, следовательно, дифракционное качество выросшего кристалла. В условиях земной гравитации транспорт

веществ осуществляется конвекционными потоками. Поскольку в процессе роста вблизи кристалла возникает градиент концентраций белка в растворе, конвекционные потоки в таких условиях приводят к возникновению анизотропии условий роста для различных областей кристалла, что сказывается отрицательным образом на качестве его структуры.

В условиях микрогравитации вблизи кристалла в растворе возникает стабильный градиент концентраций белковых молекул, и кристаллическая решетка формируется в оптимальных условиях. «Кроме того, при диффузионном транспорте, преобладающем в этих условиях, скорость роста замедляется, и молекулы с большей энергией, первоначально присоединившиеся неправильно, могут диссоциировать от кристалла и при повторном присоединении занять оптимальное положение. Это понижает мозаичность кристаллов и увеличивает их совершенство» [164].

Также, важно отметить, что в земных условиях выросший до определенных размеров кристалл опускается на дно кристаллизатора, и дальнейший рост кристалла в таких условиях может изменить его конечную форму. В невесомости кристалл не опускается на дно, а плавает в растворе, в результате чего «доставка» веществ к поверхности кристалла осуществляется равномерно, благодаря «сферической симметрии диффузионного поля» [164]. Таким образом, в условиях микрогравитации реализуется рост изометричных кристаллов.

По данным рентгеновских исследований [146 – 151, 171], дифракционное поле кристаллов, выращенных в невесомости, на $0.3 - 0.4 \text{ \AA}$ превышает поле контрольных кристаллов, полученных в земных условиях. Пространственная структура исследуемых белков, при использовании «космических» кристаллов, была определена в интервале разрешений от 1.05 до $1.7 \text{ \AA}$ [164].

1.4. ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ И РОСТА КРИСТАЛЛА БЕЛКА НА ПРИМЕРЕ ЛИЗОЦИМА

Один из наиболее важных аспектов в понимании механизмов кристаллизации белков – установление структуры элементов, которые участвуют в построении ядра при нуклеации и в последующем росте белкового кристалла.

Существует классическая и двухступенчатая модели нуклеации [172]. В классической модели нуклеации полагается, что рост кристаллов происходит путем присоединения отдельных молекул белка. Вначале образуется зародыш, затем он приобретает критический размер, при котором он уже не распадается на отдельные молекулы. В этого момент начинается рост кристалла – к зародышу присоединяются отдельные молекулы, выстраивая упорядоченную кристаллическую структуру.

В [172, 173] описана двухступенчатая модель нуклеации, которая состоит в следующем. Первая ступень – этап формирования «мезоскопического кластера», образованного отдельными молекулами белка, агрегатами или олигомерами. Вторая ступень – формирование упорядоченной структуры сформировавшегося кластера, после чего начинается рост кристалла путем присоединения к кластеру отдельных молекул белка, агрегатов или олигомеров.

В ряде работ [174 – 179], посвященных исследованиям процессов кристаллизации белков, рассматривалась возможность формирования комплексов в пересыщенном растворе.

Большое количество работ по исследованию процесса кристаллизации белков было выполнено на примере модельного белка лизоцима из куриного яйца (*Hen Egg-White Lysozyme*, HEWL) и роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии ввиду малой трудоемкости процесса и доступности указанного белка.

Лизоцимы (ЕС 3.2.1.17) представляют собой гидролитические ферменты, характеризующиеся способностью расщеплять β -(1,4)-гликозидные связи

между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в пептидогликане, «главном» полимере клеточной стенки бактерий [180].

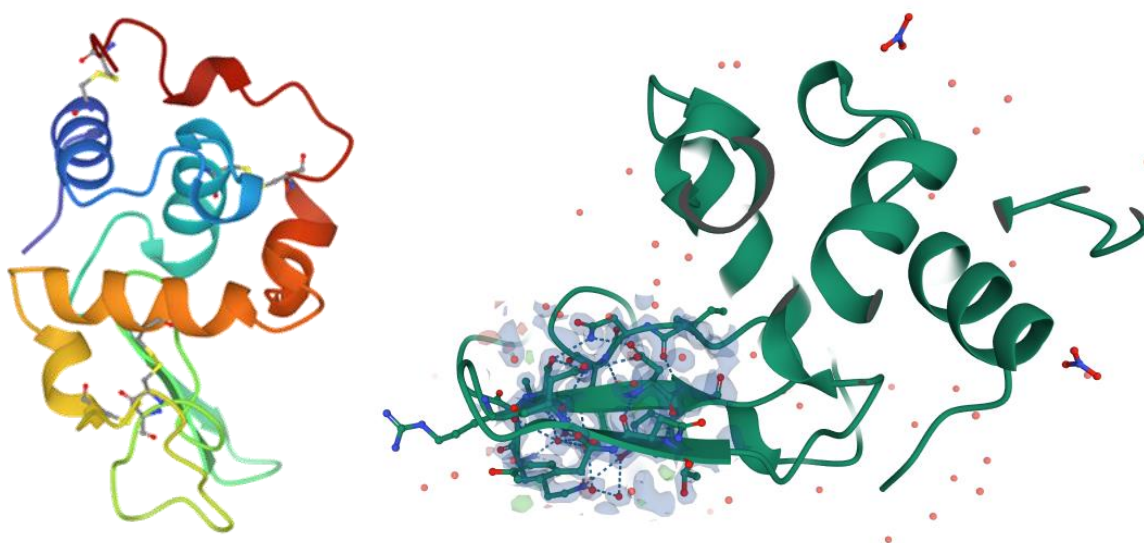


Рис. – Структура лизоцима PDB ID: 1JKC. (а) – 3D структура; (б) – структура электронной плотности малого домена³.

HEWL был первым ферментом, структура которого была определена с методом рентгеноструктурного анализа в белковой кристаллографии [181 – 183]. С тех пор белок служил модельной системой в химии белка, энзимологии, кристаллографии и молекулярной биологии для изучения сворачивания белка, катализа и механизмов ферментации, эволюции фермента и инженерии белка [184 – 188].

Относительно небольшая молекула лизоцима HEWL имеет только 129 аминокислотных остатков в полипептидной цепи, но содержит четыре дисульфидных мостика. Это делает молекулу белка достаточно жесткой и удобной для использования в большом количестве модельных экспериментов.

Следующий раздел посвящен исследованиям растворов лизоцима, процессам агрегации молекул и кристаллизации на начальной стадии роста кристалла.

³ Рисунки получены с использованием ресурсов <https://www.rcsb.org/>

1.4.1. Исследования растворов лизоцима. Процессы агрегации и кристаллизации

Был проведен ряд исследований растворов лизоцима с применением метода динамического рассеяния света (ДРС), который является неразрушающим методом, позволяющим проводить *in situ* исследования. В связи с этим метод ДРС применялся во многих работах по исследованию процесса кристаллизации лизоцима.

В [189] представлены результаты исследований методом ДРС раствора лизоцима в условиях, соответствующих условиям роста кристаллов тетрагональной сингонии: 20 мг/мл раствор лизоцима с добавлением 2.5 % w/v хлорида натрия в натрий ацетатном буфере (40 mM, pH 4.6). «Управление» процессом кристаллизации осуществлялось путем изменения температуры, поскольку растворимость лизоцима зависит от температуры значительным образом [190]. Все измерения, которые проводились при разных температурах (T), были реализованы до того, как кристаллы достигли размеров 150 – 200 мкм.

В результате исследований при температуре $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ было показано, что раствор лизоцима был ненасыщенным, и растворимость белка составляла 22 мг/мл. Полученная величина гидродинамического радиуса составила $22.5\text{ }\text{\AA}$, что достаточно близко по величине к данным, полученным в [191] ($21.2\text{ }\text{\AA}$). В результате был сделан вывод о составе раствора лизоцима – в данных условиях он состоит из невзаимодействующих, одиночных молекул белка.

В результате исследований при $T = -2\text{ }^{\circ}\text{C}$, после выдерживания раствора в течение 5 часов, наблюдалось увеличение гидродинамического радиуса, который спустя 10 – 11 часов достиг максимальной величины $33\text{ }\text{\AA}$. После этого радиус стал уменьшаться, пока его величина не достигла исходного значения. После достижения максимального значения радиуса, на пластине, расположенной последовательно за кюветой с раствором, наблюдались дифракционные кольца, что свидетельствовало об образовании кристаллов с

характерными размерами ≈ 30 мкм. Размеров 150 – 200 мкм кристаллы достигали в течение 2 дней. Методом оптической микроскопии было показано, что морфология выросших кристаллов соответствует морфологии кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии (получаемых при использовании NaCl в качестве осадителя, при $T < 25$ °C).

Были проведены исследования при $T = -5$ °C с целью установления соответствия/несоответствия величины гидродинамического радиуса размеру критического зародыша лизоцима. В результате эксперимента: отношение максимального значения радиуса к исходному составило 1,75 (в предыдущем случае 1,55 при $T = -2$ °C); время кристаллизации составило 11 – 12 часов, примерно вдвое меньше в сравнении с предыдущим случаем. В соответствии с теоретическими представлениями, размер зародыша при насыщении раствора должен уменьшаться, в то время как гидродинамический радиус в экспериментах – увеличивается. Вследствие этого был сделан вывод: гидродинамический радиус отражает процессы как образования критического размера зародыша, так и взаимодействия между молекулами белка.

В результате описанных исследований процессов кристаллизации лизоцима было показано, что фаза зародышеобразования есть быстрый процесс в сравнении с временами роста кристалла. При этом критический зародыш может состоять всего лишь из нескольких молекул, а рост кристалла реализуется путем присоединения либо одиночных молекул, либо малых агрегатов.

В [176] методом ДРС проводились исследования раствора лизоцима в условиях кристаллизации при добавлении осадителя и скорости роста граней кристалла методом оптической микроскопии. Проводились исследования раствора лизоцима (при относительном пересыщении $\sigma = 2.58$ и $\sigma = 4.68$) с 7 % хлоридом натрия, растворенных в 50 мМ натрий ацетатном буфере, pH 4.5 при температуре 26.5 °C. Скорости роста граней кристаллов исследовались при таких же условиях. Было показано, что до образования кристаллов в растворе присутствуют агрегаты с размерами 5.62 и 7.50 нм для $\sigma = 2.58$ и $\sigma = 4.68$

соответственно. При этом был сделан вывод, что с увеличением концентрации белка растет размер агрегатов.

При исследовании морфологии кристаллов показано, что через 45 мин после начала роста грань (110) кристалла при $\sigma = 4.68$ меньше, чем при $\sigma = 2.58$. С ростом кристалла грань (110) при $\sigma = 4.68$ постепенно увеличивается и в итоге, кристалл имеет такую же форму как кристалл при $\sigma = 2.58$.

Из данных о размерах мономеров $3.79 \text{ нм} \times 2.8 \text{ нм} \times 2.8 \text{ нм}$, было сделано предположение, что агрегаты с размером 5.62 нм соответствует тетрамерам, а агрегаты с размером 7.50 нм соответствуют октамерам. Из-за разницы в скоростях роста граней был сделан вывод о том, что тетрамеры участвуют в росте граней (101), а октамеры – (110).

В [192] проводилось изучение агрегации молекул лизоцима методом ДРС в пересыщенных растворах в условиях, соответствующих условиям роста кристаллов тетрагональной и орторомбической сингоний. Авторами было выдвинуто предположение, что кристаллизация проходит в несколько этапов. Вначале в растворе присутствуют только момеры белка. Было показано, что на первом этапе образуются единицы, состоящие из нескольких молекул белка, радиус которых составляет от 2.0 до 3.5 нм . На втором этапе из таких единиц формируются кластеры, размер которых составляет от 0.1 до 1 мкм . На третьем этапе происходит агрегация самих кластеров, сопровождающаяся образованием первых кристаллов. Так, авторами было показано, что формирование вышеуказанных единиц и кластеров создает условия для роста кристаллов. Также, было показано, что динамика образования белковых единиц или кластеров одинакова как в случае орторомбической, так и тетрагональной сингонии.

В [193] проводились исследования, аналогичные описанным выше. Методом ДРС были изучены растворы лизоцима разной степени пересыщения при добавлении осадителя NaCl . Были обнаружены частицы двух типов – с радиусом $25 \text{ \AA}$ и $2700 \text{ \AA}$. Поскольку размер мономера, определенный из

кристаллической структуры, составлял 17 Å, был сделан вывод, что первая частица представляет собой мономер, а вторая – агрегат, включающий тысячи молекул.

В [194] методом ДРС проводилось исследование растворов лизоцима при добавлении осадителей NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в зависимости от их концентрации. Было обнаружено, что в растворе лизоцима наряду с мономерами или небольшими олигомерами, на начальной стадии агрегации образуются фрактальные кластеры. Также, на более поздней стадии агрегации методом статического рассеяния света (CPC) была выявлена прогрессивная перестройка фракталов в компактные структуры.

С использованием импульсно-градиентных ЯМР измерений в [195] проводились исследования динамики лизоцима в растворе в зависимости от ряда параметров: концентрации белка, осадителя NaCl, pH и температуры. Изоэлектрической точкой для молекулы лизоцима является число 11, поэтому при нормальном pH молекула имеет чистый положительный заряд. Поскольку молекула лизоцима заряжена, изменения в коэффициентах диффузии интерпретировались с учетом конкурирующих эффектов изменений в белковых взаимодействиях (например, электростатического отталкивания) и агрегации. Поведение молекул в растворе согласовывалось с моделью Дерягина-Ландау-Вервей-Овербека, учитывающей силы притяжения и отталкивания. Экспериментальные данные диффузии сравнивались с различными моделями самоорганизации. Коэффициенты диффузии высших олигомеров были получены из предположения, что мономеры агрегируют в виде твердых сфер. Используя модель изодесмической ассоциации, константа равновесия для самоорганизации лизоцима при pH 4.6 и 298 K в присутствии 0.5 M NaCl оценивалась как $(118 \pm 12) \text{ M}^{-1}$. Результаты работы демонстрируют доказательства агрегации лизоцима при высоких концентрациях солей.

Таким образом, в [192, 195] обсуждалось образование кластеров белка в растворе с размерами от 100 нм до 1 мкм, играющие важную роль в процессе кристаллизации, а в [194, 196 – 198] методами ДРС, CPC описано

формирование фрактальных кластерных агрегатов на начальной стадии кристаллизации. Однако связь между кристаллизацией белка и фрактальной агрегацией не была установлена. Агрегаты (кластеры), которые могут являться кристаллическими зародышами, могут отличаться по структуре от агрегатов, присутствующих в растворе, но не участвующих впоследствии в формировании кристаллической структуры.

В [199] предложен подход к исследованию агрегации лизоцима в растворах на начальной стадии кристаллизации, основанный на анализе профилей прямого статического рассеяния света (П-СРС). В работе изучались растворы лизоцима с концентрацией белка 10 – 30 мг/мл при добавлении NaCl. Растворы лизоцима демонстрировали профили П-СРС, которые описываются нецелочисленным (α) степенным законом, что указывает на образование фрактальных агрегатов лизоцима. При концентрациях HEWL и NaCl 20 мг/мл и 4.0 % (мас./об.), соответственно, α составляло 1.59 ± 0.06 ; при концентрациях 30 мг/мл и 3.5% (мас./об.) – 1.66 ± 0.05 . Также, было показано, что рассеяние от растворов с концентрацией 1.5 % (мас./об.) не имеет степенного закона, и, следовательно, фрактальные кластеры не образуются. При этом в растворе с концентрацией 1.5 % (мас./об.) кристаллы лизоцима не образовались. В предкристаллизационных растворах, в которых в дальнейшем выросли кристаллы, формировались плотные структурные фрактальные кластеры с фрактальной размерностью $D > 1,5$.

Единицы роста кристаллов HEWL из раствора изучались методом аналитического ультрацентрифугирования в [200]. В качестве исследуемых образцов использовались растворы с различными концентрациями белка и осадителя NaCl, и режим ультрацентрифугирования соответствовал условиям, когда осаждение и диффузия находились в равновесии. Во всех растворах, за исключением тех, в которых впоследствии выросли кристаллы, молекулярный вес частиц варьировался в диапазоне $(12 - 16,5) \times 10^3$ кДа. На основе данных о молекулярной массе мономера лизоцима (равной $14,4 \times 10^3$ кДа) был сделан

вывод, что молекулы лизоцима в ненасыщенных и в пересыщенных растворах пребывают только в виде мономеров.

Ряд работ по исследованию кристаллизации лизоцима был проведен с применением методов малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и рассеяния нейтронов (МУРН). Указанные методы широко применяются при изучении структуры растворов и в исследованиях процесса кристаллизации, позволяют определить состояние белкового раствора, моодисперсное или агрегированное (полидисперсное), размеры, форму молекул белка и агрегатов.

В [2] проводилось исследование процесса кристаллизации раствора HEWL методом МУРН. Кристаллизация проводилась в условиях роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии с использованием тяжелой воды. Было показано, что при условиях кристаллизации радиус инерции был выше, чем в моодисперсных системах мономеров, но ниже, чем в моодисперсных системах олигомеров. В исследуемых растворах присутствовали олигомеры с эффективными радиусами: 13.5 Å, 20.5 Å, 27.2 – 27.7 Å, 31.8 – 32.6 Å, которые, вероятнее всего, являются соответственно мономерами, димерами, тетрамерами и октамерами. На основе этих результатов были сделаны выводы, что в ненасыщенном растворе присутствуют мономеры и димеры, в насыщенном только димеры, а в пересыщенном тетрамеры и октамеры. Также было сделано предположение, что тетрамеры являются минимальными строительными единицами роста. Октамеры в свою очередь являются строительными единицами роста необходимыми для образования критических зародышей и также максимальными единицами роста кристалла. Также был продемонстрирован рост радиуса инерции с понижением температуры раствора.

К сожалению, кривые рассеяния были записаны только в диапазоне малых углов. Данные результаты не дают полной картины в части типов олигомеров и их распределений по размерам. Авторам не удалось достичь хорошей воспроизводимости результатов, вероятно, из-за специфики

методики подготовки образца (недостаточной чистоты процедур фильтрации и центрифугирования).

В [201, 202] были проведены исследования методом МУРН ненасыщенных и перенасыщенных растворов лизоцима при добавлении хлорида натрия в качестве осадителя. Показано, что ненасыщенный раствор лизоцима пребывает в равновесном состоянии, в то время как пересыщенный – в неравновесном, и в пересыщенном растворе был осуществлен рост кристаллов. Также, в пересыщенном растворе обнаружены агрегаты двух типов: первого типа с размерами 200 – 600 Å; второго – около 30 Å. При этом наблюдалась динамика размеров агрегатов на протяжении 14 часов, и концентрация агрегатов второго типа превышала концентрацию первого в 10^5 раз.

С применением метода МУРР в [4] проводилось исследование влияния различных солей на взаимодействие между молекулами лизоцима в ненасыщенных растворах в 50 мМ натрий ацетатном буфере при постоянном рН 4.5 и температуре 18 °С.

Было показано, что в разбавленном растворе лизоцима белок находится в виде мономеров. При увеличении концентрации момеры остаются в растворе, а отталкивающее белок-белковое взаимодействие все более проявляется на кривых рассеяния. При добавлении одновалентных солей раствор лизоцима остается монодисперсным (в составе только момеры), не переходя к нуклеации. Однако добавление сульфата аммония приводит к формированию полидисперсных олигомеров в растворе.

При более высокой концентрации лизоцима (когда на кривой рассеяния проявляется эффект межчастичной интерференции) при низкой ионной силе раствора наблюдалось отталкивание между молекулами, а при повышении ионной силы наблюдается притяжение между молекулами, которое приводит к изменению состояния белковых молекул и началу кристаллизации. Данный эффект непрерывно наблюдался независимо от характера добавленной соли и возрастал при увеличении ее концентрации.

В то время как все катионы (Li^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Cs^+) показали одинаковый эффект, между анионами наблюдались значительные различия в их эффективности изменения потенциала взаимодействия. Был установлен такой же порядок анионов (SCN^- , паратолуол сульфат, NO_3^- , Cl^- , H_2PO_4^-), который наблюдали при эффективности снижения растворимости лизоцима и инициирования кристаллизации. Так, было показано, что эффективность влияния анионов на белково-белковое взаимодействие укладывается в обратный ряд Гофмейстера. Подобное поведение наблюдалось в исследованиях растворимости белка лизоцима [203, 204].

Стоит отметить, что растворители, поддерживающие функциональность белков, представляют интерес для биохимических применений, и поиск новых растворителей – актуальная проблема. Методами Фурье-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии, МУРР и рентгеновской кристаллографии проводилось исследование влияния ионных жидкостей (ИЖ) на конформационные изменения лизоцима [205]. Методами спектрометрии показано, что вторичная структура лизоцима сохраняется при более низких концентрациях ИЖ, равных 1 и 5 мол.%. Радиус гирации лизоцима увеличивается в присутствии 1 мол.% ИЖ, а затем уменьшается с увеличением концентрации ИЖ. Третичная структура, особенно области петель, изменялась в зависимости от концентрации ИЖ, а это зависело от ее типа. Кристаллографическая структура лизоцима с присутствующей ИЖ нитрата этиламмония подтвердила, что область петли была расширена, и идентифицировала три специфических сайта связывания с нитрат-ионами.

1.4.2. Исследования процесса роста кристалла лизоцима

Исследования процесса роста кристалла лизоцима, главным образом, проводились методом атомно-силовой микроскопии.

В [206, 207] изучали скорости роста грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в зависимости от степени пересыщения белка в

растворе. Был проведен анализ данных с помощью модели диффузии для определения эмпирической зависимости между скоростью роста и локального пересыщения на границе раздела. Рост кристалла из раствора можно рассматривать как двухстадийный процесс: сначала идет транспорт растворенного белка к границе роста, затем происходит встраивание частиц в кристаллическую решетку на границе роста. На основании полученных данных в [207] было выдвинуто предположение о том, что олигомеры в растворе белка с осадителем (димеры и тетрамеры) участвуют в росте кристалла.

Измерения усредненных или макроскопических скоростей роста грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии проводили в работе [208] при различных концентрациях белка в зависимости от температуры (4 – 22 °C) при разных значениях pH и концентрации соли. Зависимости скорости роста от перенасыщения были схожи с полученными в предыдущих работах микроскопическими скоростями роста. Тем не менее, было обнаружено, что при высоких значениях пересыщения скорости роста достигают максимума, а затем начинают уменьшаться. Обнаружить «мертвую зону» не удалось, однако было определено, что, скорость роста асимптотически стремилась к нулю при очень низком значении пересыщения. Данные скорости роста также продемонстрировали зависимость от pH и концентрации соли. Такая зависимость не может быть охарактеризована исключительно пересыщением. Кроме того, предложен полный механизм роста кристаллов лизоцима, включая формирование агрегатов-единиц роста, перенос массы единицы роста к границе раздела кристалла и рост граней кристаллов за счет присоединения к ним единиц роста. Такой механизм может обеспечить более последовательное объяснение наблюдаемых тенденций скорости роста, чем механизмы, предложенные другими исследователями. Возможно, взаимодействия в кристаллизационном растворе, приводящие к образованию агрегатов-единиц роста, столь же важны, как и те взаимодействия, которые

происходят на границе раздела кристалла. Именно эти процессы и могут отвечать за различия между ростом кристаллов и белковых молекул.

В [209] исследовали скорости роста грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, которые показали сложную зависимость от степени перенасыщения. В более ранних исследованиях было показано, что такие тенденции роста можно объяснить образованием агрегатов – строительных единиц кристалла. В частности, упаковка молекул и взаимодействия в процессе роста кристалла объяснены образованием спиралей вдоль винтовой оси 4_3 .

В данной работе была рассмотрена кристаллическая структура кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии и проанализированы связи между молекулами. На основе такого анализа бы выявлено, что рост грани (110) представляет собой двухступенчатый процесс: сильные межмолекулярные связи вызывают быстрое образование и накопление в объеме раствора лизоцима агрегатов винтовой осью 4_3 , в то время как более слабые связи в основном ответственны за более медленное присоединение единиц роста к грани кристалла. Процесс образования агрегатов в объеме происходит намного быстрее процесса присоединения к граням кристалла. Это связано с силой связей.

Ни одна из стандартных моделей скорости роста, проверенных в данной работе, с мономерами в монодисперсном растворе лизоцима в качестве единиц роста или тетрамерами в растворах с распределением агрегатов, не может объяснить наблюдаемые тенденции скорости роста в зависимости от температуры и концентрации лизоцима. Скорости роста в двух дислокационных и одной модели двумерного зарождения с октамером в качестве единицы роста превосходно согласуются с измеренными в эксперименте; это согласуется с результатами анализа структуры кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии и микроскопических наблюдений роста данных кристаллов [210]. С помощью микроскопических исследований было показано, что даже с октамером в виде единицы роста, при меньшем

пересыщении белка более точные результаты дает дислокационная модель, а при высоком – модель двумерного зарождения; отличия в расчетах при использовании двух разных дислокационных моделей были незначительными.

Также было отмечено, что при уменьшении температуры или при увеличении концентрации белка, происходит рост концентрации олигомеров более высоких порядков.

В работе [5] исследовали механизмы роста грани (101) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии с помощью математического моделирования. Как и в предыдущей работе рассматривались различные модели роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии за счет присоединения мономеров, тетрамеров и октамеров к растущей грани. Расчеты показали, что лучше всего подходит модель, содержащая единицы роста в виде тетрамеров или октамеров. Анализируя результат исследования, было сделано предположение о том, что рост грани может осуществляться различными единицами роста, средний размер которых располагается между размерами тетрамеров и октамеров.

Работа [211] посвящена исследованию механизмов роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). В работе исследовали ступени роста кристалла. Показано, что одиночное сканирование вдоль $[\bar{1}10]$ направления соответствует ширине единиц роста с винтовой осью 4_3 : 5.6 нм и 11.2 нм. Средний размер стандартного отклонения размера единицы роста по всем сканам составило 1.2 нм.

Распределение размеров единиц роста, полученное из 65 сканов в направлении $[001]$ (вдоль винтовой оси 4_3), то есть, фактически, высота единицы роста, отвечающая количеству витков спирали 4_3 , составляет 3.8 нм (один), 7.6 (два), 11.4 нм (три). Данные размеры соответствуют, по мнению авторов, одной и двум единицам с винтовой осью симметрии 4_3 . На основе полученных данных о размерах ступеней были сделаны выводы о том, что тетрамер, соответствующий одному витку спирали 4_3 , является минимальной

единицей роста для грани (110). Результаты этой работы согласуются с результатами анализа периодических цепей связи (ПЦС) [5, 212 – 214] и полученными ранее экспериментальными данными [215 – 217].

В предыдущих исследованиях структуры кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии методом АСМ и методом ПЦС было выдвинуто предположение, что грань (110) состоит из цепей молекул, которые располагаются по отношению друг к другу по винтовой оси 4_3 , параллельной грани кристалла. Для подтверждения этого предположения в работе [218, 219] были получены и обработаны фотографии АСМ высокого разрешения. С помощью компьютерной программы были сконструированы теоретические АСМ изображения, соответствующие определенной упаковке молекул и форме наконечника иглы АСМ. Параметры упаковки и форму иглы меняли, чтобы получить максимально возможную корреляцию между экспериментальными и теоретическими изображениями. Предположения, основанные на ПЦС анализе, о расположении/упаковке молекул вокруг винтовой оси 4_3 были подтверждены, поскольку альтернативное расположение, состоящее из молекул, связанных друг с другом по оси 2_1 , не наблюдалось. Тем не менее, было установлено, что структура поверхности существенно отличается от кристаллографического расположения молекул в объеме кристалла. Было обнаружено, что молекулы на границе упакованы плотнее относительно оси 4_3 , чем молекулы, находящиеся в объеме кристалла. В процессе роста и покрытия поверхности новыми слоями молекул происходит релаксация молекул первоначальной границы в правильное кристаллографическое расположение. Если такое перераспределение действительно происходит на грани (110) кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, то эта работа является первой в мире, в которой показано что на поверхности белкового кристалла происходит реорганизация молекул, которая в какой-то мере соответствует реконструкции поверхности, широко наблюдаемой на неорганических кристаллах. Данное исследование

представляет новый подход более точного определения механизмов молекулярной упаковки на гранях белковых кристаллов методом АСМ.

В результате, были проведены исследования механизма роста грани (110) с применением двух подходов. Первый заключался в анализе молекулярной упаковки в кристаллической структуре тетрагонального лизоцима и установлении связи с механизмом роста грани кристалла [209, 212, 214]. В том числе, методом АСМ было показано, что рост кристаллов тетрагонального лизоцима реализуется посредством присоединения агрегатов, содержащих винтовую ось 4_3 [211, 217, 218]. В основе второго подхода лежит установление связи условий роста со скоростями роста граней кристалла, анализ процессов как в растворе, так и на поверхности кристалла [208, 209]. Была построена теоретическая модель, позволяющая рассчитывать скорости роста граней для заданной структуры кристалла, которые затем сравнивались с экспериментальными значениями скоростей.

Аналогичным образом, на основе анализа кристаллической упаковки, проведенного в [212], где было показано, что минимальная «единица роста» есть тетрамер, содержащий винтовую ось 4_3 , с применением двух вышеуказанных подходов к исследованию роста грани (101) [5] было определено, что рост, вероятно, реализуется при участии нескольких типов кластеров (единиц роста) и их средних размер соответствует величине в интервале размеров от тетрамера до октамера.

Методом АСМ в [220] было показано, что в большинстве случаев высота ступеней роста грани (110) кристалла лизоцима тетрагональной сингонии составляла 5.5 ± 0.3 нм. Однако также наблюдались и ступени высотой 2.8 нм, но такие ступени встречались только попарно.

В [221] проводились исследования роста тетрагональных кристаллов лизоцима на ранней стадии кристаллизации в различных условиях, при использовании семи концентрация в диапазоне величин 25 – 55 мг/мл, осадителя и буфера 5 % раствора NaCl (w/v) и 0.1 М натрий-ацетатного буфера с pH 4.0, соответственно, при фиксированной температуре 22.0 °C. Анализ

экспериментальных скоростей роста и процессов, согласно модели [210], позволил определить, что, тетрамеры и октамеры – возможные единицы роста, представляющие собой наиболее объемную фракцию агрегатов, оказывающих влияние на рост кристаллов, а тетрамер, по-видимому есть минимальный критический зародыш, во всем диапазоне концентраций.

Теоретические исследования процесса роста кристалла лизоцима и кинетики его поверхности были проведены методом компьютерного моделирования на основе случайного процесса Монте-Карло [222]. В моделировании в качестве единиц роста использовались мономеры, димеры и тетрамеры, а рассчитанные скорости роста граней сравнивались с экспериментальными значениями [208]. Показано, что только при включении в расчет агрегатов (не мономеров) результаты моделирования удовлетворительно соответствуют экспериментальным данным.

В [223] методами ДРС, АСМ и Броуновской микроскопии проводились исследования нуклеации в условиях кристаллизации. Показано формирование в пересыщенном растворе мезоскопических кластеров размером в несколько сотен нанометров, существующих благодаря конформационной гибкости белковых молекул и предшествующих нуклеации.

В [173, 224 – 226] предложен двухступенчатый механизм зарождения кристаллов в растворе: 1 – формирование беспорядочных белковых кластеров мезоскопического размера; 2 – образование кристаллических ядер внутри кластеров [224, 227, 228]. Данный механизм позволил объяснить ряд расхождений между теорией и экспериментом в исследованиях скоростей роста кристаллов, которые на десять или более порядков ниже предсказанных классической теорией нуклеации [225, 228, 229].

В таком случае, существование такого рода кластеров размером до нескольких сотен нанометров представляют собой вторую фазу. Поскольку раствор сохраняет три степени свободы – температура, давление и концентрация, – то в соответствии с фазовым правилом Гиббса $f = 2 + c - \pi$, где f – число степеней свободы, c – число компонент и π – число фаз, при $f = 3$,

$\pi = 2$ получается $c = 3$. Две компоненты тривиальные – белок и растворитель. Третья компонента есть следствие образования кластерной фазы и можно предположить, что этот новый компонент лежит в основе кластерного механизма. Он должен быть новым химическим состоянием белка, формироваться при высокой концентрации белка и распадаться при низкой, и это свидетельствует о том, что этот компонент наиболее вероятно должен представлять собой слабосвязанный димер белка или другой олигомер [230].

Также, исследования процесса кристаллизации лизоцима проводились методом АСМ в [231]. В работе представлены результаты исследования морфологии и кинетики роста нескольких граней кристаллов лизоцима орторомбической и моноклинной сингонии. На основе полученных данных исследования грани (010) кристаллов лизоцима орторомбической сингонии об удвоенном параметре решетки вдоль осей a и b сделан вывод, что при взаимодействии раствора с поверхностью грани происходит реконструкция последней.

Кристаллы лизоцима растут по дислокационному механизму при параметре пересыщения $s < 3$ ($s = C/C_0 - 1$). Показаны дефекты на ступенях кристалла, их плотность мала настолько, что они не взаимодействуют. Движение ступеней происходит за счёт заравнивания дефектов единицами роста. Глубина дефектов составляет от 7.2 нм, что соответствует параметру элементарной ячейки вдоль оси b .

Известно [232 – 234], что зарождающиеся кристаллиты белка взаимодействуют со ступенями графоэпитаксиальной структуры и осаждаются на них ориентированным образом. Рост биокристаллов реализуется присоединением монокристаллических блоков биологических макромолекул к торцам микро- или макроступеней, созданных на поверхности кристаллизационной подложки.

1.5. ПОЛУЧЕНИЕ ПЛЕНОК И ИССЛЕДОВАНИЯ ИХ СТРУКТУРЫ

1.5.1. Методы получения

В настоящее время можно выделить следующие методы получения ансамбля белковых молекул в виде пленки на твердой подложке. К наиболее широко применяемым методам относятся методы на основе адсорбционных свойств молекул белка и поверхности, ленгмюровская технология, методы послойного нанесения, самосборки, химического связывания и другие. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, и выбор определяется поставленной задачей, требуемой структурой и свойствами будущего материала.

Адсорбция на границах раздела

Один из наиболее широко используемых методов получения пленки, состоящей из молекул белка, – адсорбция на поверхности твердой подложки. Указанный метод имеет полезное практическое применение в медицине в связи с важностью адсорбционных свойств, например, биоимплантов, а также в разработке устройств биосенсоров. Также, метод адсорбции на границах раздела активно применяется в пищевой промышленности.

В исследованиях явления адсорбции и отдельных связанных с ним задач ряд работ посвящен изучению факторов, определяющих как стабильность молекул, так и структуру формируемых на границе раздела пленок [235 – 240]. К таким факторам относятся гидрофобные свойства поверхности, зависимость от pH среды, ионной силы, изменение концентрации белка, температура, присутствие в растворе различных добавок.

Процесс формирования пленки реализуется посредством соприкосновения поверхности твердой подложки с раствором (жидкой средой), содержащим молекулы белка (макромолекулы, биомолекулы и т.д.). Наиболее простой способ такого контакта – погружение подложки в раствор, в котором белок находится в требуемых (технологией) условиях; как правило

белок растворяют в буферном растворе, что обеспечивает стабильность его молекул. В связи с этим исследованиям поведения белковых молекул при контакте с различными твердыми поверхностями уделяется особое внимание [241].

Осуществление контроля ориентации молекул белка на поверхности одна из основных задач формирования молекулярного слоя методом адсорбции. После формирования пленки ориентация молекул определяется путем сравнения экспериментальных данных с расчетными величинами, соответствующими молекулярному покрытию с заданной в нем ориентацией молекул белка [242, 243]. Другой способ заключается в определении толщины полученной пленки и ее сопоставлении с известными размерами молекулы белка [244].

Ориентация молекул на поверхности подложки – крайне важная характеристика формируемого молекулярного слоя при разработке и создании биосенсоров, например, при использовании ферментов важное значение имеет ориентация каталитически активного ферментного центра, что определяет функциональные свойства создаваемого устройства.

Также, на структуру слоя в процессе его формирования существенным образом влияет наличие различных добавок (примесей) в растворе, оказывающих влияние на условия, в которых белок пребывает в растворе, в частности, на стабильность его молекул и, соответственно, величину покрытия и другие параметры белкового слоя на подложке [239, 245, 246]. Так, в [236, 247, 248] было показано, что при добавлении солей неорганических кислот в методе адсорбции может привести к образованию многослойной пленки.

В [249] было исследовано формирование пленок альбумина, сформированных из белковых растворов с добавлением NaCl при различных концентрациях соли, белка и температуры дегидратации. Было показано, что пленки имеют преимущественно дендритную структуру, образующуюся в результате процессов самоорганизации в водно-солевом растворе альбумина.

Наличие дендритов и их геометрические характеристики в значительной степени зависят от параметров самоорганизации в процессе изотермической дегидратации растворов. Для этого исследования был разработан уникальный алгоритм обработки изображений для определения структуры белковых пленок и расчета их фрактальной размерности в зависимости от различных параметров эксперимента.

Стоит отметить, что главным недостатком метода адсорбции как метода формирования белковых пленок на границе раздела раствор/твердая поверхность является проблема контроля толщины получаемой на подложке пленки. Адсорбция белка из жидкой среды зачастую приводит к формированию слоев и многослойных пленок, и определение ее детальной структуры, включая ориентацию молекул относительно подложки и взаимное расположение молекул на поверхности, остается достаточно сложной задачей.

Технология Ленгмюра-Блоджетт

Ленгмюровская технология (Ленгмюра-Блоджетт, ЛБ) – это технология контролируемого формирования упорядоченного монослоя молекул, позволяющая получить тонкий слой органических молекул, в том числе молекул белка. В отличие от описанного выше метода адсорбции на границе раздела, метод Ленгмюра-Блоджетт предоставляет возможность создания структуры пленки с определенной заданной организацией посредством контроля ее толщины и ориентации молекул в монослое [250]. Основы данной технологии были заложены в работах И. Ленгмюра и К. Блоджетт [251 – 255].

Метод ЛБ заключается в формировании на поверхности воды или водного раствора (субфазы) мономолекулярного слоя амфифильного органического вещества с последующим переносом сформированного слоя на поверхность твердой подложки, в результате чего на ней образуется упорядоченная органическая моно- или многослойная (при многократном переносе) пленка [256].

Поскольку ЛБ-технология позволяет с высокой точностью осуществлять контроль толщины монослоя, его однородность (гомогенность), а также обеспечивает возможность его переноса на любую твердую поверхность, она является одной из наиболее перспективных и многообещающих с точки зрения получения тонких пленок амфифильных молекул.

Описание применяемых в настоящей работе методик на основе ленгмюровской технологии получения органических тонких пленок приводится Разделе 2.7.1 Главы 2.

Первые работы по исследованию монослоев белков были проведены И. Ленгмюром и В. Шеффером [257, 258], которые показали, что молекулы белков формируют монослои на поверхности жидкости. Также, был предложен и разработан специальный способ переноса на твердые подложки – метод Ленгмюра-Шеффера (ЛШ), который состоит в горизонтальном соприкосновении подложки с монослоем [259]. В последующие годы интерес к исследованиям монослоев белков значительно вырос [260, 261], что связано, главным образом, с совершенствованием технологий выделения и очистки белков, а также первыми успехами в области белковой кристаллографии – расшифровки атомарной структуры белковых кристаллов и молекул.

Несмотря на то, что методы ЛБ, ЛШ обеспечивают возможность переноса монослоя белка на твердую подложку, считается, что горизонтальный перенос ЛШ-методом более эффективен для формирования белковых пленок, поскольку он позволяет получить однородные (гомогенные) и воспроизводимые монослои на подложках [262 – 267].

Два важных вопроса, возникающие при адсорбции глобулярных белков на поверхности водной субфазы: 1 – приводит ли формирование слоя на поверхности к денатурации белка; 2 – степень погруженности белковой молекулы в субфазу. Определение ориентации молекул в монослое и степени их погружения дает важную информацию о соотношении гидрофобности-гидрофильности в молекуле белка. С целью минимизации эффекта погруженности в субфазу при формировании монослоя можно использовать

добавки, которые снижают растворимость белка, например, используются неорганические соли, которые являются электролитами, их добавляют в субфазу, тем самым препятствуя проникновению молекул с поверхности вглубь субфазы [268, 269].

Также, научный и практический интерес представляет возможность адсорбции молекул белка из водной субфазы в липидный слой, сформированный на границе раздела (интерфейсе) «вода-воздух». Молекулы белка могут либо встроиться в предварительно сформированный монослой, либо провзаимодействовать лишь с полярными группами липидов [270, 271].

В [272, 273] описан другой способ получения белково-липидных пленок. При однократном или многократном переносе предварительно формируется липидная ЛБ-пленка на твердой подложке, затем полученная пленка погружается в раствор белка, в котором реализуется взаимодействие белка с липидной структурой. Данный способ представляется перспективным с точки зрения создания модельных биоподобных белково-липидных мембран и изучения их поведения [274 – 276].

Споровая оболочка *Bacillus subtilis* — это бактериальная белковая структура с удивительными характеристиками самоорганизации, уникальной упругости, прочности и гибкости одновременно. Оболочка споры представляет собой сложную многослойную белковую структуру, которая состоит из более чем 80 белков. Некоторые из этих белков образуют двумерные кристаллические 2D структуры, однако трехмерная структура этих белков, определенная с помощью электронной микроскопии, имеет низкое разрешение в виду проблемы получения трехмерных кристаллов. В [277] метод рассеяния рентгеновских лучей при скользящем падении (GIWAXS) был применен для исследования дифракционной картины 2D-кристаллов CotY, сформированных с помощью модифицированного метода ЛШ.

В [278] разрабатывался метод получения самостабилизирующихся слоев одного из гликопротеинов внеклеточного матрикса фибронектина (FN) с сохраненной нативной вторичной структурой на подложке. Формирование

слоев FN происходило на границе раздела вода-воздух, далее происходил перенос слоев на подложку методом ЛШ. Предполагается, что двумерное ограничение и высокая локальная концентрация на границе вода-воздух поддерживают самосвязывание FN с образованием когезионных пленок. *In situ* модуляционная спектроскопия (Polarization modulation infrared reflection-absorption spectroscopy, PM IRRAS) показала, что FN сохраняет свою естественную антипараллельную структуру бета-листа после адсорбции на границе раздела воздух-вода.

Методы: послойное формирование; самоорганизующиеся монослои; иммобилизация, основанная на ковалентном связывании

Метод послойного формирования (Layer-by-Layer, LbL) применяется для получения слоистых структур и разработки таких устройств, как сенсоры, фотовольтаические, электрохимические устройства и топливные элементы. В основе метода лежит чередование адсорбции комплементарных мультивалентных соединений на подложку посредством электростатических взаимодействий, водородных связей и других вторичных взаимодействий [279, 280, 281]. В большинстве случаев послойное формирование реализуется за счет электростатических взаимодействий. Такая поэтапная «электростатическая сборка» была впервые предложена в 1990-х [282] с целью формирования упорядоченных многослойных структур путем последовательной адсорбции полианионов и поликатионов.

К веществам, используемым в данной технологии, относится широкий круг соединений, включая традиционные полиэлектролиты, проводящие полимеры, дендримеры, белки, нуклеиновые кислоты, неорганические коллоидные частицы, а также пленки ЛБ и липидные мембраны [283].

Выделяют три метода послойного формирования [284]: 1) погружение, когда покрытие наносится посредством погружения подложки поочередно в резервуары, каждый из которых содержит определенные контрионы; 2) центрифугирование (spincoating) [285 – 287], когда раствор, содержащий

осаждаемое вещество, наносится на плоскую поверхность, которая затем начинает вращаться; 3) распыление, когда осаждение реализуется посредством распыления, что обеспечивает однородное покрытие.

В методе послойного формирования также используются различные взаимодействия, включая взаимодействия типа металл-лиганд, водородную связь, перенос заряда и биоспецифическое распознавание [288 – 290].

Востребованность методов получения самоорганизующихся органических монослоев (Self-Assembled Monolayers, SAM) прежде всего обусловлена развитием элементной базы современной органической электроники [291]. Так, интерес к SAM возникает по ряду причин, включая перспективы их использования в электронике и широкие возможности химического синтеза, что позволяет подобрать соединения с требуемым составом для каждой конкретной поверхности [292].

Структура SAM определяется термодинамически обусловленной поверхностной сегрегацией молекул на границе раздела двух фаз, в большинстве случаев – на твердой поверхности, контактирующей с жидкостью или другой средой. Как правило SAM формируются из органических молекул небольших размеров (несколько нанометров), обладающих амфифильными свойствами. Например, один из самых широко распространенных примеров самоорганизации молекул в биологии это клеточные биомембраны, представляющие собой бислой, образованный липидными молекулами. При этом мембрана имеет жидкокристаллическую структуру, сочетая ее упорядоченность с латеральной подвижностью [293, 294].

Несмотря на то, что SAM состоят из амфифильных молекул, как и ленгмюровские монослои, SAM формируются на твердых подложках и подвергаются химической сорбции, то есть становятся сильно связанными [295]. Однако, в случае формирования ленгмюровского монослоя молекул на поверхности жидкого металла (таких как тиолы, самоорганизующиеся на

жидкой ртути [296]), при охлаждении субфазы происходит ее замерзание, что можно рассматривать, как переход от ЛБ-монослоя к SAM.

Технология получения SAM это мощный инструмент конструирования монослоев биологических молекул на различных подложках. В [297] представлены метод получения и результаты исследований слоев SAM белка А (с прикрепленной к нему SH-группой), используемых в качестве иммуносенсоров, принцип действия которых основан на способности данного белка связывать иммуноглобулины класса G.

Использование SAM слоев биомолекул позволяет сочетать их функционал с возможностями наноэлектроники, в связи с чем важной задачей представляется подбор интерфейса SAM/электрод, который должен обеспечивать передачу электрического сигнала. В [298] проводились исследования электрических свойств гидрофобина на гидрофобной графитовой подложке.

В [299] разрабатывались протоколы изготовления нанопокровов из бычьего сывороточного альбумина (БСА) на поверхности стекла с использованием методов SAM и ЛБ. Результаты анализа нанопокровов, выполненного с использованием метода ЛБ, были очень похожи на результаты, полученные с использованием SAM. Также было показано, что небольшие изменения температуры или pH влияют на формирование слоя, так эти изменения затрагивают ориентацию белковых молекул на поверхности стекла.

Наиболее широко метод иммобилизации, основанной на ковалентном связывании, применяется для ферментов, поскольку основной задачей является сохранение их каталитической активности в каждом конкретном случае. Термин «иммобилизованные ферменты» определяется как «ферменты, которые физически прикреплены к конкретным твердым носителям и, таким образом, ограничены, и которые могут использоваться многократно и непрерывно при сохранении их каталитической активности» [300]. Между функциональными участками молекул и подложкой посредством ковалентных

связей образуются стабильные комплексы, вследствие предварительной модификации молекул фермента путем добавления таких функциональных участков.

Связывание фермента с твердой подложкой осуществляется в два этапа: 1) активация поверхности с использованием линкерных молекул (например, глутаральдегид или карбодиимид); 2) ковалентное связывание молекул фермента с активированной твердой подложкой [301]. При этом линкеры подбираются на основе свойств поверхности подложки.

К преимуществам метода ковалентного связывания относятся однородность получаемых слоев и возможность контроля количества иммобилизованного фермента. Однако в ходе модификации молекул фермента существует высокий риск его денатурации, что является существенным недостатком метода. В сравнении с адсорбцией в данном методе требуется более длительное время формирования слоя – образование слоя с последующим связыванием ферментов может занимать несколько часов. Несмотря на то, что процедура иммобилизации существенно повышает стабильность фермента, она также может послужить причиной снижения его каталитической активности.

1.5.2. Исследования структуры органических пленок

Рентгеновская рефлектометрия

Метод рентгеновской рефлектометрии широко применяется в исследованиях моно- и многослойных тонких пленок, полученных на границе раздела (интерфейсе) воздух/твердая подложка. Такие пленки могут быть сформированы путем нанесения на твердые, в том числе, кристаллические подложки, органических веществ – белков, липидов и полимеров [302]. Данный метод является неразрушающим методом исследования реальной структуры планарных систем (тонких органических и неорганических пленок), позволяющий получить важную информацию об их слоистой

структуре и морфологии границ раздела для развития технологий получения функциональных материалов на основе такого рода систем (см. также Раздел 2.7.2 Главы 2).

В последние десятилетия метод рентгеновской рефлектометрии зарекомендовал себя весьма эффективным в исследованиях многослойных структур, полученных с использованием технологии Ленгмюра-Блоджетт [303 – 305]. Важной особенностью ЛБ метода является то, что он позволяет формировать слои с включением тяжелых элементов, в том числе, ионов металлов. Это позволяет создавать слоистые системы с градиентом электронной плотности и, тем самым, повысить чувствительность метода рентгеновской рефлектометрии при их изучении.

Структура отдельных компонент биологических и биоподобных мембран, таких как, гликолипиды, липопротеины и стерины, может быть определена рядом методов, включая РСА и ЯМР-спектроскопию, но в случае, например, бислойных мембран, применение данных методов затруднительно, поскольку такие мембраны, по существу, являются жидкокристаллическими структурами, не имеющими дальнего порядка [306].

В [307] методом рентгеновской рефлектометрии в сочетании с нейтронной рефлектометрией проводились исследования бислоев дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) и димиристоилфосфатидилглицерола, нанесенные на твердые подложки, при их взаимодействии с тау-белком, который участвует в патогенезе болезни Альцгеймера.

В [308] исследовались характеристики слоев гемоглобина на кремниевых подложках с различными модификациями поверхности (гидрофильных (гидроксильных, карбоксильных, аминных) и гидрофобных (алкилированных) поверхностях) несколькими методами, включая рентгеновскую рефлектометрию (с использованием СИ). Слои гемоглобины получались как с помощью адсорбции (в процессе помещения подложки в раствор), так и с помощью технологии Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ). Упорядоченные слои

(полученные методом ЛБ) меньше подвержены влиянию химического состава поверхности по сравнению с многослойными структурами, образованными за счет физической адсорбции. Химический состав поверхности и заряд белков имеют решающее значение для контроля характеристик адсорбционных слоев белка на кремнии, таких как толщина (коррелирующая с размером молекулы) и шероховатость.

Исследования монослойных пленок Ленгмюра-Блоджетт методом рентгеновской рефлектометрии проводятся также на границе раздела жидкость/воздух. В [309] методом рентгеновской рефлектометрии впервые были проведены исследования ленгмюровского монослоя стеарата свинца на поверхности жидкости – водной субфазы.

В [310] проводились исследования формирования комплекса ДНК с монослоем цвиттер-ионного природного липида ДПФХ на интерфейсе вода/воздух в присутствии катионов Ca^{2+} . В результате было показано, что присутствие катионов существенным образом влияет на формирование комплекса ДНК-ДПФХ. При этом слой ДНК был прикреплен к монослою липида со стороны субфазы, и его толщина составляла 25 – 26 Å. Такая толщина указывала на то, что молекула ДНК пребывала в таком комплексе преимущественно в двухцепочечной форме.

В [311] исследовалось образование ленгмюровских слоев глобулярных белков бычьего сывороточного альбумина (BSA) и сывороточного альбумина человека (HSA) на поверхности воды при pH, приблизительно равном 7.0, и дальнейшее формирование из них белковых слоев на гидрофильной поверхности Si (001) с использованием метода ЛБ. Было показано, что наиболее компактная слоистая структура белковых пленок осаждается на поверхности Si при более высоком поверхностном давлении монослоев. АСМ-изображения пленок BSA и HSA показывают морфологию, близкую к глобулярной, а их соответствующая высота показывает, что толщина осажденных пленок незначительно увеличивается с увеличением количества циклов переноса монослоя. Анализ толщин пленок с помощью метода

рентгеновской рефлектометрии также показывает небольшое изменение толщин сформированных пленок с увеличением циклов переноса.

В исследованиях органических тонких пленок метод рентгеновской рефлектометрии имеет ряд ограничений, к одному из которых относится разрушительное воздействие синхротронного излучения высокой интенсивности. В [312] проводилось изучение структурных изменений тонких слоев полимеров при облучении их рентгеновскими пучками с различными плотностями падающего потока в зависимости от температуры исследуемого образца. В результате было описано влияние излучения на разные типы полимеров.

Также, на рассеяние рентгеновского излучения в органической пленке существенным образом влияет наличие в ней жидкости, что может привести к увеличению выхода вторичных электронов и свободных радикалов и, в свою очередь, к повреждению пленки [313]. Кроме того, дополнительное рассеяние приводит к возрастанию фона, что уменьшает динамический диапазон регистрации данных рентгеновской рефлектометрии и, следовательно, ограничивает пространственное разрешение метода. Важно отметить, что органические материалы, как правило имеют электронную плотность сравнимую с электронной плотностью воды, вследствие чего малый контраст электронной плотности затрудняет обнаружение интерфейсов и определение структурных параметров слоистой модели пленки.

Стоячие рентгеновские волны, СРВ в ПВО

Метод стоячих рентгеновских волн (СРВ), применяется в структурных исследованиях кристаллов, приповерхностных слоев и тонких пленок, и сочетает в себе возможности спектроскопии и дифрактометрии (в условиях дифракции рентгеновских лучей) или рефлектометрии (в геометрии полного внешнего отражения, ПВО). Пространственное разрешение в методе СРВ

позволяет с высокой точностью определить положение атомов конкретного химического элемента и может достигать $\sim 10^{-2}$ Å.

В основе метода СРВ лежит использование стоячей рентгеновской волны – пространственно-модулированного электромагнитного поля, – которая возбуждает вторичное излучение, испускаемое атомами исследуемого образца. СРВ возникает в результате интерференции падающей и дифрагированной (или отраженной в случае ПВО) волн. Результирующая СРВ внутри кристалла и над его поверхностью (эванесцентная волна) имеет фиксированный период, соответствующий межплоскостному расстоянию кристаллической решетки. В [314, 315] описанный эффект эффективно использовался с целью определения положения атомов в объеме исследуемых кристаллов.

Стоит отметить, что СРВ в рентгенодифракционном эксперименте проявляется крайне слабо, поскольку разница амплитуд упругого и неупругого рассеяния весьма значительна. СРВ наблюдается лишь в виде аномальной угловой зависимости поглощения [316] и слабой асимметрии дифракционного отражения в брэгговской геометрии. В связи с этим, в экспериментах с применением методов СРВ осуществляется регистрация вторичного излучения – фотоэлектронная эмиссия, флуоресценция и другие [315, 317].

Условия формирования СРВ можно разделить на четыре типичных случая: динамическая дифракция в монокристалле; сильная дифракция Брэгга на искусственных периодических структурах, таких как многослойные тонкие пленки и сверхрешетки [318]; кинематическая брэгговская дифракции в монокристаллической тонкой пленке; ПВО от зеркальной поверхности [319].

Описание методик на основе СРВ в ПВО, применительно к настоящим исследованиям, приводится в Разделе 2.7.2 Главы 2.

В последние десятилетия огромный вклад в развитие метода СРВ в ПВО в сочетании с ленгмюровской технологией внес Михаил Валентинович Ковальчук. Под его руководством была сформирована научная школа,

разработаны методические подходы к исследованию структуры органических планарных систем, с применением которых было проведено большое число исследований тонких пленок, приповерхностных структур, многослойных систем, включая белковые и белково-липидные пленки как на поверхности жидкости, так и на твердых подложках [320 – 329].

Ключевой особенностью метода СРВ в ПВО является малая, порядка единиц нанометров длина экстинкции, глубина проникновения излучения в образец, что повышает чувствительность метода и значительно снижает спектральный фон. Благодаря чему сегодня метод СРВ в ПВО имеет статус прецизионного метода структурной диагностики, и позволяет проводить различные высокочувствительные исследования, такие как обнаружение и определение содержания следовых элементов в микроколичествах изучаемых объектов и определения положения ионов в органических монослоях, пленках Ленгмюра-Блоджетт, а также наночастиц металлов, сформированных на плоской поверхности (твердой или жидкой субфазы) [330 – 332].

На примере неорганических и органических пленок в [333] представлены результаты исследований образцов типа вакуум-пленка-подложка в случае, когда показатель преломления пленки больше, чем подложки. Проведен анализ поля СРВ, сформированного над зеркальной поверхностью образца в условиях ПВО. Также, методом СРВ в ПВО при регистрации выхода флуоресцентного излучения было изучено распределение тяжелых ионов в ленгмюровских пленках на примере стеариновой кислоты и показаны возможности исследований органических многослойных планарных структур [334].

В [335] представлены результаты исследований взаимодействия катионов Mn^{+2} с молекулами ленгмюровского монослоя бегеновой кислоты. По данным выхода флуоресцентного излучения было точно определено количество катионов в монослое, а метод СРВ в ПВО позволил определить, что катионы были локализованы в монослое в очень тонкой области, толщиной менее 0,5 нм.

В [329] методами рентгеновской рефлектометрии и СРВ в ПВО были проведены исследования структуры монослойных ЛБ пленок порфирина-фуллереновых диад с включенными в их структуру ионами цинка. Исследования проводились как на поверхности водной субфазы, так и на монокристаллических подложках Si. По характеру восстановленного распределения атомов Zn и электронной плотности по толщине исследуемых пленок была определена преимущественная ориентация молекул диад в монослое, а также показано, что молекулы сохраняют свою ориентацию при переносе монослоя с поверхности жидкой субфазы на твердую подложку.

В связи с развитием оборудования, техники и источников синхротронного излучения (СИ) рентгеновские и синхротронные методы, включая СРВ, получили широкое распространение в исследованиях в различных научных и научно-технологических областях, связанных с медициной и биотехнологиями, биоорганическими системами и коллоидными структурами [336, 337]. Например, в [338] методом СРВ в ПВО проводились исследования пленок на основе гемоглобина на поверхности жидкости. В результате были описан эффект усиления способности связывания ионов металлов с белком в зависимости от конформационных изменений, обусловленных различными внешними воздействиями (повреждающими факторами). В [339] методом СРВ в ПВО проводились исследования ЛБ белково-липидных пленок на примере слоев глюкозооксидазы и бегеновой кислоты на поверхности водной субфазы и при воздействии различных токсичных реагентов.

Геометрия СРВ в ПВО в литературе, также, часто называется геометрией скользящего падения (Grazing Incidence, GI). Данная геометрия эффективно используется в ряде рентгеновских и синхротронных методов анализа структуры тонких пленок, в том числе, дифракционные методы (Grazing Incidence Diffraction, GID, GIXD) и методы малоуглового рассеяния (Grazing Incidence Small-Angle X-ray Scattering, GISAXS). В исследованиях наноструктурированных планарных систем, данные методы применяются с

целью получения информации об их морфологии и латеральной упорядоченности их структуры. Указанные методы позволяют определить размер и форму частиц, а также корреляционные длины между ними на масштабе от единиц до сотен нанометров [340 – 346]. Дифракция в скользящей геометрии также используется в исследованиях текстуры молекулярных планарных систем на поверхности воды, включая органические и биоорганические тонкие пленки [347 – 351].

В [352] методом μ GISAXS, с использованием микрофокусного пучка СИ, проведены исследования влияния температуры на структурные изменения белка, происходящие в многослойной белковой ЛШ-пленке ферментов ацилазы, пенициллина G и уреазы. Было показано, что после нагрева и охлаждения происходит появление дальнего порядка в многослойных пленках, что ранее также было показано для пленок белков тиоредоксина, иммуноглобулина, бактериородопсина, цитохрома P450 [353].

Исследование тонких пленок и монослоев на основе белка лизоцима

Лизоцим считается достаточно хорошо изученным белком и сегодня широко используется в решении задач структурной биологии и медицины в качестве модельного образца поскольку является относительно дешевым и легко кристаллизуемым белком. Кроме того, сравнительно недавно [354] было показано, что кристаллы лизоцима моноклинной и тетрагональной сингонии обладают пьезоэлектрическими и пирозлектрическими (только моноклинные кристаллы) свойствами, что представляется перспективным с технологической точки зрения, в частности, для создания пьезоэлектрических датчиков/сенсоров.

Исследованиям процессов адсорбции на границах раздела разного типа (в том числе жидкость-твердое тело) с использованием лизоцима посвящено большое количество работ [236, 244, 247, 355 – 357].

В [238, 244] представлены результаты исследований тонких пленок ряда глобулярных белков, включая лизоцим, методом рентгеновской

рефлектометрии, которые позволили определить, что при адсорбции из водного раствора на гидрофильную поверхность, белок не подвергается денатурации, в отличие от адсорбции на поверхность, обладающую гидрофобными свойствами. Также, в [247] было продемонстрировано, что при адсорбции на кремний лизоцим не подвергается значительной денатурации и сохраняет свою третичную структуру. Указанные исследования свидетельствуют о том, что структурные изменения, обусловленные адсорбцией, не приводят к разрушению белка на поверхности, обладающей гидрофильными свойствами.

Аналогичные исследования адсорбции лизоцима и других глобулярных белков методом рентгеновской рефлектометрии на подложках Si, обладающих гидрофильными свойствами, и подложках с гидрофобным покрытием были проведены в [241]. Показано, что использование гидрофильной поверхности более предпочтительно с целью сохранения нативной структуры молекулы белка. Толщина пленки лизоцима при нейтральном pH среды составляла около 4 нм, что соответствует размеру молекулы (глобулы) белка. При pH = 11 толщина пленки возрастала до 6 нм. Такое изменение толщины было объяснено уменьшением поверхностного заряда молекулы до нуля, поскольку такое pH соответствует значению изоэлектрической точки лизоцима.

В ряде работ [358 – 361] были проведены исследования влияния добавления различных неорганических солей (электролитов) в раствор лизоцима при формировании пленок белка. В результате было показано, что при наличии ионов солей толщина адсорбированного монослоя увеличивается, а поверхностная плотность белка уменьшается, что свидетельствует о конформационных изменениях на интерфейсе воздух-вода.

В [361] представлены результаты исследований адсорбции лизоцима из концентрированного солевого раствора и, так называемого, эффекта «высаливания» молекул белка на интерфейсе воздух-вода, в основе которого лежит снижение количества доступных для взаимодействия с белком молекул воды посредством влияния на систему гидратированных ионов солей.

Результаты работы свидетельствуют о наличии конформационных изменений молекул лизоцима в присутствии ионов солей, которые, в свою очередь, зависят от pH раствора. При этом степень адсорбции белка уменьшается при pH ниже изоэлектрической точки, что может быть обусловлено сильным отталкиванием между молекулами.

Четыре дисульфидных мостика (связи) и относительно небольшая масса молекулы лизоцима определяют жесткость ее структуры. В [362] было проведено исследование динамики разворачивания (unfolding) молекул лизоцима на интерфейсе воздух-вода и показано, что молекулы являются достаточно устойчивыми в течение достаточно длительного времени. Позднее в [363] было определено, что при заданной концентрации белка молекула лизоцима на интерфейсе воздух-вода может утратить третичную структуру в течение приблизительно трех часов.

В [360] представлены результаты исследований монослоев лизоцима на интерфейсе воздух-вода при добавлении солей в зависимости от типа аниона. Известно, что в зависимости от степени влияния ионов на растворимость белка, они образуют, так называемые лиотропные ряды или ряды Гофмейстера [364 – 370]. Показано, что анионы различным образом влияют на конформацию молекул лизоцима в монослое при их высокой концентрации в водной субфазе. В результате, было выдвинуто предположение, что молекулы лизоцима, связываясь с анионами, могут образовывать нерастворимые комплексы, что, в свою очередь, может привести к дальнейшей кристаллизации белка.

В [371] с помощью молекулярной динамики была исследована ориентация молекулы лизоцима (HEWL) на границе раздела вода/воздух. Белок моделировался с использованием двух различных комбинаций силовых полей и моделей воды. Было показано, что лизоцим принимает осевую конформацию при pH 7, в то время как при изменении pH в сторону изоэлектрической точки лизоцима происходит депротонирование

положительно заряженных (гидрофильных) остатков, которые влияют на его межфазную ориентацию.

В [264] были проведены исследования термостабильности многослойных (100 – 200 слоев) пленок лизоцима, полученных на твердых кремниевых подложках методом Ленгмюра-Шеффера. Для анализа структуры пленок при термической обработке применялась методика на основе ИК Фурье-спектроскопии. Было определено, что при нагреве до 100° С в пленках происходило удаление молекул воды, а структура самой пленки сохранялась вплоть до температуры 150 °С. При дальнейшем нагреве до 200° С наблюдалось постепенное разрушение структуры пленок, а при 250° С – термическая деградация исследуемых многослойных пленок лизоцима.

В [372] пленки лизоцима на гидрофильной кремниевой подложке были получены из водного раствора белка методом центрифугирования. Затем пленки подвергались воздействию паров H₂O в закрытой камере. Для контроля толщины пленки на разных стадиях "набухания" (в процессе воздействия водяного пара) использовалась рентгеновская рефлектометрия. Было обнаружено, что скорость вращения сильно влияет на динамику "набухания". Поскольку вращение это процесс, который оказывает давление на молекулы, большее напряжение приводит к межцепочечному переплетению полипептидной цепи, возможно, вызывая частичное повреждение вторичной структуры. Термическая обработка при 70° С в течение 20 минут приводит к необратимой потере функции набухания в пленке, приготовленной при 1000 об./мин, поскольку термический отжиг может вызвать дальнейшую интердиффузию, ведущую к потере индивидуальной идентичности молекул и сильному связыванию через противоположные остатки заряда. В ультратонких пленках, где на поверхность нанесен только один молекулярный слой, становится сложно идентифицировать перепутывание цепей с помощью обычных методов.

1.6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 1

Представлен обзор методов и подходов к исследованию структуры макромолекул с атомарным разрешением, а также работ, посвященных исследованию взаимодействия белковых молекул в растворах на начальной стадии кристаллизации.

В настоящее время наибольшее число структур белков и белковых комплексов (более 88%) решено с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Для применения этого метода исследования структуры необходимо предварительно получить кристалл белка, причем чем более совершенным будет кристалл, тем с лучшим разрешением удастся определить структуру белковой молекулы. Белковые кристаллы получают из растворов, как правило, добавляя к раствору белка раствор осадителя, что приводит к изменению растворимости белка. Для того, чтобы получить кристалл белка, необходимо, чтобы все параметры раствора (температура, концентрация белка и осадителя, pH, состав буферного раствора) попали в достаточно узкую область значений, при которых белковые молекулы выстраиваются в упорядоченную структуру.

Представлен обзор работ, посвященных изучению взаимодействия и самоорганизации белковых молекул в растворах, а также механизмов образования белковых кристаллов.

Ранее было показано, что добавление осадителя к раствору белка приводит к увеличению среднего радиуса частиц, сформированных из молекул белка в растворе. Были сделаны различные предположения о природе и возможной структуре комплексов белков, образующихся при кристаллизации, однако они не нашли однозначного экспериментального подтверждения. В большинстве представленных ранее гипотез о механизмах кристаллизации белков, основанных на предположении об образовании промежуточных белковых комплексов, допускалось, что такие комплексы формируются произвольным образом и могут содержать любое количество молекул.

В результате анализа литературы в качестве исследуемого объекта был выбран лизоцим из куриного яйца. Его относительно небольшая молекула

имеет только 129 аминокислотных остатков, при этом содержит четыре дисульфидных мостика, что делает молекулу белка довольно жесткой и удобной для использования в качестве модели. В качестве дополнительных объектов для исследования (и обобщения подходов) процесса кристаллизации были выбраны протеиназа К и термолизин.

Также, дан обзор работ, посвященных методам получения упорядоченных белковых пленок и исследованию их структуры. Особое внимание уделено анализу результатов получения ленгмюровских монослоев и пленок белков и исследованию их структуры при помощи рентгеновских методов.

На основе проведенного анализа литературных данных можно сделать следующие основные выводы:

1) определение структуры белков – крайне важная и актуальная задача, имеющая практическое значение во многих аспектах жизни человека и общества, в том числе, создании новых лекарств, развитии медицины и генетики, разработке эффективных органо-неорганических, гибридных систем и устройств на их основе (биосенсоры, датчики, приборы фотовольтаики и другие), развитии экологически интегрированных, природоподобных технологий;

2) необходимо изучение механизмов образования упорядоченных белковых систем (кристаллических и планарных) и влияния внешних условий на процесс образования кристаллов в целях оптимизации поиска условий кристаллизации и создания общей теории кристаллизации для решения современных проблем белковой кристаллографии и структурной биологии.

Знание механизмов взаимодействия белков с компонентами растворов крайне важно для понимания функционирования белков в нативной среде и определения фундаментальных принципов работы «молекулярных машин».

Разработка и создание методов контроля и управления механизмами самоорганизации белков в упорядоченные системы позволит уже сегодня создавать эффективные технологические процессы дизайна и ускоренной разработки терапевтических препаратов и диагностических систем,

технологий для сельского хозяйства и промышленной биотехнологии, а «завтра» создать технологии использования белков как функциональных элементов природоподобных технических систем.

ГЛАВА 2. Методы и подходы к исследованию взаимодействия белков в растворах и тонких пленках

2.1. АННОТАЦИЯ К ГЛАВЕ 2

В настоящей главе описаны развитые и примененные в работе методы и подходы к исследованию взаимодействия белковых молекул в растворах и тонких пленках.

Раздел 2.2 посвящен описанию развитого в работе комплексного подхода к исследованию белковых растворов, монослоев и кристаллов на основе оптических, рентгеновских, синхротронных и нейтронных методов.

В Разделе 2.3 приведено описание используемых материалов и методик для подготовки исследуемых и кристаллизационных растворов лизоцима, протеиназы К и термолизина.

Раздел 2.4 посвящен методам и подходам к исследованию и анализу структуры растворов белка с использованием как лабораторных рентгеновских установок, так и установок класса мегасайенс – источников СИ и нейтронов, а также вычислительного кластера (суперкомпьютер).

Как было показано в обзоре литературы (Глава 1, Раздел 1.2.2), под руководством М.В. Ковальчука в НИЦ «Курчатовский институт» была создана уникальная *инфраструктура* для решения современных научных задач, в том числе, изучения структуры белков и систем на их основе, включающая экспериментальные станции СИ на источнике «КИСИ-Курчатов» (станции «Ленгмюр», «РКФМ», «БиоМУР», «РСА» и др.), исследовательские комплексы крио-ПЭМ, ЯМР, Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса. Также, под его научным руководством ранее (обзор работ в Разделе 1.5.2 Главы 1) были развиты подходы и методы структурной диагностики и анализа наносистем, тонких пленок и многослойных систем, как на твердых подложках, так и на поверхности жидкости, на основе сочетания дифракционных, спектральных методов и методов рассеяния рентгеновского излучения, включая метод

стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения (СРВ в ПВО).

На основе созданной инфраструктуры и научно-методических подходов, указанных выше, для решения поставленных в работе задач был подобран комплекс взаимодополняющих, комплементарных методов (Раздел 2.2), развиты и адаптированы экспериментальные и теоретические методы (Разделы 2.4 – 2.7), разработан и создан инструментальный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии (Раздел 2.5), что позволило *проследить переход «от хаоса к порядку» и провести анализ структуры белковых систем на всех его стадиях.*

2.2. КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ИССЛЕДОВАНИЮ БЕЛКОВЫХ РАСТВОРОВ, КРИСТАЛЛОВ И ТОНКИХ ПЛЕНОК

На Рис. 2.1 представлена блок-схема структуры разработанного методологического подхода к исследованию процессов кристаллизации – от растворов до слабоупорядоченных и кристаллических систем.



Рис. 2.1 – Блок-схема структуры методологического подхода к исследованию процессов кристаллизации – от растворов до слабоупорядоченных и кристаллических систем.

В Табл. 2.1 приведен комплекс вышеуказанных взаимодополняющих методов в соответствии со структурой подхода к исследованию процессов кристаллизации, представленного на Рис. 2.1.

Табл. 2.1 – Комплекс взаимодополняющих методов исследования процессов кристаллизации белков.

Методы исследований	
Раствор	1. Малоугловое рассеяние рентгеновского, синхротронного излучения и нейтронов (МУРР, МУРН) 2. Динамическое рассеяние света (ДРС) 3. Молекулярная динамика
Слабоупорядоченные системы	4. π / A изотерма 5. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) 6. Рентгеновская рефлектометрия 7. Стоячие рентгеновские волны в области полного внешнего отражения (СРВ в ПВО)
Кристаллические системы	8. Оптическая микроскопия 9. Рентгеноструктурный анализ (РСА) / Белковая кристаллография 10. <i>In situ</i> рентгеновская высокоразрешающая дифрактометрия

Исследования состояния и взаимодействия белковых молекул в растворе как до добавления осадителя (в отсутствие взаимодействия, приводящего к образованию упорядоченной структуры), так и непосредственно после добавления осадителя, проводились методами малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (**МУРР**) и нейтронов (**МУРН**). Указанные методы позволяют определить изменение характера взаимодействия белковых молекул в растворе, а также фиксировать образование частиц (олигомеров), размером от двух молекул (димеров).

Образование более крупных частиц контролировалось методом динамического рассеяния света (**ДРС**). Более "тонкая картина" взаимодействия белковых частиц в растворе в зависимости от внешних условий исследовался методом молекулярной динамики.

В силу специфики работы с органическими материалами ("живыми" системами) для каждого метода потребовались адаптация методик и подбор условий экспериментов, которые бы позволяли в ходе исследований сохранять белки в состоянии, максимально приближенном к нативному. Были разработаны специальные методики исследований, в том числе специализированное оборудование, измерительные ячейки для формирования окружения образца, термостатирования и проведения *in situ* экспериментов.

2.3. МАТЕРИАЛЫ И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ РАСТВОРОВ – ЛИЗОЦИМ, ПРОТЕИНАЗА К, ТЕРМОЛИЗИН

Как было указано в Главе 1, глобулярные (водорастворимые) белки кристаллизуются в растворе. Процесс кристаллизации, как правило, инициируется путем добавления к раствору белка в буфере раствора осадителя в буфере. Буферный раствор для белка подбирают таким образом, чтобы он имел постоянный рН, который не меняется при добавлении раствора соли – осадителя, или при взаимодействии с атмосферой. При этом буферный раствора должен обеспечивать стабильность белковых молекул в растворе – препятствовать агрегации, не содержать компонентов, которые приводили бы к изменению конформации белка или его денатурации.

При приготовлении растворов для исследования процессов кристаллизации белка в настоящей работе, а также для проведения исследования влияния отдельных параметров раствора на процесс кристаллизации, крайне важным было исключить влияние случайных параметров. С этой целью была отработана стандартная процедура приготовления растворов, исключающая попадание в исследуемые растворы случайных примесей.

Подготовка буферного раствора для получения растворов лизоцима. Для получения растворов лизоцима был приготовлен 0.1 М натрий-ацетатный буферный раствор (далее буфер) с рН = 4.55. Для приготовления буфера

использовались деионизованная вода высокой степени чистоты (Milli-Q, Millipore, 18 МОм·см) или тяжелая вода (тяжеловодородная вода, оксид дейтерия) фирмы Line Chemical (15 МОм·см). Соответственно, $pD = 4.55$ при использовании тяжелой воды.

Для получения 0.1 М буфера объемом 200 мл к объему, определенному по табличным данным из [373], 0.2 М раствора ледяной уксусной кислоты (CH_3COOH), был добавлен соответствующий данному pH объем 0.2М раствора тригидрат ацетата натрия ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) фирмы Helicon (CAS # 6131-90-4), а затем было добавлено 100 мл воды, используемой в конкретном случае.

Навески всех солей осуществлялись с использованием весов Mettler Toledo и специальной бумаги для взвешивания. Объем воды определялся с помощью мерного цилиндра, а объем уксусной кислоты – с использованием калиброванной автоматической пипетки переменного объема фирмы Eppendorf (до 1000 мкл).

После приготовления буфер помещался в холодильник (5 °C) не менее, чем за сутки до начала его использования. pH полученного раствора измерялся с помощью pH-метра. Во всех экспериментах по исследованию растворов лизоцима, а также для получения кристаллизационных растворов и выращивания кристаллов лизоцима, использовался буферный раствор, полученный описанным способом.

Буферный раствор подготавливался в лабораторных условиях, а затем доставлялся в необходимом объеме на источники СИ или нейтронов для дальнейшего проведения экспериментов и приготовления растворов лизоцима.

Подготовка растворов лизоцима и кристаллизационных растворов. Для приготовления растворов лизоцима использовался очищенный лизоцим из куриного яйца (HEWL) фирмы Sigma-Aldrich (CAS # 12650-88-3) без дополнительной очистки. В качестве осадителя использовались следующие соли с высоким классом чистоты: NaCl (CAS# 7647-14-5, Helicon); KCl (CAS#

7447-40-7, abcr GmbH); LiCl (ТУ 6-09-3751-83, Лаверна Стройинжиниринг); CoCl_2 (CAS# 7791-13-1, Alta Aesar); NiCl_2 (CAS# 7791-20-0, Alta Aesar); CuCl_2 (CAS# 7447-39-4, Acros Organics); KI (CAS# 6131-90-4, Helicon).

Растворы белка и осадителя фильтровали с помощью мембранных шприцевых фильтров Millex с размером пор 0.22 мкм, далее раствор белка центрифугировали в течение 10 минут с частотой 10000 об./мин.

Изначально все компоненты кристаллизационного раствора были приготовлены с повышенной концентрацией, затем они разбавлялись до необходимой. Контроль концентрации белка осуществлялся посредством измерений спектров поглощения на длине волны 280 нм на спектрофотометрах Cary 5000 (Varian, Австралия) или NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Подготовка растворов протеиназы К и кристаллизационных растворов.

Для приготовления растворов протеиназы К и кристаллизационных растворов использовался белок протеиназа К (CAS# 39450-01-6, AppChem) без дополнительной очистки, молекулярная масса белка составляет 27 кДа.

В качестве осадителей использовались сульфат аммония (CAS# 7783-20-2, Fisher Scientific), нитрат натрия (CAS# 7631-99-4, Sigma-Aldrich). Белок и осадитель растворялись в 0.2 М Tris-буфере, pH = 8 (CAS# 77-86-1, Sigma-Aldrich), приготовленном с использованием ультрачистой воды (Millipore, 18 МОм·см).

Подготовка растворов термолизина и кристаллизационных растворов.

Для приготовления растворов термолизина и кристаллизационных растворов использовался очищенный термолизин (CAS# 9073-78-3, Sigma-Aldrich) без дополнительной очистки.

Белок растворялся до конечной концентрации 50 мг/мл в 0.025 М NaOH растворе, приготовленном с использованием ультрачистой воды (Millipore, 18 МОм·см). В качестве осадителя был подготовлен 1.5 М раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

(CAS # 7783-20-2, Sigma-Aldrich) в 0.1 М Tris-буфере (CAS # 77-86-1, CAS # 1185 -53-1, pH 8.5, Sigma-Aldrich).

Растворы протеиназы К, термолизина и соответствующих осадителей подвергались фильтрации и центрифугированию аналогичным подготовке растворов лизоцима образом. Также, контроль концентрации белков в растворах осуществлялся посредством регистрации спектров с использованием вышеуказанного оборудования (в случай лизоцима).

Особенности подготовки образцов растворов для экспериментов МУР. В ходе исследований растворов белков методами малоуглового рассеяния (МУР) всегда проводились измерения с использованием «чистого» (без добавления осадителя) раствора белка той же концентрации, что и раствор белка с осадителем (т.е. раствор в условиях кристаллизации). Также, с целью учета вклада в картину рассеяния самого белкового раствора проводились измерения рассеяния от буферного раствора. Аналогично, в исследованиях раствора белка с осадителем с целью учета, вычитания сигнала от фона проводились измерения МУР от раствора осадителя в буфере.

Таким образом, при подготовке всех экспериментов МУР была подготовлена серия исследуемых и «вспомогательных» образцов-растворов:

1) буферный раствор (в необходимом объеме помещался в одноразовую центрифужную пробирку из исходного резервуара), который в ходе экспериментов поступал в измерительную ячейку;

2) образец (или ряд образцов) раствора белка с заданной концентрацией (для этого был подготовлен базовый раствор белка, с концентрацией, превышающей самую высокую концентрацию белка в конкретной серии экспериментов в два раза; затем базовый раствор разбавлялся буфером до требуемой концентрации для каждого конкретного измерения);

3) образец (или ряд образцов) раствора осадителя с заданной концентрацией.

В каждом эксперименте МУР (за исключением исследований растворов термолизина, где процедура подготовки образца несколько отличалась), как

отмечалось ранее, был подготовлен базовый раствор белка. К базовому раствору белка добавлялся раствор осадителя в пропорции 1:1 и раствор буфера, также в пропорции 1:1 (для получения контрольного образца). При подготовке базовый раствор подвергался фильтрации, центрифугированию, а контроль концентрации белка осуществлялся с помощью специализированных спектрофотометров, аналогично подготовке растворов лизоцима.

2.4. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ БЕЛКОВ

2.4.1. Малоугловое рассеяние рентгеновского излучения и нейтронов

Исследования растворов белков методами малоуглового рассеяния рентгеновского, синхротронного излучений и нейтронов проводили с использованием разных установок и источников:

- Лабораторная рентгеновская установка АМУР-К (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, ИК РАН, Москва);
- Синхротронные станции ДИКСИ и БиоМУР (НИЦ «Курчатовский институт», ККСНИ, Москва);
- Синхротронная станция BM-29 Biosaxs (ESRF, Гренобль, Франция);
- Нейтронная станция ЮМО (ОИЯИ, ИБР-2, Дубна, Московская область).

Проводилось исследование изменения структуры растворов белка с осадителем для разных условий/состава растворов. В каждом эксперименте проводились следующие измерения:

- регистрация малоуглового рассеяния от раствора белка с осадителем;
- регистрация малоуглового рассеяния от раствора осадителя в буфере (вычитали как фон при обработке данных);
- в качестве контроля регистрировалось малоугловое рассеяние от раствора белка без осадителя.

Растворы для данных измерений подготавливались по методике, описанной в Разделе 2.3.

Далее приводится описание основ метода МУРР и методики подготовки образцов, реализации экспериментов, количественного анализа данных, полученных с использованием вышеуказанных установок и источников рентгеновского излучения, СИ и нейтронов.

Метод МУРР/МУРН

Малоугловое рассеяние – когерентное диффузное рассеяние монохроматических рентгеновских лучей и нейтронов вблизи первичного луча на апериодических флуктуациях электронной плотности в материалах (например, при наличии микропор в твердом теле).

Картина малоуглового рассеяния, как и дифракционная картина, является результатом интерференции лучей, когерентно рассеянных на образце.

При типичных длинах волн излучения в диапазоне от 0,05 до 0,5 нм малоугловое рассеяние позволяет исследовать структуры размерами от единиц до нескольких сотен нанометров, обычно в диапазоне $\approx 1 - 200$ нм.

Интерференционная картина рассеяния формируется сложением множества вторичных когерентно рассеянных волн, которые отличаются друг от друга по фазе. Фазовые отличия и амплитуды слагаемых зависят от пространственного распределения электронной плотности, то есть от структуры объекта, и определяют форму экспериментальной кривой рассеяния $I(s)$, анализ которой позволяет определить электронный радиус инерции и максимальный размер наночастиц в монодисперсных системах и их распределение по размерам в полидисперсных образцах.

Метод определения структурных параметров частиц в монодисперсных системах и распределения по размерам частиц (неоднородностей) в полидисперсных системах основан на математической обработке результатов

измерений угловой зависимости интенсивности рассеянного образцом рентгеновского излучения при прохождении такого излучения сквозь образец.

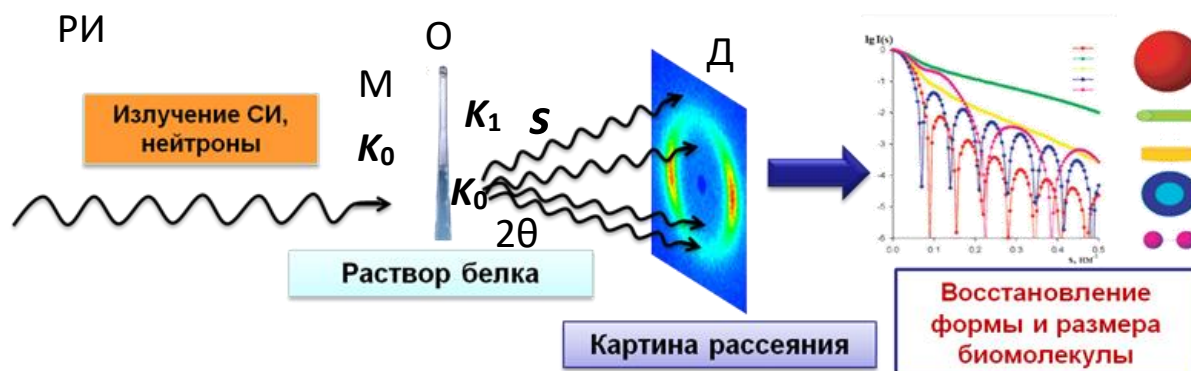


Рис.2.2 – Схема малоуглового эксперимента по упругому рассеянию.

Где K_0 – Волновой вектор, $k_0 = 2\pi/\lambda$

S – Вектор рассеяния $s = k_1 - k_0$; $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$;

РИ – Белый пучок рентгеновского, синхротронного излучений или нейтронов;

М – Монохроматор (монокристалл, зеркало);

О – Образец, на просвет;

Д – Детектор, статическая картина интенсивности рассеяния.

Источник монохроматического излучения:

Трубка ($\lambda \approx 0,07 - 0,2$ нм)

Синхротрон ($\lambda \approx 0,03 - 1$ нм)

Тепловые нейтроны ($\lambda \approx 0,1 - 5$ нм)

Основы метода малоуглового рассеяния, его описание и применения изложены в ряде научных работ и монографий [36, 44, 374 – 376].

Метод расчета интенсивности малоуглового рассеяния от многокомпонентной полидисперсной системы состоит в следующем.

Малоугловое рассеяние от смеси, содержащей различные типы невзаимодействующих компонентов, представляют в виде суммы

парциальных интенсивностей рассеяния $I_k(s)$ этими компонентами, взвешенных согласно их объемным долям V_k :

$$I_{mod}(s) = \sum_{k=1}^K V_k I_k(s), \quad (2.1)$$

где K – число компонент, $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$ – модуль вектора рассеяния, 2θ – угол рассеяния, λ – длина волны. Под компонентом в данном подходе подразумевают систему частиц одинаковой формы, распределенных по размерам согласно заданному аналитическому выражению, параметры которого необходимо найти. При априори заданной форме частиц и, соответственно, известной нормированной интенсивности рассеяния частицей $i(sR)$ (при $s = 0$, $i(0) = 1$) интенсивность рассеяния от k -го компонента определяется соотношением

$$I_k(s) = T_k(s) \int_0^\infty N_k(R) [v_k(R) \Delta\rho_k(R)]^2 i_k(s, R) S_k(s) dR, \quad (2.2)$$

где $N_k(R)$ – функция распределения по размерам, $\Delta\rho_k(R)$, $v_k(R)$ и $i_k(s, R)$ обозначают рассеивающий контраст (разность между средней электронной плотностью частицы и средней плотностью окружения), объем и нормализованную интенсивность рассеяния (квадрат формфактора) частицы радиусом R , $T_k(s)$ – структурный фактор, учитывающий межчастичную интерференцию в приближении Перкуса–Йовика. Распределения по размерам оказываются более наглядными, если использовать объемные доли частиц, т.е. функции $D_k(R) = N_k(R)v_k(R)$. В качестве аналитического выражения для $D_k(R)$ в данной работе использовали распределение Шульца–Цимма, определяемое средним размером (радиусом) частиц R_{0k} и полушириной ΔR_k :

$$Dk(R) = G(R, R_{0k}, \Delta R_k) = \left(\frac{z+1}{R_{0k}}\right)^{z+1} \frac{R^z}{\Gamma(z+1)} \exp\left[-\frac{(z+1)R}{R_{0k}}\right],$$

$$z = \left(\frac{R_{0k}}{\Delta R_k}\right)^2 - 1. \quad (2.3)$$

В качестве формфактора использовали выражения для амплитуд рассеяния от сферических частиц радиуса R . Практика решения модельных задач показала, что применение сферических формфакторов применимо для описания рассеяния и от несферических частиц, в этом случае R имеет смысл радиуса эквивалентной (по объему) сферы, а формы распределений на практике достаточно близки к распределениям несферических неоднородностей в достаточно широком диапазоне отклонений от сферичности. Формулы для формфакторов частиц различной геометрической формы приведены в [44].

Решение задачи по параметрам V_k , R_{0k} , ΔR_k и $T_k(s)$ ищут путем минимизации нелинейного квадратичного функционала с помощью разработанной программы POLY MIX, которая представляет собой модифицированную версию программы расчета распределений наночастиц по размерам MIXTURE, свободно доступную на сайте EMBL c/o Hamburg, DESY [377]. Минимизируемый функционал имеет вид

$$\min_{V_k, R_{0k}, \Delta R_k, \Delta \rho_k} \left\{ \frac{\sum_{i=1}^N \left[\left(I_{exp}(s_i) - \xi I_{mod}(s_i) \right) W(s_i) \right]^2}{\sum_{i=1}^N \left[I_{exp}^2(s_i) W^2(s_i) \right]} \right\},$$

$$k = 1, \dots, K$$

$$W(s_i) = [\bar{I}_{exp}(s_i)]^p, p = 1, -\frac{1}{2}, -\frac{2}{3}, -\frac{3}{4}, \quad (2.4)$$

где N – число экспериментальных точек, $W(s)$ – весовая функция, рассчитываемая из сглаженных экспериментальных данных и предназначенная для сужения динамического диапазона интенсивности до пределов, обеспечивающих получение адекватного описания формы кривой рассеяния во всем взятом диапазоне s . В работе использовали $p = 1/2$, определенное путем решения модельных задач как оптимальное для данного случая. ξ есть множитель, совмещающий кривые $I_{exp}(s)$ (экспериментальные данные рассеяния) и $I_{mod}(s)$ (интенсивность рассеяния от модельной смеси)

методом наименьших квадратов, рассчитываемый в программе поиска перед вычислением критерия минимизации (2.4). Параметрами поиска являются доли аналитических распределений в сумме (2.2) и их коэффициенты, указанные выше.

Программа OLIGOMER [377, 378] использует в качестве входных данных так называемый набор формфакторов компонентов смеси (интенсивностей рассеяния от макромолекул и их агрегатов, которые предполагаются априори) и экспериментальную кривую рассеяния от соответствующей смеси. Критерием качества решения системы является значение квадратичной невязки:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N \left[\frac{I_{mod}(s_j) - I_{exp}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (2.5)$$

где $\sigma(s_j)$ – соответствующие стандартные отклонения измерений. Также OLIGOMER дает возможность присваивать значения эффективных молекулярных масс каждой компоненте смеси, выбирать рабочий диапазон величин модуля вектора рассеяния и сохранять в файле результаты приближения. Программа позволяет определить состояние таких систем, как равновесные смеси разных олигомеров белков, структура высокого разрешения которых известна или ее можно предположить.

Метод малоуглового рассеяния применяется в исследованиях различных систем.

В случае монодисперсных систем – растворы белков – метод малоуглового рассеяния позволяет провести следующие исследования:

- определение формы молекул и их внутренней структуры с учетом аминокислотной последовательности по данным рассеяния до разрешения 5 – 10 Å;
- Коррекция кристаллических структур высокого разрешения для раствора;
- Определение неизвестных фрагментов структуры;
- Позиционирование доменов и фрагментов с известной структурой.

Полидисперсные системы – смеси белков, наноэмульсии, наночастицы:

- Определение структуры компонентов (формфакторов, структурных факторов), параметров полидисперсности и относительных вкладов компонентов.

Произвольные конденсированные системы – нанокомпозиты, гели, аэрозоли, полимеры, сплавы, мезопористые материалы и т.п.:

- Прямое моделирование внутренней структуры неупорядоченных или частично упорядоченных многофазных систем с помощью малых объемных элементов (молекулярно-массовое распределение, доменная структура, фазовый состав, межфазные границы), параметры фрактальности и т.д.

Области применения малоуглового рассеяния, определяемые параметры:

- объемные распределения рассеивающих неоднородностей по размерам в изотропных дисперсных системах различной природы (наночастицы, поры, кластеры дефектов в монокристаллах, выделения фаз в сплавах, неоднородности в стеклах и т.д.);

- распределения по диаметрам сильно вытянутых или по толщинам плоских нанообразований как в случае их частичной упорядоченности, так и в хаотических системах;

- функции распределения и радиусы корреляции наноразмерных неоднородностей в конденсированных системах;

- удельную площадь границы раздела между фазами и/или толщину межфазной границы в двухфазных системах;

- параметры внутренней структуры (размеры флуктуаций плотности, толщина межфазных границ, типичные формфакторы флуктуаций) для конденсированных разупорядоченных и частично упорядоченных произвольных систем путем прямого компьютерного моделирования пространственного распределения плотности;

- в случае изотропных монодисперсных систем, или систем с узким распределением по размерам рассеивающих неоднородностей, определяют максимальный размер частиц или пор; радиус инерции частиц; объем и

площадь их поверхности, форму наночастиц при разрешении 1/3-1/5 от максимального размера.

- Рассеяние тепловых нейтронов: используют особенности рассеяния поляризованных нейтронов на ядрах с селективно ориентированными ядерными спинами – различные приемы вариации контраста и исследования релаксаций.

Дифрактометр АМУР-К

На Рис. 2.3 представлена схема лабораторной рентгеновской установки, малоуглового дифрактометра «АМУР-К» (ИК РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва).

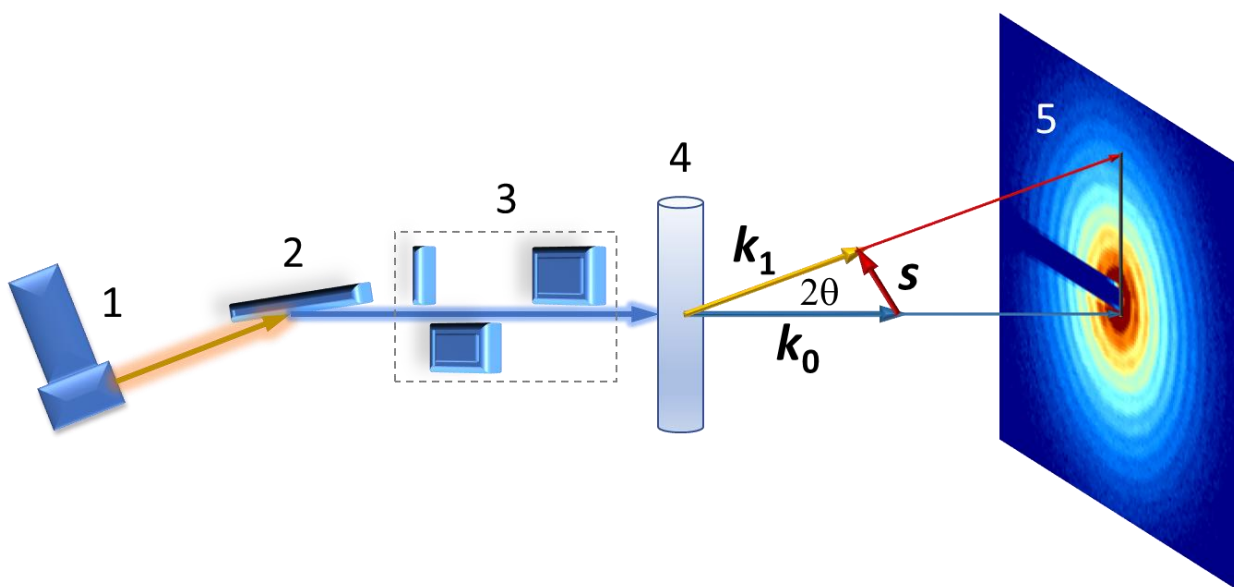


Рис. 2.3 – Схема малоуглового эксперимента по упругому рассеянию.

1 – Рентгеновская трубка, излучение $\text{CuK}_{\alpha 1}$, $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$;

2 – Монохроматор (пиролитический графит);

3 – Блочный коллиматор по схеме Кратки;

4 – Образец, на просвет;

5 – Детектор, статическая картина интенсивности рассеяния;

k_0 – волновой вектор, $k_0 = 2\pi / \lambda$;

s – вектор рассеяния $s = k_1 - k_0$; $s = 4\pi \sin \theta / \lambda$.

Методика измерений МУРР с использованием дифрактометра «АМУР-К» состояла в следующем.

Для изучения состояния молекул лизоцима в растворе на начальной стадии процесса кристаллизации, исследуемые образцы помещали в кварцевые капилляры диаметром 1 мм со стенками толщиной 10 мкм (Рис.2.4).

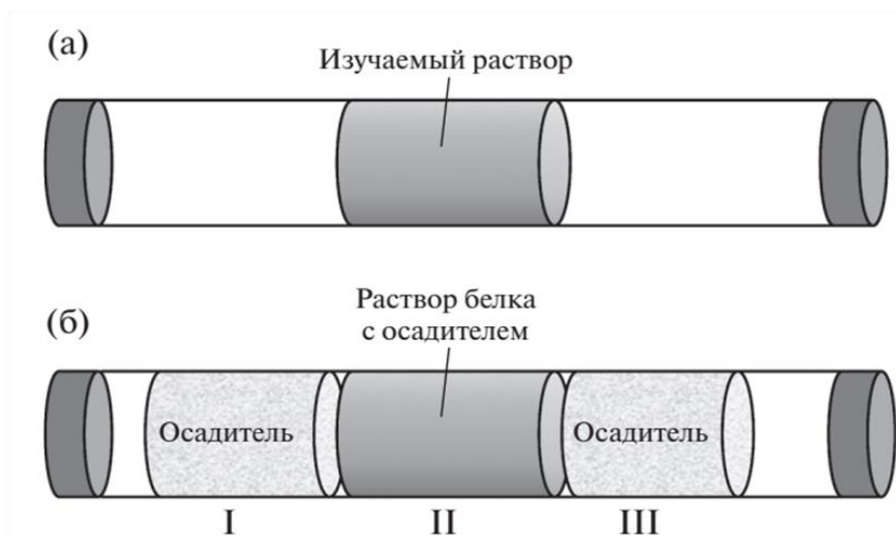


Рис.2.4 – Схемы загрузки измерительного капилляра: а – для изучения раствора белка или раствора белка с осадителем, б – для изучения раствора белка с осадителем в кристаллизационной ячейке.

Исследования проводили при двух типах загрузки капилляра. В первом случае в капилляр помещали только один раствор (Рис.2.4 а) – осадителя, белка или белка с осадителем. Во втором случае моделировали процесс кристаллизации белка методом диффузии паров (Рис.2.4 б), для этого в центр капилляра (кристаллизационной ячейки) (II) помещали концентрированный раствор белка (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл), а по краям (I, III) – раствор осадителя (50 мг/мл). В обоих случаях с двух сторон после загрузки капилляры плотно закрывали.

В качестве контроля проведены измерения отдельно чистого раствора лизоцима (40 мг/мл) и осадителя (25 мг/мл).

Измерения интенсивности рассеяния проводились на автоматическом малоугловом рентгеновском дифрактометре «АМУР-К» [379] с линейным беспараллаксным однокоординатным позиционно-чувствительным

детектором ОДЗМ при фиксированной длине волны излучения λ , равной 0.1542 нм (CuK α -линия острофокусной трубки с медным анодом, монохроматор из пиролитического графита), и коллимационной системой Кратки. Сечение рентгеновского пучка на образце составляло 0.2×8 мм.

Капилляры устанавливали в вакуумную камеру дифрактометра на расстоянии 700 мм от камеры детектора. Время измерений одного образца составляло 1 ч. Экспериментальные данные нормировались на интенсивность падающего пучка, после чего в них вводилась поправка на коллимационные искажения. Все расчеты проводили по данным с введенной поправкой. В аналогичных условиях проводили измерения растворителя, интенсивность рассеяния от которого вычитали из данных рассеяния образцами.

Синхротронная станция ДИКСИ

Исследования методом МУРР проводились на синхротронной станции ДИКСИ («КИСИ-Курчатов», НИЦ «Курчатовский институт», Москва) (Рис.2.5, 2.6). На Рис.2.5 представлена фотография станции ДИКСИ [380] на канале К 1.3а Сибирь2 (а) с различными типами систем детектирования (б) и рассматривается обобщенная базовая схема (в) экспериментальных рентгенографических станций. Базовый вариант станции обеспечивает диапазон значений энергии 5–12.5 кэВ, ширину спектрального интервала $\Delta\lambda/\lambda = 10^{-3}$ – 10^{-4} , регистрацию периодов 0.2–100 нм.

В экспериментальных установках создана оригинальная последовательность фокусирующих рентгенооптических элементов кристалл-зеркало, расположенных в вакуумируемых модулях, что позволило увеличить светосилу схемы, уменьшить радиационные и тепловые нагрузки на зеркальные поверхности элементов, а также обеспечить подавление высших гармоник основной длины волны [381, 382]. Для монохроматизации и фокусировки пучка СИ в горизонтальной плоскости принята традиционная схема отражения рентгеновского потока от изогнутого кристалла по принципу Иоганна [383].

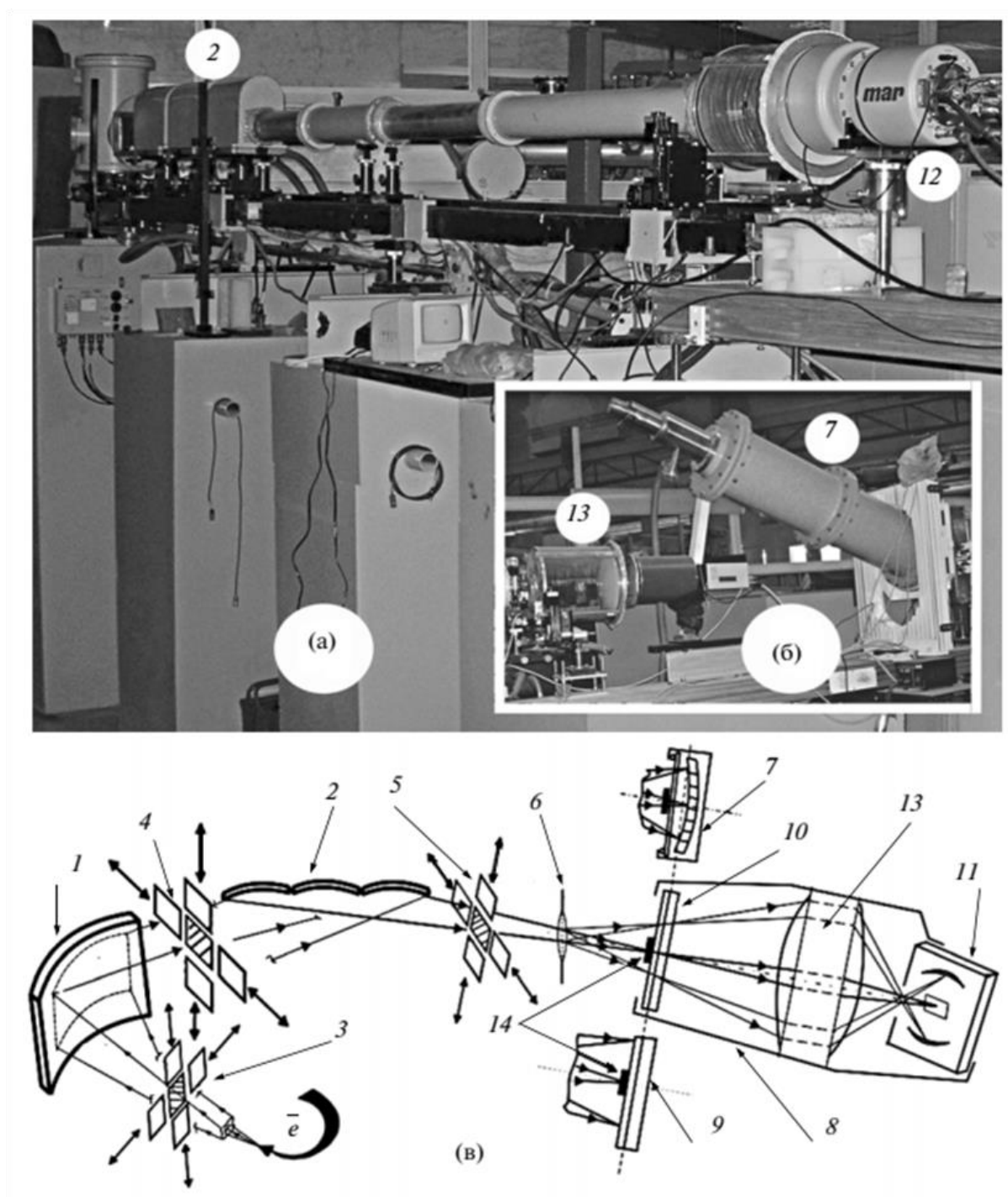


Рис.2.5 – Общий вид станции ДИКСИ на канале К1.3а накопителя Сибирь2 (а) с различными типами систем детектирования (б) и обобщенная базовая схема экспериментальных рентгенографических станций (в) [380].

Монохроматизация пучка, выходящего из накопительного кольца, осуществляется устройством с кристаллом-монокроматором 1, который также выполняет функции трансфокатора для фокусировки пучка в сагиттальной (горизонтальной) плоскости. В таком монохроматическом трансфокаторе

использовались кристаллы с высоким коэффициентом подавляемости четных гармоник (Ge, Si), что позволяет исключить из дифрагированного пучка высокоэнергетичные составляющие с помощью последующего зеркального трансфокатора 2, который создан на основе полисекционной системы зеркал полного внешнего отражения и фокусирует пучок в меридиональной плоскости [384].

Для формирования оптимальной геометрии сечения пучка СИ и уменьшения уровня фона от рентгенооптических элементов были созданы три комплекта четырехстворчатых щелей: входная щель 3 располагается перед устройством кристалла-монокроматора 1; формирующая щель 4 установлена перед зеркальным трансфокатором 2; фоновая щель 5 помещается вблизи перед исследуемым образцом 6.

Монохроматический пучок, проходя сквозь структуру образца 6, формирует дифракционную картину, которая регистрируется в задней фокальной плоскости рентгенооптических трансфокаторов любым типом детектора: однокоординатным 7 (на вставке показан детектор ОДЗ 1500), двухкоординатными. Перед каждым из детекторов 7 – 9 размещается ловушка первичного рентгеновского пучка 14, толщина которой подбирается эмпирически [385]. Для устранения паразитного рассеяния на воздухе установлены вакуумируемые телескопические камеры между образцом 6 и детектором, а также между зеркальным трансфокатором 2 и фоновой щелью 5.

В 2015 г. была проведена модернизация станции СИ «ДИКСИ», введена в эксплуатацию новая система детектирования МУРР на основе 2D-детектора Pilatus 1M (Dectris) (Рис.2.6).

Методика измерений МУРР на станции СИ «ДИКСИ» состояла в следующем. Измерения проводились при фиксированной длине волны 1.62 Å. Картины рассеяния регистрировали высокоскоростным двумерным детектором Pilatus3 1M при расстоянии образец-детектор 300 мм и времени экспозиции 5 мин. Сечение пучка, сформированного по трехщелевой схеме коллимации, было равно 0.4×0.6 мм.



Рис.2.6 – Общий вид детектирующей системы на базе 2D-детектора *Pilatus 1M* (Dectris) на станции СИ «ДИКСИ» (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, 2016 г.)

Калибровку угловой шкалы измерений проводили путем обработки дифракционной картины от поликристаллического порошка бегената серебра [386]. Для интегрирования двумерных картин рассеяния и первичной обработки использовали программы Fit2D [387] и Primus (из пакета ATSAS) [388].

Образцы помещали в тонкостенные стеклянные капилляры диаметром 1.5 – 2.0 мм и толщиной стенки 0.01 мм. Для обеспечения стабильности температуры капилляры помещали в латунный держатель с проточным теплоносителем, подключенный к водяному термостату. Температуру контролировали цифровым термодатчиком, расположенным в непосредственной близости от образца. Перед началом измерений образец выдерживали при заданной температуре в течение 5 минут. Путем сопоставления кривых МУРР от белковых растворов, снятых через 5, 10, 20 минут от достижения заданной температуры было выявлено отсутствие каких-либо эффектов, связанных с радиационными повреждениями образца, поскольку поперечное сечение первичного пучка было достаточно большим, а его интенсивность не превышала 10^9 фотонов/с.

Синхротронная станция БиоМУР

Эксперименты по малоугловому рентгеновскому рассеянию на Курчатовском источнике синхротронного излучения проводились в течение длительного времени на станции «ДИКСИ» до 2018 г. [380].

С начала 2018 года пользователи станции имеют возможность проводить эксперименты на новой станции «БиоМУР» [389], нацеленной на исследования методами малоуглового рассеяния и сконструированной с использованием элементов станции «ДИКСИ».

Станция «БиоМУР» имеет типичную схему для измерений МУРР (Рис.2.7), с одним фокусирующим монохроматором, одним фокусирующим зеркалом и блоками щелей коллимации.

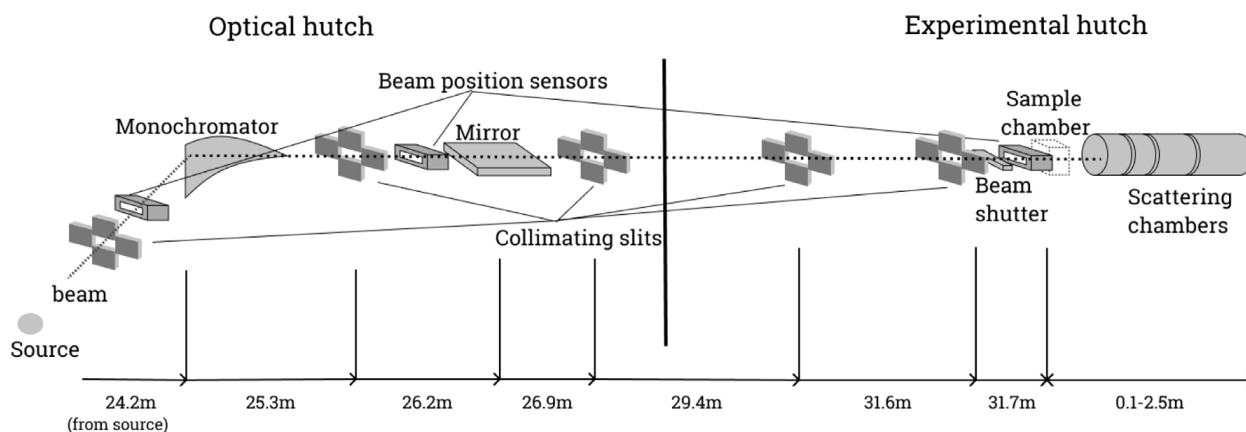


Рис.2.7 – Схема малоугловой станции «БиоМУР» [389].

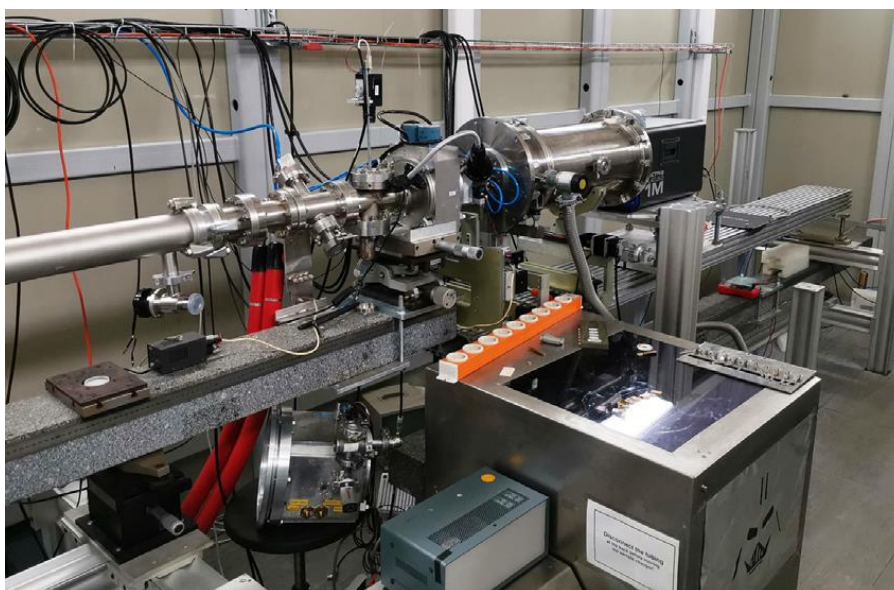


Рис.2.8 – Фотография малоугловой станции «БиоМУР» [389].

Табл. 2.2 – Параметры станции СИ «БиоМУР»

Источник СИ	Поворотный магнит 1,7 Тл на 2,5 ГэВ источнике СИ, $E_c = 7,1$ кэВ
Монохроматор	Треугольный кристалл Si (111), максимальная апертура белого пучка 4×10 мм ² , асимметричный срез 7°, изгиб для горизонтальной фокусировки
Энергия СИ	8 кэВ ($\lambda = 0.1445$ нм)
Энергетическое разрешение ($\Delta E/E$) [390]	5×10^{-3}
Зеркало	Однократное отражение, родиевое покрытие, длина 1000 мм, изгиб для фокусировки в вертикальной плоскости
Поток фотонов на образце	10^{10} – 10^{11} фот./с при токе ускорителя 100 мА (зависит от коллимации)
Размер пучка на образце	500×350 мкм
Диапазон величин q	0.03 – 30 нм ⁻¹
Детектор	2D, DECTRIS Pilatus3 1M, 1043×981 пикселей, динамический диапазон 20 бит, 500 Гц

Для построения графического интерфейса системы автоматизированного управления на станции использовался пакет Taurus [391], который широко используется для управления системами TANGO. Было разработано специальное программное обеспечение и графические интерфейсы для управления элементами оптической схемы станции «БиоМУР» (Рис.2.9).

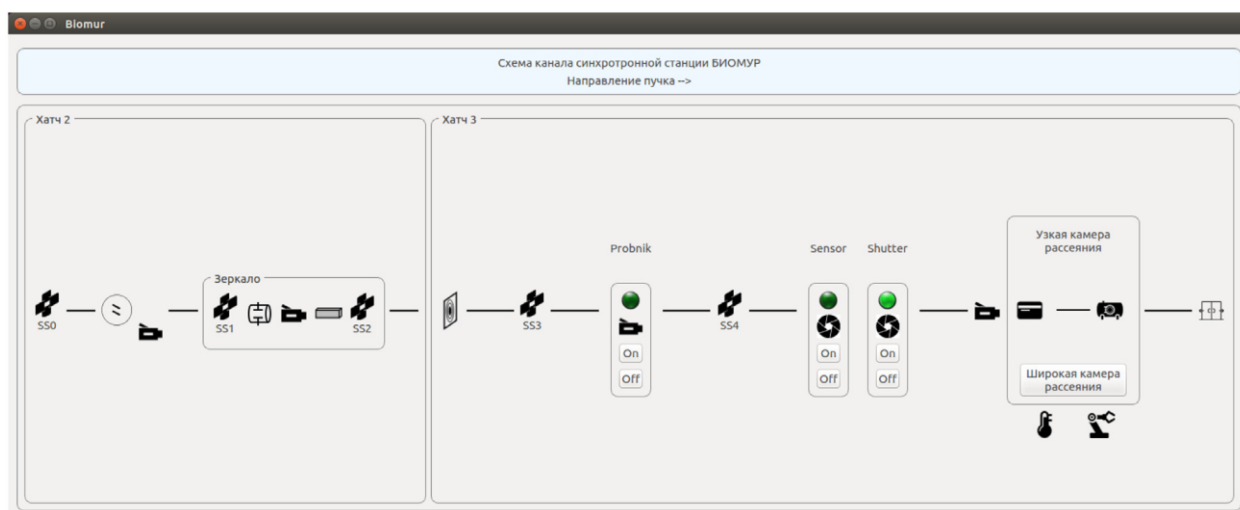


Рис.2.9 – Графический интерфейс системы управления элементами оптической схемы станции «БиоМУР» [389].

Синхротронная станция BM29 BioSAXS

Измерения проводились на станции BM29 BioSAXS [392] Европейского источника синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция).

На Рис.2.10 представлена рентгенооптическая схема формирования и транспорта пучка СИ (Optics Hutch) станции BM29 BioSAXS.

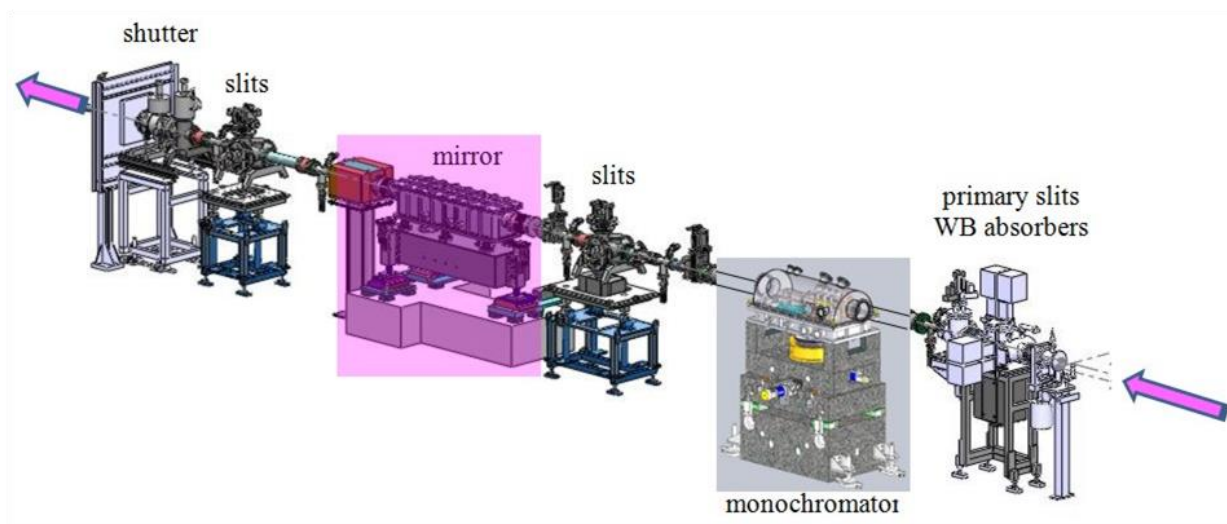


Рис.2.10 – Рентгенооптическая схема формирования пучка СИ (Optics Hutch), станция BM29 BioSAXS (ESRF, Гренобль, Франция).

- Двукратный многослойный монохроматор – многослойная структура $[\text{Ru}/\text{V}_4\text{C}]_{120}$ изготовлена на внутреннем производстве на двух Si-подложках длиной 300 мм с периодом 2.96 нм в центре. Измеренное разрешение $\Delta E/E$ на 8 кэВ составляет 1.6%.

- Тороидальное зеркало – фокусирующий элемент станции, представляющий собой цилиндрическое тороидальное зеркало длиной 1,1 м, отражающее в вертикальной плоскости. В стандартной схеме 4 мм×4 мм пучок фокусируется в пятно 0,5 мм×0,5 мм в плоскости детектора и имеет размер 0,7 мм×0,7 мм на позиции образца (11 м от зеркала). Соответствующая расходимость пучка составляет 130 мкрад.

- Вакуумный путь – длинный путь между образцом в капилляре и детектором пучок проходит в вакууме. В конце вакуумного пути

устанавливается поглотитель пучка (beamstop), большое каптонное окно сохраняет вакуум, детектор находится на воздухе сразу за окном.

Общий вид станции BM29 BioSAXS (Experimental Hutch) показан на Рис.2.11.

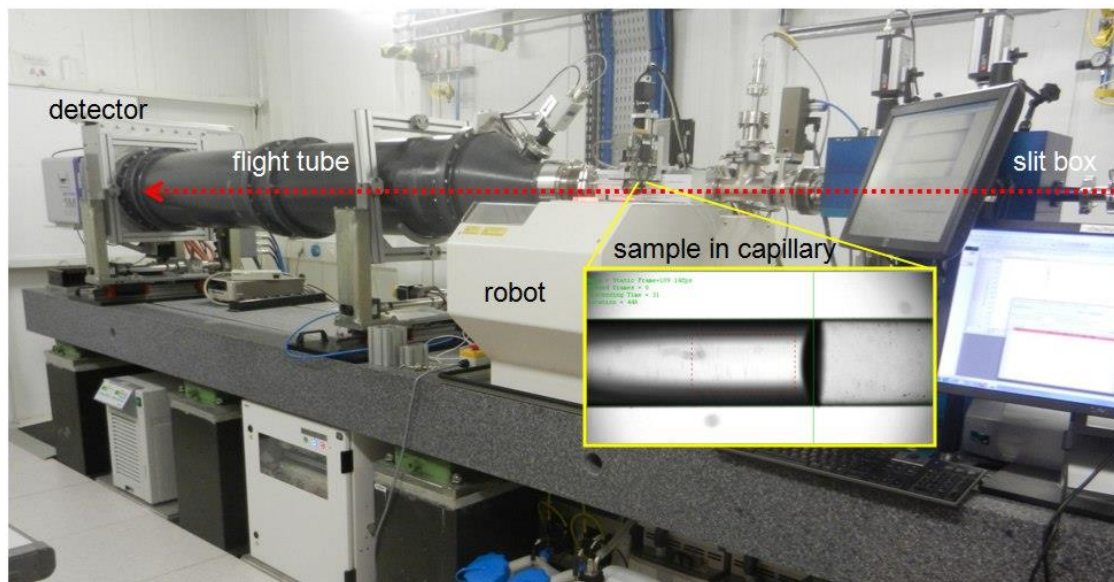


Рис.2.11 – Общий вид станции BM29 BioSAXS (Experimental Hutch).

Методика измерений МУРР на станции BM29 BioSAXS (ESRF) состояла в следующем.

Измерения проводились с использованием СИ с энергией 12.4 кэВ и двухкоординатного детектора Pilatus 1M. Расстояние образец-детектор составляло 2.9 м.

Исследуемые образцы помещались в специальную термостатируемую роботизированную систему [393] в кюветы из полистирола объемом 200 мкл. Раствор из кюветы с помощью робота помещали в проточный кварцевый капилляр диаметром 1.8 мм, с использованием которого проводились измерения. Исследуемый раствор равномерно продвигался по капилляру, при этом пучок попадал в одну и ту же точку на капилляре, но все время в новую часть образца. За время движения образца по капилляру было сделано 10 съемок. Время экспозиции каждого измерения составляло 1 с. Сечение пучка на образце составляло 700 мкм².

Станция ЮМО, нейтронный реактор ИБР-2

Исследования методом МУРН проводились на модернизированном спектрометре, оснащённом двухдетекторной системой, на станции ЮМО (реактор ИБР-2, ОИЯИ, Дубна, Россия) [394].

Схема спектрометра МУРН на станции ЮМО представлена на Рис.2.12.

Расстояние от образца до детектора составляло 12.96 и 5.3 м для «новых» и «старых» детекторов соответственно.

Диапазон длин волн нейтронов варьировался от 0.7 до 4.0 Å (с разбросом длин волн 10% FWHM), чтобы охватить диапазон s от 0.01 до 0.5 Å⁻¹, где $s = 4\pi\sin(\theta)/\lambda$ есть вектор рассеяния; 2θ – угол рассеяния; λ – длина волны.

Во ходе эксперимента управление спектрометром осуществлялось с использованием программного обеспечения SONIX+ [395].

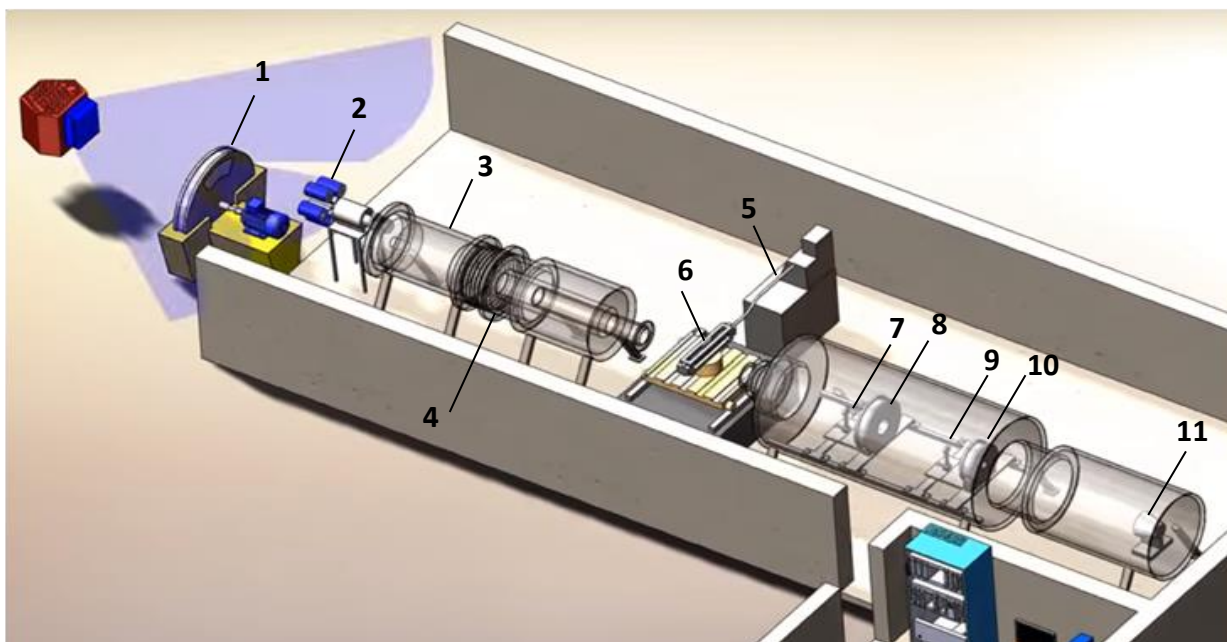


Рис.2.12 – Общий вид МУРН спектрометра на станции ЮМО (ИБР-2, ОИЯИ, Дубна, Россия) с двумя детекторами: 1 – прерыватель (чоппер); 2 и 4 – первый и второй коллиматоры; 3 – вакуумный путь; 5 – водный термостат; 6 – держатель образца; 7 и 9 – ванадиевый стандарт; 8 – первый детектор, который называется «старый» (с центральным отверстием 200 мм); 10 – второй детектор, который называется «новый» (с центральным отверстием 80 мм); и 11 – детектор прямого нейтронного пучка [396].

Методика анализа данных МУРР, полученных с использованием дифрактометра АМУР-К состояла в следующем.

Для анализа экспериментальных данных малоуглового рассеяния на основании известной трехмерной структуры лизоцима (PDB ID: 4WLD) с использованием программ COOT [397] и Rymol [398] были построены модели различных олигомеров – димер, тетрамер, октамер. При этом предполагалось, что молекулы друг относительно друга в олигомере строятся так же, как в кристаллической решетке тетрагональной формы лизоцима.

Первичную обработку полученных экспериментальных данных малоуглового рассеяния и расчеты интенсивности МУРР от смесей макромолекул и смоделированных олигомеров проводили с помощью программ AGBEN, SASPLOT, CRY SOL, MIXTURE, OLIGOMER [377] и ряда других с использованием методики, описанной в [399].

Метод расчета интенсивности малоуглового рассеяния от многокомпонентной полидисперсной системы описан в предыдущем разделе. Интенсивность рассеяния многокомпонентной системы, относительная объемная доля и интенсивности компонент рассчитывались по формулам (2.1 – 2.4). Качество приближения оценивалось с помощью минимизации невязки χ^2 по формуле (2.5).

Методика анализа данных МУРР, полученных на синхротронной станции ДИКСИ (КИСИ, НИЦ «Курчатовский институт») состояла в следующем.

Расчет интенсивности рассеяния многокомпонентной системы, относительной объемной доли и интенсивностей компонент, оценка качества приближения проводились аналогичным предыдущему случаю образом (по формулам 2.1 – 2.5). Обработка данных МУРР проводилась программами POLY MIX и OLIGOMER. Детальный анализ состава кристаллизационных растворов проводился программой OLIGOMER, которая позволила с

помощью предложенных моделей возможных олигомеров определить количество различных олигомеров в растворе белка.

Моделирование интенсивности рассеяния проводили с помощью программ CRY SOL [400]. Для проверки присутствия больших агрегатов кривые рассеяния обрабатывались программой MIXTURE [401] в предположении сферической формы макромолекул и их производных, так как достоверно известно, что молекулярные комплексы в данном случае имеют приблизительно сферическую форму.

Методика анализа данных МУРР, полученных на синхротронной станции BioSAXS BM29 (ESRF), состояла в следующем.

Первичная обработка экспериментальных малоугловых данных (радиальное усреднение, нормировка на интенсивность прошедшего пучка, проверка на наличие радиационного повреждения, поправка на чувствительность детектора) проводилась с помощью автоматической системы обработки данных «SaxsAnalysis» [402].

Следующие этапы обработки (усреднение сигнала от буфера раствора, вычитание усредненного сигнала от буфера из экспериментальных данных рассеяния раствором белков и нормировка на концентрацию белков) выполнялись с помощью программы PRIMUS [388], входящей в программный пакет ATSAS [377, 403].

В результате были получены обработанные экспериментальные зависимости интенсивности I МУРР от модуля вектора рассеяния s ($s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, 2θ – угол рассеяния, λ – длина волны) для растворов белка при различных условиях. Угловой диапазон составлял $0.003 < s < 0.5 \text{ \AA}^{-1}$.

Проводилось сравнение профилей рассеяния полученных данных: никаких эффектов радиационного повреждения не наблюдалось в течение общего времени экспозиции.

Анализ данных проводился с учетом наличия нескольких компонент в системе, расчеты проводились аналогичным, описанному выше, образом.

Методика анализа данных МУРР, полученных на нейтронной станции ЮМО, ИБР-2 (ОИЯИ, г. Дубна, МО) состояла в следующем.

Используя программу SAS [404], обрабатывались данные МУРН, используя следующую схему: (i) сбор данных, относящихся к одному и тому же образцу; (ii) расчет функции разрешения спектрометра для заданных экспериментальных условий; (iii) коррекция данных с учетом мертвого времени нейтронно-кольцевых проводных детекторов; (iv) вычитание фонового сигнала из данных детектора; (v) нормировка на полученный спектр стандартного ванадиевого рассеивателя с целью приведения данных к абсолютным единицам; (vi) вычитание фона из данных от образца.

Картины рассеяния нормировались с использованием внутренних процедур [405, 406], проводилось усреднение по падающему пучку, вычитался вклад в рассеяние от буфера и пустой ячейки, при этом разностные кривые были соответствующим образом масштабированы с использованием стандартных процедур. Оценка интенсивность под нулевым углом $I(0)$, экспериментальных молекулярных масс (MW ; оценка по калибровке с использованием стандарта ванадия) и радиусов инерции (R_g) проводилась в приближении Гинье [407].

Расчетные кривые рассеяния от моделей олигомеров (PDB: 4WLD; [408]) были получены с использованием программы CRYSON [409]. Наилучшее совпадение кривых рассеяния от смесей мономеров, димеров, тетрамеров, гексамеров и октамеров лизоцима получено с использованием программы OLIGOMER [388]. Эти олигомеры являются частью кристаллической структуры тетрагонального лизоцима. Моделирование олигомеров проведено с использованием программ Coot [397] и PyMOL v.1.8 (Schrödinger) аналогично вышеописанным случаям.

2.4.2. Динамическое рассеяние света

Метод динамического рассеяния света (ДРС) (также известен как метод фотон-корреляционной спектроскопии или квазиупругого рассеяния света) является одним из наиболее распространенных методов, используемых для определения размера эмульсий, мицелл, полимеров, белков, наночастиц или коллоидных частиц, диспергированных или растворенных в жидкости.

Проходящий через среду со сферическими броуновскими частицами монохроматический луч света (лазерный луч), попадая на движущуюся частицу, вызывает изменение частоты (Доплеровский сдвиг), интенсивности и направления движения света. Это изменение зависит от размера частицы. Измеряя и анализируя флуктуацию интенсивности рассеяния света (а именно частоту осцилляций интенсивности света относительно среднего значения, используя автокорреляционную функцию), можно вычислить коэффициент диффузии, рассчитать распределение частиц по размерам и дать описание движения этой частицы в растворе (в среде).

Разрешающая способность данного метода от нескольких нанометров до нескольких микрон. Метод ДРС используют для исследования монодисперсных растворов слабой концентрации.

Этот метод имеет ряд преимуществ: прежде всего короткое время проведения эксперимента, быстрая настройка и почти полностью автоматизированный процесс измерений, позволяет использовать данный метод для проведения обычных (стандартных, повседневных, рутинных) измерений, не имея большого опыта. Кроме того, этот метод исследования является достаточно недорогим.

Коммерческие приборы, определяющие размеры частиц, в основном работают только в одном режиме: угол рассеяния 90° и длина волны $\lambda = 675$ нм (красный свет). Обычно в таких системах пренебрегают зависимостью от концентрации рассеивающих частиц. Использование более сложного экспериментального оборудования (проектор, коротковолновый

источник света), приводит не только к усложнению метода и увеличению его стоимости, но и к значительному расширению его возможностей.

Несмотря на то, что с помощью ДРС, в принципе, можно отличить мономер белка от димера в растворе, для определения мелких олигомеров в растворе данный метод является гораздо менее точным, чем классическое рассеяние света или скорость оседания.

Преимуществом использования ДРС является возможность анализа образцов, содержащих ярко выраженное распределение сильно различающихся по молекулярной массе видов частиц (например, мономера белка и различных размеров его агрегатов, отличающихся более чем в 2,5 раза!), а также для обнаружения очень небольших количеств (в большинстве случаев $<0,01\%$) частиц с высокой молекулярной массой. Кроме того, в отличие от метода хроматографии при измерении размеров агрегатов белка методом ДРС, хроматографического разделения не происходит, а значит, не происходит потеря агрегатов белка (как это бывает в хроматографической колонке).

Кроме того, с помощью ДРС можно также измерить абсолютные величины некоторых параметров, представляющих интерес, таких как молекулярная масса, радиус инерции, константы поступательной диффузии и так далее. Тем не менее, анализ может быть затруднен из-за тепловых колебаний молекул в растворе (отклонения молекул от своего среднего положения) а также для нежестких макромолекул.

В данной работе методом ДРС были исследованы растворы лизоцима и лизоцима с осадителем в условиях кристаллизации тетрагональной формы лизоцима. Измерения проводили на приборе Zetasizer Nano – ZS (Malvern Instruments Ltd.) в ячейке с поддержанием температуры $\pm 0,5^\circ\text{C}$ на длине волны $\lambda = 633 \text{ нм}$, при угле рассеяния 173° (Рис.2.13, 2.14).

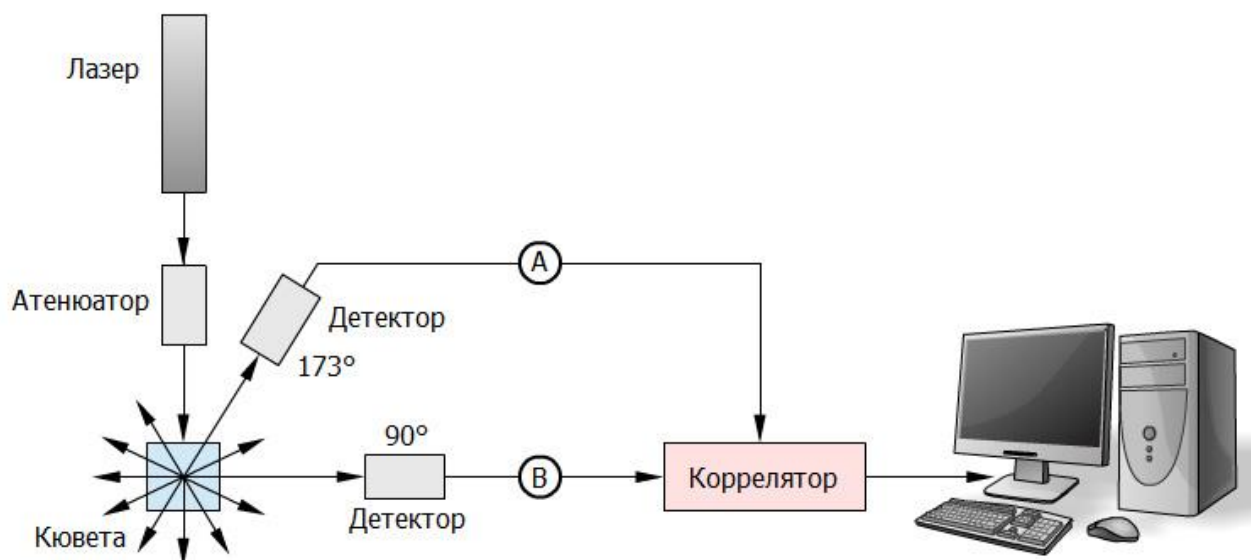


Рис.2.13 – Схема эксперимента для измерения рассеяния света от раствора белка.



Рис.2.14 – Внешний вид прибора Zetasizer Nano – ZS для измерения рассеяния света от раствора белка.

2.4.3. Молекулярная динамика

Метод молекулярной динамики (МД) – метод, в котором временная эволюция системы взаимодействующих атомов или частиц отслеживается интегрированием их уравнений движения. МД допускает рассмотрение большего числа частиц, т.к. при расчётах вычисляются только уравнения Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = \vec{F}_i = - \frac{dU}{d\vec{r}_i} \quad (2.6)$$

Метод МД широко применяется для моделирования динамики молекул и их агрегатов в растворе и в условиях кристаллизации.

В работе метод МД применяется с целью определения стабильности олигомеров белка в растворе, что является принципиально важным в анализе структуры растворов белка как в присутствии, так и в отсутствие осадителя.

Алгоритм вычислений:

1. Вычисление сил на основе набора координат материальных точек.
2. Вычисление ускорений для каждого центра, в соответствии со значением действующей результирующей силы и массы этого центра.
3. Решение уравнений движения в предположении, что силы и ускорения не меняются во времени.
4. Определение координаты центров системы для небольшого отрезка времени (шага интегрирования).

В настоящей работе моделирование МД было выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса» (суперкомпьютер) [410], Объединенный вычислительный кластер, НБИКС-ПТ, НИЦ «Курчатовский институт» (г. Москва).

Все расчёты были выполнены с помощью программного пакета GROMACS версии 5.0.4 [411] и в поле Amber ff99SB-ILDN, поскольку новые

торсионные потенциалы, применяемые в этой версии поля, точнее по сравнению с предыдущими версиями силового поля Amber [412].

Состояния протонирования аминокислотных остатков в составе олигомеров и мономеров лизоцима при pH 4.5 (в соответствии с экспериментальными условиями (Раздел 4.3) были определены с помощью сервера PROPKA [413].

Трехмерная структура белка лизоцима представлена в виде файла с координатами атомов, в котором каждому атому полагался идентификационный номер, номер аминокислотного основания, а также название, соответствующее данному атому в списке атомов поля Amber ff99SBILDN.

Была создана кубическая ячейка моделирования, в центр которой помещался олигомер или мономер белка. Размеры ячейки моделирования задавались таким образом, чтобы расстояние между любым атомом белка и краем ячейки превышало 1 нм, т.е. минимальное расстояние между двумя копиями белка в соседних ячейках было не меньше 2 нм, что исключает взаимодействие между ними.

В исследовании методом МД стабильности октамеров лизоцима (Раздел 3.6 Главы 3) в растворе ячейка заполнялась молекулами воды, для чего была выбрана модель воды TIP3P, так как силовое поле Amber разрабатывалось непосредственно для данной модели воды, представленной тремя атомами, взаимодействующими с атомами других молекул электростатически или через ван-дер-Ваальсово взаимодействие [414].

В исследовании методом МД температурной зависимости стабильности олигомеров лизоцима в растворе (Раздел 4.4 Главы 4) для заполнения ячейки моделирования явно заданным растворителем использовалась 4-центровая модель воды TIP4P-Ew, разработанная для возможности использования методов суммирования по Эвальду [415].

Чтобы точнее воспроизвести экспериментальные условия, в которых находится белок в процессе кристаллизации, олигомеры лизоцима

моделировались в водном растворе с осадителем NaCl. Для этого молекулы воды заменялись ионами натрия и хлора таким образом, чтобы концентрация соли в ячейке составляла 0.43 М (в соответствии с экспериментом (Раздел 4.3)). В случаях моделирования систем без ионов осадителя в воде шаг с заменой молекул воды пропускался. Общий заряд системы нейтрализовался добавлением незначительного количества ионов хлора.

Вследствие того, что в начальных конформациях молекулы лизоцима имеют перекрывающиеся атомы (ASN 77) и из-за наличия других атомов, расположенных слишком близко друг к другу (например, по причине изменения количества атомов водорода при задании pH или добавления растворителя и ионов), начальные энергии системы могут быть очень велики, что может приводить к большим ошибкам на начальной стадии работы МД алгоритмов. Чтобы этого избежать, до начала МД расчетов проводилась минимизация энергии системы методом наискорейшего спуска (50 000 шагов).

Затем осуществлялось уравнивание системы, основной задачей которого являлось приведение в равновесие растворителя вокруг белка, т.е. создание нужной температуры и плотности молекул растворителя. Приведение системы в состояние равновесия проводилось в два этапа: на первом, называемом NVT-уравниванием, приводилась в равновесие температура системы, далее с помощью приложения давления в процессе NPT-уравнивания достигалось необходимое давление.

Начальные скорости были присвоены в соответствии с распределением Максвелла – Больцмана при различных температурах (от 5 до 40 °C), и производились 100-пикосекундное термостатирование системы улучшенным методом Берендсена [416] и баростатирование методом Паринелло-Рамана [417] (100 пс), при этом на все неводородные атомы белка накладывались ограничивающие силы ($k_{pr} = 1000$ кДж/(М · нм²)), а на все связи накладывались ограничения с помощью алгоритмов LINCS [418].

После того, как система должным образом была уравновешена, и ее энергия минимизирована, был проведен расчет МД.

Моделирование МД проводилось в изотермическо-изобарическом ансамбле с использованием термостата Берендсена и баростата Паринелло-Рамана (при $P = 1$ атм для всех систем). Интегрирование производилось с помощью стандартного интегратора leap-frog [419], временной шаг интегрирования равнялся 2 фс, а координаты атомов сохранялись каждые 100 пс. Электростатические взаимодействия вычислялись методом ускоренного суммирования по Эвальду PME (Particle Mesh Ewald [420]) с интерполяцией четвёртого порядка (кубической) и шагом сетки в пространстве Фурье 0.16 нм, при этом взаимодействие Ван-дер-Ваальса учитывалось с отсечкой 1,0 нм, а список соседей обновлялся каждые 10 шагов. Длительность каждой рассчитанной траектории олигомеров белка составила 100 нс.

2.5. ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ОКРУЖЕНИЯ ОБРАЗЦА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЛКОВЫХ СИСТЕМ В НАТИВНОМ СОСТОЯНИИ

Разработан экспериментальный комплекс окружения образца для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре специализированные измерительные ячейки, и позволяющий проводить исследования с применением рентгеновского, синхротронного излучений, а также оптических методов:

- термостатируемая ячейка для МУРР с использованием СИ (на станциях СИ БиоМУР, ДИКСИ);
- микрофлюидная ячейка для изучения структуры растворов белков методом МУРР [421];
- Специализированная ячейка для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов рентгеновскими и оптическими методами [422];
- Специализированная ячейка для исследований белковых структур методом СРВ в ПВО.

Измерительные ячейки для образцов растворов

В экспериментах МУРР, МУРН на каждом из источников использовались свои измерительные ячейки (Рис.2.15).

Для дифрактометра АМУР-К использовали тонкостенный капилляр, который с двух сторон герметично закрывался (Раздел 2.4.1 «Дифрактометр АМУР-К»).

На станциях СИ БиоМУР (Роботизированная система автоматической подачи исследуемого раствора, Рис.2.15 а) и ДИКСИ (Рис.2.15 в) растворы после смешивания загружались непосредственно в измерительные тонкостенные капилляры, которые помещались в *термостатируемую ячейку, разработанную для проведения настоящих исследований*. Такая схема

позволяла проводить несколько (до 6) измерений каждого образца в одном и том же капилляре, а каждый новый образец загружали в новый капилляр.

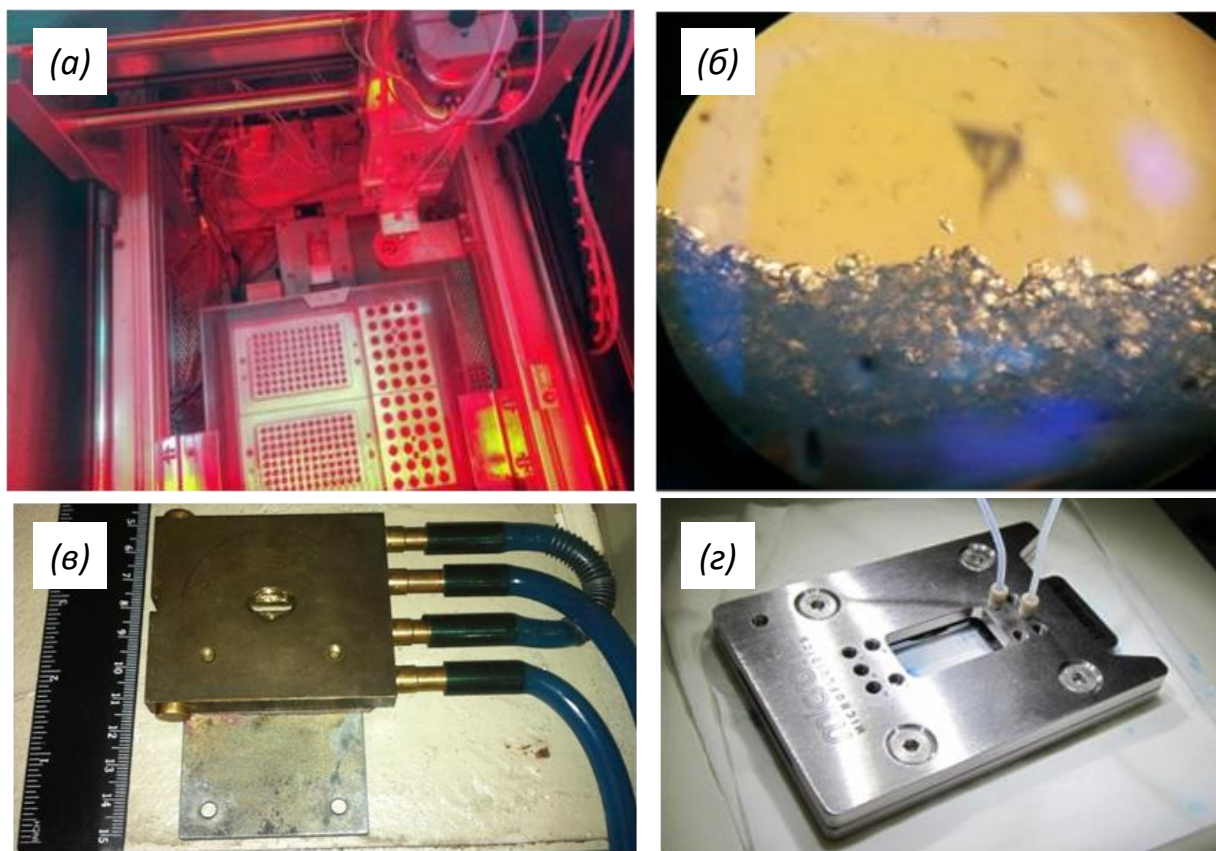


Рис.2.15 – Измерительные ячейки для образцов растворов. Все ячейки термостатируемы. а) – БиоМУР; б) – ЮМО, ИБР-2; в) – ДИКСИ; г) – микрофлюидная ячейка.

На станции СИ ВМ-29 Biosaxs растворы помещались в ячейки роботизированной системы (Рис.2.16), из которых в процессе эксперимента растворы автоматически подавались в измерительный капилляр. Температура в ячейках указанной системы и измерительном капилляре поддерживалась постоянной, в соответствии с заданным значением. После каждого образца измерительный капилляр промывался детергентом и буферным раствором.

Для проведения исследований на источнике нейтронов, станции ЮМО, образцы помещались в тонкие кюветы (Рис.2.15 б) объемом около 0,5 мл, температура которых поддерживалась постоянной, а сам эксперимент занимал около суток.

С целью оптимизации расхода белка была разработана *микрофлюидная ячейка* (Рис.2.15 г) для изучения структуры растворов белков методом МУРР.

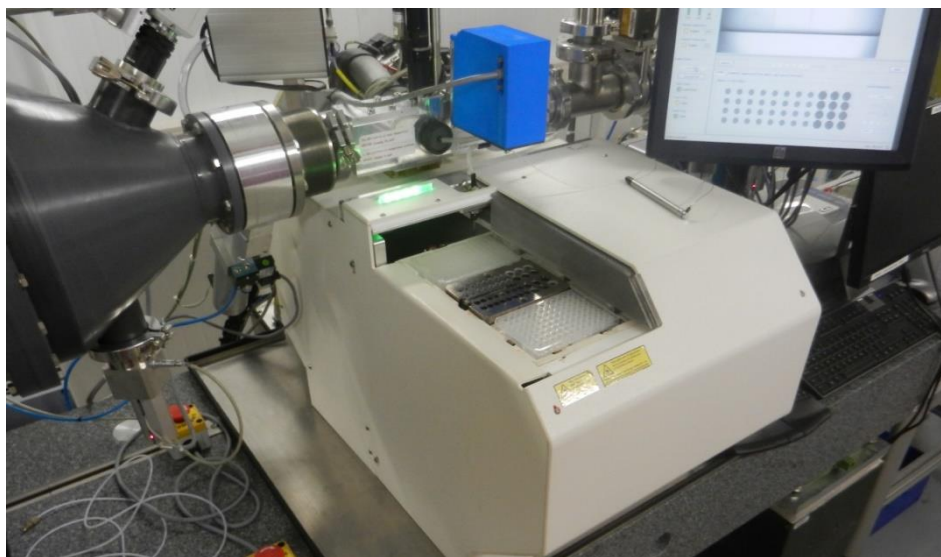


Рис.2.16 – Роботизированная система автоматической подачи исследуемого раствора в измерительный капилляр в процессе эксперимента.

Использование сборной конструкции, обеспечивающей малый объем образца, позволяет подстраивать параметры микрофлюидной ячейки под конкретные задачи. Тестовые испытания растворов лизоцима проводились на лабораторном дифрактометре АМУР-К (ИК РАН), на станции BM29 (ESRF, Гренобль) и на станции “ДИКСИ” Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ “Курчатовский институт”). Также, экспериментальная работа показала, что при использовании в качестве рентгенопрозрачного окна особо чистого кварцевого стекла толщиной 60 мкм собственный уровень фона рассеяния ячейкой в диапазоне измеряемых углов меньше, чем у кварцевых капилляров, что обеспечивает возможность увеличения точности измерений.

Специализированная ячейка для структурных in situ исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов

На воздухе вследствие испарения, потери воды, которая может составлять около 70% кристалла белка, белковые кристаллы быстро деградируют, то для

проведения исследований степени их совершенства *in situ* в процессе роста и деградации с помощью рентгеновских методов, в том числе с помощью высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии, была разработана и создана специальная кристаллизационная измерительная ячейка (Рис.2.17) [422].

Специальная ячейка (Рис.2.17) изготовлена из фторопласта-4 (политетрафторэтилена) размером $70 \times 80 \times 15$ мм³. Она состоит из двух основных частей: корпуса и чаши, фиксированной на основании. Нижняя часть корпуса позволяет крепить ячейку на гониометр рентгеновского дифрактометра в горизонтальной геометрии, когда плоскость дифракции располагается вертикально (в частности, на станции СИ).

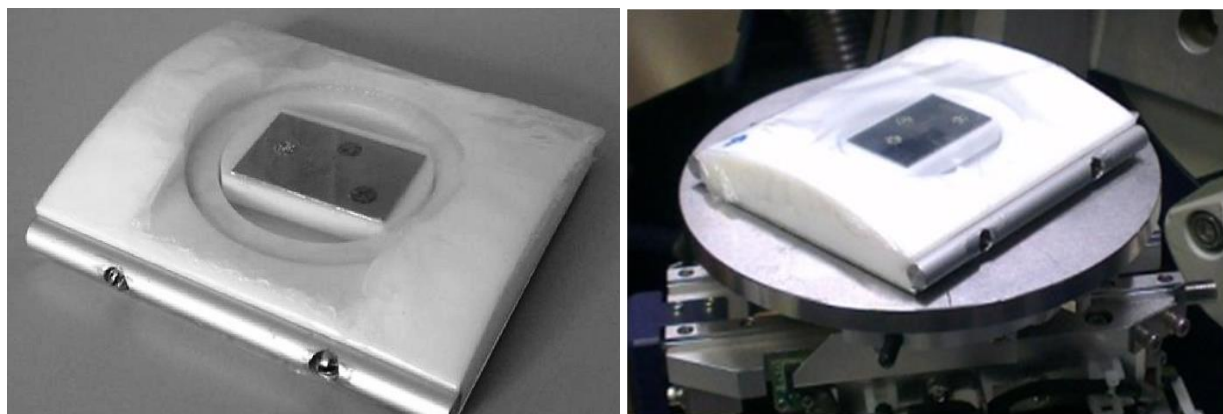


Рис.2.17 – Специальная герметичная кристаллизационная ячейка для получения белковых кристаллов на кристаллической подложке с рентгенопрозрачным окном.

Конструкция ячейки позволяет реализовать различные экспериментальные схемы, широко применяемые в рентгеновских методах: дифракцию в скользящей геометрии, сильно асимметричную дифракцию (диапазон 2θ до 180°); схемы в геометрии полного внешнего отражения (в области малых углов, порядка нескольких критических α_c); *in-plane* и *out-of-plane* геометрии (диапазон по $2\theta/\chi$ до 35°).

Используемые материалы и конструкция ячейки рассчитаны на обеспечение химической чистоты внутреннего объема ячейки и ее герметичности в течение, примерно, четырех недель. Верхняя часть

внутреннего объема представляет собой окно из материала прозрачного для света и слабопоглощающего в рентгеновском диапазоне.

В разработанной ячейке (Рис.2.17, Рис.2.18) проводили рост кристаллов методом «сидячей капли», контролировали процесс образования кристаллов с помощью оптической микроскопии.

Также благодаря тому, что ячейка закрыта рентгенопрозрачной пленкой (майлар) и герметична, в процессе образования кристаллов проводили их рентгенодифракционный анализ, который позволил осуществить контроль изменения качества, степени структурного совершенства кристаллов *in situ*, в процессе роста и в зависимости от внешних условий.

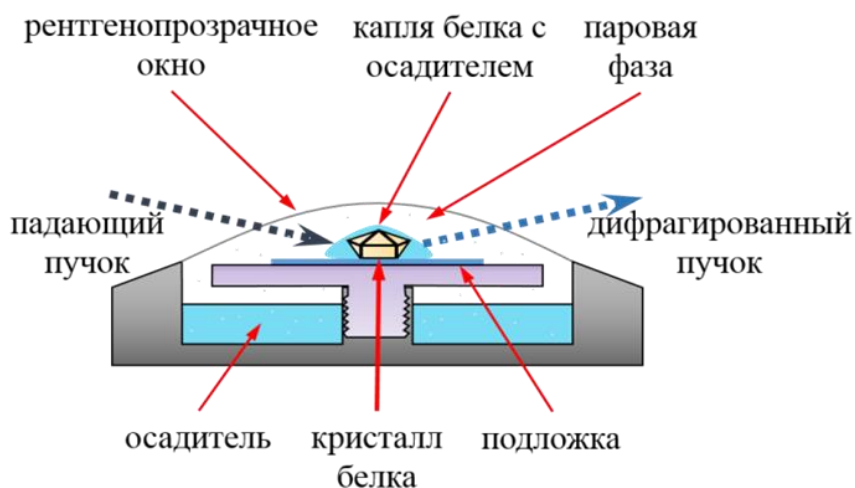


Рис.2.18 – Специальная кристаллизационная измерительная ячейка.

Также с помощью данной ячейки проводились исследования белковых пленок с помощью метода рентгеновской рефлектометрии, что позволило проводить контроль структуры (в том числе толщины и плотности) белковых пленок, в процессе их высыхания, изменения структуры во времени.

*Специализированная ячейка для исследований белковых структур
методом CPB в ПВО*

Для повышения точности исследований была разработана и создана специализированная измерительная ячейка (Рис.2.19) для проведения

исследований белковых структур методом СРВ в ПВО и рентгенофлуоресцентного анализа:

- Разработана ячейка проточного типа, позволяющая реализовать исследования белковых структур (кристаллы, ленгмюровские пленки) в условиях гелиевой атмосферы методами СРВ в ПВО, рентгенофлуоресцентного анализа и др.
- Обеспечивает уменьшение фона флуоресцентного излучения
- Позволяет исключить из флуоресцентного спектра линию Ar, перекрывающую сигналы от ряда элементов – K, Cl, S и т.д.

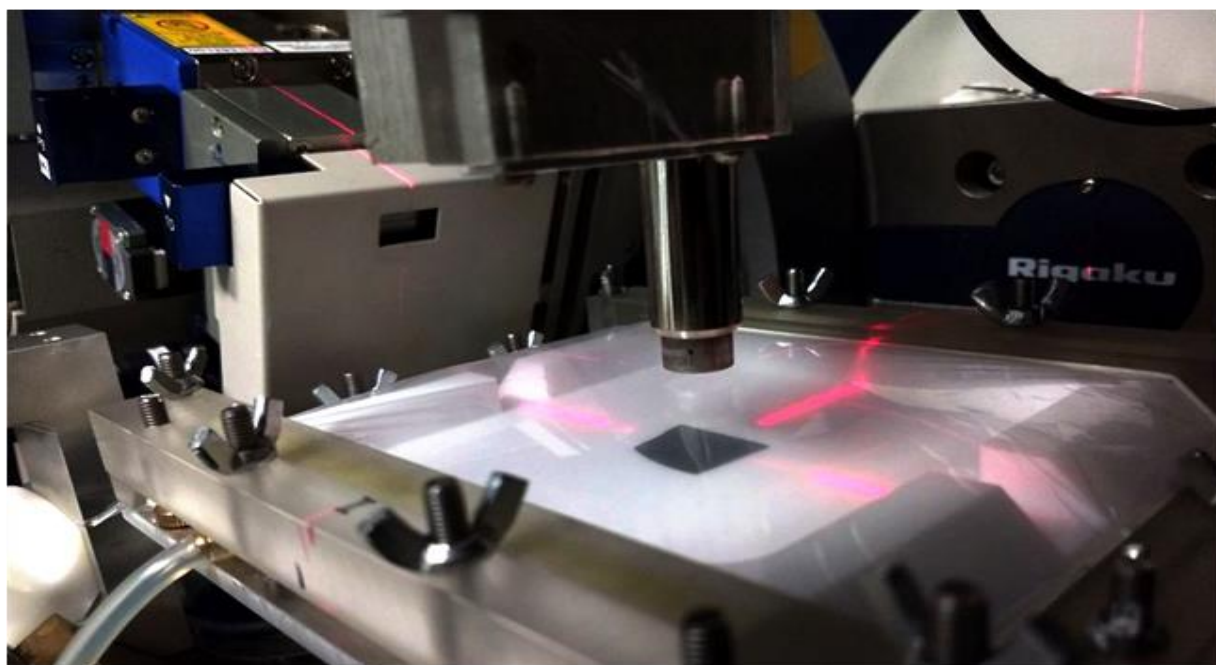


Рис.2.19 – *Специальная кристаллизационная измерительная ячейка.*

2.6. АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВЫХ КРИСТАЛЛОВ

В случае, когда в растворе образуется частично упорядоченная структура частиц, размер которых превышает размеры нескольких элементарных ячеек (будущего кристалла), то уже на кривой малоуглового рассеяния проявляются интерференционные максимумы, отражающие дифракционный характер взаимодействия излучения с веществом. В связи с этим анализ структуры белковых кристаллов проводился рентгенодифракционными методами:

- расшифровка структуры методом рентгеноструктурного анализа;
- оценка степени совершенства белкового кристалла в процессе его роста и деградации методом *in situ* высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии.

Образование кристаллов и кристаллографическая ориентация граней определялись методом оптической микроскопии.

2.6.1. Получение кристаллов белков

Кристаллизацию белка проводили из газовой фазы методом диффузии паров (в режимах «сидячей капли» или «висящей капли») [423], который заключается в том, что концентрированный раствор белка помещают на подложку и размещают в замкнутом пространстве, где с помощью осадителя обеспечивается специальная среда.

В качестве подложек использовались монокристаллические подложки Si, кварцевые подложки, предметные стекла и лабораторные стекла с различными покрытиями (силанизированное стекло, адгезивное покрытие SuperFrost и др.)

Для кристаллизации белка использовались материалы, растворы и методики их подготовки, описанные в Разделе 2.3 настоящей главы. Для каждого белка предварительно проводился скрининг условий кристаллизации, который осуществлялся методом диффузии паров с изменением концентрации белка и осадителя.

Кристаллизация лизоцима проводилась в геометрии «сидячей капли» при следующих условиях: концентрация белка и осадителя в капле 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно (6 мкл, 1/1, v/v), концентрация осадителя в резервуаре 50 мг/мл.

Для дальнейших исследований кристаллов методом белковой кристаллографии кристаллы выращивались на различных подложках, подложка помещалась в одноразовую пластиковую чашку Петри. На подложку наносилось несколько капель (3 – 5) раствора белка объемом 3 мкл, затем в эти капли было добавлено 3 мкл раствора осадителя. Затем на дно чашки Петри (не касаясь подложки) наносились капли осадителя, общий объем которого составлял около 1 мл. Чашка закрывалась крышкой и была герметично закрыта – плотно замотана парафиновой лентой (Parafilm) для исключения быстрого испарения жидкости и пересыхания белковых кристаллов (Рис.2.20а). Через несколько дней с помощью микроскопа оценивалось качество кристаллов, и выбирались кристаллы для проведения рентгенодифракционного анализа. На Рис.2.20 (б–г) представлены полученные микроскопические изображения кристаллов.

Для проведения *in situ* исследований процедура выращивания кристаллов несколько отличалась от вышеописанной. Подложки размещались в центральной зоне пьедестала, возвышающегося над резервуаром с осадителем, в специализированной ячейке для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов (Раздел 2.5). На подложки Si, расположенные на пьедестале, при помощи микропипеток были нанесены капли раствора белка в буфере, а затем раствор осадителя по 3 мкл, соответственно. Также раствор осадителя (500 мкл) находился в виде капель по краю пьедестала с подложками и в специальном резервуаре.

В описанной выше кристаллизационной ячейке кристаллы лизоцима образовывались за 48 – 96 ч, и достигали максимальных размеров спустя ~7 – 9 суток (~190 ч) после начала кристаллизации. Линейные размеры

кристаллов составляли от 350 до 800 мкм, высота кристаллов – в среднем 300 мкм (от 150 до 450 мкм) [422].

Температура в помещении, в котором проводился процесс кристаллизации, поддерживалась постоянной и была равна 19 °С. Максимальные размеры кристаллов лизоцима, полученных таким методом, составляли около 1.5 мм.

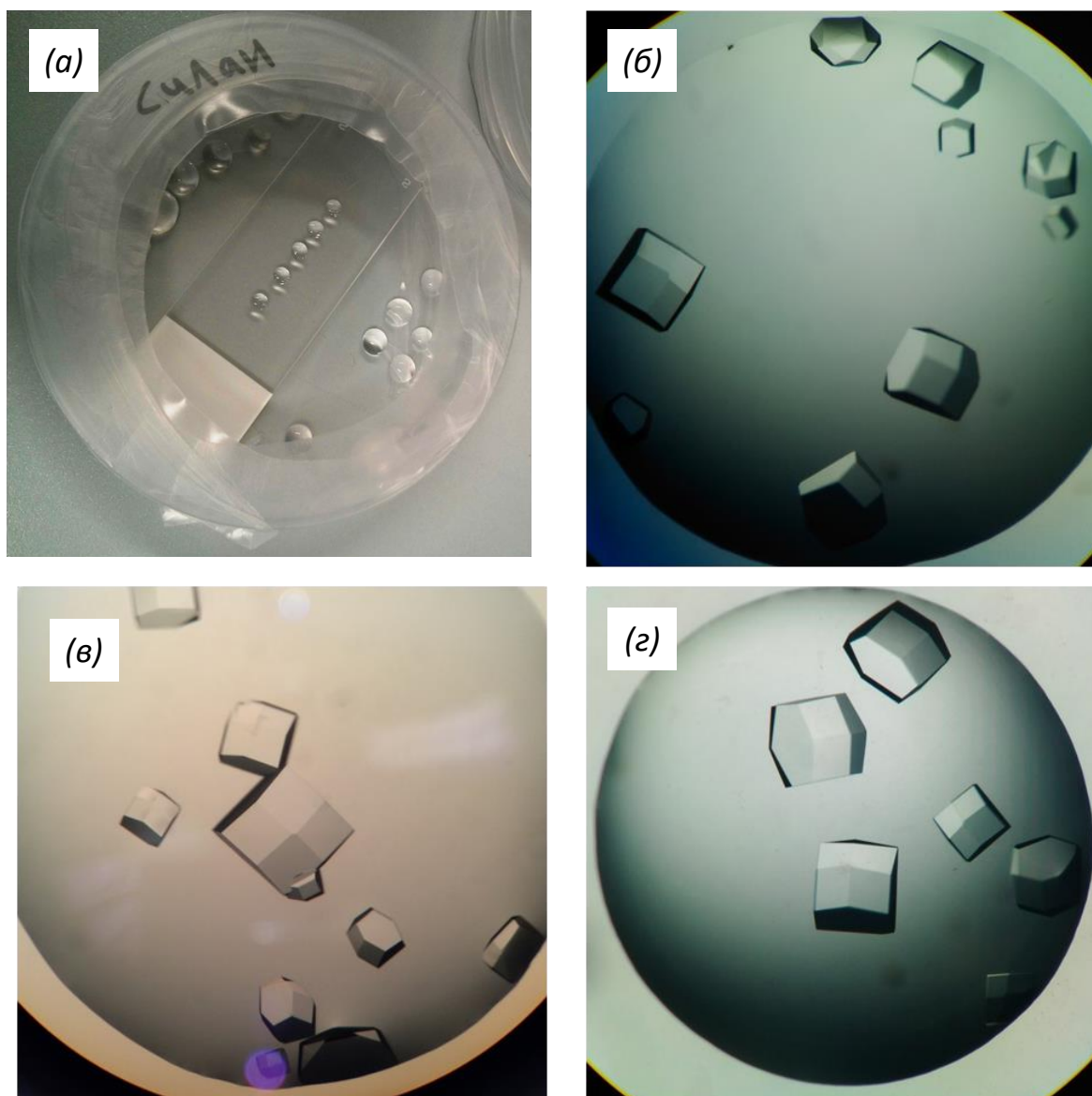


Рис.2.20 – а) – Вид ячейки для выращивания белковых кристаллов на подложке; б – з) – микроскопические изображения кристаллов, полученные на различных подложках; б) – силанизированное стекло; в) – стекло с покрытием SuperFrost с монослоем димиристоилфосфатидилхолина; з) – стекло с покрытием SuperFrost с монослоем поли (3-гексилтеофена).

Кристаллизация лизоцима в исследовании взаимодействия ионов осадителя (металлов и хлора) с молекулами белка с целью выявления их роли в образовании кристаллов тетрагональной сингонии при добавлении различных осадителей ($LiCl$, $NaCl$, KCl , $NiCl_2$, $CuCl_2$) проводилась с использованием кристаллизационных планшетов на 24 ячейки (HR 3-160, Hampton Research) и покровных стекол (HR3-215, Hampton Research) методом диффузии паров в геометрии «висящей капли». Исходный раствор белка содержал 80 мг лизоцима в 1 мл 0.2 М NaAc буфера, pH = 4.55. Раствор осадителя состоял из 0,8 М хлористой соли в 0,2 М буфере, pH = 4.55.

Капли кристаллизационного раствора были приготовлены путем смешивания 3 мкл исходного раствора белка и раствора осадителя, с конечной концентрацией белка в кристаллизационном растворе 40 мг/мл, и концентрацией соли 0.4 М. Объем раствора осадителя в ячейке был равен 500 мкл. Рост кристаллов осуществлялся при комнатной температуре в течение трех дней.

Кристаллизация протеиназы К тетрагональной сингонии проводилась методом диффузии паров в геометрии «сидячей капли». Конечные концентрации протеиназы К, нитрата натрия ($NaNO_3$) и сульфата аммония ($(NH_4)_2SO_4$) составляли 10 мг/мл, 0.5 М и 1 М, соответственно. Полученные кристаллы представлены на Рис.2.21.

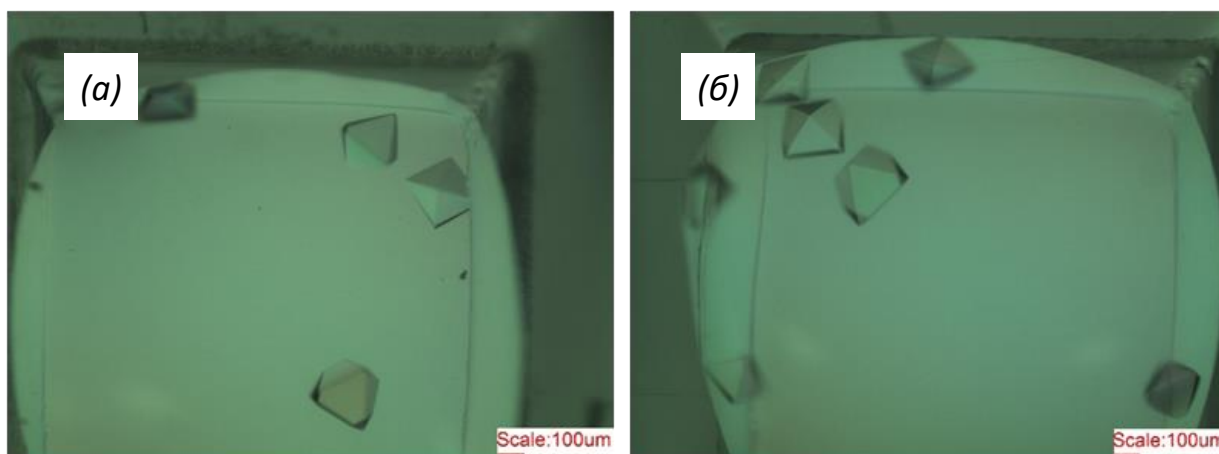


Рис.2.21 – Кристаллы протеиназы К, выращенные с использованием осадителями нитратом натрия (а) и сульфатом натрия (б).

Кристаллизация термолизина гексагональной сингонии проводилась также методом диффузии паров в геометрии «сидячей капли». Концентрации белка и осадителя $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ были равны 25 мг/мл и 0.75 М, соответственно. Полученные кристаллы представлены на Рис.2.22.



Рис.2.22 – Кристаллы термолизина гексагональной сингонии, выращенные в растворе с концентрацией белка $C_b = 25$ мг/мл и концентрацией осадителя $C_{oc} = 0,75$ М.

2.6.2. Белковая кристаллография. Станции СИ «БЕЛОК», «РСА» (КИСИ-Курчатов)

Рентгенодифракционные исследования выращенных кристаллов проводились на базе станции СИ БЕЛОК@КИСИ, модернизированной станции РСА@КИСИ (с 2018 года) (НИЦ «Курчатовский институт») и лабораторного дифрактометра Bruker FR-591 с источником с вращающимся анодом (ЦКП, ИК РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН).

Рентгенооптическая схема станции СИ «БЕЛОК» представлена на Рис.2.23. Основные параметры станции представлены в Табл. 2.3.

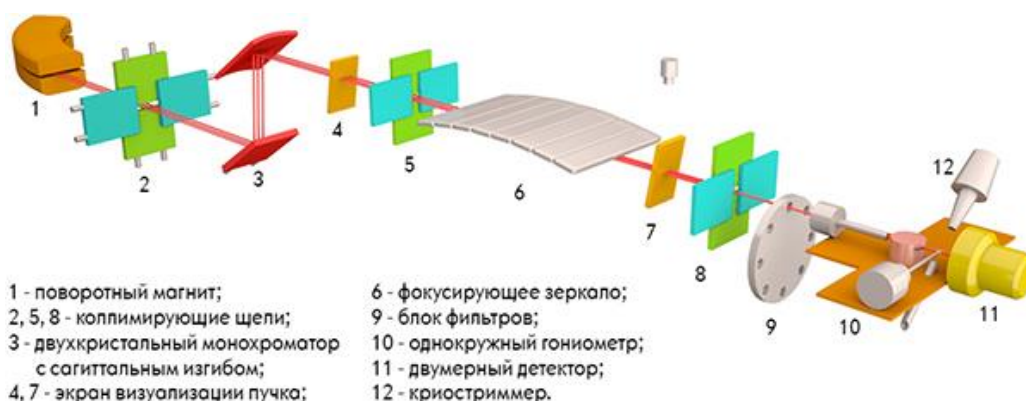


Рис.2.23 – Оптическая схема станции «БЕЛОК» КИСИ [424].

Табл. 2.3 – Основные параметры станции СИ «БЕЛОК», КИСИ, НИЦ «Курчатовский институт».

Энергетический диапазон	5 – 20 кэВ
Энергетическое разрешение ($\Delta E/E$)	2×10^{-3}
Источник	Поворотный магнит, 1,7 Тл ($E_c = 7,1$ кэВ)
Оптика	Двухкристальный монохроматор с сагиттальным изгибом второго кристалла, фокусирующее зеркало.
Поток фотонов на образце	$10^{11} - 10^{12}$ фот/мм ²
Размер пучка на образце	2×1 мм ²
Окружение образца/установка	Криостриммер Oxford CryoJet. Температура до 95 К
Детекторы	MarCCD165

Рентгенооптическая схема станции СИ «РСА» представлена на Рис.2.24. Основные параметры станции представлены в Табл. 2.4.

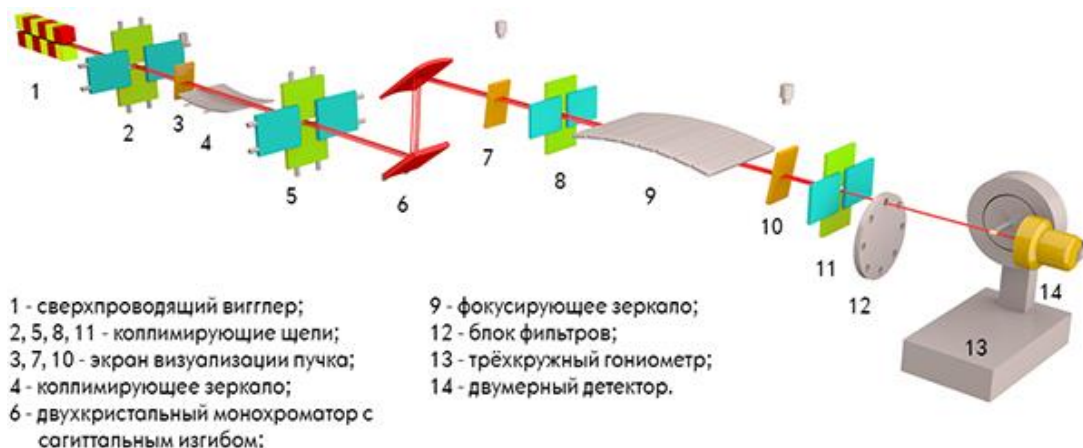


Рис.2.24 – Оптическая схема станции «РСА» КИСИ [425].

Табл. 2.4 – Основные параметры станции СИ «РСА», КИСИ, НИЦ «Курчатовский институт».

Энергетический диапазон	5 – 40 кэВ
Энергетическое разрешение ($\Delta E/E$)	2×10^{-3}
Источник	Поворотный магнит
Оптика	Двухкристальный монохроматор с сагиттальным изгибом второго кристалла, фокусирующее зеркало.
Поток фотонов на образце	$10^{11} - 10^{12}$ фот/мм ²
Размер пучка на образце	от $0,5 \times 1,5$ мм ²
Окружение образца/установка	Криостриммер Oxford CryoJet. Температура до 95 К
Детекторы	4096×4096 CCD Princeton Instruments

Структура полученных кристаллов определялась методом рентгеноструктурного анализа, регистрация дифракционной картины (с использованием 2D детектора) осуществлялась при одноосном вращении белкового кристалла в парах кипящего азота, с последующим восстановлением 3D структуры молекулы белка.

Кристаллы вынимали из капли с помощью специальной криопетли. Перед началом измерения их погружали на 3 с в криораствор, состоящий из осадителя и 15 % глицерина, и устанавливали на гониометр под ток жидкого азота. Далее происходила съемка двух дифрактограмм.

Полученные дифрактограммы обрабатывались с использованием программ XDS и iMosflm [426]. На основе обработки полученных данных определялась сингония кристаллов.

Для примера ниже приведены результаты дифракционного анализа структуры кристалла лизоцима (Табл. 2.5, Рис.2.25, станция СИ «БЕЛОК») и протеиназы К (Рис.2.26, Bruker, ИК РАН).

Набор дифракционных данных до разрешения $1,27 \text{ \AA}$ собран с одного кристалла лизоцима с использованием СИ. Кристалл для съёмки был предварительно заморожен в криорастворе. Набор собран методом вращения при длине волны $1 \text{ \AA}$, угол вращения 98° , угол качания $0,1^\circ$. Расстояние

кристалл – детектор 217,45 мм. Полученный набор использовался для решения пространственной структуры фермента методом молекулярного замещения с помощью программы PHASER. Статистические характеристики набора приведены в Табл. 2.5.

Табл. 2.5 – Статистические характеристики рентгенодифракционного набора, полученного от кристалла лизоцима HEWL, выращенного на стеклянной подложке с покрытием SuperFrost с монослоем димиристоилфосфатидилхолина (Рис.2.20в).

Пространственная группа	$P4_32_12$
$a, b, c, \text{\AA}; \alpha, \beta, \gamma, \text{град}$	78,2, 78,2, 36,9; 90, 90, 90
Разрешение, $\text{\AA}$	100,0-1,27 (1,32-1,27)
Кол-во независимых рефлексов	30725 (2934)
Полнота, %	99,6 (98,6)
$I/\sigma(I)$	11,25 (2,27)
Rmrgd-F, %	7,3
*В скобках приведены значения для последней оболочки	

Две рентгенограммы из набора дифракционных данных показаны на Рис.2.25.

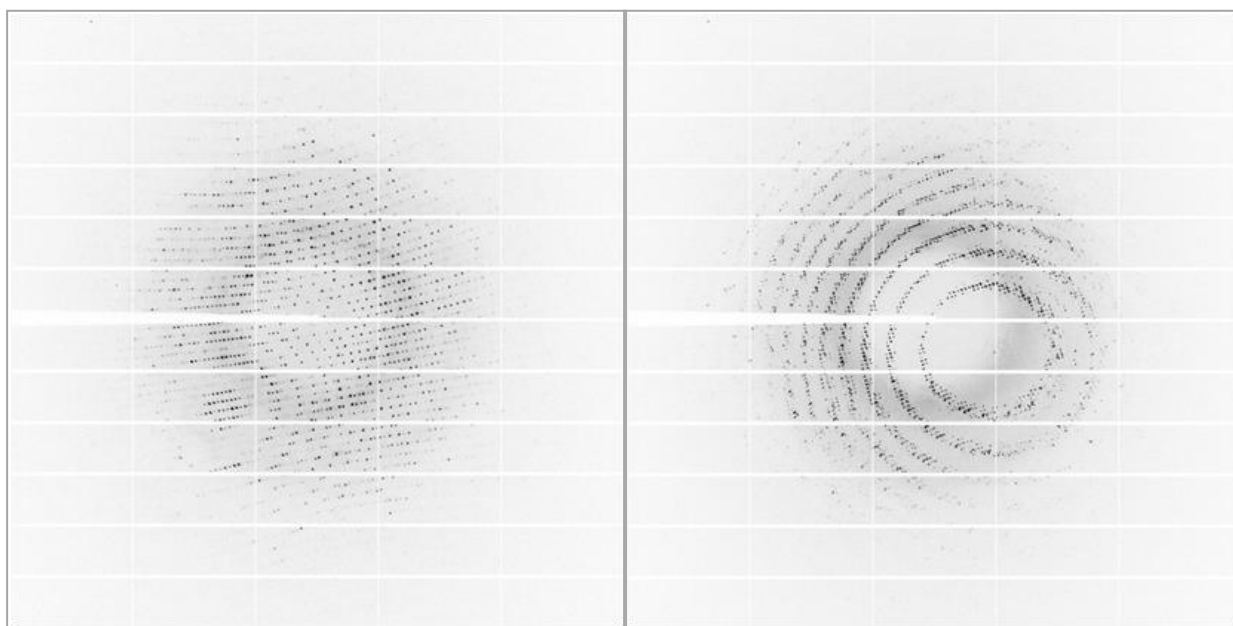


Рис.2.25 – Рентгенограммы от кристалла лизоцима выращенного на стеклянной подложке с покрытием SuperFrost с монослоем димиристоилфосфатидилхолина (Рис.2.20в).

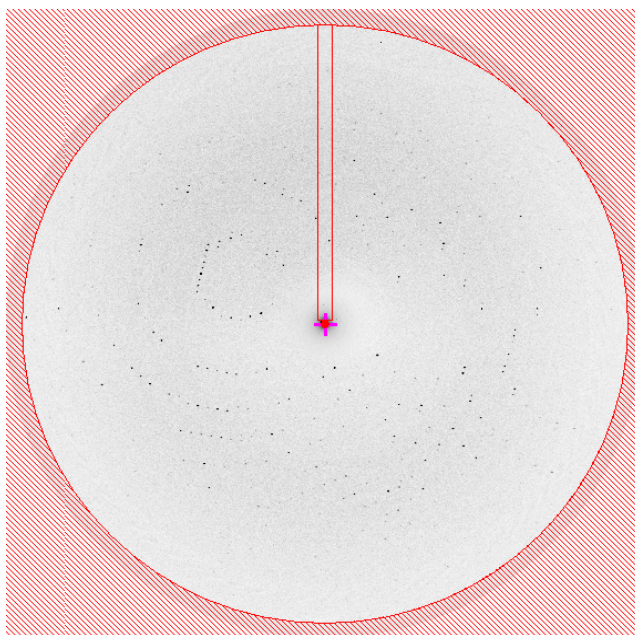


Рис.2.26 – Двумерная дифрактограмма кристаллизованного образца протеиназы К (Рис.2.21). Расстояние образец-детектор 220 мм, экспозиция кадра 200 секунд.

2.7. ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ СЛАБОУПОРЯДОЧЕННЫХ СИСТЕМ

В целях получения и анализа структуры слабоупорядоченных систем формировались планарные белковые системы из кристаллизационных растворов с добавлением осадителя с применением ленгмюровской технологии. Ленгмюровские монослои получали как на поверхности водной субфазы, так и при переносе на твердые подложки.

Для переноса белковых пленок на твердые подложки (монокристалл Si, предметные стекла с различными покрытиями) применялся метод Ленгмюра-Шеффера. Структура полученных монослоев контролировалась с помощью записи изменения поверхностного давления пленки (монослоя) в зависимости от площади, приходящейся на одну молекулу (изотерма сжатия, π/A -изотерма). Полученные монослои переносили на кремниевые и стеклянные подложки, после чего сформированные пленки исследовали методами атомно-силовой микроскопии (АСМ), рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения (СРВ в ПВО). Исследования монослоев лизоцима проводились методом СРВ в ПВО как на поверхности жидкости, в процессе их формирования, так и после переноса на твердую подложку.

2.7.1. Ленгмюровская технология получения органических пленок

ЛБ-технология. Метод ЛШ. π/A -изотерма

Технология Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ) является одним из наиболее перспективных методов получения тонких органических планарных наносистем, поскольку позволяет создавать многослойные структуры с контролируемой толщиной отдельных монослоев различных по составу, и имеющих большую площадь однородности в латеральной плоскости. Еще одним достоинством ЛБ технологии является то, что органические монослои можно наносить на разнообразные твердые подложки.



Рис.2.27 – Специальная кристаллизационная измерительная ячейка.

Ленгмюровская ванна (Рис.2.27) в общем случае представляет собой емкость (1), которую заполняют жидкой субфазой (2). На поверхности субфазы с помощью подвижного барьера (3), позволяющего менять площадь поверхности, занятой молекулами (4), формируется монослой. Контроль за состоянием монослоя осуществляется путем измерения поверхностного давления при помощи специальных весов Вильгельми (5). Рассмотрим более подробно процесс формирования монослоя и его переноса на твердые подложки.

Монослой органических молекул на поверхности жидкости. Поверхность жидкости всегда обладает дополнительной свободной энергией, которая возникает из-за разницы окружения молекул в объеме и на поверхности. В

частности, на поверхности *не скомпенсированы водородные связи.*

Поверхностное натяжение

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial S} \right)_{T,P,n_i} \quad (2.7)$$

где G – свободная энергия Гиббса системы, S – площадь поверхности, T – температура, P – давление, n_i – количество молекул типа i . (Под поверхностным натяжением понимают силу, отнесенную к единице длины контура, ограничивающего поверхность раздела фаз (размерность Н/м); эта сила действует тангенциально к поверхности и препятствует ее самопроизвольному увеличению.)

Молекулы, формирующие монослой, относятся к типу полярно-неполярных или амфифильных веществ. Классическим примером таких молекул являются жирные кислоты, которые имеют полярную (гидрофильную) часть или головку $-\text{COH}_2$ группу и неполярную (гидрофобную) часть или хвост – углеводородную цепочку. При этом полярные головки сильно взаимодействуют с водой и могут структурироваться водородными связями, ионной атмосферой и т.д., а неполярные хвосты взаимодействуют только друг с другом.

При нанесении раствора таких молекул в несмешиваемом с водой летучем растворителе (например, в хлороформе) на водную субфазу раствор быстро распространяется по ее поверхности, занимая все свободное пространство. При этом гидрофильные группы встраиваются в локальную структуру субфазы, а гидрофобные хвосты остаются над поверхностью. Пока расстояние между молекулами велико они слабо взаимодействуют друг с другом, и их можно представить как двухмерный газ, при этом наличие монослоя почти не оказывает влияния на поверхностное натяжение субфазы. При движении барьера площадь, занимаемая молекулами, уменьшается, и расстояние между молекулами также уменьшается. Это двумерный аналог давления, который называют поверхностным давлением, обозначается Π (π), и определяется как $\pi = \gamma - \gamma_0$, где γ – поверхностное натяжение в отсутствие

монослоя, а γ_0 – значение натяжения в том случае, когда на поверхности субфазы есть монослой.

Одной из основных характеристик формируемого монослоя, дающей первое представление об его структуре и физических свойствах, является построенная зависимость поверхностного давления от площади поверхности субфазы, приходящейся на одну молекулу. Такую зависимость, полученную при постоянной температуре, называют *изотермой сжатия*.

Как правило, изотерму сжатия можно поделить на несколько областей, которые соответствуют разным состояниям монослоя на поверхности жидкости в процессе его формирования (по аналогии с фазовыми состояниями вещества). При больших площадях на молекулу (область G на Рис.2.28) кривая, описывающая изотерму сжатия, имеет практически горизонтальный вид, при этом значение поверхностного давления составляет менее 1 мН/м. Это состояние монослоя называют газообразным, при этом поведение молекул монослоя описывается уравнением идеального газа.

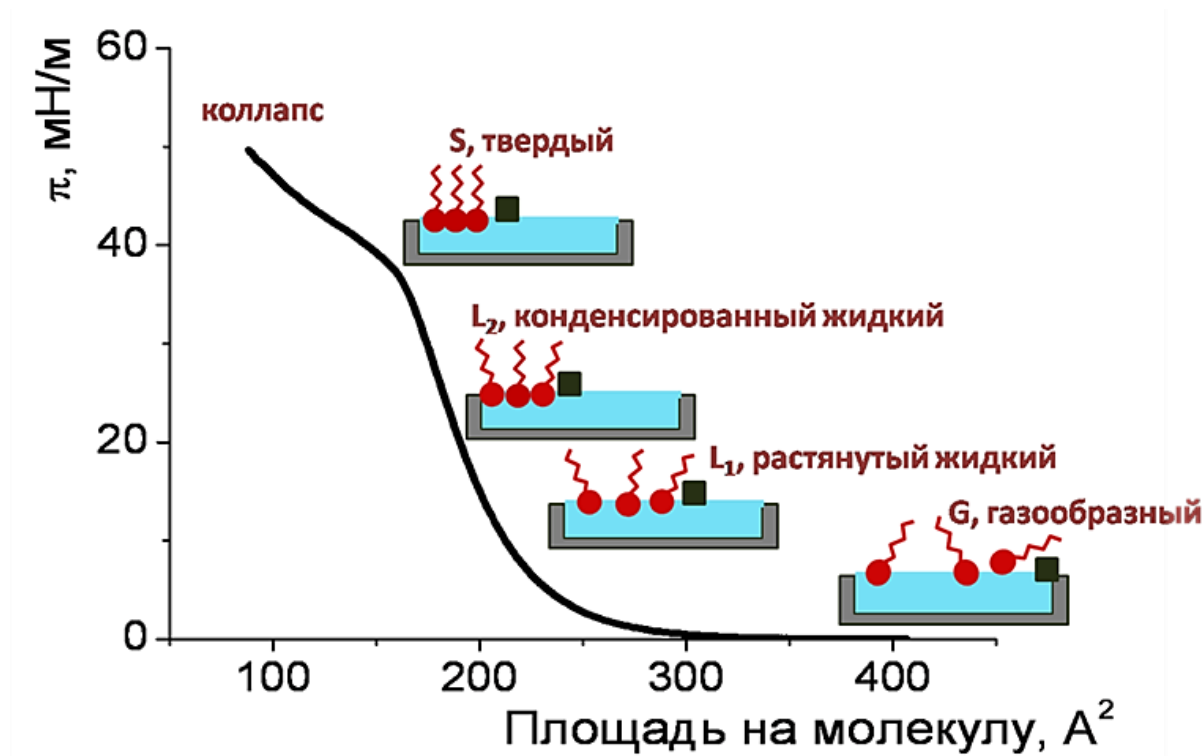


Рис.2.28 – Изотерма сжатия монослоя и фазовые состояния.

При дальнейшем сжатии монослоя расстояние между молекулами уменьшается, что приводит к возникновению их коллективного взаимодействия, а монослой переходит в состояние, аналогичное трехмерной жидкости (L).

Различают, по крайней мере, два жидких состояния монослоя. Согласно классификации в [427], первое жидкое состояние монослоя (L1), характеризующееся более высокой сжимаемостью, по сравнению с обычной жидкостью, называют растянутой жидкостью. При дальнейшем поджатии монослой переходит во второе состояние (L2), называемое жидко-конденсированным, при этом зависимость имеет, как правило, линейный характер, а сжимаемость практически равна константе.

Дальнейшее поджатие переводит монослой в твердое состояние (S), подобное двумерному кристаллу. Сжимаемость в этой области так же постоянна и близка к сжимаемости твердого тела, что указывает на плотную упаковку хвостов, которые теряют гибкость. Если экстраполировать в этой области изотерму до нулевого давления, то полученное значение будет соответствовать площади на молекулу в состоянии несжимаемого плотноупакованного слоя.

Наконец, если продолжить сжимать монослой, то он переходит в состояние коллапса, при котором упорядочивание разрушается, молекулы наползают друг на друга, образуя уже трехмерную структуру.

Вид изотермы сжатия может существенно меняться в зависимости от молекул монослоя. Для некоторых веществ не так легко выделить различные состояния и области переходов между ними. Существенное влияние на вид изотермы сжатия оказывает состав и степень чистоты субфазы. Из анализа изотермы сжатия можно сделать предварительные выводы об упаковке молекул в монослой, определить оптимальное давление для его последующего переноса на твердую подложку и др.

Перенос монослоев на твердые подложки. Сформированные монослои могут быть перенесены на твердые подложки для получения моно- или мультислойной (многослойной) организованной структуры, ее дальнейшего исследования и применения в качестве функционального элемента устройства.

Первый способ переноса монослоя на твердую подложку – метод Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ) [251]. В методе Ленгмюра-Блоджетт подложку ориентируют вертикально, последовательно погружают и вынимают через монослой (Рис.2.29а), при этом слои последовательно переносятся на подложку.

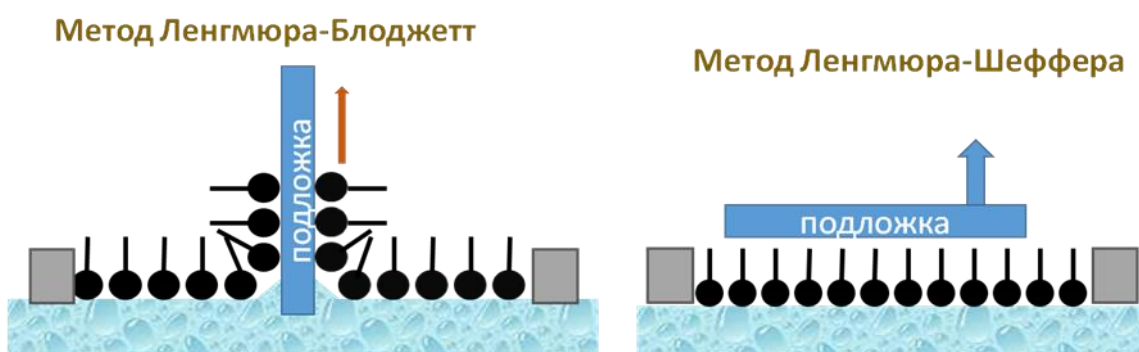


Рис.2.29 – Схема переноса монослоя на твердую подложку: а) Метод Ленгмюра-Блоджетт; б) Метод Ленгмюра-Шеффера.

Ориентация молекул относительно подложки зависит от начального положения (в субфазе или в воздухе) относительно монослоя и последовательности направлений движения подложки. Давление при переносе монослоев на подложку поддерживается постоянным благодаря системе обратной связи весов Вильгельми и подвижного барьера.

Позже И. Ленгмюр и его коллега В.Ж. Шеффер, исследовавшие монослои белковых молекул, предложили еще один метод переноса монослоя с поверхности жидкой субфазы на твердую подложку, названный методом Ленгмюра-Шеффера (ЛШ) [257]. Метод ЛШ заключается в том, что подложкой, расположенной горизонтально относительно поверхности субфазы, касаются сформированного монослоя. Затем подложку поднимают,

при этом на подложке остается монослой, возможно с каплями субфазы (Рис.2.29б).

Создание белково-липидных монослоев как моделей клеточных мембран

Биофизические процессы, происходящие в клеточных мембранах, являются ключевыми для функционирования всего организма. Понимание таких процессов дает возможность управлять ими, в том числе проводить направленный поиск лекарств. Поскольку клеточные мембраны можно представить как липидный бислой со встроенными или присоединенными к нему разнообразными типами белков, для многих клеточных процессов крайне интересным представляется возможность создания планарных моделей мембран на поверхности жидкости и их последующее исследование в условиях приближенных к естественным (нативным) с привлечением различных методов, что позволит изучать процессы, протекающие в клетках, по стадиям или по мере вовлечения различных компонентов мембран.

Так, представляют интерес исследования процесса самоорганизации липидного монослоя с белком *цитохромом С* (ЦитС). Цитохром *с* – железосодержащий водорастворимый белок, выполняющий в клетке несколько функций. С одной стороны, он участвует в процессах внутриклеточного дыхания, поскольку способен к обратимому одноэлектронному взаимодействию, с другой стороны, будучи связанным с фосфолипидом митохондриальной мембраны – *кардиолипином* (КЛ), играет ключевую роль в запуске процесса запрограммированной гибели клетки – апоптоза, при этом условия образования и сама структура комплекса ЦитС-КЛ являются недостаточно изученными. Информацию о процессах образования и структуры данного комплекса можно использовать для управления апоптозом, а также создания различных датчиков для медицинских приложений.

В [271] поверхность митохондриальной мембраны была смоделирована в виде ленгмюровского монослоя липидов на поверхности водной субфазы. В качестве липидов были выбраны бычий кардиолипин (БКЛ), тетраолеил

кардиолипид (ТОКЛ) (данные липиды отличаются составом жирных кислот: БКЛ содержит остатки полиненасыщенных жирных кислот в разном соотношении, ТОКЛ содержит четыре остатка олеиновой кислоты, вследствие чего является устойчивым к пероксидации). Были изучены особенности формирования лентгмюровских монослоев выбранных липидов.

Подобраны условия формирования монослоя ЦитС, изучены особенности формирования и упругие свойства монослоя данного белка [271].

В работе проводилась подготовка растворов и образцов белка ЦитС и фосфолипида митохондриальной мембраны КЛ, детальное описание которых приведено в [271].

Экспериментально показано (Рис.2.30), что повышение поверхностного давления при взаимодействии ЦитС (различной концентрации) с монослоем КЛ (с разным количеством липида) хорошо описывается уравнением $\pi = \pi_0 + \Delta\pi_\infty[1 - \exp(-\beta t)]$, где π_0 – выбранное начальное поверхностное давление липидного монослоя, определяющее плотность упаковки липидов в монослой; $\Delta\pi_\infty$ – конечное приращение поверхностного давления, отражающее степень сжатия липидного монослоя после встраивания белка; β – константа связывания ЦитС с липидным монослоем псевдопервого порядка, отвечающая за скорость взаимодействия белка с монослоем; t – время после начала взаимодействия белка с липидным монослоем.

В случае взаимодействия с БКЛ, содержащим полиненасыщенные жирные кислоты, и ТОКЛ, устойчивым к пероксидации, параметры адсорбции были примерно одинаковыми. Это показывает, что пероксидация БКЛ, вызванная воздействием воздуха, не влияет на процесс встраивания ЦитС в липидный монослой.

Максимальное увеличение поверхностного давления во всех экспериментах было одинаковым и составляло $18.6 \pm 1.0 \text{ мНм}^{-1}$ для БКЛ и $18.1 \pm 1.8 \text{ мНм}^{-1}$ для ТОКЛ. То есть при заданном начальном давлении количество встроенного ЦитС в монослой не зависит от вводимого количества белка и одинаково как для природного, так и для синтетического КЛ.

Вероятно, именно количество мест связывания (т.е. количество липидов) в липидном монослое является единственным ограничивающим фактором для связывания белка, а не концентрация белка, так как ЦитС был в избытке во всех экспериментах. В противоположность этому, скорость встраивания (β) была пропорциональна концентрации белка в субфазе, по крайней мере, до концентрации 100 нМ.

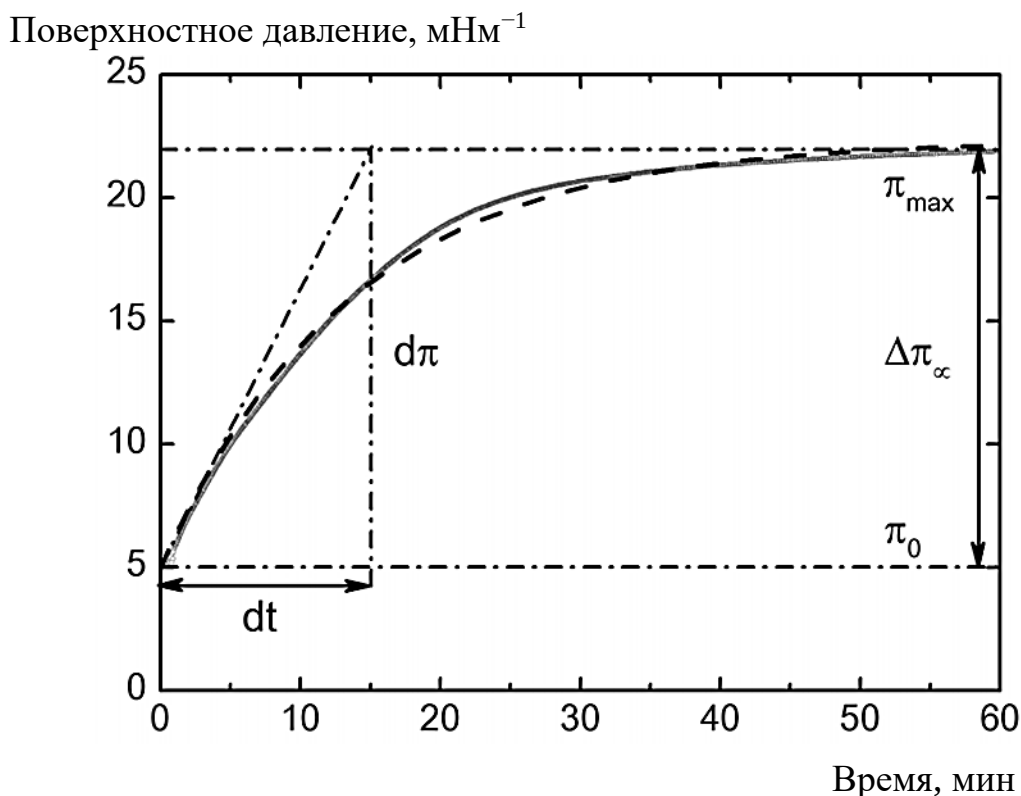


Рис.2.30 – Кинетика изменения давления при введении цитохрома *c* (250 нМ) под монослой 27.4 нмоль ТОКЛ. Серая сплошная кривая – экспериментальные данные, черная штриховая линия – аппроксимация экспериментальных данных.

При более высоких начальных давлениях монослоя КЛ максимальный прирост давления в присутствии белка ($\Delta\pi_\infty$) уменьшался с увеличением начального давления липидного монослоя (π_0), причем зависимость является линейной. На самом деле $\Delta\pi_\infty$ (Нм⁻¹) численно равна изменению плотности поверхностной энергии ΔW (Дж м⁻²) при встраивании ЦитС в липидный монослой, следовательно, $\Delta\pi_\infty$ является энергией связи белка. Эта энергия уменьшается при повышении начального давления монослоя, так как в

липидный монослой может встроиться меньшее количество белковых молекул.

Была получена серия изотерм сжатия пленок ЦитС-КЛ, полученных при различном начальном давлении липидного монослоя и концентрации белка в субфазе. В отличие от изотерм монослоя чистого КЛ на изотермах ЦитС-КЛ появляется гистерезис. Можно предположить, что потеря энергии в течение цикла сжатия-растяжения происходит из-за конформационного изменения белка в процессе его адсорбции/десорбции и/или при структурной организации белок-липидной системы на поверхности субфазы. Эти изменения являются обратимыми, так как гистерезис сохраняется при повторных циклах сжатия-растяжения даже на очень низких скоростях.

Вертикальными стрелками на Рис.2.31 показан прирост давления в результате встраивания ЦитС в монослой. В результате получилась линейная зависимость приращения поверхностного давления от начального давления монослоя, как было продемонстрировано в случае прямого измерения.

Изотермы сжатия для монослоев цитохрома, полученных без добавления и с добавлением этанола, имеют один и тот же вид. Обе системы обратимы. Молекулы на поверхности образуют монослой, по-видимому, претерпевая некоторые конформационные изменения. При взаимодействии ЦитС с этиловым спиртом конформация белка меняется. Уже “подготовленному” белку с явно выделенными гидрофильной и гидрофобной частями легче образовать монослой. Количество белка, необходимое для получения одинаковой изотермы сжатия в описанных двух случаях, различается почти в 30 раз. Для образования монослоя из цитохрома при добавлении этанола необходимо 5.7 нмоль, без добавления – 165 нмоль.

Сравнение π -А-изотерм для монослоев, образованных ЦитС [428], ЦитС + нейтральными или анионными фосфолипидами [429] и ЦитС + КЛ, показало сходство кривых в области низкого поверхностного давления, обусловленное присутствием белка.

Сходство между изотермами предполагает сходство в механизмах адсорбции белка на поверхности воды в отсутствие липидов и в ситуации, когда поверхность покрыта амфифильными молекулами липидов. Адсорбция является результатом взаимодействия полярных групп на поверхности белка с молекулами воды на границе раздела фаз в случае, когда гидрофобные участки поверхности белка не должны контактировать с водой. В водных растворах ЦитС, со всех сторон равномерно покрытый полярными и гидрофобными аминокислотными остатками, изменит свою конформацию при адсорбции на поверхности воды так, чтобы максимально заряженные и полярные группы остались в объеме субфазы (в контакте с водой).

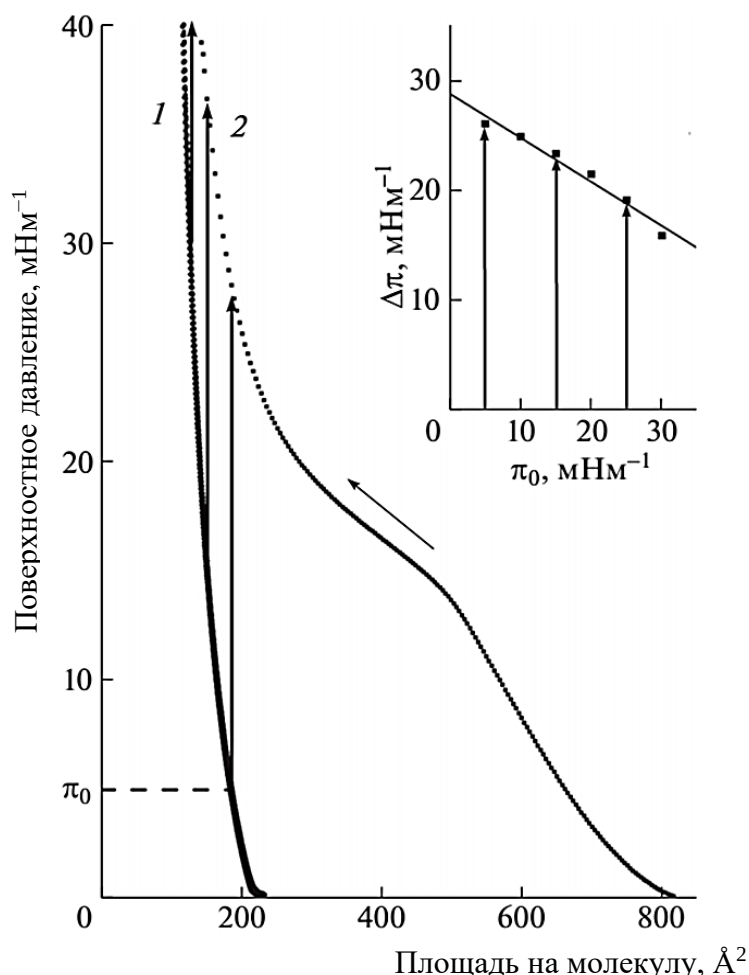


Рис.2.31 – Изотерма 13.5 нмоль ТОКЛ до (1) и после (2) введения 50 нМ цитохрома с под монослой, сформированный до $\pi_0 = 5 \text{ мНм}^{-1}$. Вставка – зависимость $\Delta\pi$ от π_0 .

Таким образом, одна половина глобулы белка становится преимущественно гидрофобной, а другая – гидрофильной, т.е. формируется так называемый “стратифицированный” ЦитС. Это будет происходить независимо от того, будут ли более гидрофобные части поверхности белка контактировать с воздухом, с молекулами фосфолипидов или друг с другом (Рис.2.32).

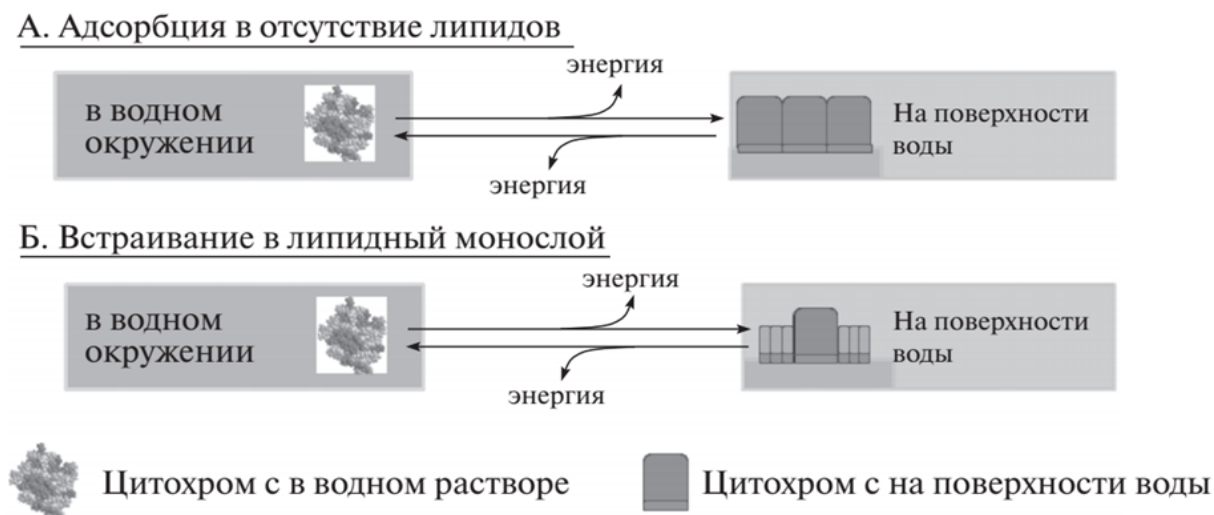


Рис.2.32 – Гипотетическая схема молекулы цитохрома с с конформационным переходом во время его адсорбции и десорбции на и от поверхности воды.

Одним из доказательств конформационного перехода в процессе адсорбции или десорбции ЦитС на поверхности воды является наличие петель гистерезиса, полученных для монослоев как для чистого ЦитС [428], так и для белково-фосфолипидных монослоев, в то время как сами фосфолипидные монослои не проявляют таких свойств.

Можно предположить, что в митохондриальной мембране гидрофобная часть стратифицированного ЦитС взаимодействует с углеводородными цепями липидов противоположного монослоя. Гидрофильные группы либо обращены к окружающей воде, либо связаны с заряженными группами ближайших фосфолипидов. Именно такое изменение конформации ЦитС может объяснять его особенности взаимодействия с бислойной мембраной.

Таким образом, получена планарная модель клеточной мембраны, позволяющая изучать взаимодействие ЦитС с кардиолипином, а также применять для исследования особенностей их взаимодействия широкий спектр поверхностночувствительных структурных методов.

Получение монослоев лизоцима с осадителем

Монослой лизоцима с осадителем NaCl формировали с помощью ленгмюровской ванны KSV 5000 LB (KSV Instruments) с рабочей площадью поверхности 750 см² (ИК РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) (Рис.2.33). Поверхностное давление (π) измеряли с помощью весов Вильгельми с платиновой пластиной (± 0.1 мН/м). Эксперименты проводили при температуре 18.5 ± 0.5 °С. Перед экспериментом поверхность ванны очищали этанолом и промывали чистой водой.

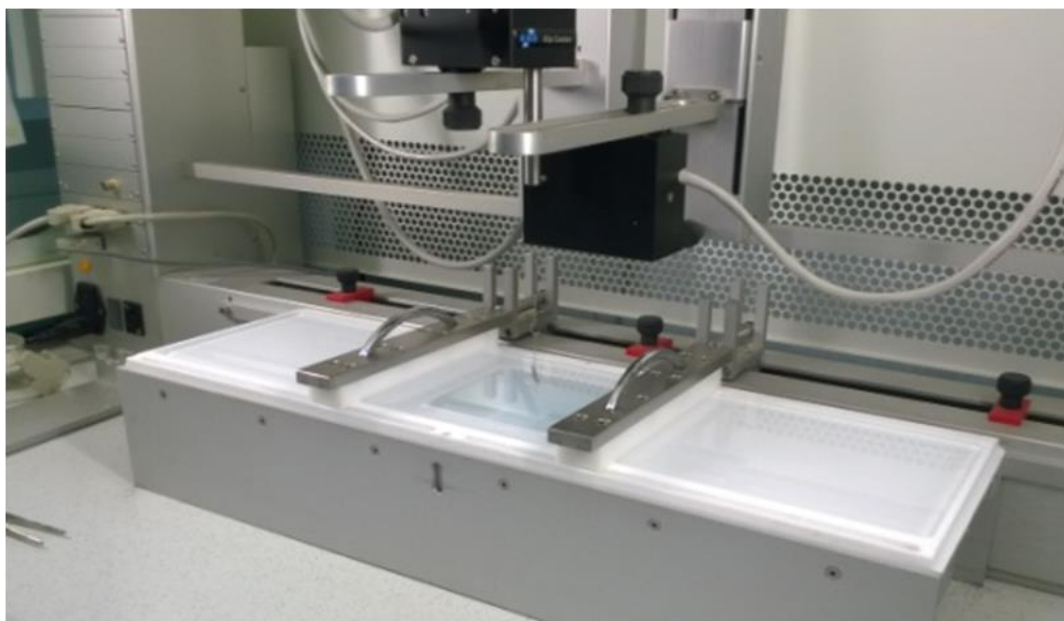


Рис.2.33 – Установка для получения тонких органических пленок на твердых подложках – ленгмюровская ванна KSV 5000 LB (KSV Instruments).

В качестве субфазы использовали чистую воду. Раствор наносили на предварительно очищенную поверхность субфазы с помощью автоматической пипетки Eppendorf. Для формирования монослоя лизоцима с осадителем на поверхность субфазы наносили 1000 мкл раствора лизоцима с хлоридом

натрия. Для приготовления такого раствора за 1 ч до эксперимента маточный белковый раствор смешали с раствором хлорида натрия в равных объемах. Таким образом, концентрации лизоцима и хлорида натрия в буферном растворе составили 40 и 25 мг/мл соответственно. Такие концентрации белка и осадителя соответствуют условиям, при которых происходит кристаллизация лизоцима тетрагональной сингонии.

Монослой лизоцима формировали сразу после нанесения раствора за счет движения симметричных барьеров со скоростью 20 мм/мин. Перенос монослоев на твердую подложку осуществляли при фиксированном значении поверхностного давления (14 мН/м) методом ЛШ, однократно касаясь поверхности подложки поверхностью субфазы с монослоем. После переноса монослоя подложку помещали в чашку Петри, которую закрывали парафиновой пленкой, или в специальную кристаллизационную ячейку (Раздел 2.5 «Специализированная ячейка для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов») – в специальное углубление наливали около 1 мл раствора осадителя концентрации 50 мг/мл.

Использование указанной ячейки необходимо для стабилизации внешних условий в процессе высыхания пленки. Путем дополнительного нанесения в ячейке капель смеси буфера с осадителем создается атмосфера насыщенных паров, обеспечивающая постоянную влажность и отсутствие конвекционных потоков. Выдерживание в таких условиях приводит к медленному высыханию капли субфазы, захваченной с монослоем, в парах осадителя.

Монослой лизоцима с осадителем KI был сформирован в ленгмюровской ванне KSV 5000 LB (KSV Instruments) с двумя подвижными барьерами. Рабочая площадь ванны 750 см². Поверхностное давление измерялось методом Вильгельми, точность измерения составляла ± 0.1 мН/м. Перед нанесением монослоя поверхности ванны и барьера очищались этанолом и промывались дистиллированной водой. Формирование монослоя происходило при температуре $T = 20^\circ\text{C}$. Раствор с концентрациями лизоцима и KI 40 и 25 мг/мл

соответственно объемом 1000 мкл был нанесен на поверхность воды с помощью автоматической пипетки Eppendorf по истечении 30 мин после смешивания. Сразу после нанесения монослой поджимался подвижными барьерами со скоростью 20 мм/мин до достижения значения поверхностного давления $\pi = 14$ мН/м.

После того как поверхностное давление достигало заданного значения, сформированный монослой лизоцима переносили методом ЛШ на кремниевую подложку. Подложки Si использовались такие же, как при получении пленок с осадителем NaCl (см. предыдущий раздел).

Аналогичным образом, после переноса монослоя подложку помещали в специальную кристаллизационную ячейку (Раздел 2.5 «Специализированная ячейка для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов») – в специальное углубление наливали около 1 мл раствора KI концентрации 50 мг/мл. Выдерживание в таких условиях приводило к медленному высыханию капли субфазы, захваченной с монослоем, в парах осадителя.

Монослой лизоцима с осадителем KCl формировали с помощью ленгмюровской ванны NIMA 601A (Nima Technology) (станция СИ «Ленгмюр», канал 1.2, ККСНИ, НИЦ «Курчатовский институт», Раздел 2.7.2).

Ленгмюровская ванна NIMA 601A изготовлена из политетрафторэтилена с одним подвижным барьером. Поверхностное давление измерялось методом Вильгельми с весами из фильтровальной бумаги Whatman, расположенными на одном конце ванны. Рабочая площадь составляла 700 см². Точность измерения поверхностного давления составляла ± 0.1 мН/м.

Перед нанесением монослоя поверхность ванны и барьер отмывали хлороформом и этанолом, и затем промывали водой. Формирование монослоя происходило при температуре $T = 20^\circ\text{C}$. Приготовленные растворы наносили на поверхность субфазы с помощью автоматической пипетки.

Монослой лизоцима без осадителя готовили с использованием 500 мкл исходного раствора лизоцима в Na-Ас-буфере с pH 4.5 при концентрации 80 мг/мл. Монослой поджимался подвижным барьером со скоростью 30 см²/мин до достижения значения поверхностного давления $\pi = 14$ мН/м.

Для получения монослоя лизоцима с осадителем KCl использовали 1200 мкл смешанного раствора лизоцим-KCl с концентрациями белка и соли 40 и 25 мг/мл, соответственно. Нанесение раствора на поверхность жидкой субфазы происходило через 30 мин после начала перемешивания. Сразу после нанесения монослой поджимался подвижным барьером со скоростью 30 см²/мин до достижения значения поверхностного давления $\pi = 14$ мН/м.

По достижении в монослоях поверхностного давления 14 мН/м начинались измерения методом СРВ в ПВО. Поверхностное давление поддерживалось неизменным в ходе измерений.

2.7.2. Методики исследования структуры планарных белковых систем на основе методов СРВ в ПВО, рентгеновская рефлектометрия, АСМ

Рентгеновские исследования пленок лизоцима как на твердых подложках, так и на поверхности жидкости, проводили методами СРВ в области ПВО и рентгеновской рефлектометрии (РР) [315, 329]. Метод СРВ в области ПВО основан на одновременной регистрации интенсивности зеркальной компоненты рентгеновского отражения (рефлектометрия, РР) и угловой зависимости выхода рентгеновской флуоресценции.

РР широко используется в исследованиях качества поверхности и определения параметров планарных периодических и аperiodических наносистем (шероховатостей, толщин, плотностей), в том числе органических пленок [430, 431], многослойных систем на их основе и монослоев на поверхности жидкости [432]. Форма угловой зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения дает информацию о распределении

общей электронной плотности по нормали к поверхности, которая определяет распределение CPB [433, 318].

Метод CPB в ПВО, являющийся частным случаем метода CPB, сочетает в себе возможности рентгеновского рассеяния и спектроскопии [315, 434, 435]. Метод CPB в ПВО успешно применяется для исследования различного рода тонкопленочных планарных систем [322, 337]. Применение данного метода позволяет получать профили распределения атомов определенного сорта по нормали к поверхности образца.

Для анализа экспериментальных данных CPB в ПВО и РР применялся следующий подход. Исследуемые образцы представляли в виде слоистых систем, характеризующихся определенным профилем распределения электронной плотности по глубине. Каждый слой такой системы задавали следующим набором параметров: толщина; электронная плотность, определяемая поляризуемостью слоя; неидеальность верхней межслоевой границы, обусловленная размытием межслойных границ; концентрация атомов. Методом рекуррентных соотношений Парратта [436] проводили теоретический расчет рефлектометрии для данной слоистой модели.

На основе заданного профиля распределения электронной плотности рассчитывали распределение CPB и в рамках дипольного приближения получали теоретические угловые зависимости выхода флуоресценции. Путем минимизации методом Левенберга-Марквардта [433] расхождения между экспериментальной и теоретической кривыми были получены профили распределений электронной плотности и элементов (входящих в состав исследуемого образца), соответствующие в большей степени экспериментальным данным.

Дифрактометр SmartLab Rigaku

Эксперименты методами РР и CPB в ПВО проводились на дифрактометре SmartLab (Rigaku) [437], оснащенном источником излучения с вращающимся молибденовым анодом мощностью 9 кВт [438, 439].

В экспериментах использовалась спектральная линия $\text{MoK}\alpha_1$ ($\lambda = 0.70932 \text{ \AA}$), интенсивность пучка регистрировалась сцинтилляционным детектором. В плоскости рассеяния приемные щели обеспечивали угловое разрешение 0.012° , в поперечном направлении падающий пучок засвечивал весь образец.

Измерения РР проводились с использованием специальной ячейки (Раздел 2.5 «Специализированная ячейка для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов»), которая представляла собой герметичную камеру, позволяющую формировать и поддерживать химически изолированную атмосферу для исследуемого объекта [422].

Измерения СРВ в ПВО проводились с использованием специальной ячейки (Раздел 2.5 «Специализированная ячейка для исследований белковых структур методом СРВ в ПВО»).

В экспериментах методом СРВ в ПВО использовался SDD-детектор Amptek X123. Регистрировались угловые зависимости выхода характеристической рентгеновской флуоресценции ($\text{SK}\alpha$, $\text{ClK}\alpha$, $\text{KK}\alpha$, $\text{IK}\alpha$ и т.д.) и зеркальной компоненты рентгеновского отражения. Измерения проводили в диапазоне углов падения пучка на образец от 0° до 0.2° . Время набора сигнала в точке составляло 1000 с.

Синхротронная станция РКФМ

Исследования методом СРВ в области ПВО проводили на синхротронной станции РКФМ НИЦ «Курчатовский институт» [440, 441].

Станция «Рентгеновская кристаллография и физическое материаловедение» (РКФМ) расположена на выходе поворотного магнита (канал 4.6) большого накопительного кольца КИСИ-Курчатов в НИЦ «Курчатовский институт». РКФМ является экспериментальной установкой, предназначенной для проведения исследований структуры материалов различными методами: дифрактометрии, рефлектометрии, СРВ в ПВО и др.

За последние годы на РКФМ проведена масштабная модернизация оборудования, позволившая значительно расширить экспериментальные возможности станции, параметры которой приведены в Табл. 2.6.

Табл. 2.6 – Основные параметры станции РКФМ КИСИ.

Излучатель	Поворотный магнит
Монохроматор	Двухкристальный, две пары кристаллов. Возможна установка пары Si (111) или Si (311).
Диапазон энергий	5-40 кэВ
Минимальный шаг изменения энергии	≈ 0.25 эВ
Энергетическое разрешение $\Delta E/E$	$10^{-4} \div 10^{-3}$
Угловая расходимость	вертикальная $\sim 10^{-4}$ рад, горизонтальная $\sim 10^{-3}$ рад
Гониометр	пятикружный, оснащен датчиками точного положения, минимальный шаг 0.7 угл. сек. Три линейные оси перемещения столика образца. Двухкружный узел кристалла-анализатора
Интенсивность	$10^8 \div 10^9$ в 1 мм^2 поперечного сечения пучка
Система автоматизированного управления экспериментом	SPEC

На текущий момент РКФМ включает в себя несколько функциональных модулей (Рис.2.34): блок входных щелей 1, блок монохроматизации 2, блок гониометра 5.

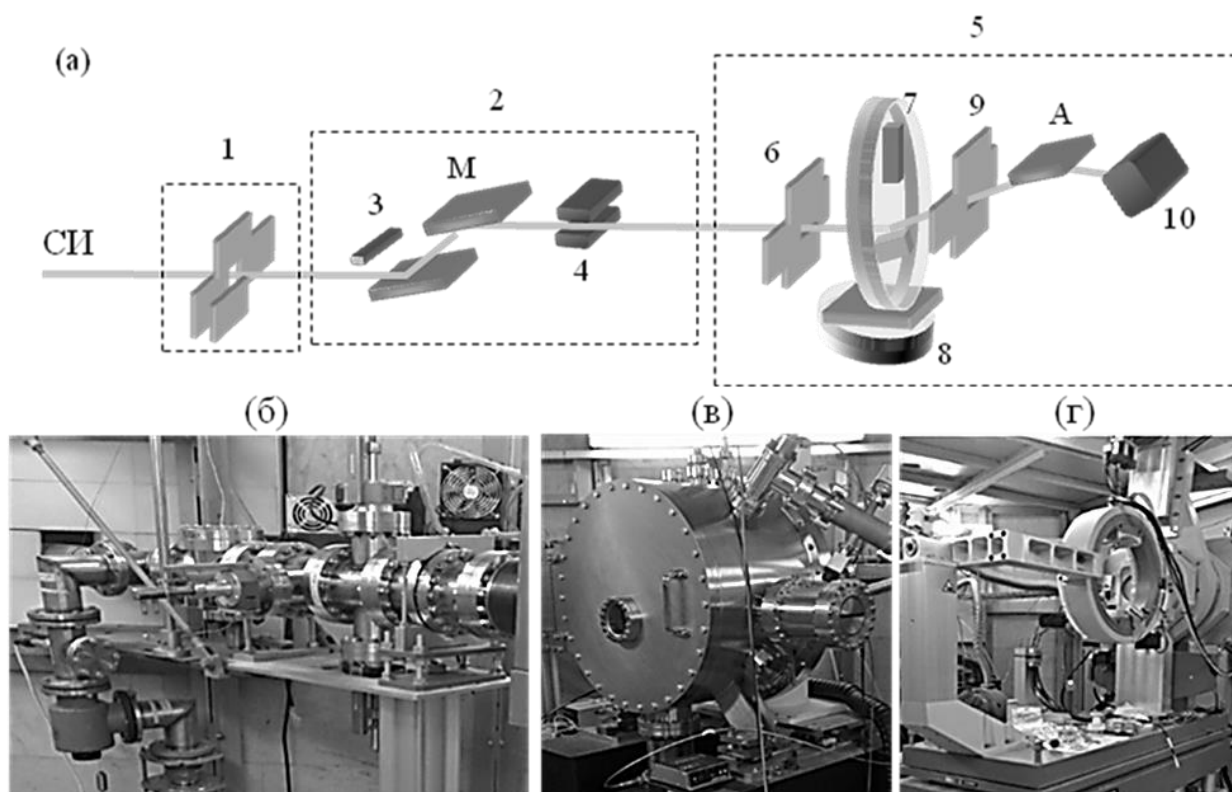


Рис.2.34 – Оптическая схема станции РКФМ КИСИ (а) и изображения (б – г) ее основных узлов: б – блок входных щелей; в – блок монохроматизации; г – блок гониометра. СИ – источник синхротронного излучения; 1 – блок двумерных входных щелей; 2 – блок монохроматизации; 3 – датчик пучка; 4 – ионизационная камера; 5 – блок гониометра; 6 – двумерная щель перед образцом; 7 – энергодисперсионный детектор; 8 – гониометр; 9 – двумерная приемная щель; 10 – сцинтилляционный детектор; М – двукратный монохроматор Si (111) или Si (311); А – кристалл-анализатор.

Блок входных щелей 1 состоит из датчика положения пучка во входном канале и вакуумных щелей с водяным охлаждением. Блок монохроматизации 2 объединяет в себе оборудование двухкристального монохроматора М с системой обратной связи производства FMB Oxford. Используя пары кристаллов Si (111) или Si (311) реализована возможность изменять с шагом 0.25 эВ энергию пучка в диапазоне от 5 до 40 кэВ, сохраняя неизменным его пространственное положение. Система обратной связи на основе измерения интенсивности на входе и выходе блока монохроматизации позволяет корректировать отстройку угла наклона второго кристалла монохроматора относительно первого.

Блок гониометра 5 включает в себя коллимирующие щели 6, ослабители пучка, многокружный гониометр 8, систему детектирования. На РКФМ установлен многокружный гониометр производства фирмы Huber с возможностью установки кристалла-анализатора А, что позволяет проводить прецизионные исследования рентгеновскими методами в широком угловом диапазоне. В систему детектирования входит NaI детектор, энергодисперсионный детектор Amptek X-123, лавинный фотодиод FMB Oxford APD0005.

В экспериментах по исследованию пленок белка использовалось монохроматическое излучение с энергией 12 кэВ, для монохроматизации применяли двукратный монохроматор Si (111). Пятно засветки пучка на поверхности образца устанавливали с помощью щелей, его размер составлял 5×0.1 мм.

Флуоресцентный сигнал из пятна засветки регистрировал SDD-детектор Amptek X123. Одновременно регистрировали угловые зависимости выхода характеристической рентгеновской флуоресценции ($SK\alpha$, $ClK\alpha$) и зеркальной компоненты рентгеновского отражения. Измерения проводили в диапазоне углов падения пучка на образец от 0° до 0.3° . Время набора сигнала в точке составляло 600 с.

Синхротронная станция «Ленгмюр»

Для характеристики сформированного монослоя лизоцима, получения распределения электронной плотности по толщине и распределения ионов по нормали к поверхности, проводились исследования методом СРВ в ПВО [315, 337, 434, 435, 442, 443].

Метод сочетает в себе возможности рентгеновского рассеяния и спектроскопии. Преимущество метода СРВ в ПВО состоит в том, что он позволяет получить распределение атомов определенного сорта в структурных исследованиях тонких пленок и монослоев.

Эксперименты по исследованию структуры монослоев лизоцима на поверхности жидкой субфазы с применением метода СРВ в ПВО проводились в НИЦ «Курчатовский институт» на синхротронной станции «Ленгмюр», канал 1.2 (Рис.2.35, Рис.2.36).

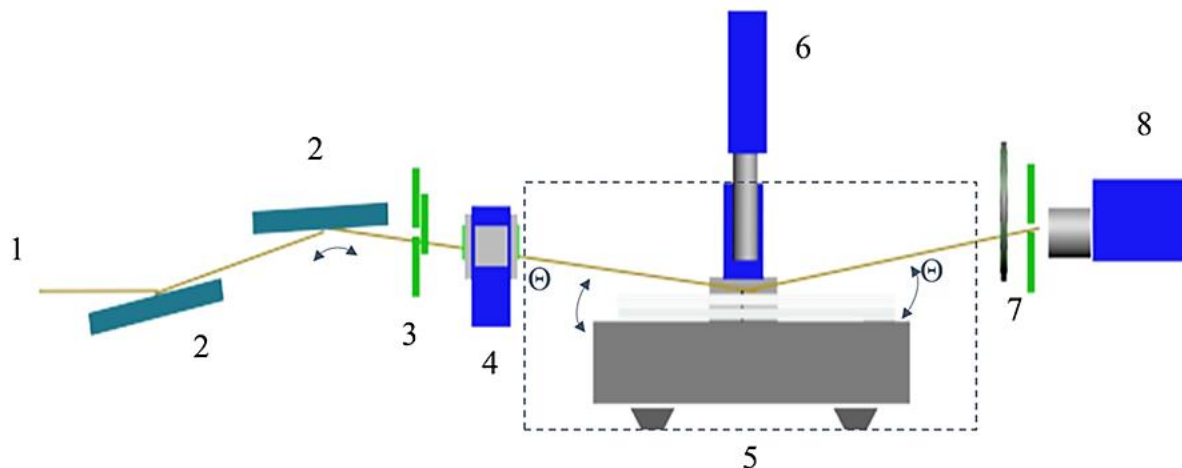


Рис.2.35 – Рентгенооптическая схема станции «Ленгмюр», канал 1.2 (ККСНИ, НИЦ «Курчатовский институт»). 1 - пучок после монохроматора; 2 - зеркало; 3 - щели; 4 - ионизационная камера; 5 - ленгмюровская ванна в гелиевой камере; 6 - SDD детектор; 7 - щель и аттенюаторы; 8 - сцинтилляционный детектор.

В измерениях использовалось монохроматическое СИ излучение с $E = 13$ кэВ для возбуждения рентгеновской флуоресценции S K α , Cl K α и K K α . Интенсивности зеркального отражения (рефлектометрия) и выхода флуоресцентного излучения регистрировались одновременно в диапазоне углов падения пучка на поверхность жидкости от 0 до 0.13 °.

Спектры рентгеновской флуоресценции регистрировались с использованием детектора VORTEX SDD, а интенсивность зеркального отражения – сцинтилляционным детектором. Общее время сбора данных в каждой точке составило 300 с.

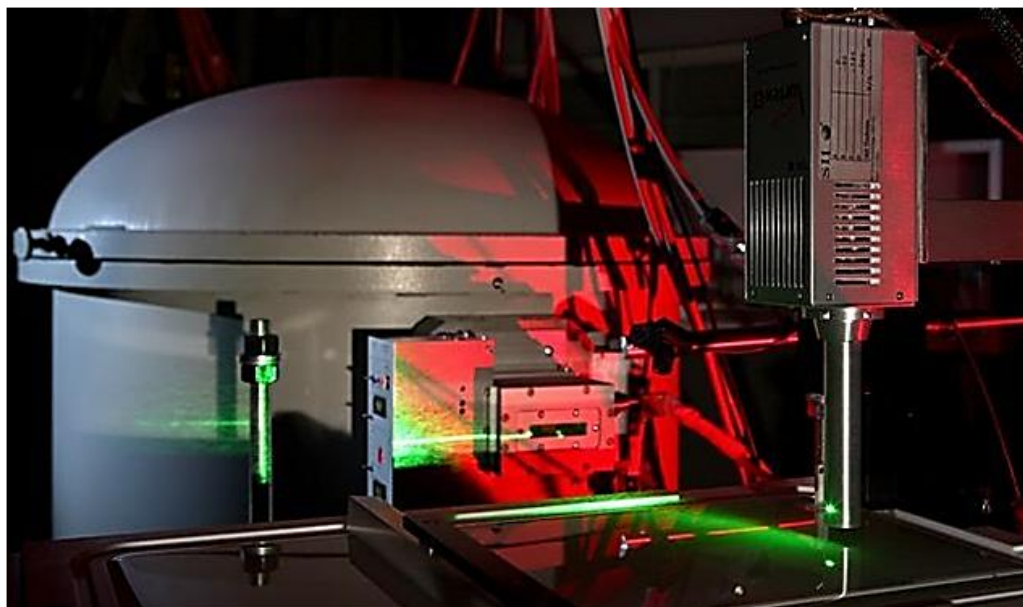


Рис.2.36 – Фотография станции «Ленгмюр», канал 1.2 (ККСНИ, НИЦ «Курчатовский институт»).

Для уменьшения фонового флуоресцентного сигнала от рассеяния на воздухе ленгмюровская ванна была установлена в камере с гелиевой атмосферой. Камера представляла собой герметичный плексигласовый контейнер с окнами из тонкой рентгенопрозрачной фольги и с каналами для подачи и напуска газов. Воздух в камере вытеснялся гелием, создавая избыточное давление гелия, подаваемого в камеру. Воздух выпускался через гидравлический затвор. Чтобы обеспечить доступ к ванне, камера была оборудована съемной крышкой. После нанесения раствора белка на поверхность водной субфазы гелиевую ячейку герметично закрывали, после чего осуществлялся напуск гелия. Степень вытеснения воздуха оценивали по уменьшению интенсивности линии $Ag\ K\alpha$ в флуоресцентном спектре, полученном при прохождении рентгеновского пучка через атмосферу в камере.

Пучок СИ был ориентирован параллельно поверхности ванны с помощью рентгенооптических элементов станции. Барьер ленгмюровской ванны использовался для поджатия монослоя до заданного значения поверхностного давления. Затем начинался рентгеновский эксперимент, а поверхностное давление поддерживалось постоянным в процессе измерений. Активная

виброзащита использовалась для устранения влияния вибраций ленгмюровской ванны. Измерения проводились при комнатной температуре.

Атомно-силовая микроскопия

Методом атомно-силовой микроскопии проводились исследования пленок лизоцима на твердых подложках, полученных модифицированным методом Ленгмюра–Шеффера, и пленок лизоцима, сформированных без осадителя (Раздел 2.7.1 настоящей главы и Раздел 5.2 Главы 5).

После проведения измерений методом рентгеновской рефлектометрии, высушенные пленки были исследованы методом АСМ в полуконтактном режиме на приборе NTEGRA Prima (NT-MDT). Использован кремниевый зонд типа NA_НС (резонансная частота 235 кГц, радиус закругления острия менее 10 нм, коэффициент жесткости 12 Н/м). Размеры области сканирования варьировались в пределах от 1×1 до 100×100 мкм. Максимальная скорость сканирования составляла 30 мкм/с.

По изображениям строились профили поверхности и гистограммы распределения высот, определялась средняя шероховатость поверхности.

2.8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 2

Представлено описание, развитых в настоящей работе методов и подходов к исследованию взаимодействия и самоорганизации белковых молекул в растворе и монослое.

Для решения поставленных в работе задач был подобран и оптимизирован комплекс взаимодополняющих методов, позволяющий проследить переход от монодисперсного раствора белка к образованию прекурсоров будущего кристалла, а затем провести исследование структуры кристалла в процессе его роста. В силу специфики работы с биологическими (природными) макромолекулами для каждого метода необходимо было подобрать соответствующую методику, учитывающую особенности техники проведения эксперимента, которые позволяли бы предотвратить денатурацию белка.

Исследования состояния и взаимодействия белковых молекул в растворе как до добавления осадителя, так и непосредственно после добавления осадителя в предкристаллизационных условиях, проводились методами малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) и нейтронов (МУРН), которые позволяют определить изменение характера взаимодействия, а также фиксировать образование олигомеров.

Исследования растворов белков методами МУРР, МУРН проводились с использованием ряда источников: лабораторного источника АМУР-К (ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва) синхротронных станций ДИКСИ и БиоМУР (КИСИ-Курчатов, НИЦ «Курчатовский институт», Москва), синхротронной станции BM29 BioSAXS (ESRF, Гренобль, Франция), нейтронной станции ЮМО (ИБР-2, ОИЯИ, Дубна).

Для экспериментов на каждом источнике излучения использовались специализированные измерительные ячейки для термостабилизации, автоматической подачи образца, оптимизации расхода белка (микрофлюидика), регистрации спектров флуоресценции, обеспечения герметичности и т.д.

Обработка данных МУР проводилась с использованием программ Polymix и Oligomer. Polymix – усовершенствованная версия программы Mixture, которая позволяет оценить средний размер частиц, присутствующих в растворе. Более детальный анализ состава кристаллизационных растворов проводился с использованием Oligomer, которая позволила определить олигомерный состав раствора белка (как порядок, так и их количество).

Для уточнения механизмов взаимодействия белковых молекул в растворе проводились моделирование возможных элементов кристалла (молекулярное моделирование) и анализ связей молекул в кристаллической структуре на основе рентгеноструктурного анализа (РСА) (с разрешением менее 2Å). Также, характер взаимодействия белковых молекул и их поведение в растворе, содержащем олигомеры, изучались методом молекулярной динамики.

Анализ структуры белковых кристаллов проводился с применением рентгенодифракционных методов: определение кристаллической структуры осуществлялось методом РСА (станции СИ «Белок» и «РСА», КИСИ-Курчатов, НИЦ «Курчатовский институт»); оценка степени совершенства белкового кристалла в процессе его зарождения и роста осуществлялась методом *in situ* высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии (SmartLab Rigaku, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН).

Формирование планарных белковых систем из кристаллизационных растворов с добавлением осадителя осуществлялось с использованием ленгмюровской технологии. Для переноса белковых пленок на твердые подложки (монокристалл Si, предметные стекла с различными покрытиями) применялся метод Ленгмюра-Шеффера. Полученные монослои изучались методами рентгеновской рефлектометрии (РР), стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения (СРВ в ПВО), атомно-силовой микроскопии (АСМ). Исследования монослоев лизоцима проводились методом СРВ в ПВО как на поверхности жидкости, в процессе их формирования, так и после переноса на твердую подложку.

Методы РР, СРВ в ПВО с использованием специализированных ячеек (в составе измерительного комплекса для исследования белковых систем в нативном состоянии) обеспечивали возможность проведения *in situ* исследований, позволили определить параметры слоистой модели тонких пленок (толщина монослоя, толщины переходных слоев и т.д.), сформированных с использованием различных растворов, а также позволили провести исследования взаимодействия молекул белка монослоя с ионами осадителя путем анализа распределения ионов (K, Cl, Cu, Ni и т.д.) и молекул белка (S) по толщине пленки (станция РКФМ, КИСИ-Курчатов, НИЦ «Курчатовский институт»; SmartLab Rigaku, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН).

Использование уникальной синхротронной станции «Ленгмюр» (КИСИ-Курчатов, НИЦ «Курчатовский институт», Москва) позволило провести исследование взаимодействия слоя белка с компонентами субфазы непосредственно в процессе формирования монослоя на поверхности жидкости, что дало дополнительную информацию о роли осадителя в процессе образования упорядоченных белковых структур.

Предложенный и апробированный в работе подход к исследованию механизмов организации белковых систем и их структуры, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов, молекулярного моделирования и молекулярной динамики, а также инструментальный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре измерительные ячейки, позволил получить принципиально новые знания о структуре и динамике образования упорядоченных белковых систем с атомарным разрешением.

Разработанный и созданный измерительный комплекс может быть использован в качестве основного элемента метрологической базы принципиально новых природоподобных технологических процессов.

ГЛАВА 3. Определение структуры растворов в условиях кристаллизации на примере белка лизоцима, выявление механизма влияния термодинамических параметров на процесс кристаллизации

3.1. АННОТАЦИЯ К ГЛАВЕ 3

В настоящей главе описаны результаты определения структуры раствора белка в условиях кристаллизации на примере лизоцима, а также представлены описание влияния термодинамических параметров на процесс кристаллизации и результаты моделирования поведения олигомеров в растворе методом молекулярной динамики.

В Разделе 3.2 сформулирована гипотеза о том, что в процессе кристаллизации формируется промежуточная фаза из специфических 3D-фрагментов структуры кристалла белка в кристаллизационном растворе.

Раздел 3.3 посвящен описанию результатов исследования взаимодействия молекул лизоцима в растворе в условиях кристаллизации методом МУРР и методологии однозначного экспериментального подтверждения предположений о составе кристаллизационного раствора лизоцима.

В Разделах 3.4, 3.5 приведено описание результатов изучения структуры и динамики состава кристаллизационных растворов лизоцима в зависимости от концентраций белка и осадителя, температуры, типа растворителя ($\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$).

Раздел 3.6 посвящен исследованию поведения олигомеров белка лизоцима в растворах методом молекулярной динамики. Определено, что в присутствии осадителя стабильны только один из исследуемых октамеров (октамер А, содержащий ось 4-ого порядка) и димер, в то время как другой октамер (октамер В), а также тетрамеры и гексамеры, являются нестабильными и диссоциируют.

В Разделе 3.7 предложен новый подход к поиску условий кристаллизации белков на основе гипотезы об образовании «единиц роста» (олигомеров,

являющихся составными элементами будущей кристаллической структуры) в кристаллизационном растворе и результатов исследований, описанных в настоящей главе.

3.2. ОБ ОБРАЗОВАНИИ «ЕДИНИЦ РОСТА» КРИСТАЛЛА В КРИСТАЛЛИЗАЦИОННОМ РАСТВОРЕ БЕЛКА. МОДЕЛИРОВАНИЕ ОЛИГОМЕРОВ

Было сделано предположение, что еще до начала образования зародышей кристалла в растворе белка при создании условий кристаллизации образуются олигомеры, являющиеся составными элементами кристалла, из которых впоследствии образуется кристалл.

Сформулированная выше гипотеза проиллюстрирована на схеме, представленной на Рис.3.1.

Эмпирическая проверка данной гипотезы была проведена на примере процесса образования кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. Были выбраны условия (концентрация белка 40 мг/мл, осадитель – NaCl с концентрацией 25 мг/мл, температура 20°C), при которых стабильно получались достаточно крупные и совершенные кристаллы тетрагональной сингонии ($P4_32_12$ $a=b=79.20$ Å, $c=37.90$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90.00^\circ$).

На первом этапе проведено молекулярное моделирование, основанное на анализе структуры тетрагональной формы лизоцима.

Проведено молекулярное моделирование, основанное на анализе структуры тетрагональной формы лизоцима. Для построения молекулярных моделей возможных элементов роста тетрагональной формы лизоцима была использована кристаллическая структура из Базы Данных Белков (PDB ID: 4WLD), определенная с разрешением 1.54 Å. Кристалл принадлежит к пространственной группе $P4_32_12$ с параметрами элементарной ячейки $a = b = 79.20$ Å, $c = 37.90$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$. Концентрация растворителя составляла 40.68%, асимметричная ячейка содержала одну молекулу лизоцима. Для выбранной пространственной структуры молекулы с помощью программы Coot [397] были применены по очереди операторы симметрии, позволившие

получить фрагмент соответствующей кристаллической решетки $P4_32_12$ ($-X, -Y, 1/2+Z$; $1/2-Y, 1/2+X, 3/4+Z$; $1/2+Y, 1/2-X, 1/4+Z$; $1/2-X, 1/2+Y, 3/4-Z$; $1/2+X, 1/2-Y, 1/4-Z$; $Y, X, -Z$, $-Y, -X, 1/2-Z$).

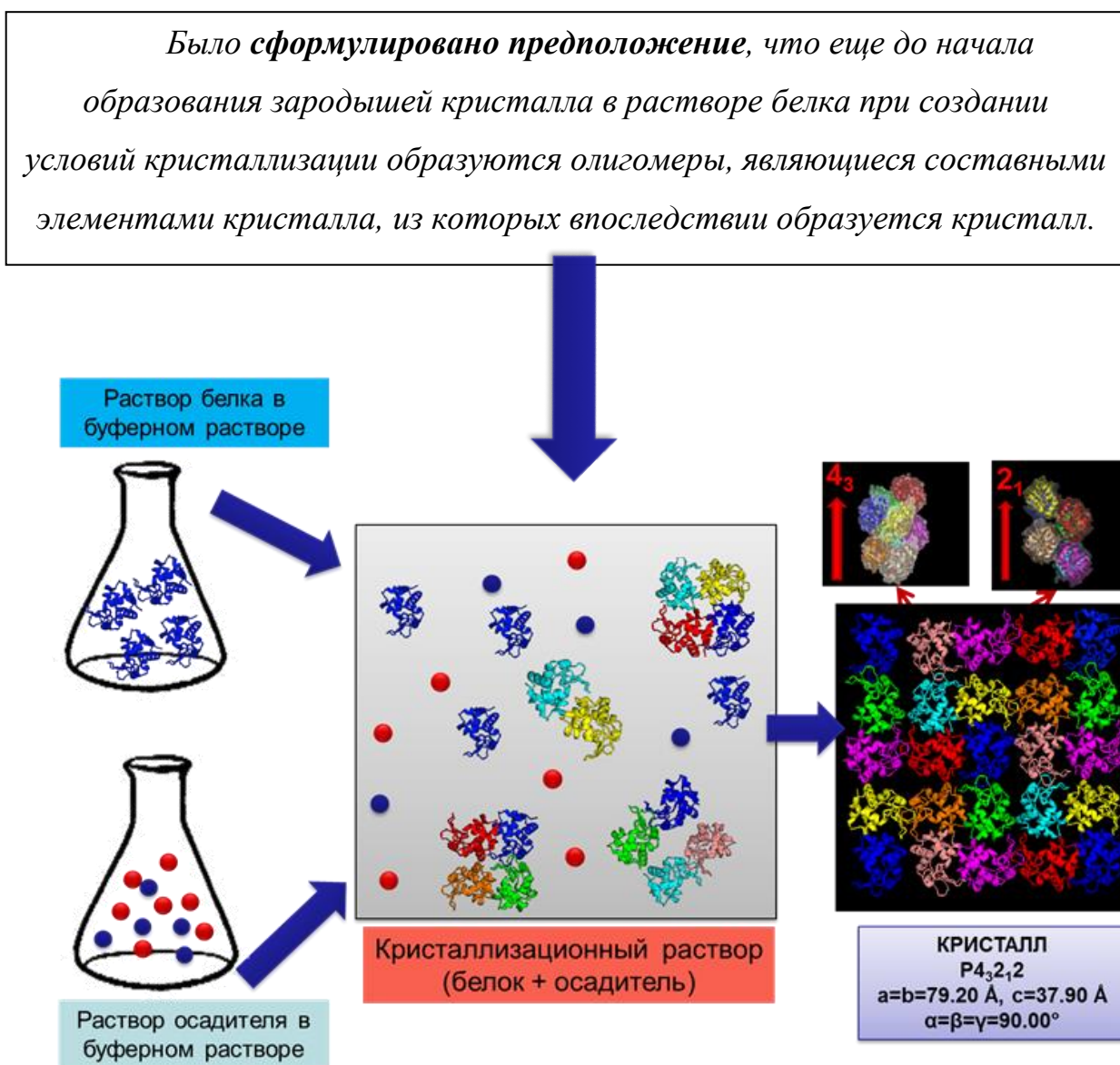


Рис.3.1 – Схема, иллюстрирующая гипотезу, – в растворе белка при создании условий кристаллизации образуются олигомеры, являющиеся составными элементами кристалла.

Определение элементов роста на основе анализа структуры тетрагонального лизоцима. На Рис.3.2 (слева) показана проекция структуры тетрагональной модификации лизоцима, перпендикулярная оси 4 порядка. Анализ молекулярной упаковки кристалла лизоцима показывал, что в

структуре можно выделить элементарный мотив – октамер – с помощью трансляций которого можно получить полную структуру кристалла.

Такой октамер можно выделить тремя различными способами. С помощью программ Coot и PyMOL [444] были получены координаты двух октамеров (наибольшего и наименьшего объема). Кластеры (элементарные единицы роста), как видно из Рис.3.2 (А – левый и В – правый), отличаются по конфигурации и объему (размеру). Один из них формируется путем вращения асимметричного элемента вокруг оси 4 порядка, а другой – путем комбинации двух тетрамеров, составленных с помощью вращения асимметричного элемента вокруг оси 2 порядка.

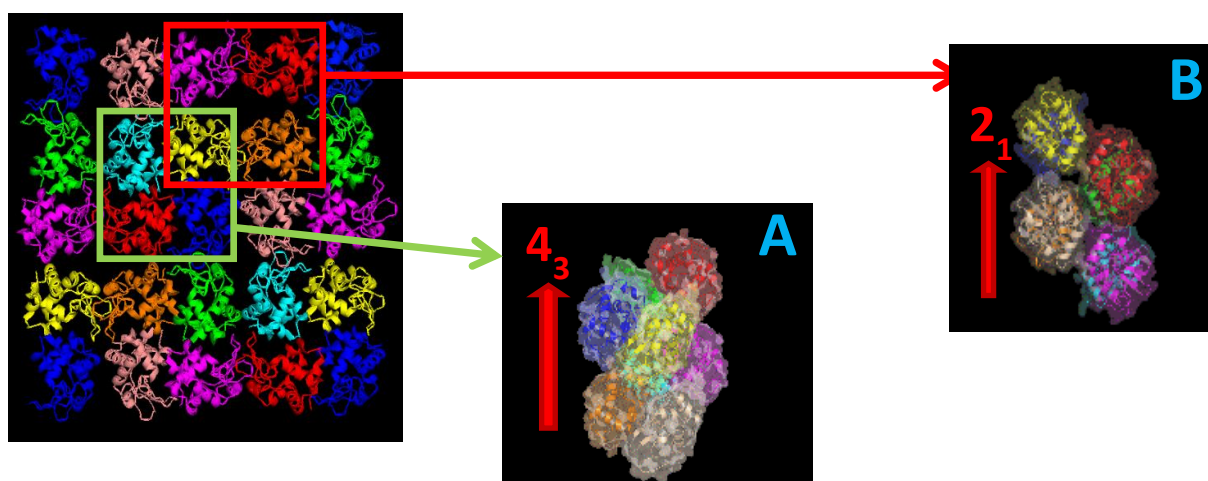


Рис.3.2 – Построение двух типов октамеров на основе структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. а) октамер типа А (обладающий минимальным объемом) - стабильный, б) октамер типа В (имеет больший объем) - нестабильный.

Кристаллическая структура гексамеров, тетрамеров и димеров была получена из структуры октамеров путем удаления мономеров лизоцима. Каждый из полученных кластеров был сохранен в файл, содержащий координаты атомов.

Два различных октамера (Рис.3.3) тип А (слева) тип и В (справа) в структуре лизоцима предлагаются в качестве возможных «строительных блоков» для роста кристалла. Объемы октамеров типов А и В равны, соответственно, 117 нм^3 и 140 нм^3 .

Эмпирическая проверка данного предположения была проведена методом МУРР на примере процесса образования кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. Были выбраны условия (концентрация белка 40 мг/мл, осадитель – NaCl с концентрацией 25 мг/мл, температура 20°C), при которых стабильно получались достаточно крупные и совершенные кристаллы тетрагональной сингонии ($P4_32_12$ $a=b=79.20$ Å, $c=37.90$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90.00^\circ$).

Предварительный анализ данных малоуглового рассеяния от растворов лизоцима с добавлением осадителя показал (Раздел 3.3.1), что в условиях кристаллизации в растворе помимо мономеров образуются также частицы, объем которых приблизительно в 8 раз превышает объем одной молекулы.

На основе анализа структуры кристалла были предложены модели различных олигомеров, являющихся элементарными мотивами кристаллической решетки (Рис.3.2, Рис.3.3). Данные модели использовались для обработки экспериментальных данных МУРР.

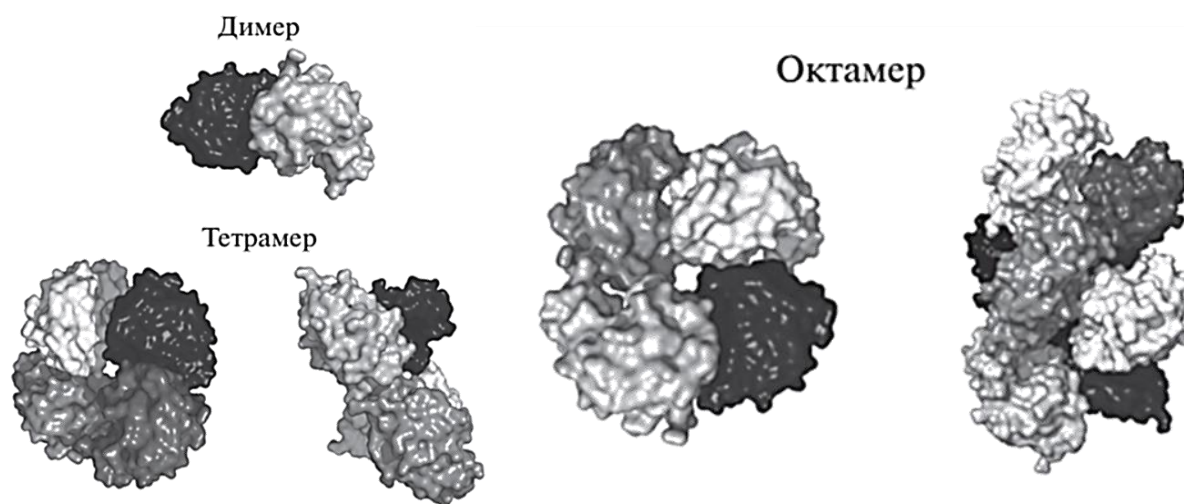


Рис.3.3 – Модели димера, тетрамера и октамера HEWL (PDB ID: 4WLD), построенные для обработки экспериментальных данных МУРР.

3.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ В РАСТВОРЕ. СОСТАВ КРИСТАЛЛИЗАЦИОННОГО РАСТВОРА ЛИЗОЦИМА

3.3.1. Предварительные исследования МУРР / АМУР-К

Представлено описание предварительного анализа структуры раствора лизоцима при добавлении осадителя по результатам исследования состояния молекул лизоцима на стадии начала процесса кристаллизации методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).

Описание материалов и подготовки растворов, исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2. Эксперименты проведены с использованием лабораторной рентгеновской установки АМУР-К. Методики МУРР-измерений и обработки экспериментальных данных, а также описание установки АМУР-К, приведены в Разделе 2.4.1, Главы 2.

На Рис.3.4 представлены кривые зависимости интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния (I) от модуля вектора рассеяния (s), измеренные от капилляра с раствором лизоцима (40 мг/мл) в буфере без осадителя (кривая 1); раствором лизоцима (40 мг/мл), смешанным с осадителем (25 мг/мл) через 1 час после смешивания растворов (кривая 2). Зависимости, аналогичные кривой 2, получены при исследовании раствора белка с осадителем, помещенного в кристаллизационную ячейку, как показано на Рис.2.4б, через 1–12 ч после загрузки растворов в капилляр.

Сравнение экспериментальной зависимости интенсивности МУРР для образца раствора лизоцима (40 мг/мл) и теоретической кривой интенсивности от полидисперсной модели, рассчитанной путем суперпозиции теоретических кривых малоуглового рассеяния от кристаллической структуры лизоцима (PDB ID: 4WLD) и построенных из нее олигомеров с различным содержанием мономеров, показало, что в растворе агрегаты отсутствуют, а рассеяние происходит на мономерных частицах.

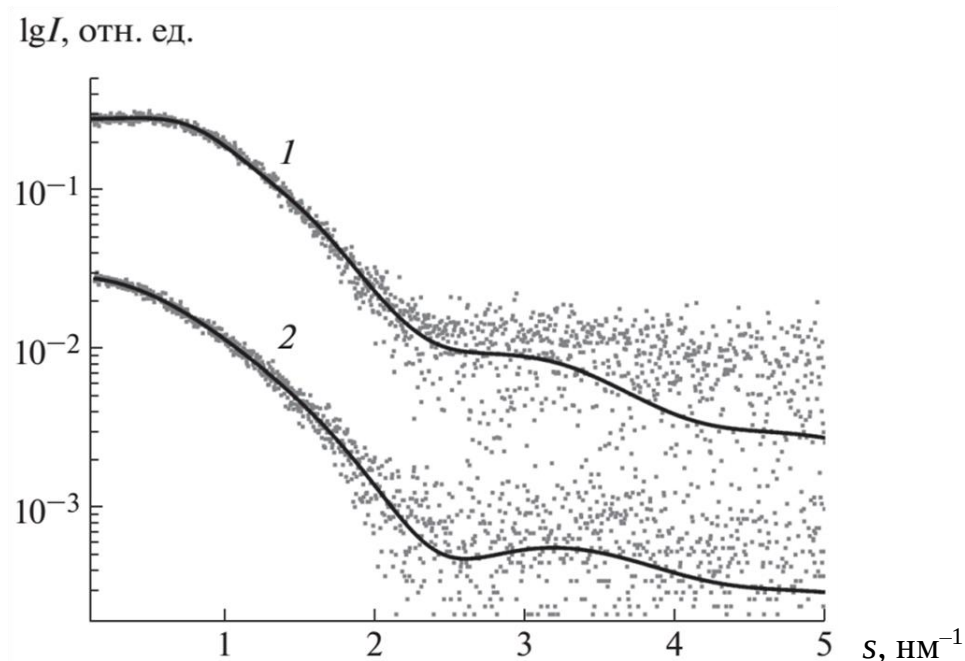


Рис.3.4 – Кривые интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния: экспериментальные данные – точки, расчет – линия. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации; 1 – рассеяние от раствора лизоцима с концентрацией 40 мг/мл; 2 – рассеяние от раствора лизоцима (40 мг/мл) с осадителем через 1 час после смешивания.

По форме кривой 1 (от раствора белка без осадителя) видно, что при концентрации 40 мг/мл наблюдается влияние межчастичной интерференции, приводящей к относительному уменьшению интенсивности рассеяния в начальных углах. При этом при добавлении к раствору белка осадителя концентрация отдельных частиц, на которых происходит рассеяние, уменьшается до такой степени, что межчастичная интерференция практически не проявляется, что видно по кривой 2 на Рис.3.4, несмотря на то, что концентрация белковых молекул в образце остается той же (40 мг/мл).

Это можно объяснить тем, что на самой начальной стадии кристаллизации (первый час) происходит сборка отдельных молекул белка – мономеров в более крупные частицы, концентрация мономеров при этом уменьшается в несколько раз по сравнению с исходным раствором. Во-первых, происходит образование олигомеров, во-вторых, формируются частицы, размер которых превышает, как минимум, сто нанометров.

Рассеяния от таких крупных образований не наблюдается: углы рассеяния находятся за пределами чувствительности прибора (слишком малые углы).

По полученным кривым интенсивности малоуглового рассеяния с помощью программы POLYMIX рассчитаны распределения по размерам частиц, наблюдаемых в растворах, в сферическом приближении их формы. На Рис. 3.5 представлены полученные распределения по размерам частиц для чистого раствора белка (кривая 1), и от растворов белка с осадителем через 1 час после смешивания (кривая 2). Из полученных распределений видно, что в присутствии осадителя в растворе появились частицы с удвоенным радиусом, что может соответствовать октамерным образованиям.

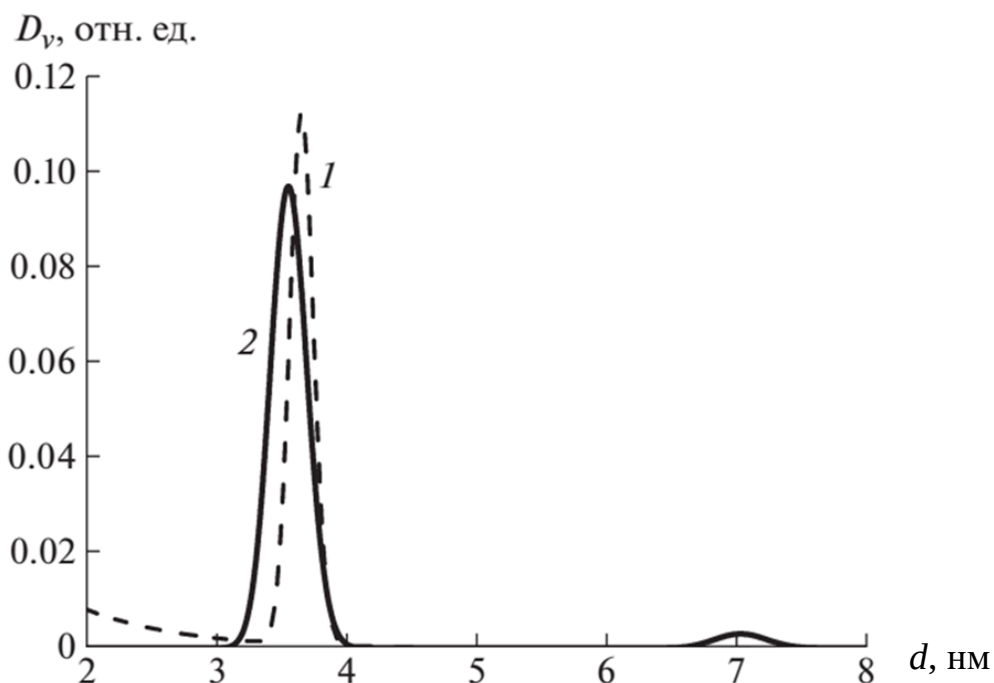


Рис. 3.5 – Сравнение объемных распределений по радиусам сферических частиц от раствора лизоцима: 1 – от раствора лизоцима с концентрацией 40 мг/мл (пунктирная линия), 2 – от раствора лизоцима (40 мг/мл) с осадителем через 1 час после смешивания (сплошная линия).

Тем не менее, не исключено, что система содержит и другие олигомеры, поэтому для более подробной и достоверной обработки экспериментальных данных смоделированы возможные олигомеры – димер, тетрамер и октамер.

На основе данных о координатах атомов в моделях олигомеров (Рис.3.2, 3.3) с помощью программы CRY SOL [400] были рассчитаны угловые зависимости рентгеновского рассеяния, а с помощью программы OLIGOMER путем подгонки теоретических кривых МУРР от смеси олигомеров к экспериментальной кривой был определен состав кристаллизационного раствора.

На Рис.3.6 показана обработка экспериментальных данных и ошибка. Обработка экспериментальных данных показала, что в растворе HEWL в условиях кристаллизации тетрагональной формы содержится: 96.0% мономеров, 1.9% димеров, 2.1% октамеров. Наличие тетрамеров в растворе не подтвердилось. При этом параметр невязки χ^2 получился равным $\chi^2 = 1.2$.

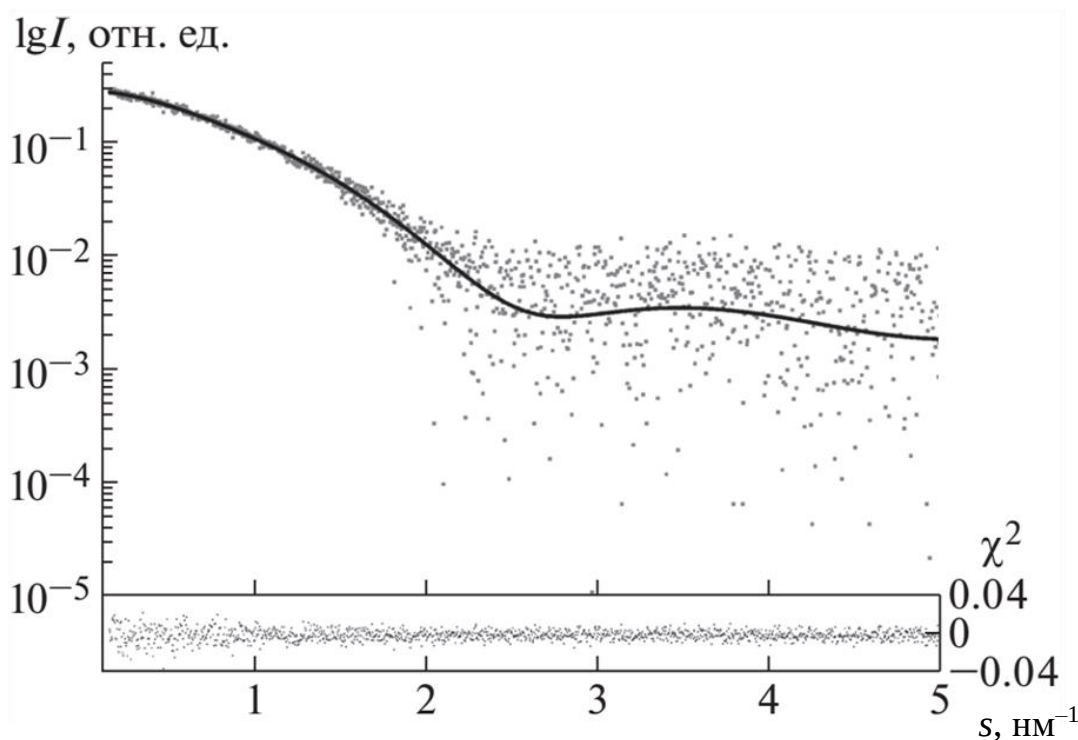


Рис.3.6 – Кривые интенсивности малоуглового рентгеновского рассеяния от раствора лизоцима (40 мг/мл) с осадителем: экспериментальные данные – точки, расчет – линия. Вставка – параметр невязки χ^2 .

Значение параметра невязки, большее единицы, может быть обусловлено как недостаточно адекватной оценкой экспериментальных шумов, так и наличием в растворе частиц с размерами более сотни нанометров, являющихся

зародышами кристаллов. Можно предположить, что димеры и октамеры, находясь в растворе в равновесном состоянии, являются строительными блоками кристалла. Также димеры могут собираться в октамеры.

Таким образом, согласно полученным данным в насыщенном растворе лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной формы помимо мономеров данного белка образуются примерно в равных концентрациях димеры и октамеры, при этом ни тетрамеров, ни гексамеров, отмеченных в [5, 176, 209], не обнаружено.

Смоделированная структура октамера, хотя и может быть легко встроена в решетку кристалла и являться строительным «кирпичом», не совпадает с общепринятой элементарной ячейкой.

Вопрос о том, какие олигомеры принимают наибольшее участие непосредственно в формировании кристалла, на данном этапе остается открытым и требует дополнительной экспериментальной проверки.

3.3.2. Исследования МУРР / ДИКСИ

В целях экспериментальной проверки высказанных предположений, сформулированных в Разделе 3.2, и подтверждения результатов предварительного анализа растворов лизоцима методом МУРР в лабораторных условиях на установке АМУР-К (Раздел 3.3.1) были проведены исследования растворов лизоцима методом МУРР с использованием синхротронного излучения (СИ).

Эксперименты проведены с использованием СИ на синхротронной станции «ДИКСИ» (НИЦ «Курчатовский институт», ККСНИ, Москва). Методики МУРР-измерений и обработки экспериментальных данных, а также описание станции СИ «ДИКСИ», приведены в Разделе 2.4.1, Главы 2.

Описание материалов и подготовки растворов, исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2.

МУРР измерения комплексов в растворе лизоцима

Лизоцим без осадителя. Были получены кривые рентгеновского рассеяния для раствора белка с концентрацией 40 мг/мл, при температурах 10, 25 и 35°C (Рис.3.7).

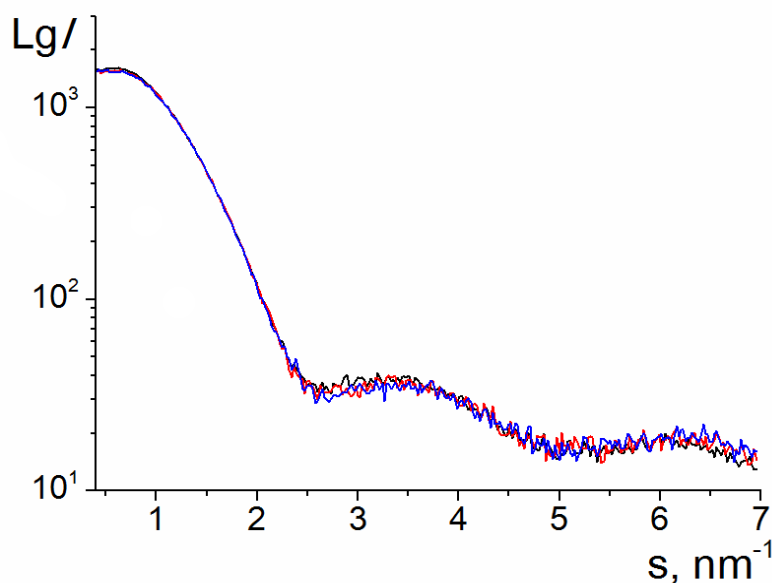


Рис.3.7 – Кривые МУРР раствора лизоцима (40 мг/мл) при разных температурах без добавления осадителя. Черный – 10°C; красный – 25°C; синий – 35°C.

Как видно на Рис.3.7, кривые рассеяния от раствора белка без осадителя практически не отличаются друг от друга при разных температурах. По формам кривых заметно влияние межчастичного взаимодействия, которое вызывает некоторое снижение интенсивности рассеяния в области малых углов.

Лизоцим с осадителем. На Рис.3.8 приведены результаты исследования МУРР в диапазоне температур от 10 до 35°C для растворов лизоцима (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл).

Добавление осадителя вызывает изменение характера взаимодействия между молекулами [4]. В растворе белка, в который добавлен осадитель при концентрации, достаточной для начала кристаллизации, кривые рассеяния заметно отличались друг от друга при изменении температуры. Данное обстоятельство дает возможность сделать вывод о том, что распределение молекул в растворе олигомеров различно при различных температурах. Это различие было также заметно при увеличении температуры в кристаллизационных условиях, что свидетельствует о меньшей степени агрегации макромолекул.

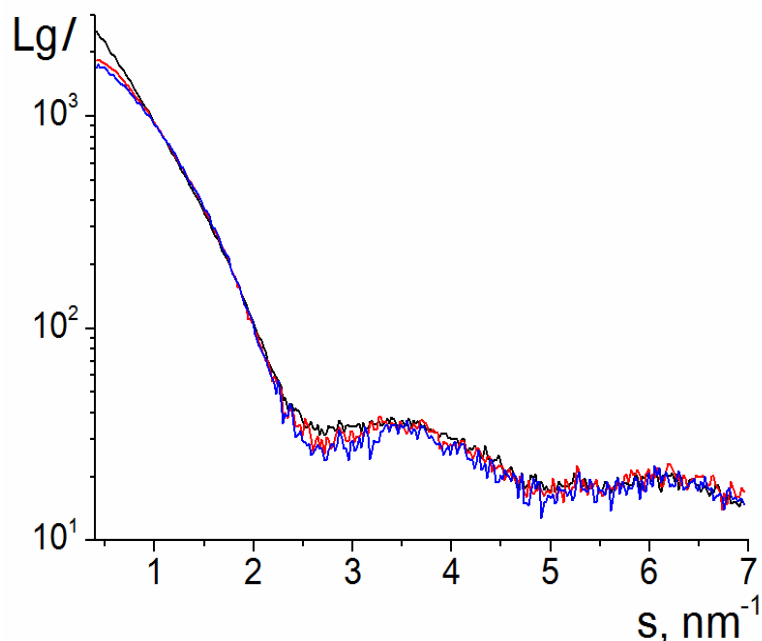


Рис.3.8 – Кривые МУРР раствора лизоцима (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл) при разных температурах. Черный – 10°C; красный – 25°C; синий – 35°C.

На Рис.3.9 показано сравнение формы кривых МУРР от растворов лизоцима без (черный) и с осадителем (25 мг/мл) (красный) при температуре 10°C. Добавление осадителя привело к уменьшению межчастичной интерференции из-за изменения состояния молекул белка в пересыщенном растворе. Данный эффект объясняется формированием олигомеров.

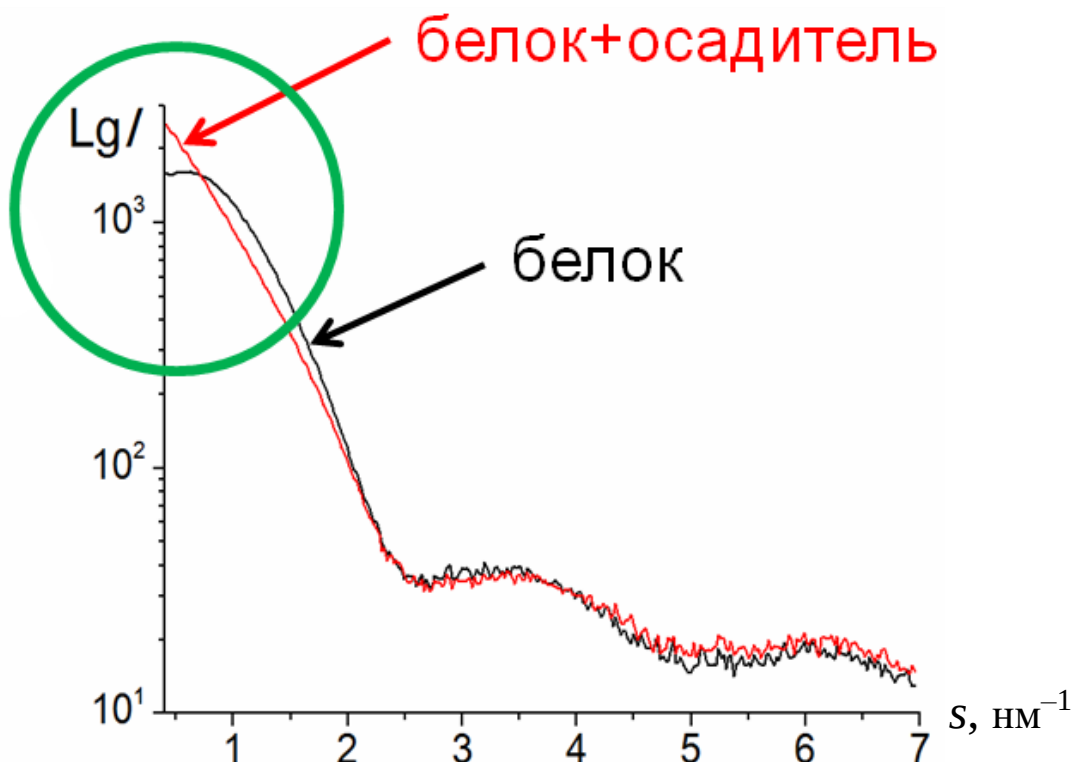


Рис.3.9 – Сравнение формы кривых МУРР от растворов лизоцима без (черный) и с осадителем (25 мг/мл) (красный) при температуре 10°C.

Распределение объемных долей сферических частиц с подобранной с учетом их размеров моделью рассеяния показано на Рис.3.10 (ДИКСИ) и для сравнения на Рис.3.11 (АМУР-К). Представленные результаты получены в программе MIXTURE. Наиболее интенсивный максимум распределения соответствует мономеру. Полуширина определяется отклонением формы молекулы от сферической. Второй, менее интенсивный пик, соответствует частицам со средним диаметром 6.07 нм и объемом 117 нм^3 , равному объему октамера А (117 нм^3). Однако, с учетом погрешностей, нельзя полностью исключить присутствие также октамеров В (140 нм^3).

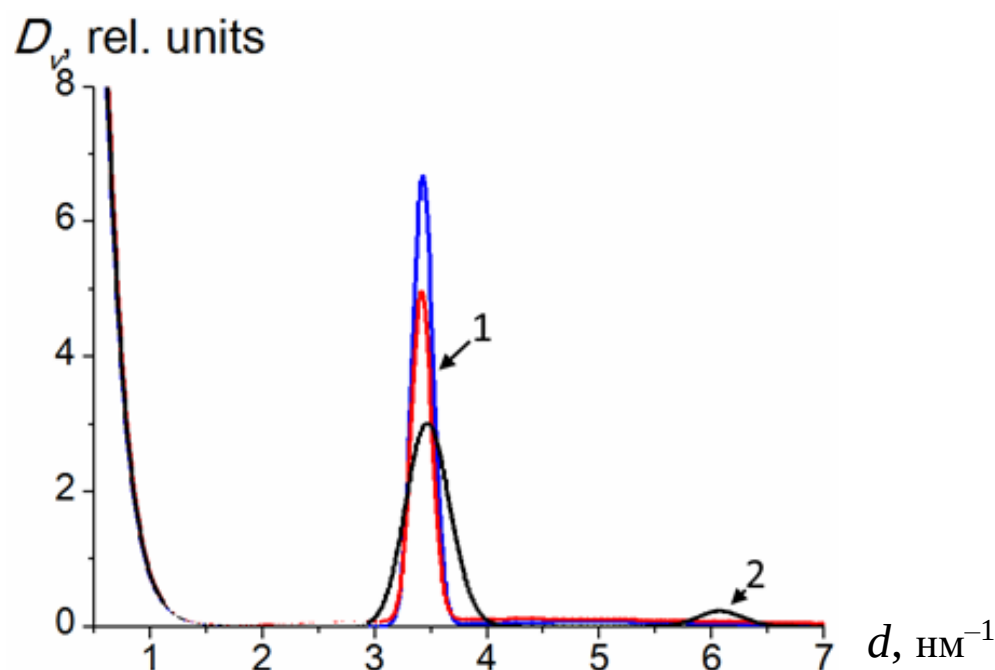


Рис.3.10 – Распределение объемных долей частиц в предположении сферической формы: черный – 10°C; красный – 25°C; синий – 35°C. Максимум 1 соответствует мономеру, максимум 2 – октамеру А (станция СИ «ДИКСИ»).

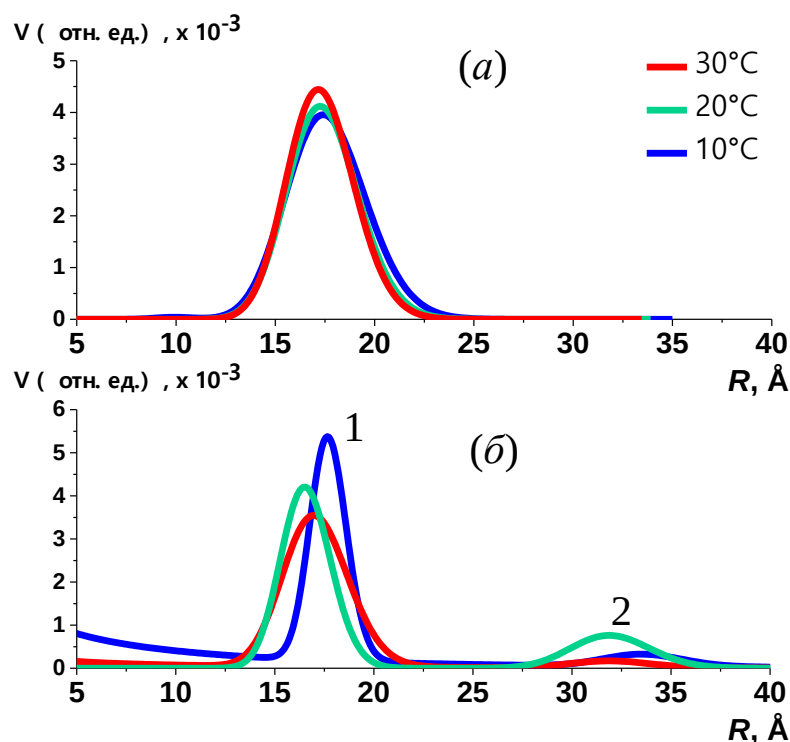


Рис.3.11 – Распределение объемных долей частиц в предположении сферической формы: синий – 10°C; зеленый – 20°C; красный – 30°C. (а) – лизоцим без осадителя; (б) – лизоцим с осадителем NaCl. Максимум 1 соответствует мономеру, максимум 2 – октамеру А (АМУР-К, разд. 3.2.1).

Исходя из предварительной обработки данных, для выяснения состава смеси раствора белка и осадителя (при условиях кристаллизации тетрагональной формы лизоцима), нами была использована модель октамера А, а также соответствующих моделей димера, тетрамера и гексамера, для аппроксимации экспериментальных данных.

Модельные кривые МУРР для каждого компонента, рассчитанные в программе CRY SOL, показаны на Рис.3.12а. Данные были интерполированы методом наименьших квадратов в программе OLIGOMER как суммы интенсивностей модельных компонентов, т.е. атомных структур мономеров, димеров, тетрамеров и октамеров лизоцима (Рис.3.12б).

Расчетные кривые МУРР, полученные для предложенных моделей олигомеров, совпали в пределах ошибки.

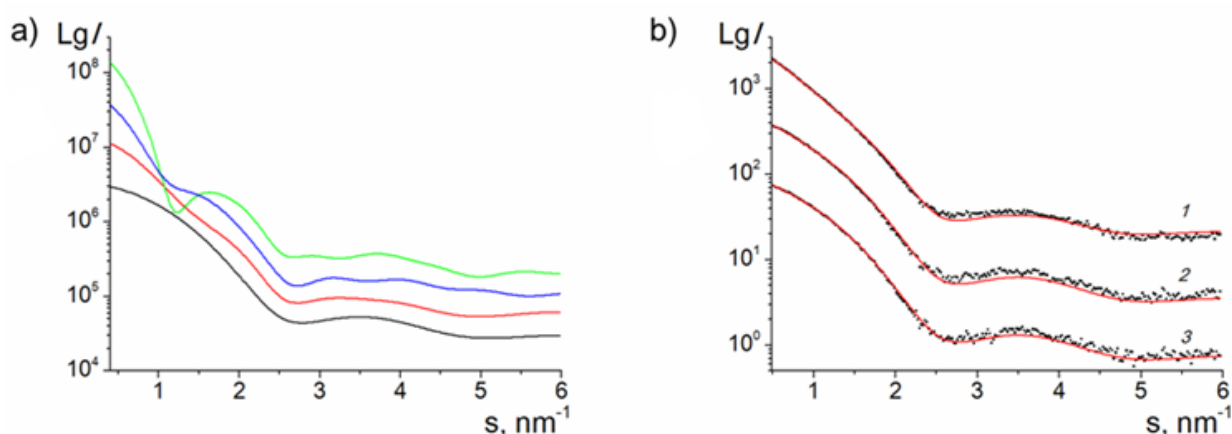


Рис.3.12 – а) – Модельные кривые МУРР от структур лизоцима – мономер (черный), димер (красный), тетрамер (синий) и октамер (зеленый) – рассчитанные в программе CRY SOL; б)– Экспериментальные кривые рассеяния (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные на основе комбинации мономеров, димеров и октамеров, показанной в Табл. 3.1, в программе OLIGOMER: 1 – 10°C, 2 – 25°C, and 3 – 35°C. Кривые смещены по вертикальной оси для лучшего представления.

В Табл. 3.1 представлены результаты расчета распределений различных типов олигомеров в растворе белка с осадителем для температур 10, 25, 35°C. При этих температурах меняется растворимость лизоцима в присутствии NaCl [445] так, что состояние белка и раствора осадителя соответствует трем

различным областям на фазовой диаграмме кристаллизации [446]. Первая точка ($T = 10^{\circ}\text{C}$) соответствует оптимальному росту, вторая точка ($T = 25^{\circ}\text{C}$) соответствует области, где рост подавляется, и третья ($T = 35^{\circ}\text{C}$) – области, где рост не происходит вовсе.

Табл. 3.1 – *Относительные концентрации одиночных молекул лизоцима и их олигомеров (тип А), полученные из кривых МУРР при различных температурах: лизоцим (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл).*

Тип кластера	Концентрация, %		
	$T = 10^{\circ}\text{C}$	$T = 25^{\circ}\text{C}$	$T = 35^{\circ}\text{C}$
Мономер	83 ± 4	95 ± 4	97.9 ± 0.6
Димер	8 ± 4	1 ± 4	0 ± 0
Тетрамер	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Гексамер	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Октамер	8.8 ± 1.0	3.8 ± 1.0	2.1 ± 0.3
χ^2	3.2	2.2	1.6

Поскольку растворы исследовались при высоких концентрациях, соответствующим условиям кристаллизации, на форму кривых рассеяния должен влиять эффект межчастичной интерференции. Исходя из этого, доля агрегатов, рассчитанная с помощью моделирования, должна отличаться в абсолютных значениях от их реальных величин. Однако, в данной работе было проведено относительное сравнение измерений при различных температурах и изучение тенденций в изменениях состава растворов, а не их абсолютный состав. Эффект межчастичной интерференции, который может усложнять процесс обработки экспериментальных данных, также наблюдался в кривых рассеяния, полученных от растворов лизоцима без осадителя при всех температурах (Рис.3.7). Тем не менее, при данной концентрации среднее расстояние между молекулами (~ 17 нм) было приблизительно в 6 раз больше линейного размера самих молекул (~ 3 нм). Вдобавок, при добавлении осадителя молярная доля отдельных частиц (мономеров, димеров и октамеров) была приблизительно в 2 раза меньше, чем в растворе белка без осадителя.

Данное обстоятельство позволяет предположить, что изменения в характере межчастичного взаимодействия находятся в пределах погрешности.

Исследование серии растворов разной концентрации с целью приведения кривых интенсивности к нулевой концентрации в данном случае не является адекватным ввиду того, что использование более низких концентраций приведет к уходу от условий кристаллизации и к изменению состава смеси.

Значение коэффициента χ^2 для кривых МУРР выбранных моделей варьировалось от 1.6 до 3.2 (см. Табл. 3.1). Большие значения χ^2 можно объяснить преимущественно концентрационными эффектами и расхождениями в области больших углов. При условиях кристаллизации число частиц уменьшалось из-за их агрегации, что дало ослабление концентрационного эффекта (Рис.3.9). Влияние взаимно противоположных факторов присутствия агрегатов и структурного фактора привело к появлению осцилляций в области Гинье на кривых рассеяния. Данный феномен не рассматривался в нашем исследовании, для простоты было сделано допущение об уменьшении влияния структурного фактора. Однако этот эффект также вносит свой вклад в увеличение значения χ^2 при моделировании смеси растворов различных типов агрегатов.

В нашем случае, из-за неопределенности структурных факторов, систематические ошибки могут привести к общей погрешности определения относительной доли агрегатов порядка 20-30%. Однако главной целью являлось сравнительное изучение образцов, а не определение абсолютной концентрации агрегатов, и поэтому установление абсолютных погрешностей не требовалось.

Таким образом, полагается, что определение элементарных кластеров возможно на основе анализа структуры исследуемого кристалла белка. Это предположение подтверждается проведенными экспериментами МУРР при кристаллизации тетрагонального лизоцима.

Анализ экспериментальных данных МУРР, основанный на использовании двух различных моделей октамеров, показал присутствие

димеров и октамеров в растворе в предкристаллизационном состоянии, помимо мономеров. Вне зависимости от выбранной модели олигомеров, не было выявлено наличия тетрамеров и гексамеров в растворе. По мере увеличения температуры и смещения раствора белка из области кристаллизации по фазовой диаграмме количество олигомеров в растворе уменьшалось и становилось сравнимым с погрешностями.

Полученные результаты указывают на высокую вероятность предложенной модели кристаллизации, когда элементарным кластером, образующим кристалл, является структурный блок, состоящий из восьми молекул лизоцима.

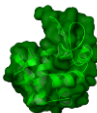
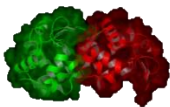
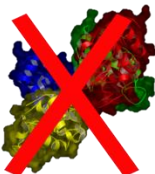
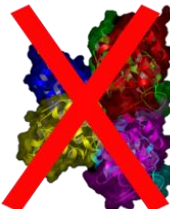
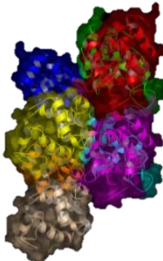
Подтверждена взаимосвязь между формированием конкретных типов олигомеров в растворе и оптимальными условиями кристаллизации.

3.3.3. Олигомерный состав кристаллизационного раствора

Аналогичные, описанным в предыдущем разделе, исследования были проведены с помощью комплементарного метода малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН), а также на различных синхротронных станциях малоуглового рассеяния рентгеновского излучения, результаты которых представлены в последующих разделах настоящей главы. Результаты всех проведенных экспериментов оказались близки – в растворе белка с осадителем помимо мономеров наблюдалось образование димеров и около 3-4 % октамеров. Результаты приведены в сводной Табл. 3.2.

Несколько отличаются результаты исследования растворов лизоцима методом МУРН (количество октамеров, обнаруженных в растворе превышает 9%), что связано с тем, что при проведении данных исследований белок растворяли в тяжелой воде, которая оказывает существенное влияние на процесс и условия кристаллизации.

Табл. 3.2 – Олигомерный состав растворов лизоцима с добавлением осадителя, определенный методом малоуглового рассеяния на различных экспериментальных установках.

	мономер	димер	тетрамер	гексамер	октамер
					
ИК РАН (АМУР-К)	96.2	1.9	0.0	0.0	2.9
ККСНИ (ДИКСИ)	95.2	1.0	0.0	0.0	3.8
ESRF (BioSAXS)	90.6	6.3	0.0	0.0	3.1
ИБР-2* (YuMO)	88.8	1.4	0.0	0.0	9.6*
C _{белка} = 40 мг/мл, C _{NaCl} = 40 мг/мл, температура 20°C, NaAc буфер, pH = 4.5					
*Растворитель - D ₂ O					

Из кристаллической решетки лизоцима тетрагональной сингонии выделить октамеры можно различным способом. Использование разных моделей октамеров для обработки данных малоуглового рассеяния приводило к результатам, которые совпадали в пределах ошибки.

Для определения типа октамера, который образуется в растворе, а также объяснения того факта, что в растворе не наблюдается других олигомеров, требуется проведение исследований устойчивости различных олигомеров в растворе лизоцима.

3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ ДОЛИ ОКТАМЕРОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА И ТЕМПЕРАТУРЫ

Методом МУРР с использованием СИ исследовался структурный состав растворов лизоцима в условиях, благоприятных для образования кристаллов тетрагональной сингонии, в зависимости от концентрации белка (C_p) и температуры. В качестве растворителя использовалась вода (H_2O). Описание исследований и результаты приводятся в Разделе 3.4.1.

Проведены исследования растворов лизоцима в тяжелой воде (D_2O) методом МУРН с концентрациями $C_p = 40, 20$ и 10 мг/мл с добавлением осадителя и без него, а также при температурах $10, 20$ и $30^\circ C$. Помимо ожидаемых мономеров белка, в исследуемых растворах с максимальной C_p и близких к оптимальным условиям кристаллизации обнаружены димеры и октамеры. Была определена оптимальная температура для образования октамеров, при этом как отклонение от указанной температуры, так и снижение C_p приводят к значительному уменьшению объемной доли обнаруженных октамеров. В отсутствие осадителя в растворе присутствуют только мономеры и небольшая доля димеров. Описание исследований и результаты приводятся в Разделе 3.4.2.

Методом МУРР с использованием СИ исследован состав растворов лизоцима в тяжелой воде (D_2O) в условиях, благоприятных для образования кристаллов тетрагональной сингонии, в зависимости от C_p . В кристаллизационных растворах наряду с мономерами лизоцима обнаружены димеры и октамеры, причем при увеличении C_p содержание октамеров возрастает. Сопоставление полученных данных с результатами исследования растворов лизоцима в сходных условиях, но при использовании в качестве растворителя обычной воды (H_2O) показало, что замена H_2O на D_2O приводит к увеличению количества октамеров при прочих одинаковых условиях. Описание исследований и результаты приводятся в Разделе 3.4.3.

3.4.1. Зависимость в H_2O . Исследования методом МУРР

Проведены исследования условий образования «единиц роста» белкового кристалла в растворах лизоцима методом МУРР с использованием СИ, измерения были проведены на станции BM29 BioSAXS Европейского источника синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция).

Описание материалов и подготовки растворов, исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2.

Методики МУРР-измерений и обработки экспериментальных данных, а также описание станции BM29@ESRF представлены в Разделе 2.4.1, Главы 2).

Экспериментальные результаты. Кривые МУРР от раствора белка и белка с осадителем при температурах 10, 20, 30°C представлены на Рис.3.13.

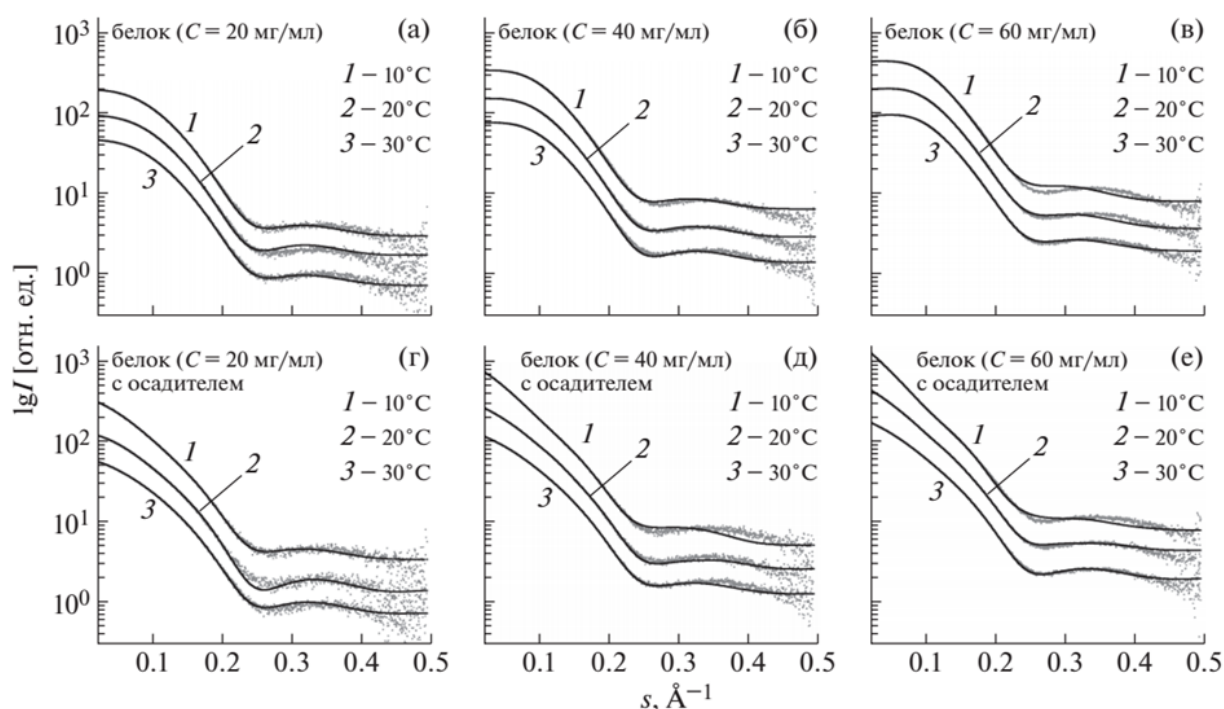


Рис.3.13 – Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой POLYMIX, при температурах 10 (1), 20 (2), 30 °C (3) от растворов лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и белка с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

На кривых рассеяния от чистого раствора белка (Рис.3.13, а – в) видно влияние межчастичной интерференции, вызванной высокими концентрациями белка (20, 40, 60 мг/мл). При добавлении к раствору белка осадителя меняется характер кривой рассеяния (Рис.3.13, г – е): увеличивается интенсивность рассеяния при малых углах, влияние межчастичной интерференции уменьшается. Можно сделать вывод, что происходит агрегация отдельных молекул, увеличивается расстояние между рассеивающими частицами.

По экспериментальным данным рассчитано объемное распределение по размерам в приближении полидисперсных сферических частиц с помощью программы POLYMIX (Рис.3.14, Табл. 3.3). Экспериментальные данные хорошо приближаются модельными расчетами во всем угловом диапазоне и имеют невязку χ^2 в диапазоне 0.9 – 1.7. На Рис.3.14 представлено полученное распределение частиц в зависимости от радиуса для раствора белка (а) – (в) и белка с добавлением осадителя (г) – (е).

Все распределения, полученные от растворов белка без осадителя, имеют максимум в области радиусов частиц, составляющих 15 – 20 Å, соответствующий радиусу мономера лизоцима. Но на Рис.3.14 (в) на кривой распределения по размерам в случае концентрации белка 60 мг/мл помимо максимума, соответствующего радиусу мономера, присутствует локальный максимум, соответствующий частицам малых размеров с радиусом около 8 - 10 Å, который можно отнести к флуктуациям плотности в буферном растворе. При добавлении к раствору белка осадителя появляются большие частицы с радиусом в диапазоне 30 – 35 Å, соответствующие олигомерным частицам белка лизоцима.

Для получения более детальной структурной информации экспериментальные данные были обработаны в программе OLIGOMER с использованием кристаллических моделей олигомеров (Раздел 3.2). В кристаллической решетке выделены октамеры, а также составляющие их

димеры, тетрамеры и гексамеры. Результаты обработки представлены на Рис.3.15 и в Табл. 3.4 для разных концентраций белка.

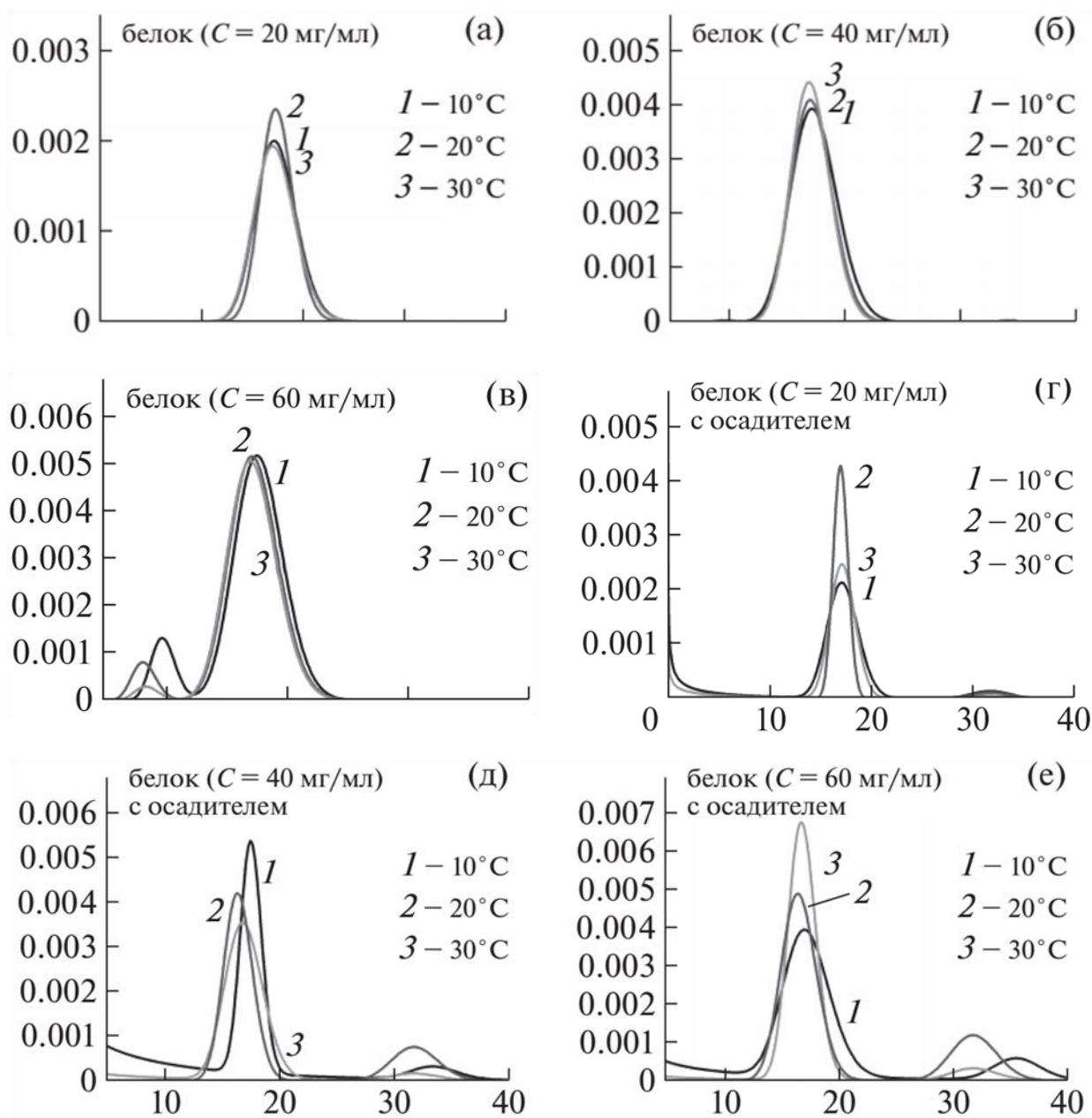


Рис.3.14 – Распределение по размерам частиц в растворах лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и белка с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е) при температурах 10 (1), 20 (2), 30°C (3).

Показано, что при всех значениях температур и концентраций в кристаллизационном растворе присутствуют мономеры, димеры и октамеры. Тетрамеры и гексамеры не были обнаружены ни при каких условиях. Полученные результаты хорошо согласуются с данными, представленными

ранее в Разделах 3.3.1, 3.3.2. При этом обнаружен рост количества октамеров при понижении температуры и увеличении концентрации белка (Рис.3.16). В то же время количество октамеров растет при увеличении концентрации белка.

Табл. 3.3 – *Распределение по размерам частиц в растворах лизоцима при разных концентрациях белка с осадителем и в его отсутствие в зависимости от температуры.*

С, мг/мл	Т, °С	Белок без осадителя*		Белок с осадителем	
		Радиус частиц, Å	χ^2	Радиус частиц*, Å	χ^2
20	30	17.4 ± 2.0	1,4	17.3 ± 1.2	1,0
				31.5 ± 2.0	
	20	17.6 ± 1.6	2,9	17.1 ± 0.7	1,4
				32.0 ± 2.0	
	10	17.5 ± 2.0	1,7	17.4 ± 1.5	0,8
				32.0 ± 2.0	
40	30	17.3 ± 1.7	3,4	17.1 ± 1.6	1,5
				32.0 ± 2.0	
	20	17.4 ± 1.8	4,3	16.6 ± 1.2	1,5
				32.0 ± 2.0	
	10	17.6 ± 2.0	6,0	17.7 ± 0.9	2,5
				33.7 ± 2.0	
60	30	17.4 ± 2.0	4,8	17.0 ± 1.2	1,5
				32.0 ± 2.0	
	20	17.5 ± 2.0	6,9	16.8 ± 1.5	2,0
				32.0 ± 2.0	
	10	17.9 ± 2.0	15,2	17.5 ± 2.0	5,2
				35.8 ± 2.0	

Примечание. * Первая цифра (меньший радиус частиц) соответствует мономерам/димерам, вторая (большой радиус частиц) – октамерам.

Рассчитанные кривые распределений для растворов с осадителем совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне. В случае растворов без добавления осадителя модельные приближения не позволяли приблизить начальные части кривых из-за сильного эффекта межчастичной интерференции, который не учитывался при моделировании (структурные факторы, которые можно рассчитать для распределения жестких

сфер, могут не вполне адекватно описывать эффект интерференции в случае несферических частиц), вследствие чего значения невязки оказались высокими. При этом показано, что в данных условиях в растворе присутствуют только мономеры.

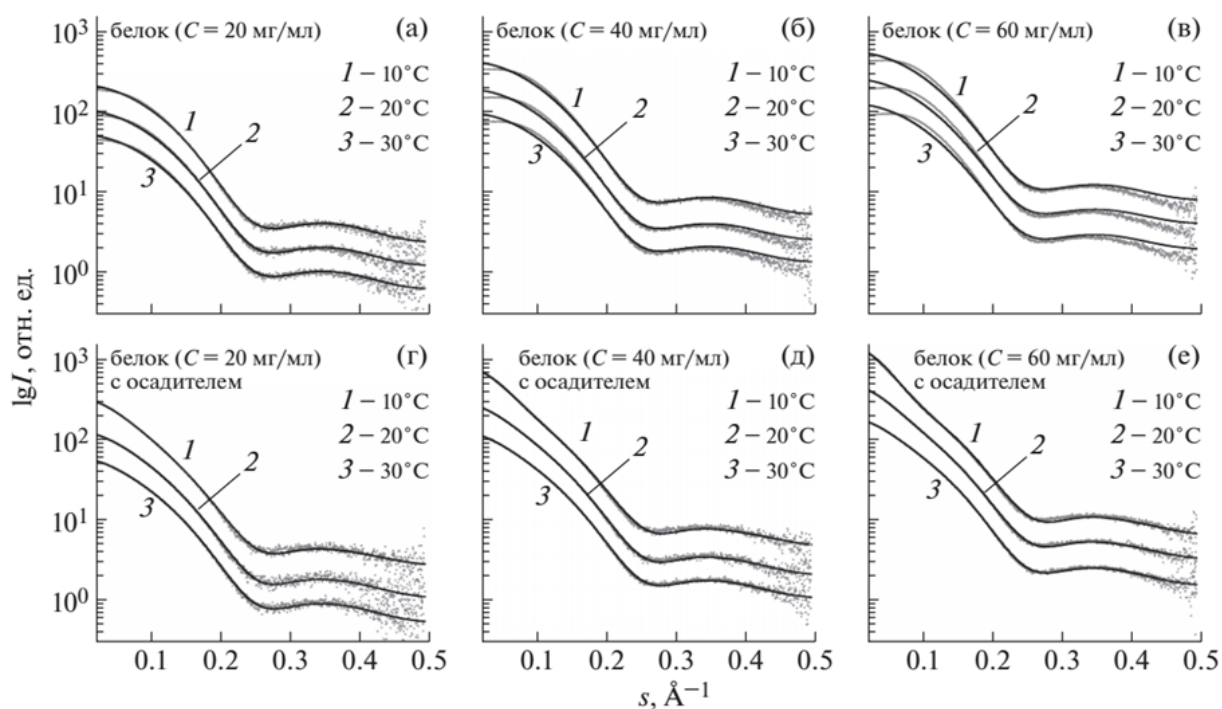


Рис.3.15 – Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой OLIGOMER, при температурах 10 (1), 20 (2), 30°C (3) от растворов лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и белка с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Табл. 3.4 – Объемные доли олигомеров, качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 и радиусы инерции R_g , рассчитанные по начальному участку кривых при разных концентрациях белка с осадителем и в его отсутствие в зависимости от температуры.

С, мг/мл	Т, °С	Белок с осадителем					Белок без осадителя*		
		Мономер	Димер	Тетрамер	Октамер	χ^2	R_g , Å	χ^2	R_g , Å
20	30	96.1 ± 0.3	2.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.1	0.81	19.24	19.83	14.33
	20	92.7 ± 0.4	5.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1	0.87	19.65	19.94	14.34
	10	87.3 ± 0.4	9.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1	1.23	22.04	19.37	14.34

40	30	94.7 ± 0.3	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.1	1.11	20.98	148.31	14.32
	20	90.6 ± 0.2	6.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.1	1.26	22.31	176.97	14.32
	10	83.5 ± 0.3	9.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	6.9 ± 0.1	3.57	25.64	127.13	14.33
60	30	95.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3	2.5 ± 0.1	1.22	21.91	452.98	14.31
	20	88.8 ± 0.2	6.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	5.1 ± 0.1	1.99	24.4	490.26	14.31
	10	84.9 ± 0.2	3.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	11.4 ± 0.1	16.97	28.02	364.82	14.32

Примечание. * Доля мономеров 100%, остальные олигомеры отсутствуют.

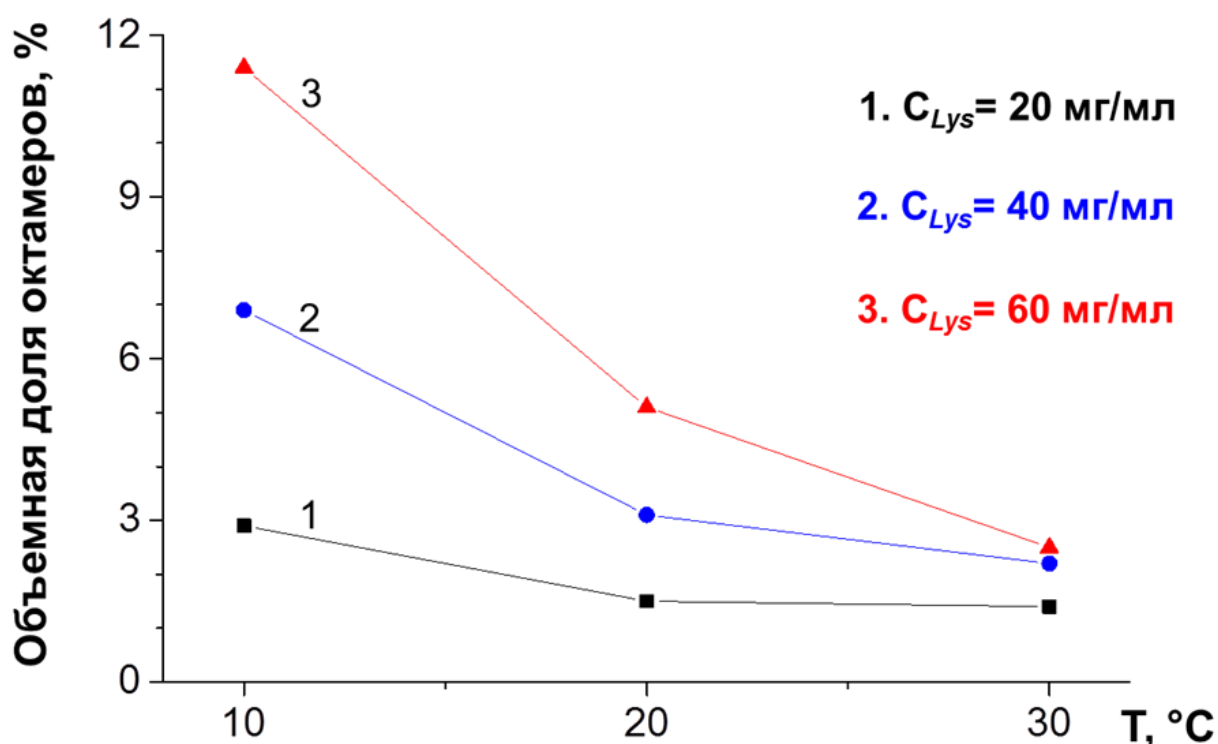


Рис.3.16 – Зависимость концентрации октамеров от температуры в растворах лизоцима с хлоридом натрия при концентрациях белка и осадителя соответственно 20 и 25 (1), 40 и 25 (2), 60 и 25 мг/мл (3).

В результате проведенных исследований было установлено, что при всех исследуемых значениях концентраций белка и температур в растворе в условиях роста кристалла лизоцима тетрагональной сингонии присутствуют мономеры, димеры и октамеры (см. Табл. 3.4). При этом тетрамеры и гексамеры не обнаружены.

Установлено, что количество октамеров возрастает при увеличении концентрации белка и понижении температуры (Рис.3.16).

Показано, что изменение взаимодействия между молекулами белка при добавлении осадителя приводит к образованию олигомеров.

Установлено влияние такого параметра кристаллизационного раствора, как концентрация белка и температура, на количество олигомеров, образующихся в растворе.

3.4.2. Зависимость в D₂O. Исследования методом МУРН

Проводились исследования структуры растворов лизоцима в тяжелой воде (D₂O) методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) при различных концентрациях белка и температурах с добавлением осадителя и без него. Эксперименты проводились на станции ЮМО, источник ИБР-2 (ОИЯИ, Дубна, Россия).

Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2.

Методики МУРН-измерений и обработки экспериментальных данных, а также описание станции ЮМО@ИБР-2 представлены в Разделе 2.4.1, Главы 2).

Исследуемые образцы. В исследованиях проводили измерения МУРН с использованием ряда образцов растворов. Растворы содержали белок в концентрациях 40, 20 и 10 мг/мл как в присутствии, так и в отсутствие осадителя NaCl, концентрация NaCl составляла 25 мг/мл. Список исследуемых растворов и их составы представлены в **Табл. 3.5**. Все растворы были приготовлены за 1 час до измерений МУРН.

Табл. 3.5 – *Список исследуемых растворов и их состав.*

SAB, натрий-ацетатный буфер.

Состав раствора				
№	Наименование образца	Буфер	Концентрация белка (лизоцим) (мг мл ⁻¹)	Концентрация осадителя (NaCl) (мг мл ⁻¹)
1	SAB	0.1M SAB в D ₂ O	0	0
2	SAB_NaCl	0.1M SAB в D ₂ O	0	25
3	SAB_Lys40	0.1M SAB в D ₂ O	40	0
4	SAB_Lys20	0.1M SAB в D ₂ O	20	0
5	SAB_Lys10	0.1M SAB в D ₂ O	10	0
6	SAB_Lys40_NaCl	0.1M SAB в D ₂ O	40	25
7	SAB_Lys20_NaCl	0.1M SAB в D ₂ O	20	25
8	SAB_Lys10_NaCl	0.1M SAB в D ₂ O	10	25

На всех образцах измерения проводились при температурах 30, 20 и 10°C в кварцевых ячейках Hellma толщиной (пролетной длиной) 1 мм. Объем каждого образца составлял 1,5 мл. Ячейки помещали в термостатированный держатель вместимостью до 12 образцов, управление температурой осуществлялось для всех образцов. Таким образом, все растворы находились в одинаковых условиях и имели одинаковую историю изменения температуры. Температура контролировалась с помощью термостата Lauda [447].

Порядок образцов, исследуемых методом МУРН, соответствует номерам образцов, приведенным в Табл. 3.5. Таким образом, чтобы избежать эффектов, обусловленных неполным растворением ранее сформированных структур, измерения для всех образцов были проведены сначала при температуре 30°C, затем при 20°C и, наконец, при 10°C.

Ранее было показано, что растворимость лизоцима в присутствии NaCl в D₂O ниже, чем в обычной воде H₂O [448]. Соотношение для растворимости лизоцима (S) в H₂O и D₂O в зависимости от температуры (t) может быть приблизительно записано, как $S_{H_2O}(t) = S_{D_2O}(t + 7.2)$. Таким образом, кривые, отражающие растворимость лизоцима для различного содержания NaCl в H₂O и D₂O, сдвинуты на 7.2°C. Так, условия для ненасыщенных и перенасыщенных растворов были выбраны с учетом этого обстоятельства. Также, белковые растворы были исследованы вблизи параметров кривой растворимости (температура, концентрация белка).

Экспериментальные результаты. Проведена серия измерений МУРН в зависимости от температуры и концентрации белка с использованием растворов лизоцима в чистом буфере D₂O и в том же буфере с добавлением 25 мг/мл NaCl. Для каждого образца измерения проводились при трех температурах: 10, 20 и 30°C. Экспериментальные зависимости МУРН показаны на Рис.3.17 (с NaCl) и Рис.3.18 (без NaCl).

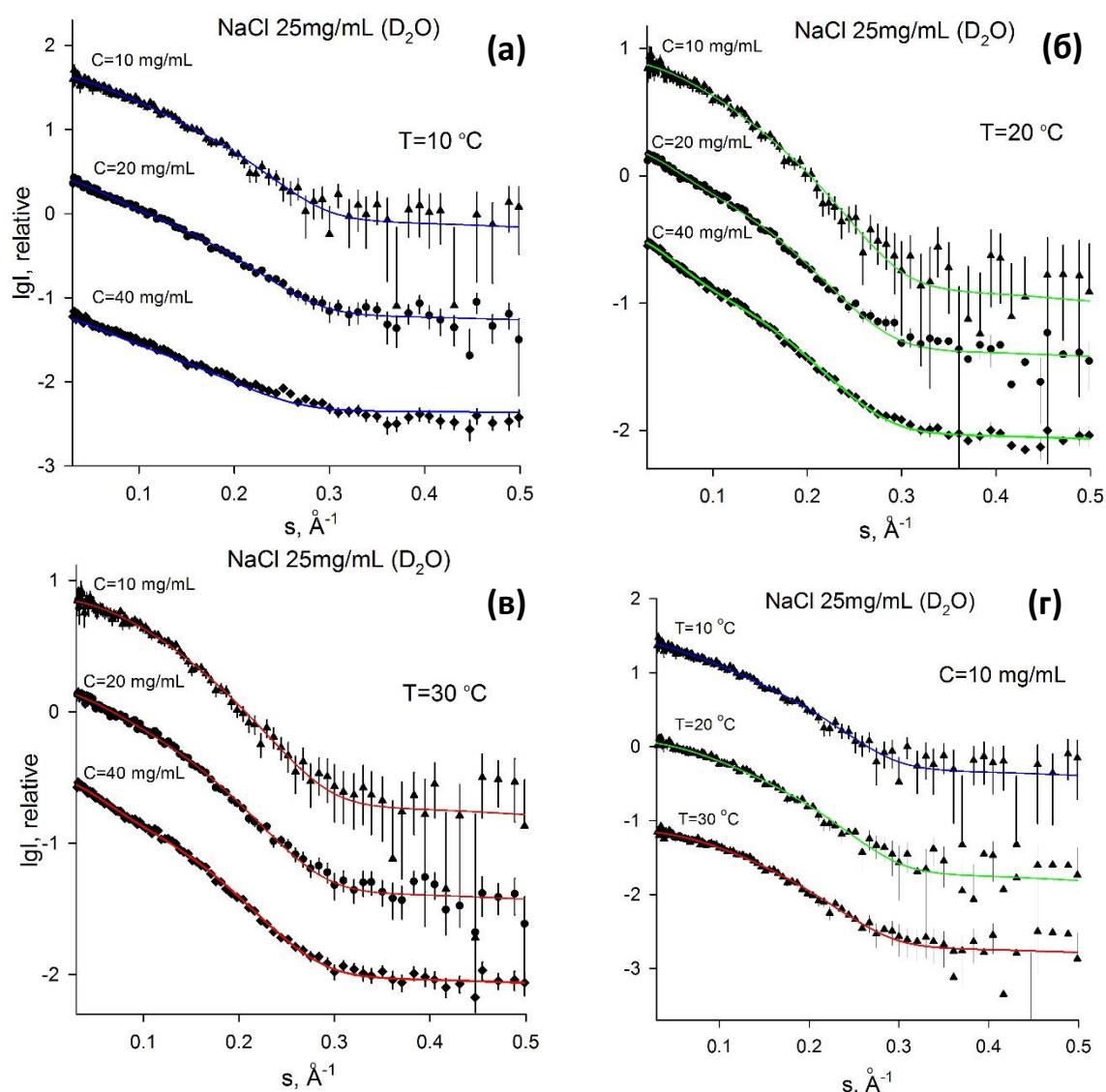


Рис.3.17 – Экспериментальные данные малоуглового рассеяния нейтронов и данные обработки (фита) с использованием программы OLIGOMER для образцов с 25 мг/мл NaCl. Показаны экспериментальные кривые рассеяния нейтронов в растворах лизоцима в диапазоне концентраций белка (от 10 до 40 мг/мл) и температур (от 10 до 30°C). Экспериментальные данные показаны точками с отложенными погрешностями. Кривые, полученные в OLIGOMER, показаны сплошными линиями. Графики отображают логарифм интенсивности рассеяния как функцию вектора рассеяния s . Кривые сдвинуты вниз на одну логарифмическую единицу для наглядности. Различные концентрации обозначены следующим образом: треугольники соответствуют $C = 10$ мг/мл, кружки - $C = 20$ мг/мл и ромбы - $C = 40$ мг/мл. Различные температуры соответствуют цветам сплошных кривых: синие линии соответствуют $T = 10^\circ\text{C}$, зеленые - $T = 20^\circ\text{C}$, красные - $T = 30^\circ\text{C}$. Различные блоки содержат данные по растворам лизоцима при (а) $T = 10^\circ\text{C}$, (б) $T = 20^\circ\text{C}$, (в) $T = 30^\circ\text{C}$ в зависимости от концентрации и (г) $C = 10$ мг/мл, (д) $C = 20$ мг/мл, (е) $C = 40$ мг/мл в зависимости от температуры.

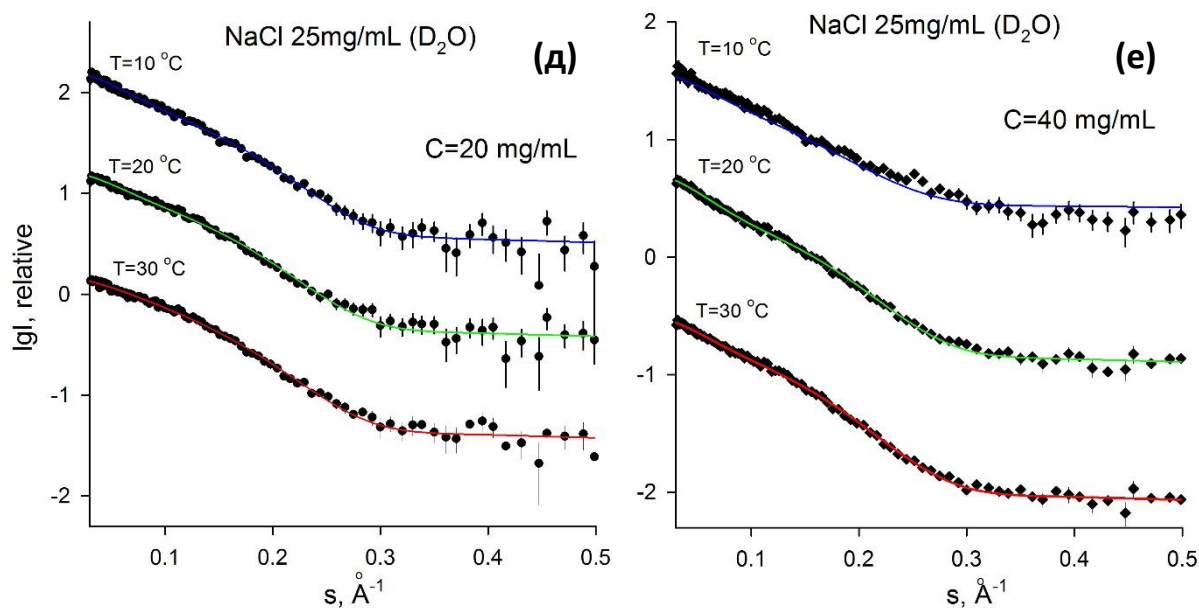


Рис.3.17 (продолжение).

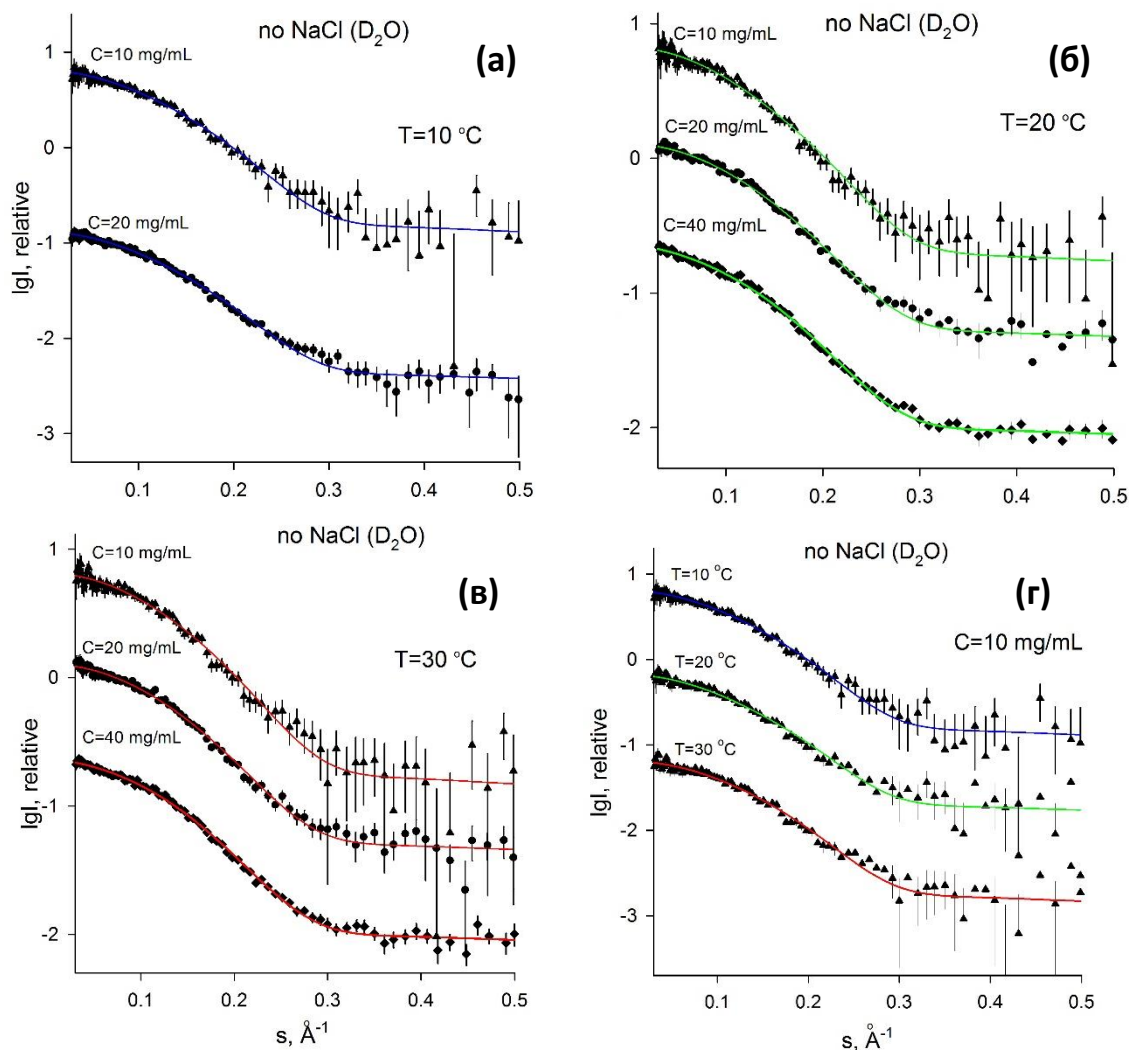


Рис.3.18 – Экспериментальные данные МУРН и подгонки в OLIGOMER для образцов без NaCl. Маркеры и цвета такие же, как на Рис.3.17.

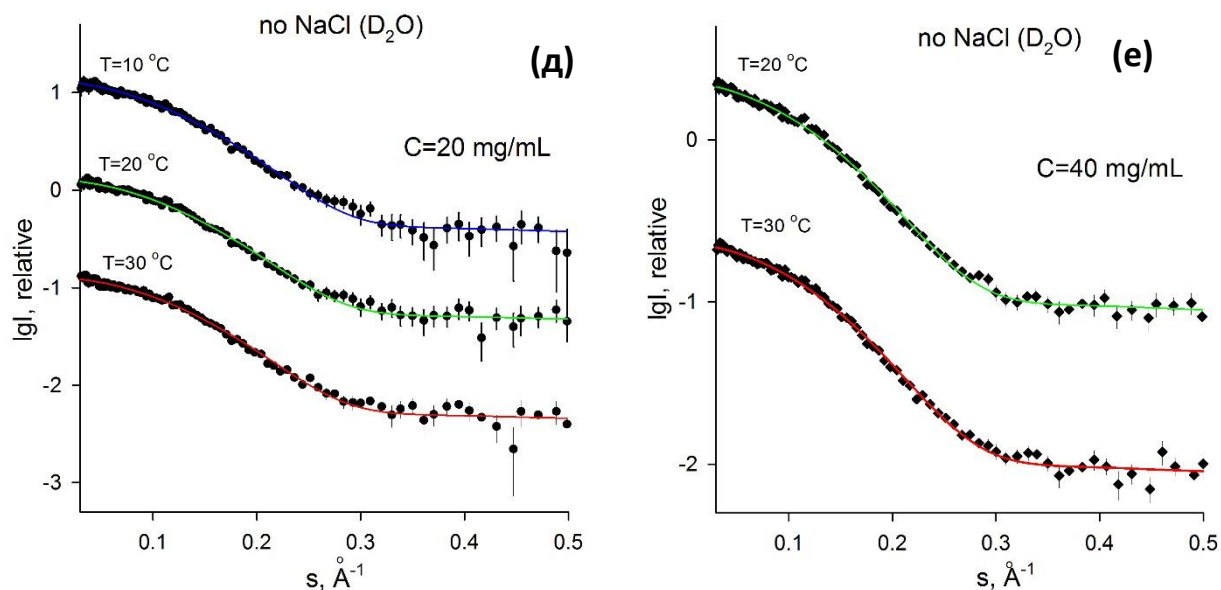


Рис.3.18 (продолжение).

Сводные данные по рассчитанным параметрам приведены в Табл. 3.6. Экспериментальные значения радиуса R_g находятся между теоретическими значениями для мономера и октамера из кристаллографической структуры лизоцима (11,6 и 31,3 Å соответственно), что указывает на образование олигомерной смеси в растворе. Графики Гинье показывают отклонения от линейного характера (как видно из неслучайных осцилляций невязки между экспериментальными данными и подгонкой Гинье на Рис.3.19), что также свидетельствует о гетерогенном составе раствора.

Табл. 3.6 – Сводные данные по структурным параметрам растворов лизоцима, полученные по данным МУРН.

NaCl25, 25 мг/мл NaCl.

С (мг/мл)	Т (°C)	Буфер	R_g , (Å)	MW (кДа)
10	10	D ₂ O, NaCl25	18.2 ± 0.2	20 ± 3
10	20	D ₂ O, NaCl25	15.4 ± 0.2	16 ± 3
10	30	D ₂ O, NaCl25	13.0 ± 0.2	15 ± 3
20	10	D ₂ O, NaCl25	21.7 ± 0.2	19 ± 3
20	20	D ₂ O, NaCl25	21.0 ± 0.2	21 ± 3
20	30	D ₂ O, NaCl25	18.1 ± 0.2	18 ± 3
40	10	D ₂ O, NaCl25	20.5 ± 0.2	26 ± 3
40	20	D ₂ O, NaCl25	23.2 ± 0.2	27 ± 3
40	30	D ₂ O, NaCl25	21.5 ± 0.2	23 ± 3
10	10	D ₂ O	13.1 ± 0.2	15 ± 3
10	20	D ₂ O	12.9 ± 0.2	15 ± 3

10	30	D ₂ O	12.3 ± 0.2	16 ± 3
20	10	D ₂ O	13.1 ± 0.2	15 ± 3
20	20	D ₂ O	12.2 ± 0.2	15 ± 3
20	30	D ₂ O	11.9 ± 0.2	15 ± 3
40	20	D ₂ O	13.6 ± 0.2	14 ± 3
40	30	D ₂ O	12.8 ± 0.2	14 ± 3

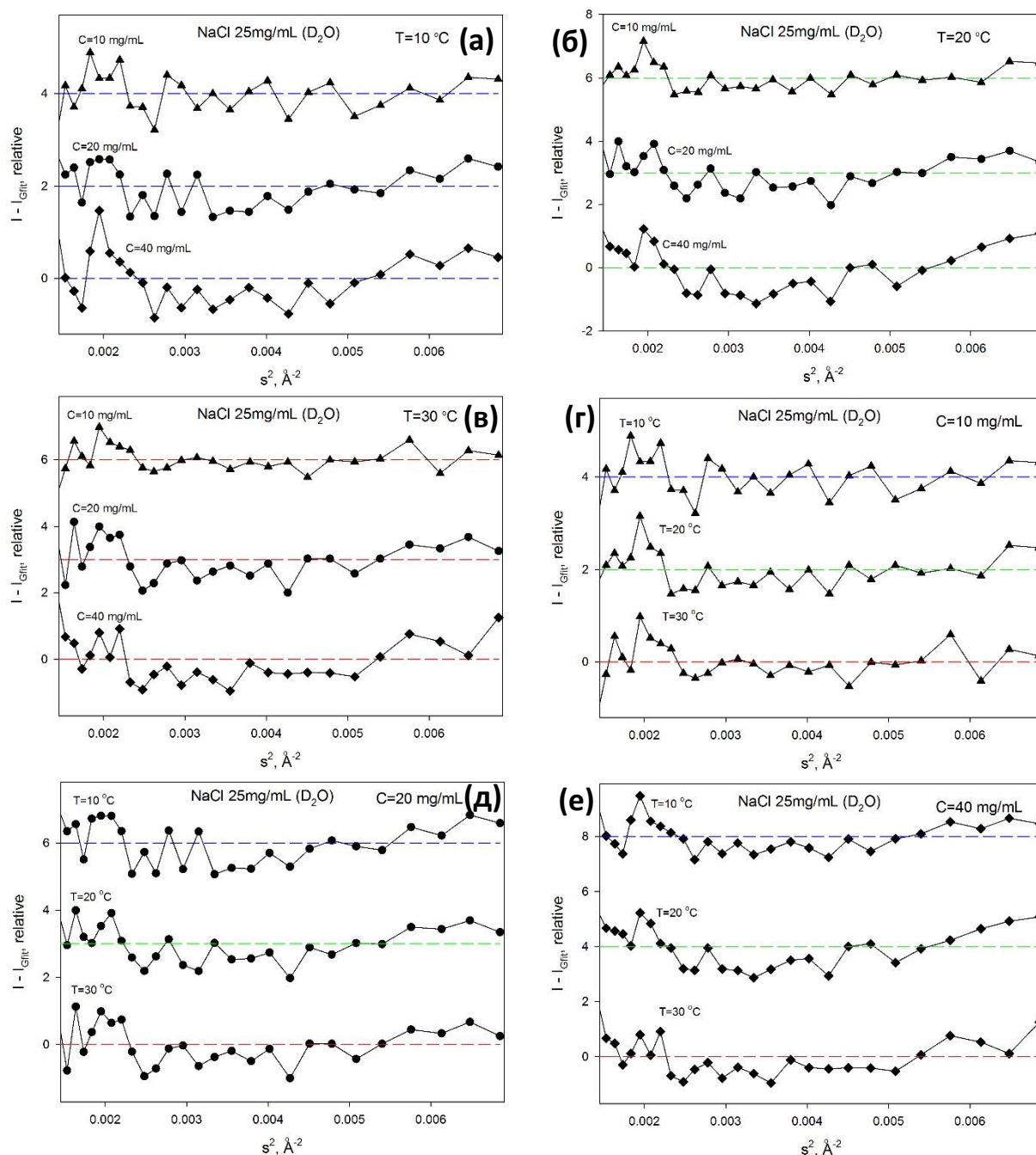


Рис.3.19 – Разностные графики между экспериментальными данными и аппроксимацией Гинье для растворов лизоцима с NaCl при различных концентрациях и температурах. Маркеры и цвета такие же, как на рис. 2 и 3. Неслучайные отклонения разностных графиков (отчетливо видно при 20 и 40 мг/мл) свидетельствуют о гетерогенном олигомерном составе растворов.

Чтобы охарактеризовать неоднородные составы растворов, был проведен анализ кривых рассеяния путем сингулярного разложения (SVD) с использованием модуля SVDPLOT программы PRIMUS [388]. В результате SVD были идентифицированы три выделенных сингулярных значения, соответствующих трем неслучайно осциллирующим сингулярным векторам (Рис.3.20).

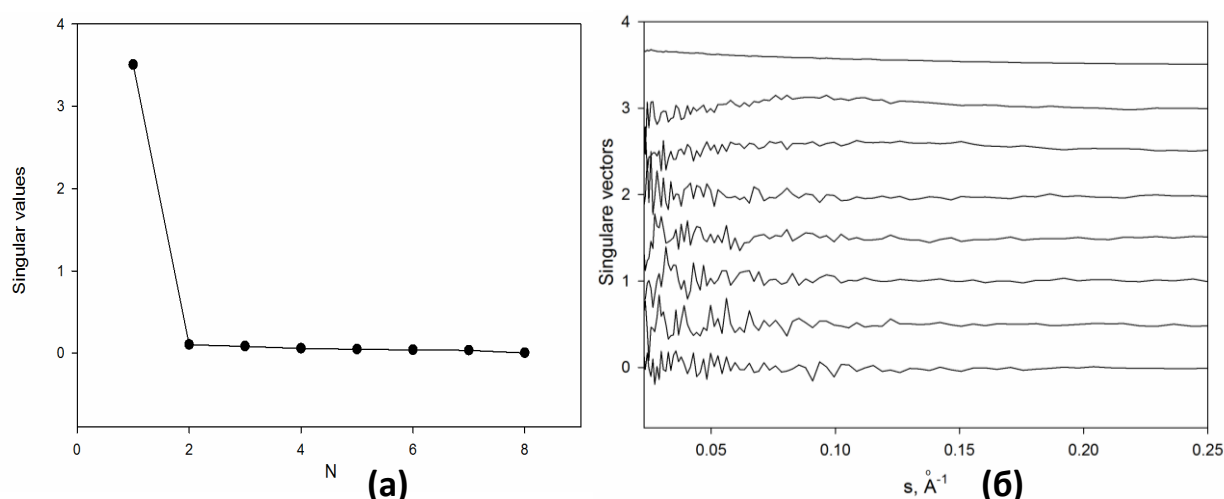


Рис.3.20 – Сингулярное разложение данных МУРН при различных температурах и концентрациях с NaCl. (а) – сингулярные значения, отсортированные по убыванию; (б) – соответствующие сингулярные векторы. Было найдено только три неслучайно осциллирующих сингулярных вектора (первые три вектора сверху вниз). Это говорит о том, что система может быть описана тремя независимыми компонентами, что подтверждает наш выбор трех типов олигомеров (мономеров, димеров и октамеров) для моделирования данных МУРН.

По результатам SVD экспериментальные данные, полученные в диапазоне концентраций от 10 до 40 мг/мл и температур от 10 до 30 ° С, были обработаны с использованием OLIGOMER [388]. В этом подходе линейная комбинация теоретических кривых рассеяния от нескольких компонентов (то есть мономеров, димеров, тетрамеров, гексамеров и октамеров) используется для наилучшей аппроксимации экспериментальных данных. Результаты анализа OLIGOMER представлены в Табл. 3.7 и на Рис.3.17, 3.18 (кривые с наилучшим совпадением, полученные с использованием программы OLIGOMER отображаются сплошными линиями). Притяжение в

межчастичных взаимодействиях наблюдается для данных при низких и средних концентрациях; однако ожидается, что их влияние на расчетные значения объемных долей составит менее 3 – 5 % от рассчитанных неопределенностей.

Табл. 3.7 – Олигомерные составы растворов лизоцима, полученные с помощью программы OLIGOMER, и соответствующие значения χ^2 обработки данных МУРН.

Наименьшие значения χ^2 были получены с использованием смеси мономеров, димеров и октамеров. Для сравнения также приведены значения χ^2 (МДТ), соответствующие обработке с использованием смеси мономеров, димеров и тетрамеров. Объемные доли мономеров, димеров и октамеров приведены в процентах. NaCl25, 25 мг/мл NaCl.

C (mg ml ⁻¹)	T (°C)	Буфер	χ^2	χ^2 (МДТ)	Мономер, %	Димер, %	Октамер, %
10	10	D ₂ O, NaCl25	0.49	0.51	79.8 ± 3.0	17.3 ± 3.0	2.9 ± 1.0
10	20	D ₂ O, NaCl25	0.43	0.43	84.1 ± 3.0	14.9 ± 3.0	1.0 ± 0.5
10	30	D ₂ O, NaCl25	0.41	0.41	88.8 ± 3.0	11.2 ± 3.0	0
20	10	D ₂ O, NaCl25	0.88	1.02	83.3 ± 3.0	9.6 ± 3.0	7.0 ± 1.0
20	20	D ₂ O, NaCl25	1.03	1.18	90.7 ± 3.0	3.0 ± 1.5	6.2 ± 1.0
20	30	D ₂ O, NaCl25	0.64	0.69	90.5 ± 3.0	6.2 ± 2.0	3.2 ± 1.0
40	10	D ₂ O, NaCl25	1.06	1.07	87.8 ± 3.0	5.2 ± 2.0	7.0 ± 1.0
40	20	D ₂ O, NaCl25	0.61	1.00	88.8 ± 3.0	1.4 ± 0.5	9.6 ± 1.0
40	30	D ₂ O, NaCl25	0.60	0.87	92.9 ± 3.0	0	7.0 ± 1.0
10	10	D ₂ O	0.39	0.39	90.1 ± 3.0	9.8 ± 3.0	0
10	20	D ₂ O	0.48	0.48	89.0 ± 3.0	10.9 ± 3.0	0
10	30	D ₂ O	0.48	0.48	93.4 ± 3.0	6.6 ± 2.0	0
20	10	D ₂ O	0.56	0.56	91.1 ± 3.0	8.6 ± 3.0	0
20	20	D ₂ O	0.60	0.60	93.6 ± 3.0	6.3 ± 2.0	0
20	30	D ₂ O	0.64	0.64	95.6 ± 3.0	4.3 ± 2.0	0
40	20	D ₂ O	0.80	0.83	99.0 ± 3.0	0	0.9 ± 0.5
40	30	D ₂ O	0.64	0.65	99.3 ± 3.0	0	0.6 ± 0.3

Было обнаружено, что растворы лизоцима в исходном буфере D₂O содержат только два типа олигомеров (преимущественно мономеры с незначительной долей димеров), в то время как добавление осадителя NaCl

приводит к появлению третьего компонента (олигомер более высокого порядка). Моделирование показало, что наилучшая аппроксимация данных получается в присутствии октамеров, в то время как результаты фита с учетом тетрамеров систематически хуже (т.е. более высокие значения χ^2). Это отчетливо наблюдается в области малых углов данных для образцов при 20 и 40 мг/мл (Рис.3.21).

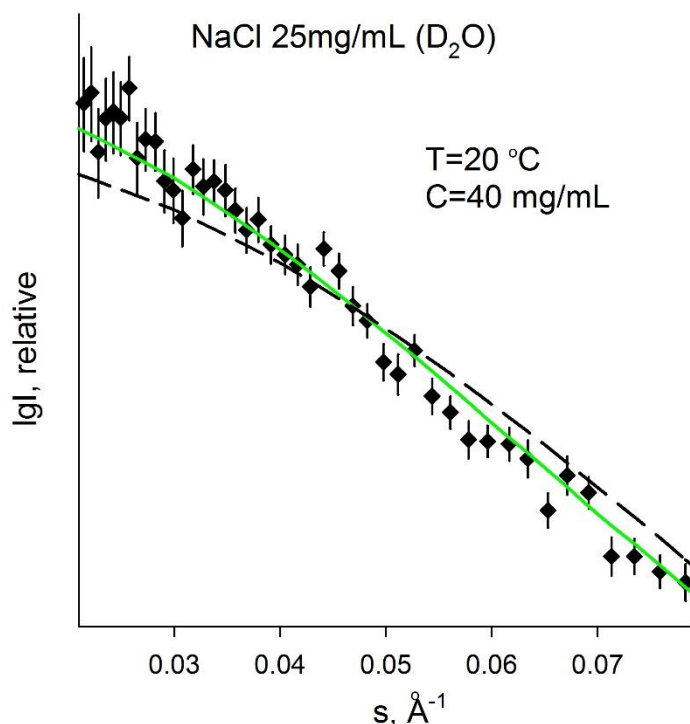


Рис.3.21 – Экспериментальные данные малоуглового рассеяния нейтронов и данные аппроксимации, полученные с помощью OLIGOMER для образцов с 25 мг/мл NaCl при $C = 40$ мг/мл и $T = 20^\circ\text{C}$. Показана часть кривой в диапазоне малых углов ($s < 0.07 \text{ \AA}^{-1}$). Штриховая (черная) кривая соответствует подгонке для смеси мономеров–димеров–тетрамеров ($\chi^2 = 1.00$); сплошная (зеленая) кривая – для смеси мономеров–димеров–октамеров ($\chi^2 = 0.61$).

Объемная доля октамеров увеличивается с увеличением концентрации белка (от 1–3% при 10 мг/мл до 7–8% при 40 мг/мл); в то же время для каждой концентрации присутствие октамеров достигает максимума при понижении температуры до 10°C . Для образцов с низкой концентрацией белка октамеры полностью исчезают.

Были проведены исследования возможного температурного индуцированного перехода лизоцима тетрагональной формы в

орторомбическую [449], и сделан вывод, что это не должно оказывать существенного влияния на результаты олигомерного моделирования. Различия находятся в пределах оценки ошибок для объемных долей, которые показаны в Табл. 3.7.

Из сравнения с данными, полученными ранее по кривым растворимости [448], можно видеть (Рис.3.22а), что в условиях ниже кривой растворимости ($C_{lys} = 10 \text{ мг мл}^{-1}$, 30°C) октамеры не обнаружены. В условиях, близких к кривой растворимости ($C_{lys} = 10 \text{ мг мл}^{-1}$, 10°C ; $C_{lys} = 10 \text{ мг мл}^{-1}$, 20°C ; $C_{lys} = 20 \text{ мг мл}^{-1}$, 30°C), образуется небольшая, но значительная доля октамеров (0,5 - 3%), однако условия для роста кристаллов все еще неблагоприятны. В условиях, далеких от кривой растворимости ($C_{lys} = 20 \text{ мг мл}^{-1}$, 20°C ; $C_{lys} = 20 \text{ мг мл}^{-1}$, 10°C ; $C_{lys} = 40 \text{ мг мл}^{-1}$, 30°C ; $C_{lys} = 40 \text{ мг мл}^{-1}$, 20°C ; $C_{lys} = 40 \text{ мг мл}^{-1}$, 10°C), объемная доля октамеров, образующихся в растворе, превышает 5%.

На Рис.3.22б показана зависимость объемной доли октамеров от температуры для разных концентраций белка в присутствии 25 мг/мл NaCl. Представлены изображения кристаллов, растущих непосредственно в измерительной ячейке из растворов при 20°C и при $t = 36 \text{ ч}$. Видно, что при увеличении концентрации белка количество и общий объем образовавшихся кристаллов белка также увеличиваются. Для каждой концентрации белка объемная доля октамеров увеличивается с понижением температуры. Исключение составляет только одна точка (температура-концентрация): 40 мг/мл при 10°C . Это противоречие объясняется тем фактом, что при высокой концентрации белка кристаллы уже образовались до измерения МУРН (вставка на Рис.3.22б). Это привело к снижению эффективной концентрации белковых молекул в растворе.

Экспериментальные данные МУРН, собранные в настоящем исследовании, подтверждают и дополняют результаты предыдущих работ, полученные методом МУРР в H_2O (Разделы 3.3.1, 3.3.2, 3.4.1).

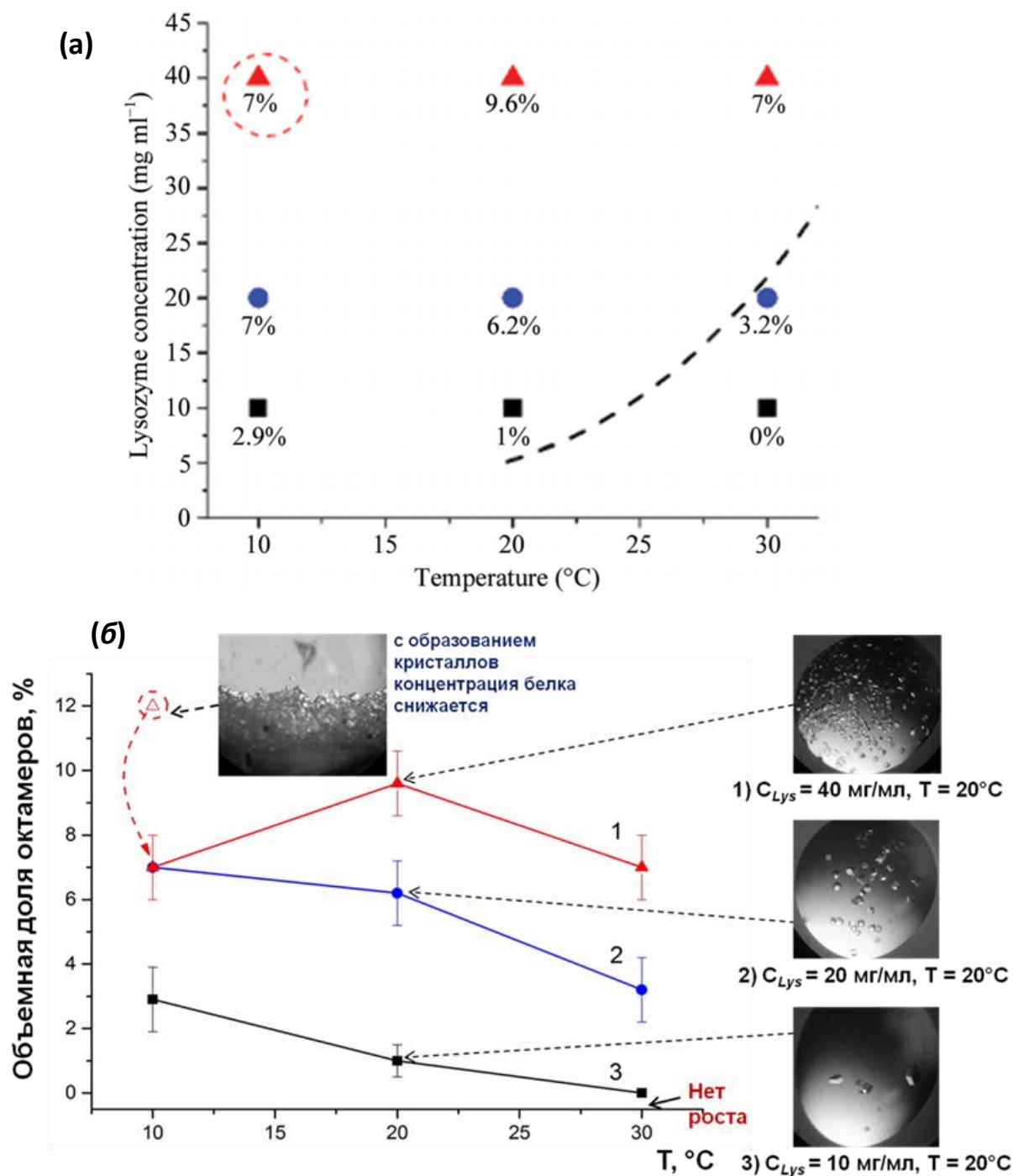


Рис.3.22 – (а) – Температурная зависимость образования октамеров лизоцима (объемная доля, %) для различных концентраций лизоцима в присутствии 25 мг/мл NaCl. Кривая растворимости лизоцима в тяжелой воде с 25 мг/мл NaCl (pD 4.75) была взята из [448] с модификацией. (б) – Зависимость объемной доли октамеров от температуры при различных начальных концентрациях белка (1, C_{lys} = 40 мг/мл; 2, C_{lys} = 20 мг/мл; 3, C_{lys} = 10 мг/мл) при добавлении 25 мг/мл NaCl. На вставках показаны фотографии кристаллов лизоцима, полученных из растворов при 20 °С. Они были сделаны непосредственно в измерительных ячейках.

В условиях роста кристаллов тетрагонального лизоцима в растворе образуются как димеры, так и октамеры. Эти олигомеры присутствуют в растворе во время кристаллизации, когда растворитель заменяется с H_2O на D_2O . Было продемонстрировано, что октамеры присутствуют на начальной стадии кристаллизации и сохраняются в растворе во время образования кристаллов.

Характер олигомеризации, наблюдаемый для лизоцима, коррелирует с оптимальными условиями кристаллизации и позволяет предположить, что октамеры образуют начальные строительные блоки в процессе кристаллизации. В этом исследовании был предложен и апробирован подход к определению условий кристаллизации, основанный на обнаружении олигомеров на ранней ее стадии. Это открытие важно для понимания механизмов кристаллизации белка, и эта методология может быть применена к другим биологическим системам. Результаты этой работы демонстрируют возможность, благодаря которой можно определить условия кристаллизации белка и разработать методы контролируемого роста для кристаллов белка и упорядоченных систем.

В результате, были проведены исследования растворов лизоцима в D_2O методом МУРН, и обнаружено образование октамеров в условиях роста кристаллов тетрагонального лизоцима, при этом объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима увеличивалась с увеличением концентрации белка и понижением температуры.

Стоит отметить, участие октамеров в качестве единиц роста кристаллов было косвенно подтверждено экспериментами по росту кристаллов лизоцима методом АСМ [211]. Было показано, что размеры единиц роста, полученные на грани (110) кластера в направлении [001], имеют размеры 3.8, 7.6 и 11.4 нм, которые представляют собой длины единиц роста, соответствующие одному, двум и трем виткам геликоидальной оси 4_3 , соответственно.

Образование октамеров лизоцима происходит в течение десятков минут, тогда как рост кристаллов белка занимает недели или месяцы. Основываясь на

данных об олигомерном составе раствора белка, можно прогнозировать наиболее благоприятные условия для роста белкового кристалла без необходимости ожидания образования кристаллов в течение длительного периода времени.

Ведутся активные исследования роли образования кластеров в процессе нуклеации ряда белковых систем, включая гемоглобин S, лизоцим, глюкозоизомеразу и инсулин [223, 450 – 452]. Ожидается, что предложенный подход будет эффективен в целях оптимизации поиска условий кристаллизации не только для указанных, преимущественно глобулярных белков, но и для белков в целом.

3.4.3. Влияние замены H_2O на D_2O . Исследования методом МУРР.

Сравнение результатов

Проведены исследование влияния замены растворителя – H_2O на D_2O – на начальную стадию кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Измерения проведены на станции BM29 BioSAXS Европейского источника синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция).

Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2.

Методики МУРР-измерений и обработки экспериментальных данных, а также описание станции BM29@ESRF представлены в Разделе 2.4.1, Главы 2).

Исследуемые образцы. Начальные концентрации лизоцима в тяжелой воде были 80, 60, 40, 20 мг/мл. Начальная концентрация NaCl в тяжелой воде была 50 мг/мл. Перед проведением измерений методом МУРР растворы лизоцима и NaCl смешивали друг с другом в равных объемах. Концентрации лизоцима в конечных растворах были 40, 30, 20, 10 мг/мл. Концентрация NaCl в каждом растворе была 25 мг/мл.

Экспериментальные результаты. Кривые МУРР в растворе белка и белка с осадителем в D_2O при температуре 10, 20, 30°C представлены на Рис.3.23. На кривых рассеяния в чистом растворе белка в D_2O (Рис.3.23г) видно влияние межчастичной интерференции, вызванной высокими концентрациями белка (40 мг/мл). При добавлении к раствору белка осадителя влияние межчастичной интерференции уменьшается, что выражается в увеличении интенсивности рассеяния при малых углах (Рис.3.23з). Такое же изменение кривых рассеяния после добавления осадителя к чистому раствору белка наблюдалось при использовании в качестве растворителя H_2O (Раздел 3.4.1).

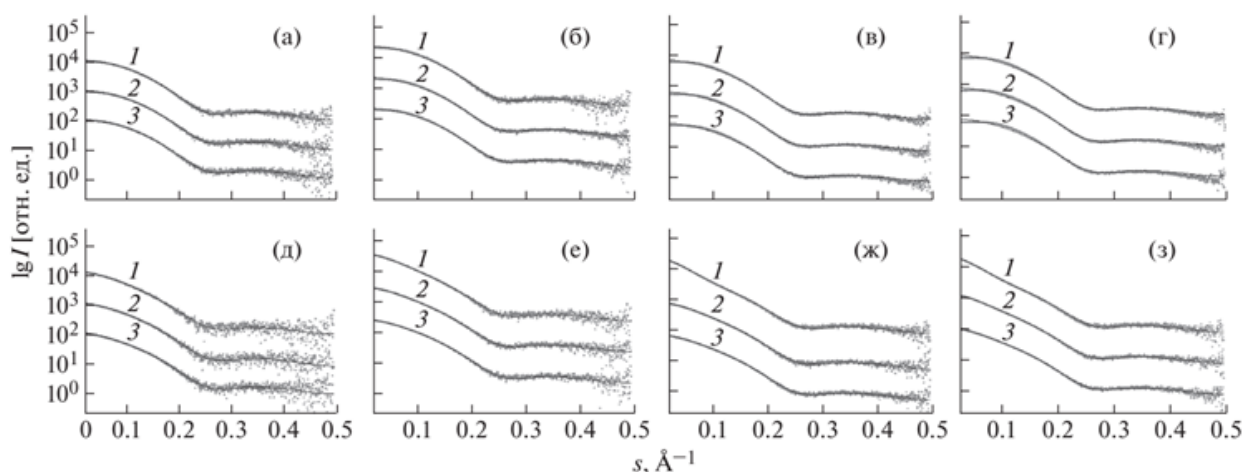


Рис.3.23 – Экспериментальные (точки) и рассчитанные в программе OLIGOMER модельные (линии) кривые МУРР в растворе: лизоцима с концентрацией белка 10 (а), 20 (б), 30 (в), 40 мг/мл (г); белка с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 10 и 25 (д), 20 и 25 (е), 30 и 25 (ж), 40 и 25 мг/мл (з) при температурах 10 (1), 20 (2) и 30°C (3). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Результат обработки экспериментальных данных Результат обработки экспериментальных данных с использованием программы OLIGOMER представлен на Рис.3.23 и в Табл. 3.8 для разных температур и концентраций белка. Рассчитанные кривые интенсивностей для растворов белка с осадителем совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне, значения невязки χ^2 не превышают 1.5 (Табл. 3.8). Для сравнения в Табл. 3.9 приведены результаты обработки кривых МУРР в кристаллизационных растворах лизоцима в случае, когда в качестве растворителя используется H_2O (Раздел 3.4.1).

Табл. 3.8 – Объемные доли олигомеров, качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 и радиусы инерции R_g , рассчитанные по начальному участку кривых при разных концентрациях белков с осадителем и в его отсутствие в D_2O .

С, мг/мл	Т, °С	Белок с осадителем						Белок без осадителя*	
		Мономер	Димер	Тетрамер	Октамер	χ^2	R_g , Å	χ^2	R_g , Å
10	30	96.0 ± 0.8	2.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.1	0.68	19.13	2.04	14.35

	20	93.1 ± 0.9	5.8 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	0.73	18.99	2.1	14.35
	10	89.2 ± 1.1	9.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.1	0.69	20.19	2.55	14.36
20	30	93.2 ± 0.5	5.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.1	0.73	19.92	23.62	14.34
	20	88.9 ± 0.5	8.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.1	0.81	21.31	26.05	14.34
	10	83.5 ± 0.7	12.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0	4.2 ± 0.1	0.93	23.45	5.85	14.34
30	30	92.0 ± 0.4	5.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.1	0.8	21.39	78.93	14.33
	20	87.9 ± 0.5	8.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.4 ± 0.1	0.94	22.65	85.13	14.33
	10	81.7 ± 0.6	11.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	7.2 ± 0.1	1.52	25.75	77.72	14.34
40	30	91.2 ± 0.3	5.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.1	1.07	22.81	223.32	14.32
	20	85.7 ± 0.4	8.7 ± 0.2	0.0 ± 0.0	5.6 ± 0.1	1.46	24.77	181.21	14.32
	10	82.8 ± 0.5	4.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	12.9 ± 0.1	5.39	28.45	194.6	14.33
* 100% мономеров; остальные олигомеры отсутствуют.									

Табл. 3.9 – Объемные доли олигомеров, качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 и радиусы инерции R_g , рассчитанные по начальному участку кривых при разных концентрациях белков с осадителем и в его отсутствие в H_2O .

С, мг/мл	Т, °С	Белок с осадителем						Белок без осадителя*	
		Мономер	Димер	Тетрамер	Октамер	χ^2	R_g , Å	χ^2	R_g , Å
20	30	96.1 ± 0.3	2.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.4 ± 0.1	0.81	19.24	19.83	14.33
	20	92.7 ± 0.4	5.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1	0.87	19.65	19.94	14.34
	10	87.3 ± 0.4	9.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1	1.23	22.04	19.37	14.34
40	30	94.7 ± 0.3	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.1	1.11	20.98	148.31	14.32
	20	90.6 ± 0.2	6.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.1	1.26	22.31	176.97	14.32
	10	83.5 ± 0.3	9.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	6.9 ± 0.1	3.57	25.64	127.13	14.33
60	30	95.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3	2.5 ± 0.1	1.22	21.91	452.98	14.31
	20	88.8 ± 0.2	6.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	5.1 ± 0.1	1.99	24.4	490.26	14.31
	10	84.9 ± 0.2	3.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	11.4 ± 0.1	16.97	28.02	364.82	14.32
* 100% мономеров; остальные олигомеры отсутствуют.									

На Рис.3.24а представлены зависимости концентрации октамеров лизоцима в растворах H_2O и D_2O от концентрации белка для трех температур: 10, 20 и 30°C. Для наглядности на Рис.3.24б также представлены зависимости

концентрации октамеров лизоцима в растворах H_2O и D_2O (Рис.3.25) от температуры для разных концентраций белка.

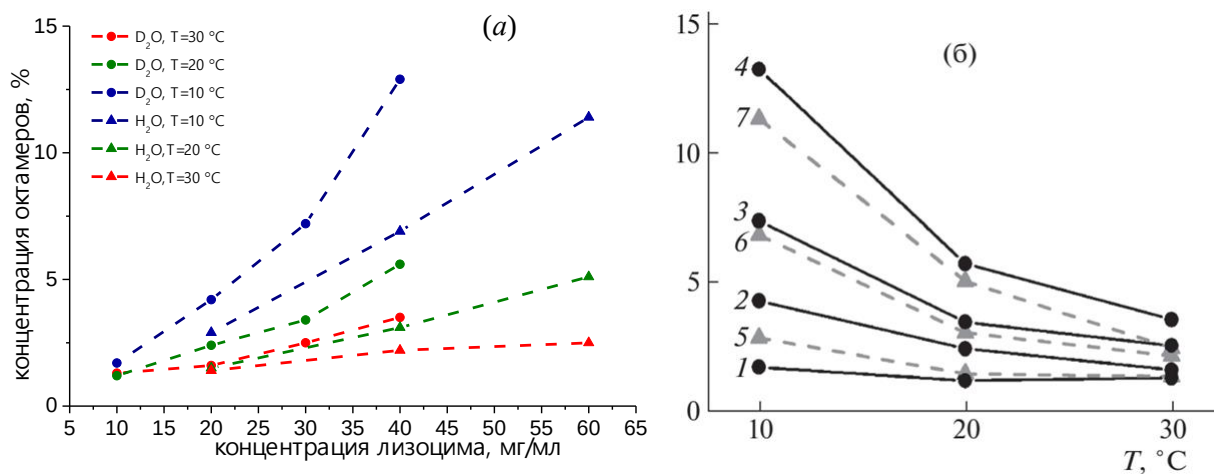


Рис.3.24 – Зависимость концентрации октамеров лизоцима: а – от концентрации белка при 30 (красный), 20 (зеленый) и 10 °C (синий) в растворах D_2O (кружки) и H_2O (треугольники); б – от температуры при концентрациях белка 10 (1), 20 (2, 5), 30 (3), 40 (4, 6), 60 мг/мл (7) в растворах D_2O (1–4) и H_2O (5–7).

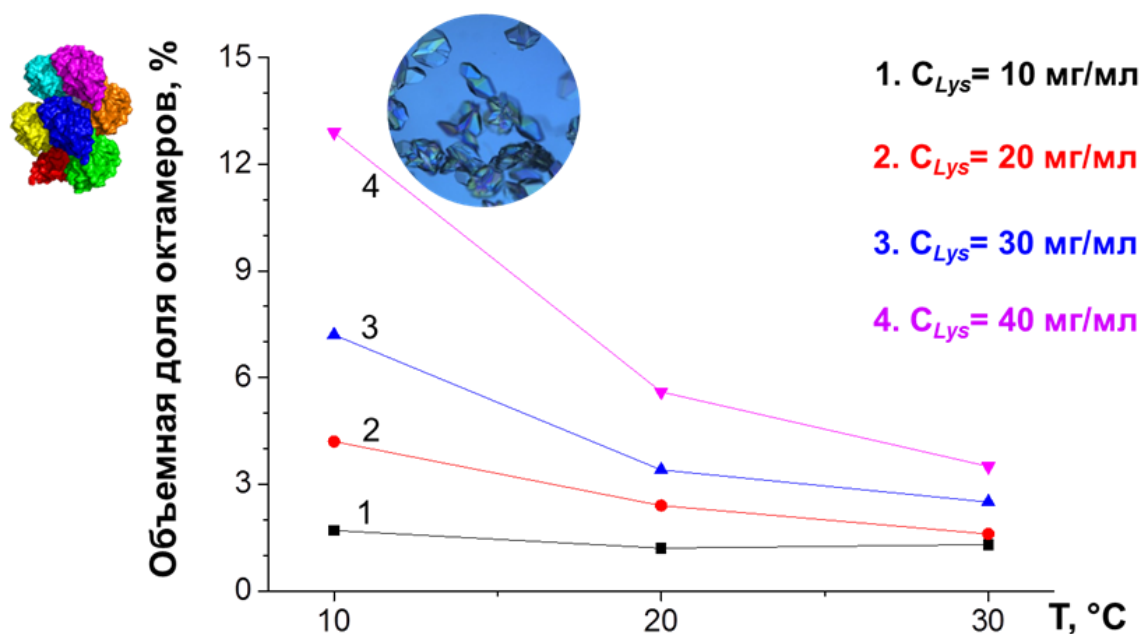


Рис.3.25 – Зависимость доли октамеров лизоцима от температуры при концентрациях белка 10 (1), 20 (2), 30 (3), 40 (4) в растворах D_2O .

Для двух типов растворителя (H_2O и D_2O) показано, что при всех значениях концентраций в кристаллизационных растворах помимо мономеров образуются димеры и октамеры. Процентное содержание октамеров в кристаллизационном растворе увеличивается с ростом концентрации белка и понижением температуры. Однако замена растворителя – H_2O на D_2O – приводит к увеличению процентного содержания октамеров в растворе при прочих равных условиях (Рис.3.26, 3.27). Полученные данные согласуются с результатами (Раздел 3.4.2) исследования начальной стадии кристаллизации лизоцима методом МУРН, когда в качестве растворителя также использовали D_2O . Незначительное расхождение концентраций октамеров, образующихся на начальной стадии кристаллизации, определенное двумя различными методами – МУРР и МУРН, обусловлено, по-видимому, существенным различием времен измерения. В экспериментах методом МУРН от момента смешивания растворов и установления температуры до начала измерений проходило 5 – 7 часов. Каждое измерение длилось 1 час. Такая длительность экспериментов привела, в частности, к тому, что в условиях высокой концентрации (40 мг/мл) и низкой температуры (10 °C) (Рис.3.26) к концу измерений в кювете образовались кристаллы (данная точка обведена пунктиром на Рис.3.22б).

Влияние времени измерений на количество образовавшихся октамеров видно при сопоставлении данных, представленных на Рис.3.26. При одинаковой температуре и концентрации в случае исследований методом МУРН наблюдается большее количество октамеров. Исключение составляет лишь точка, соответствующая концентрации 10 мг/мл и температуре 30°C (Рис.3.26, справа), которая лежит ниже кривой растворимости. Для данной точки меньшее количество октамеров, обнаруженное в ходе исследований растворов методом МУРН, объясняется опять же большим временем выдерживания исследуемого раствора при температуре 30°C, за которое успели диссоциировать все октамеры, образовавшиеся при комнатной температуре при приготовлении раствора белка с осадителем. Некоторое

влияние на различие полученных данных могло оказать и существенное различие объемов (в 100 раз) измерительных ячеек.

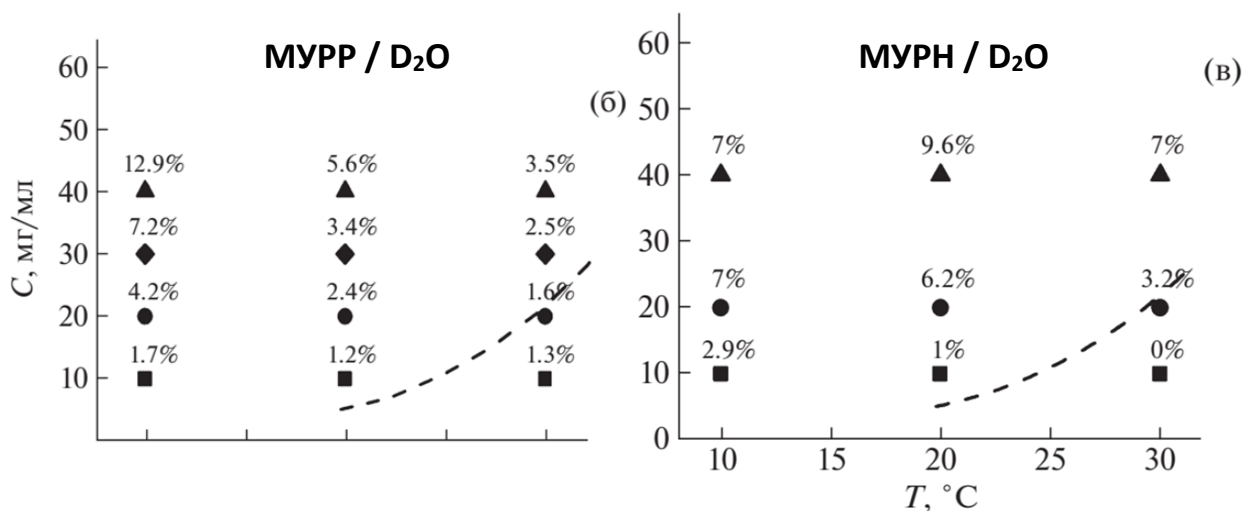


Рис.3.26 – Температурные зависимости количества октамеров (объемные доли, %), образовавшихся в растворе, для разных концентраций лизоцима в присутствии NaCl (25 мг/мл), определенные методом: (б) – МУРР в случае растворителя D₂O; (в) – МУРН в случае растворителя D₂O (Раздел 3.4.2). Кривые растворимости лизоцима в тяжелой (pD 4.75) и обычной (pH 4.6) воде в присутствии 25 мг/мл NaCl построены на основании данных [448].

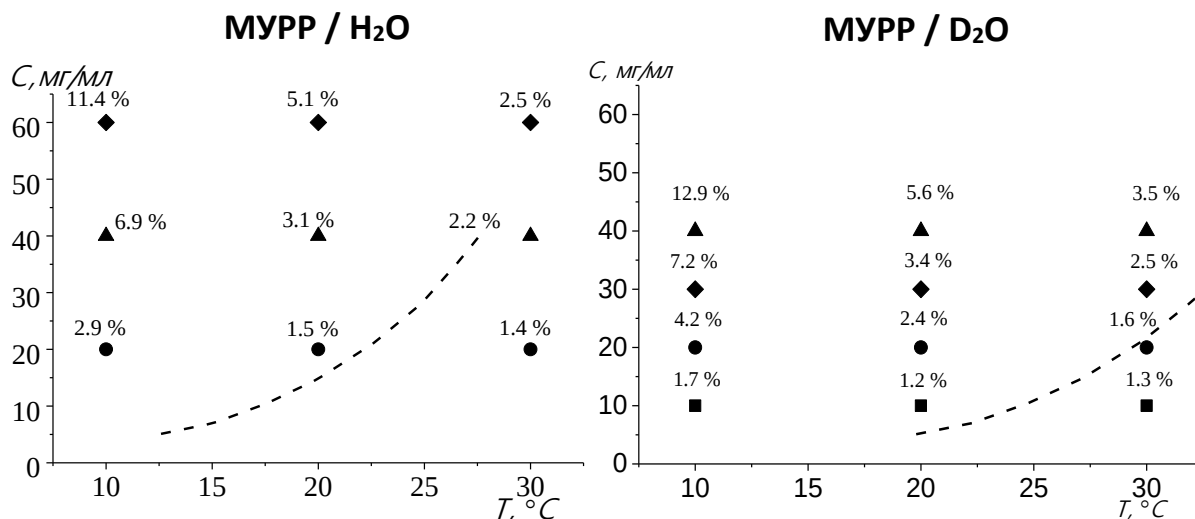


Рис.3.27 – Температурные зависимости количества октамеров (объемные доли, %), образовавшихся в растворе, для разных концентраций лизоцима в присутствии NaCl (25 мг/мл), определенные методом: а – МУРР в случае растворителя H₂O (Раздел 3.4.1), б – МУРР в случае растворителя D₂O. Кривые растворимости лизоцима в тяжелой (pD 4.75) и обычной (pH 4.6) воде в присутствии 25 мг/мл NaCl построены на основании данных [448].

Сопоставление полученных результатов исследования начальной стадии кристаллизации лизоцима показало, что температура и концентрация белка оказывают одинаковое влияние на начальную стадию кристаллизации и образование октамеров как в случае H_2O , так и D_2O . Замена растворителя оказывает существенное влияние на начальную стадию кристаллизации, приводя к увеличению процентного содержания октамеров. Для различных концентраций белка изменение количества октамеров в растворе при замене H_2O на D_2O аналогично изменению температуры примерно на 10°C . Полученный результат согласуется с результатами [448] исследования изменения растворимости лизоцима при замене H_2O на D_2O .

Несмотря на то, что методы МУРР и МУРН являются комплементарными при исследовании белковых растворов в целом и начальной стадии кристаллизации в частности, необходимо учитывать, что замена H_2O на D_2O , необходимая для повышения контраста рассеяния нейтронов, оказывает существенное влияние на состояние молекул белка в растворе, а также на начальную стадию кристаллизации. Полученные результаты показывают, что выбор растворителя (в данном случае изотопного состава воды) является одним из важных параметров при поиске условий кристаллизации белка, который необходимо учитывать. Варьируя его, можно управлять процессом кристаллизации. Также необходимо учитывать различное время проведения экспериментов, необходимое для исследования растворов методами МУРН и МУРР.

В результате исследований было изучено влияние растворителя на начальную стадию кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии. Методом МУРР показано, что при замене растворителя – обычной воды (H_2O) на тяжелую (D_2O) – на начальной стадии кристаллизации лизоцима в условиях роста кристалла так же, как и в случае растворителя H_2O , образуются димеры и октамеры.

Количество октамеров в растворе растет при повышении концентрации белка и понижении температуры. Замена растворителя приводит к

увеличению процентного содержания октамеров в растворе при прочих равных условиях. Таким образом, выбор растворителя является одним из важных параметров при подборе условий кристаллизации.

Представленные в настоящем разделе результаты позволяют более корректно сопоставлять полученные методами МУРР и МУРН данные по исследованию белковых растворов в условиях кристаллизации.

3.5. ЗАВИСИМОСТЬ ДОЛИ ОКТАМЕРОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ОСАДИТЕЛЯ NaCl

Методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) с использованием синхротронного излучения (СИ) проведены исследования состава растворов лизоцима в условиях, благоприятных для образования кристаллов тетрагональной сингонии, в зависимости от концентрации осадителя NaCl при температурах 10 и 20°C.

На Рис.3.28 показаны зависимости объемной доли октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима от концентрации NaCl , полученные при $T = 10$ и 20°C (растворитель H_2O).

В результате исследований показано, что количество октамеров растет при увеличении концентрации осадителя.

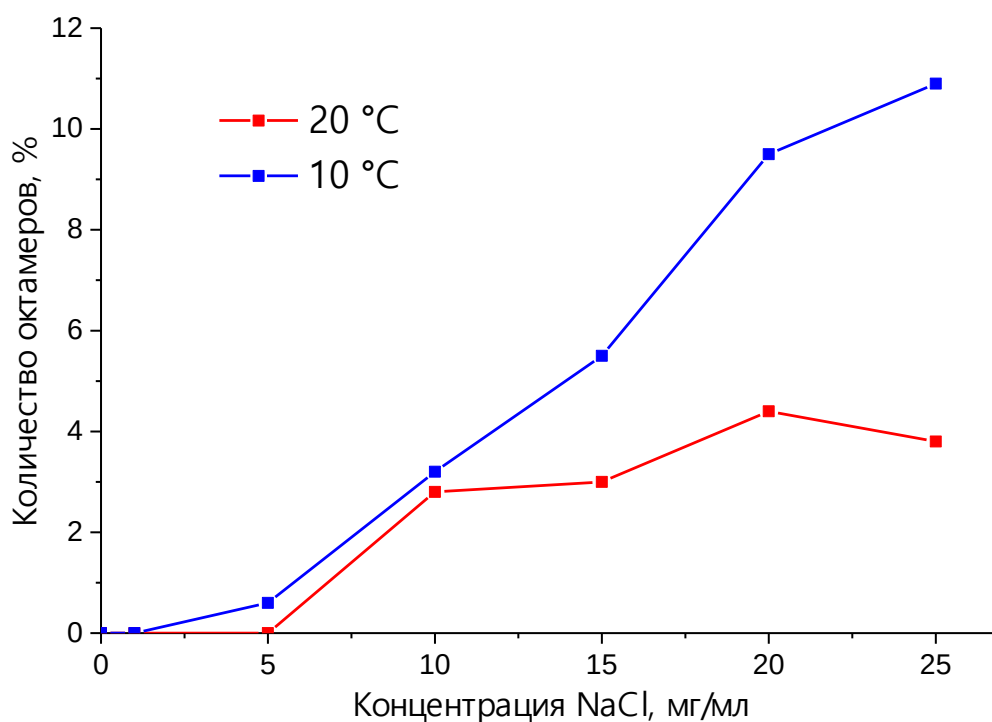


Рис.3.28 – Зависимости объемной доли октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима от концентрации NaCl , полученные при температурах 10 и 20°C (растворитель H_2O).

3.6. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ ОЛИГОМЕРОВ БЕЛКА ЛИЗОЦИМА В РАСТВОРАХ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ОКТАМЕРА

С целью определения типа октамера (А или В, Рис.3.29), образующегося в кристаллизационном растворе лизоцима, и объяснения отсутствия в растворе других олигомеров (тетрамеров, гексамеров), были проведены исследования устойчивости различных олигомеров методом молекулярной динамики (МД).

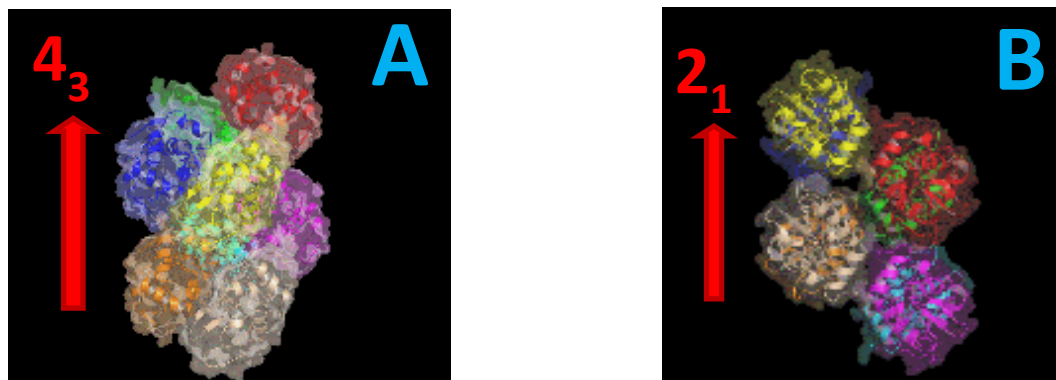


Рис.3.29 – Два типа октамеров, полученные на основе структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. Объем октамера А равен 117 нм^3 , октамера В – 140 нм^3 .

Проводилось моделирование МД октамеров лизоцима А и В в растворах с осадителем и без него при температуре 10°C . Для моделирования МД использовались исходные данные об октамерах (структура октамера, мотив кристаллической структуры) полученные, соответственно, по результатам молекулярного моделирования, описание которых приведено в Разделе 3.2.

С помощью программ COOT [397] и PyMOL [444] получены координаты двух типов октамеров. Октамеры, как видно из Рис.3.2, различаются по строению и объему. Один из них формируется путем вращения асимметричного элемента вокруг винтовой оси 4 порядка, а другой – вращением вокруг винтовой оси 2 порядка четырех димеров, связанных простой осью второго порядка.

На траектории 100 нс в присутствии и отсутствие осадителя промоделирована динамика октамеров двух типов (Рис.3.29), которые путем

трансляции образуют кристаллическую решетку кристалла лизоцима тетрагональной сингонии.

Показано, что в присутствии осадителя стабилен один из исследуемых октамеров, в то время как другой диссоциирует на составные элементы, как в присутствии, так и в отсутствие осадителя.

Полученные результаты не только подтвердили проведенные ранее измерения растворов лизоцима с осадителем NaCl методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов (см. Раздел 3.4), но и позволили установить тип октамера, образующегося в кристаллизационном растворе.

Методика моделирования молекулярной динамики описана в Разделе 2.4.3 Главы 2. Длина ребра ячейки для октамера А составляла 13.9 нм, а для октамера В – 12.7 нм.

В результате моделирования была определена МД двух октамеров белка лизоцима в растворе в присутствии и отсутствие осадителя при температуре 283 К, а также оценены времена жизни олигомеров. Критерием стабильности каждого из октамеров выбрана площадь межграничного взаимодействия каждого из мономеров (А, В, С, D, Е, F, G, H) в структурах октамеров в стартовом кристаллическом состоянии и в точке, когда происходит их диссоциация. Критерием диссоциации является исчезновение существенного взаимодействия между одной из пар молекул лизоцима. Взаимодействующие мономеры и межграничные площади для октамера типа А в начальной точке, в конечной точке (100 нс) в присутствии осадителя и в точке, где происходит диссоциация октамера в отсутствие осадителя (58 нс), приведены в Табл. 3.10.

Табл. 3.10 – *Площади границ разделов между мономерами в октамере А в кристаллическом состоянии и в результате молекулярной динамики в воде и в растворе осадителя.*

Граница раздела	Начальная точка (0 нс), Å ²	Динамика с осадителем (100 нс), Å ²	Динамика без осадителя (58 нс), Å ²
В–А	300.6	500.2	403.1
F–Е	264.5	348.7	375.7
С–В	263.1	310.9	404.1

G–E	263.1	467.5	341.2
F–D	263.6	321.2	
H–G	264.0	364.6	391.8
D–C	264.0	360.9	466.8
D–A	165.2	92.8	
H–F	165.2	209.8	233.3
E–C	165.4	169.2	
F–B	165.3	156.0	
G–D	165.1	227.4	
E–B	26.3	85.6	
G–C	25.8		
F–A	25.7	69.1	
H–D	26.1		
H–E		7.9	4.7
G–F		3.6	

Для расчета площади границ разделов использовалась программа PISA [453]. Из Табл. 3.10 видно, что без осадителя ряд существенных взаимодействий между мономерами (а именно F–D, D–A, H–C, F–B и G–D) отсутствует после 58 нс. При этом для октамера А с осадителем отмечается сохранение всех существенных границ разделов, стабилизирующих олигомер. Взаимодействующие мономеры и площади границ разделов для октамера типа В в начальной точке и в точках его диссоциации в присутствии и в отсутствие осадителя (36 и 26 нс, соответственно) приведены в Табл. 3.11.

Табл. 3.11 – *Площади границ разделов между мономерами в октамере В в кристаллическом состоянии и в результате молекулярной динамики в воде и в растворе осадителя.*

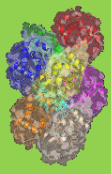
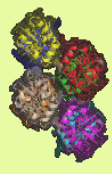
Граница раздела	Начальная точка (0 нс), Å ²	Динамика с осадителем (36 нс), Å ²	Динамика без осадителя (26 нс), Å ²
G–E	552.0	673.5	654.1
C–A	552.0		
F–D	551.7	546.0	530.9
H–B	551.7	539.3	648.8
F–C	370.6		291.9
E–B	370.6	325.7	356.2

G–D	369.8	307.4	
H–F	63.3		
E–A	64.0		
H–D	26.3		
G–A	25.7		
F–B	25.8		
E–C	26.1	157.3	
B–A		225.2	
H–D		164.1	
H–G		97.2	

Из Табл. 3.11 видно, что для октамера В как в присутствии, так и в отсутствие осадителя наблюдается разрушение существенных взаимодействий. В присутствии осадителя возникают дополнительные взаимодействия, характерные для октамера типа А (В–А, Н–G).

Проведенные расчеты позволили не только проверить результаты исследования раствора лизоцима с помощью малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и малоуглового рассеяния нейтронов, но и определить тип олигомера в предкристаллизационном растворе лизоцима, чего не удалось сделать в экспериментах МУРР и МУРН. Ниже приведена сводная Табл. 3.12, в которой представлены времена жизни олигомеров лизоцима в водном растворе при температуре $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Табл. 3.12 – Времена жизни олигомеров лизоцима в водном растворе по результатам исследования их стабильности методом молекулярной динамики.

	Время жизни, нс			
	Тип А 		Тип В 	
	Лизоцим + NaCl	Лизоцим	Лизоцим + NaCl	Лизоцим
Димер	>100	81.5	>100	>100
Тетрамер	65.5	72.5	3	1
Гексамер	30	35	70	15
Октамер	>100	58	36	26

3.7. НОВЫЙ ПОДХОД К ПОИСКУ УСЛОВИЙ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ

На основе гипотезы об образовании «единиц роста» (олигомеров, являющихся составными элементами будущей кристаллической структуры) (Раздел 3.2) в кристаллизационном растворе белка, исследований МУРР/МУРН, молекулярного моделирования и МД, описанных в настоящей главе, предложен *новый подход к поиску условий кристаллизации белков* (Рис.3.30).



Рис.3.30 – Блок-схема, иллюстрирующая предложенный подход к поиску условий кристаллизации белков.

Предложенный подход состоит в установлении взаимосвязи между параметрами раствора, образованием олигомеров в растворе и образованием кристаллов. Блок-схема, иллюстрирующая предложенный подход к поиску условий кристаллизации белков представлена на Рис.3.30.

Установление взаимосвязи между **олигомерным составом** кристаллизационного раствора и **образованием кристалла** позволит **осознанно подбирать условия кристаллизации** на основе исследования структуры раствора, сразу после добавления осадителя.

3.8. ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 3

Представлено описание результатов определения структуры растворов в условиях кристаллизации на примере белка лизоцима и механизмов влияния термодинамических параметров на процесс кристаллизации. Исследовано влияние температуры, концентрации белка, концентрации осадителя и растворителя на количество октамеров и димеров, образующихся в растворе перед началом кристаллизации. Установление взаимосвязи между олигомерным составом кристаллизационного раствора и образованием кристалла позволило разработать технологический процесс ускоренного подбора условий кристаллизации.

Было сделано предположение (гипотеза), что еще до начала образования зародышей кристалла в растворе белка при создании условий кристаллизации образуются олигомеры, являющиеся составными элементами кристалла, из которых впоследствии образуется кристалл. Эмпирическая проверка данного предположения проведена на примере изучения процесса образования кристалла лизоцима тетрагональной сингонии.

Выбраны условия (концентрация белка 40 мг/мл, осадитель - NaCl с концентрацией 25 мг/мл, температура 20°C), при которых стабильно получались достаточно крупные и совершенные кристаллы тетрагональной сингонии ($P4_32_12$ $a = b = 79.20 \text{ \AA}$, $c = 37.90 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$). Предварительный анализ данных, полученных МУРР от растворов лизоцима с добавлением осадителя, показал, что в условиях кристаллизации в растворе помимо мономеров образуются также частицы, объем которых приблизительно в 8 раз превышает объем одной молекулы.

На основе анализа структуры кристалла были предложены модели различных олигомеров, являющихся элементарными мотивами кристаллической решетки. Использование таких моделей для обработки экспериментальных данных МУРР позволило качественно и количественно определить состав полидисперсного раствора. Результаты показали, что при добавлении осадителя в растворе белка перед началом кристаллизации образуются димеры и октамеры, при этом других олигомеров не образуется. Аналогичные исследования были проведены с помощью комплементарного метода МУРН, а также на различных синхротронных станциях МУРР. Результаты всех проведенных экспериментов оказались сходны – в растворе белка с осадителем помимо мономеров наблюдалось образование димеров и около 3 – 4 % октамеров. Несколько отличаются результаты исследования растворов лизоцима методом МУРН (количество октамеров, обнаруженных в растворе, превышает 9 %), что связано с тем, что при проведении данных исследований белок растворяли в тяжелой воде, которая оказывает существенное влияние на процесс и условия кристаллизации.

Показано, что количество октамеров растет при понижении температуры и повышении концентрации белка. При этом октамеры в растворе сохраняются после образования кристаллов, непосредственно в процессе их роста, но их количество уменьшается по мере уменьшения концентрации лизоцима, находящегося в растворенном состоянии. Исследовано изменение состава раствора лизоцима в дейтерированной воде в условиях кристаллизации методом МУРР. Методом МУРР показано, что при замене растворителя – обычной воды (H_2O) на тяжелую (D_2O) – на начальной стадии кристаллизации лизоцима в условиях роста кристалла так же, как и в случае растворителя H_2O , образуются димеры и октамеры, причем количество октамеров растет при повышении концентрации белка и понижении температуры. Замена растворителя приводит к увеличению процентного содержания октамеров в растворе при прочих равных условиях.

Проведено исследование термодинамических параметров раствора белка лизоцима в условиях кристаллизации как в H_2O , так и в D_2O .

Из кристаллической решетки лизоцима тетрагональной сингонии выделить октамеры можно различным способом. Использование разных моделей октамеров для обработки данных малоуглового рассеяния приводило к результатам, которые совпадали в пределах ошибки.

Для определения типа октамера, который образуется в растворе, а также объяснения того факта, что в растворе не наблюдается других олигомеров, были проведены исследования устойчивости различных олигомеров в использованных условиях методом молекулярной динамики.

На траектории 100 нс в присутствии и отсутствии осадителя выполнено моделирование поведения октамеров двух возможных типов, которые путем трансляции образуют кристаллическую решетку кристалла лизоцима тетрагональной сингонии.

Показано, что в присутствии осадителя стабилен октамер типа А, в то время как октамер типа Б диссоциирует как в присутствии, так и в отсутствии осадителя. Также промоделировано поведение тетрамеров, гексамеров и димеров различного типа. Показано, что даже в присутствии осадителя тетрамеры и гексамеры различных типов диссоциируют на составляющие, а димеры устойчивы.

На основе гипотезы об образовании «единиц роста» (олигомеров, являющихся составными элементами будущей кристаллической структуры) в кристаллизационном растворе и результатов исследований, описанных в настоящей главе, предложен новый подход к поиску условий кристаллизации белков. Такой подход лег в основу нового способа определения условий кристаллизации [454].

ГЛАВА 4. Определение роли ионов осадителя в механизме кристаллизации белков по результатам исследований структуры растворов, кристаллов лизоцима и моделирования молекулярной динамики

4.1. АННОТАЦИЯ К ГЛАВЕ 4

Настоящая глава посвящена описанию результатов исследований роли ионов осадителя в механизме кристаллизации белков по результатам исследований структуры растворов и кристаллов лизоцима, а также моделирования молекулярной динамики.

В Разделе 4.2 представлены результаты исследования влияния ионного состава осадителя (NaCl , KCl , LiCl , NiCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2) на структуру кристаллизационных растворов лизоцима – на количество октамеров и димеров, образующихся в растворе на начальной стадии кристаллизации.

Раздел 4.3 посвящен результатам исследований взаимодействия ионов (металлов и хлора осадителей NaCl , KCl , LiCl , NiCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2) с молекулами лизоцима и определению их роли в образовании кристалла тетрагональной сингонии. На основе структурных данных РСА, полученных с высоким разрешением ($1.35 \text{ \AA}$), определена атомарная структура молекул лизоцима с учетом позиций ионов осадителя, что позволило уточнить структуру моделей мономеров и олигомеров в кристаллизационных растворах для моделирования молекулярной динамики, а также проанализировать связи в молекуле лизоцима при встраивании ионов осадителя в ее структуру с целью определения их роли в процессе кристаллизации.

В Разделе 4.4 представлены результаты исследования температурной зависимости стабильности мономеров и олигомеров лизоцима в кристаллизационном растворе, полученные методом молекулярной динамики.

4.2. ЗАВИСИМОСТЬ ДОЛИ ОКТАМЕРОВ И ДИМЕРОВ ОТ КАТИОНА ОСАДИТЕЛЯ

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния исследовано влияние типа катиона осадителя в ряду хлоридов (NaCl , KCl , LiCl , NiCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2) на структуру растворов лизоцима в условиях, благоприятных для роста кристаллов тетрагональной сингонии.

Измерения проведены на станции BM29 BioSAXS Европейского источника синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция). Методики МУРР-измерений и обработки экспериментальных данных, а также описание станции BM29@ESRF представлены в Разделе 2.4.1, Главы 2).

Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2.

Исследуемые образцы. В настоящей работе начальная концентрация в растворе белка – 40 мг/мл, начальные концентрации всех солей в растворах – 0.4, 0.2 и 0.1 М. Перед проведением измерений методом МУРР растворы лизоцима и солей смешивали друг с другом в равных объемах. Таким образом, концентрация лизоцима во всех растворах была 20 мг/мл, а осадителя – 0.2, 0.1 и 0.05 М. Первоначально образцы нагревались до 20°C, затем температура понижалась до 10°C.

Экспериментальные результаты. Для всех используемых осадителей определение структуры раствора лизоцима проводилось одинаковым образом. Ниже приведено описание характеристики образования олигомеров в растворе лизоцима на примере осадителя KCl .

В отсутствие осадителя часть кривой МУРР в области начальных углов ($s < 0.05 \text{ \AA}^{-1}$) не может быть хорошо аппроксимирована (фитирована) в случае идеальных невзаимодействующих мономеров (Рис.4.1, пунктирная линия; качество подгонки $\chi^2 = 19.94$, что неприемлемо), и, по-видимому, на них оказывает влияние сильное отталкивание. При рассмотрении отталкивающих взаимодействий между мономерами в рамках приближения Перкуса-Ивика для потенциала твердых сфер [455] удалось аппроксимировать всю кривую

рассеяния (Рис.4.1, сплошная линия; $\chi^2 = 1.48$). Таким образом, в чистом растворе лизоцима присутствовали только мономеры.

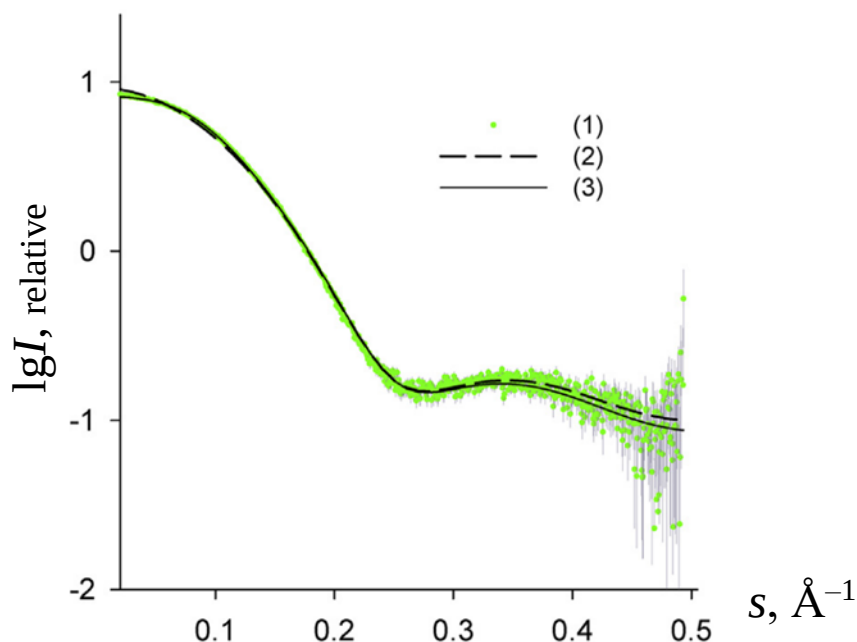


Рис.4.1 – Экспериментальная кривая МУРР (зеленые точки), аппроксимация в случае идеальных невзаимодействующих мономеров (пунктирная черная линия) и для системы отталкивающихся мономеров (сплошная черная линия) в чистом растворе лизоцима (в отсутствие осадителя).

Добавление KCl к раствору лизоцима приводило к росту кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в условиях, рассмотренных в данном исследовании. Предполагалось, что в этом случае, как и при добавлении NaCl (Глава 3), структура раствора белка изменяется уже на ранней стадии кристаллизации. Добавление осадителя должно изменять тип взаимодействия между молекулами лизоцима – отталкивание на притяжение, что в свою очередь приводит к образованию димеров и октамеров. Чтобы подтвердить это предположение и уточнить условия подготовки растворов исследовались растворы чистого белка в буфере с добавлением или без добавления осадителя KCl. Изменения в структуре раствора белка контролировались с течением времени после добавления KCl.

На Рис.4.2 (а) показаны экспериментальные кривые МУРР (цветные линии) растворов лизоцима/KCl с концентрациями белка и соли 20 мг/мл и 0.2 М, соответственно. Данные МУРР раствора были получены как функция от времени при 0, 100 и 170 мин. Время отсчитывалось от начала смешивания растворов.

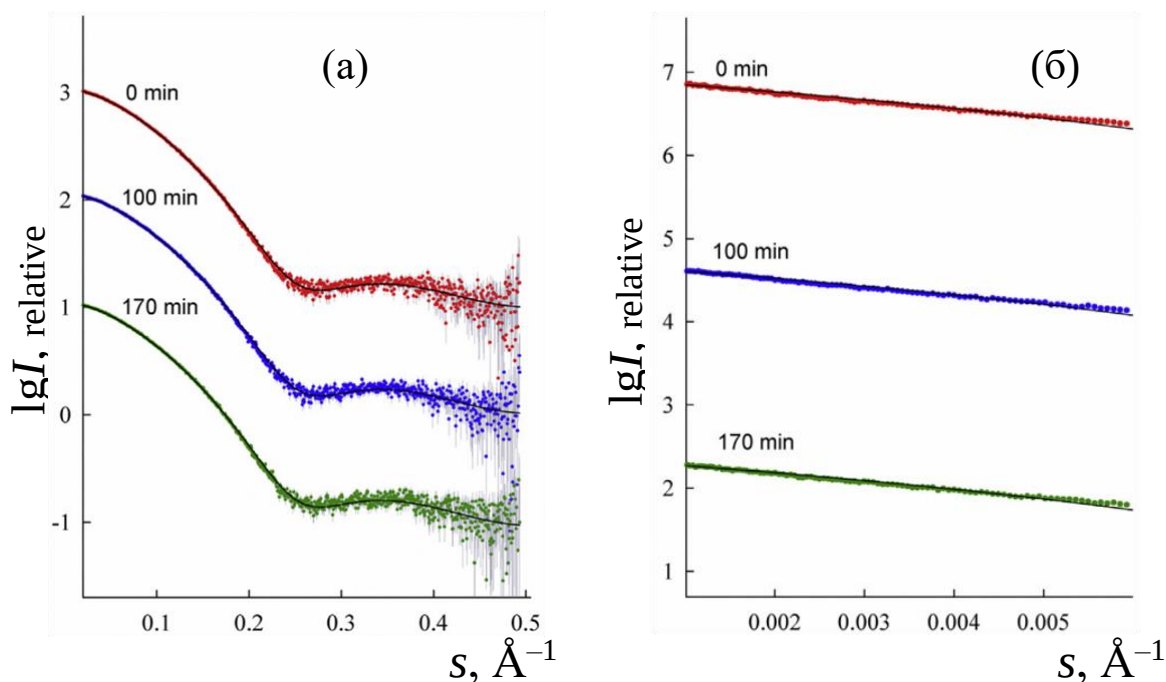


Рис.4.2 – (а) Экспериментальные кривые МУРР (цветные линии) и аппроксимация (фит) кривых рассеяния, рассчитанных с использованием программы OLIGOMER (черные линии), растворов лизоцим/KCl в зависимости от времени – через 0, 100 и 170 мин после смешивания растворов. Кривые смещены вдоль вертикальной оси для наглядности. (б) графики Гинье МУРР раствора лизоцим/KCl. Обозначения и цвета аналогичны (а).

На Рис.4.2 (б) показаны графики Гинье, соответствующие приведенным выше кривым. Линейная характер графика Гинье обычно указывает на монодисперсность раствора. Однако в нашем случае мы наблюдали значительные отклонения зависимостей от линейного характера, что указывает на наличие гетерогенных частиц в растворе.

Для описания гетерогенного состава раствора в виде смеси мономеров, димеров, тетрамеров, гексамеров и октамеров лизоцима была использована программа OLIGOMER. Наилучшая аппроксимация кривых рассеяния, рассчитанных с использованием OLIGOMER, и полученные величины объемных долей олигомерных компонент смеси показаны на Рис.4.2 (а) (черные линии) и приведены в Табл. 4.1. Указанные результаты фита совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне, а качество подгонки χ^2 не превышает значения 1.0.

Анализ экспериментальных кривых МУРР показал, что в дополнение к мономерам в растворе белок-осадитель образуется приблизительно 10% димеров и 2% октамеров. Тетрамеры, гексамеры и олигомеры, состоящие из > 8 белковых молекул, в растворе не обнаружены.

Табл. 4.1 – Объемные доли олигомеров в кристаллизационном растворе лизоцим-KCl и радиусы инерции R_g (Å), рассчитанные по начальному участку кривых рассеяния.

Время, мин	R_g , Å	Мономер, %	Димер, %	Тетрамер, %	Гексамер, %	Октамер, %	χ^2
0	19.1	88.2 ± 0.4	9.4 ± 0.4	0	0	2.3 ± 0.1	0.92
100	18.9	87.9 ± 0.4	10.0 ± 0.4	0	0	2.2 ± 0.1	0.92
170	19.1	87.9 ± 0.4	9.7 ± 0.4	0	0	2.3 ± 0.1	0.90

В растворе белка без осадителя присутствовали только мономеры в состоянии отталкивания друг от друга. С течением времени (в интервале от 0 до 170 мин) объемная доля, занимаемая октамерами в кристаллизационном растворе, оставалась на постоянном уровне в пределах погрешности.

В условиях приготовления исследуемых белковых растворов (кристаллизационных условиях) образование кристаллов белка в процессе проведения экспериментов не предполагалось. Согласно данным, представленным в Разделе 3.4.2, рост кристаллов лизоцима в таких условиях (концентрация белка 20 мг/мл и температура 20°C) наблюдается через 36 ч после смешивания растворов белка и осадителя. Тем не менее, можно

отметить, что длительность экспериментов МУРР (около 3 часов) была недостаточной для получения кристаллов лизоцима с заметными размерами или в достаточном количестве, что могло бы существенно повлиять на результаты МУРР и послужить причиной появления узких дифракционных пиков на кривых рассеяния МУРР.

Аналогичным образом проводилось исследование влияния на структуру растворов лизоцима катиона осадителя из ряда хлоридов NaCl, KCl, LiCl, NiCl₂, CuCl₂, CoCl₂ в условиях, благоприятных для образования кристаллов тетрагональной сингонии.

Радиусы инерции и распределение фракций в растворе при добавлении различных осадителей, определенные по экспериментальным данным МУРР (Рис.4.3) с использованием программы OLIGOMER, приведены в Табл. 4.2.

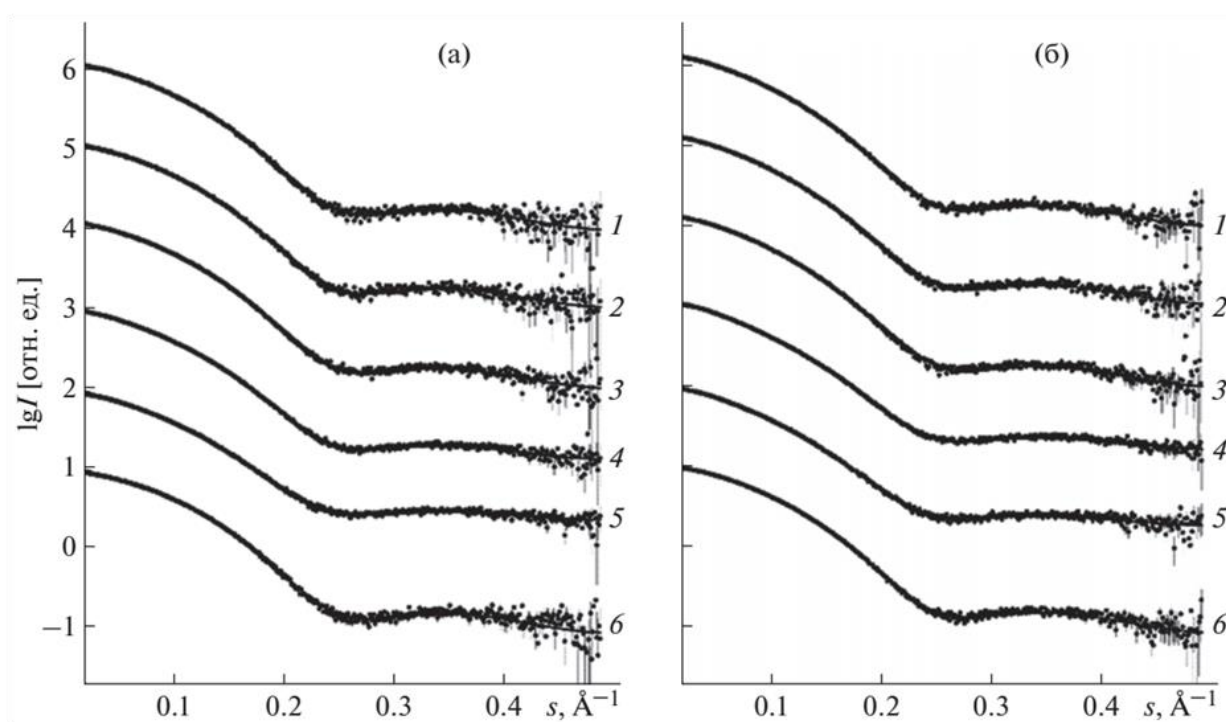


Рис.4.3 – Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные с помощью программы OLIGOMER, при температурах 20 (а) и 10°С (б) от растворов тетрагонального лизоцима с различными осадителями: NaCl (1), KCl (2), LiCl (3), CoCl₂ (4), NiCl₂ (5), CuCl₂ (6). Концентрация белка составляла 20 мг/мл, концентрация осадителей – 0.2 М. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Рассчитанные кривые МУРР от олигомерных смесей для растворов белка с осадителем хорошо совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне, значения невязки χ^2 не превышают 1.5 (Рис.4.3).

Из приведенных в Табл. 4.2 экспериментальных данных видно, что для всех исследованных случаев из возможных конфигураций олигомеров (димеров, тетрамеров, гексамеров, октамеров и других более крупных образований) в растворе присутствуют только димеры и октамеры. Это хорошо согласуется с предыдущими исследованиями растворов лизоцима с осадителем NaCl (Глава 3, Разделы 3.3.2, 3.4.1, 3.4.3) и проведенными расчетами стабильности октамера в растворе лизоцима с осадителем NaCl методом молекулярной динамики (Раздел 3.6).

Табл. 4.2 – Олигомерный состав растворов лизоцима с осадителями из ряда хлоридов для концентрации осадителей 0.05 (курсив), 0.1 (обычный шрифт) и 0.2 М (жирный шрифт) при температурах 20 и 10°C.

Осадитель	T, °C	KCl	NaCl	LiCl	CoCl ₂	NiCl ₂	CuCl ₂
R _g , Å	20	14.4	14.4	14.5	14.7	14.3	14.3
		15.6	15.9	15.3	16.8	16.4	14.3
		18.4	18.2	18.2	19.3	18.7	16.6
	10	14.7	14.8	14.8	15.0	14.7	14.3
		15.9	15.8	15.9	18.0	17.4	14.4
		19.3	19.0	18.8	20.4	19.5	17.9
Димеры, %	20	0.6	1.1	1.2	0.3	0.0	0.0
		4.5	4.9	6.2	0.0	0.0	0.0
		5.0	5.4	7.3	0.8	1.9	0.0
	10	3.3	3.8	3.4	4.3	3.3	0.0
		9.3	10.1	10.5	4.4	3.7	0.1
		10.5	10.6	13.1	8.2	7.9	3.5
Октамеры, %	20	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
		0.3	0.1	0.1	1.2	1.0	0.0
		1.9	1.8	1.7	2.9	2.4	1.1
	10	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
		0.3	0.1	0.2	1.7	1.4	0.0

		2.4	2.2	1.9	3.6	2.8	1.7
χ^2	20	1.4	1.5	1.4	1.3	1.4	1.4
		1.4	1.2	1.5	1.3	1.0	1.4
		1.2	1.2	1.4	0.9	1.0	1.3
	10	1.4	1.5	1.1	1.4	1.4	1.3
		1.5	1.5	1.5	1.4	1.3	1.5
		1.5	1.5	1.5	1.3	1.0	1.2

Примечание. Концентрация белка лизоцима составляла 20 мг/мл. R_g – средний экспериментальный радиус частиц, χ^2 – качество приближения экспериментальных данных с помощью модели от смеси мономеров, димеров и октамеров лизоцима. Объемная доля мономеров, присутствующих в растворе лизоцима, равна доле, остающейся после вычитания суммарной доли димеров и октамеров.

Зависимости радиуса инерции частиц и объемных долей димеров и октамеров лизоцима в предкристаллизационных растворах от типа осадителя и температуры показаны на Рис.4.4.

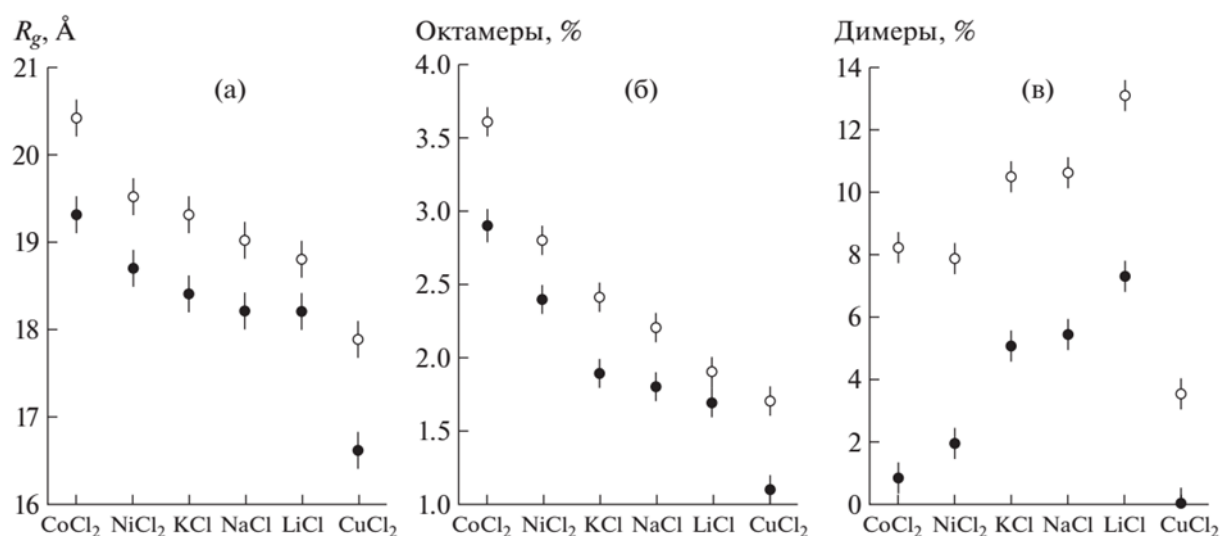
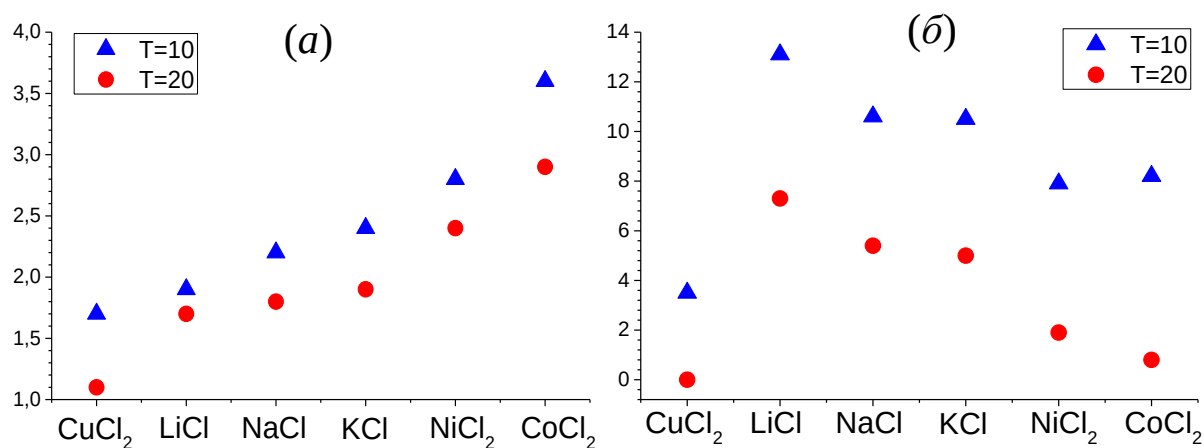


Рис.4.4 – Зависимости радиуса инерции частиц тетрагонального лизоцима (а), объемных долей октамеров (б) и димеров (в) лизоцима в предкристаллизационном растворе от типа растворителя. Темные кружки соответствуют температуре 20°C, светлые – 10°C. Концентрация белка составляла 20 мг/мл, концентрация осадителей – 0.2 М.

Как видно на Рис.4.4а, б, характер зависимости радиуса инерции частиц от типа осадителя хорошо коррелирует с объемной долей октамеров в растворе, что подтверждает чувствительность вклада крупных частиц в среднее экспериментальное значение радиуса инерции частиц в смеси даже при наличии только небольшой их доли в растворе.

Отметим, что доля октамеров возрастает в одновалентном ряду щелочных ионов (Li^+ , Na^+ , K^+) с увеличением атомного радиуса ионов, что согласуется с увеличением адсорбционной активности ионов в лиотропном ряду Гофмейстера [456] (см. Рис.4.5).



Ряд Гофмейстера: Li^+ , Na^+ , K^+

Рис.4.5 – Зависимости объемных долей октамеров (а) и димеров (б) лизоцима (из Рис.4.4) в предкристаллизационном растворе от типа растворителя в соответствии с рядом Гофмейстера.

Общей чертой проведенных измерений является рост концентрации олигомеров по мере повышения концентрации осадителей и понижения температуры, что является следствием увеличения степени пересыщения раствора.

Сравнение влияния исследованных осадителей на концентрацию димеров показывает четкое различие между хлоридами щелочных металлов и хлоридами металлов переходной группы. Концентрации димеров в первой группе заметно больше, чем во второй (Рис.4.4в).

Различие этих групп связано, во-первых, с существенной разницей концентрации хлора, так как при одинаковой молярной концентрации соли концентрация ионов хлора в 2 раза выше для двухвалентных металлов, чем для одновалентных. Во-вторых, с возможным влиянием металлов второй группы на взаимодействие между молекулами белка.

В отличие от ситуации с димерами концентрации октамеров для двух групп катионов различаются незначительно и находятся в пределах 2 – 3 % (Табл. 4.2), за исключением CuCl_2 , где концентрация октамеров заметно ниже и составляет 1.1 – 1.7 %.

Для солей двухвалентных металлов концентрация октамеров приблизительно в 1.5 раза выше по сравнению с растворами солей одновалентных металлов. При одинаковой молярной концентрации осадителя содержание ионов хлора в случае двухвалентных металлов в 2 раза выше, чем для одновалентных. При одинаковой концентрации хлора в растворе для солей двухвалентных металлов концентрация октамеров значительно ниже, чем для одновалентных.

Из растворов с осадителями NiCl_2 , CuCl_2 , LiCl , NaCl , KCl были выращены кристаллы, от которых были собраны рентгенодифракционные наборы, позволившие определить структуры данных кристаллов. В полученных структурах локализованы ионы хлора и соответствующего катиона.

Предварительный анализ структур выявил существенное различие в положении одновалентных и двухвалентных катионов осадителя, в частности показано, что катионы меди связываются в пяти местах, а катионы никеля – в двух, в отличие от катиона натрия, который связывается только в одном месте и стабилизирует в молекуле лизоцима подвижную петлю 53 – 79.

Наличие дополнительных ионов меди приводит к конформационным изменениям в молекуле белка, в частности меняют конформацию боковые группы аминокислотных остатков, образующих координационные связи с ионами меди, кроме того, наблюдается смещение $\text{C}\alpha$ атомов ряда аминокислотных остатков. Такие конформационные изменения могут влиять

на способность белка образовывать октамеры, приводя к уменьшению их концентрации в растворе.

В результате проведенных исследований была изучена структура растворов белка лизоцима при добавлении различных типов осадителей, хлоридов металлов (NaCl, KCl, LiCl, CoCl₂, NiCl₂ и CuCl₂) при температурах 10 и 20 °C.

Выявлено, что во всех случаях помимо мономеров было обнаружено заметное содержание димеров (3.5 – 13.1 %) и октамеров (1.7 – 3.6 %). Других олигомеров, в том числе более высокого порядка, чем октамер, не обнаружено.

Показано, что доля октамеров возрастает в ряду одновалентных ионов Li⁺ – Na⁺ – K⁺ с увеличением атомного радиуса ионов, что хорошо согласуется с данными по растворимости лизоцима в присутствии различных солей [4]. Также, было показано, что для всех типов осадителя наблюдается увеличение доли октамеров с ростом концентрации осадителя и понижением температуры.

4.3. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИОНОВ (МЕТАЛЛОВ И ХЛОРА) С МОЛЕКУЛАМИ ЛИЗОЦИМА И ИХ РОЛЬ В ОБРАЗОВАНИИ КРИСТАЛЛА ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ

На основе данных о кристаллической структуре проанализированы связи между молекулами лизоцима и ионами-осадителями в монокристаллах, выращенных с использованием хлоридов ряда металлов. Кристаллы тетрагонального лизоцима из куриного яйца были выращены с использованием хлоридов нескольких щелочных и переходных металлов (LiCl , NaCl , KCl , NiCl_2 и CuCl_2) в качестве осадителей, а трехмерные структуры были определены с разрешением 1,35 Å методом рентгеновской дифракции.

Позиции ионов металлов и хлора, связанных с лизоцимом, были определены, разделены на три группы и проанализированы. Некоторые из них, в соответствии с недавно предложенной и экспериментально подтвержденной моделью роста кристаллов, обеспечивают связи в димерах и октамерах белка, которые являются кластерами-прекурсорами в кристаллизационном растворе лизоцима. Первая группа включает катионы Cu^{+2} , Ni^{+2} и Na^{+1} , которые специфически связываются с молекулой белка. Вторая группа состоит из ионов металлов и хлора, связанных внутри димеров и октамеров. Третья группа ионов может участвовать в связях между октамерами, которые предлагаются в качестве строительных единиц в процессе роста кристаллов.

Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2. Описание методики роста кристаллов приведено в Разделе 2.6.1, Главы 2. Кристаллы, выращенные с различными осадителями, обозначаются как Cu-, Ni-, Na-, K- и Li-кристаллы соответственно.

Сбор дифракционных данных и определение пространственной структуры кристаллов. Регистрация рентгеновской дифракции в исследуемых кристаллах осуществлялась при температуре 100 К на станции «БЕЛОК» источника СИ «КИСИ-Курчатов», НИЦ «Курчатовский институт». Описание станции «БЕЛОК» КИСИ приведено в Разделе 2.6.2, Главы 2.

В качестве детектора использовался CCD детектор Rayonix SX156. Дифракционные данные были получены путем вращения образца монокристалла. Длина волны составляла 0,8 Å, диапазон сканирования – 1°, а угол поворота – 180°. Обработка экспериментальных дифракционных наборов интенсивности проводилась с использованием программного обеспечения iMosflm [426]. Структуры были определены методом молекулярного замещения с использованием программного обеспечения PHASER [457] и структуры HEWL (PDB ID 4WLD) в качестве исходной модели. Атомные модели были уточнены с использованием программы REFMAC [458]. Статистика сбора и уточнения рентгеновских данных обобщена в Табл. 4.3. Карты электронной плотности были рассчитаны с использованием программы REFMAC. Кристаллы принадлежали к пространственной группе P4₃2₁2. Независимая часть элементарной ячейки содержит одну молекулу фермента.

Табл. 4.3 – Сбор данных, решение структуры и уточнение. Значения в скобках указаны для внешней оболочки.

PDB ID	6QWW (CuCl ₂ комплекс)	6QWX (NiCl ₂ комплекс)	6QWY (NaCl комплекс)	6QWZ (KCl комплекс)	6QX0 (LiCl комплекс)
Набор данных и обработка					
Пространственная группа	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Параметры элементарной ячейки	A=B=78.739, C=36.774, α=β=γ=90.00	A=B=77.147, C=37.139, α=β=γ=90.00	A=B=77.147, C=37.139, α=β=γ=90.00	A=B=78.660, C=37.061, α=β=γ=90.00	A=B=78.739, C=36.774, α=β=γ=90.00
Разрешение (Å)	27.84-1.35 (1.39-1.35)	27.28-1.35 (1.39-1.35)	27.28-1.35 (1.39-1.35)	27.81-1.35 (1.39-1.35)	27.85-1.35 (1.39-1.35)
I/σ (I)	15.5	17.3	16.1	16.4	14.9
Rmrgd-F (%)	0.079	0.083	0.099	0.091	0.096
Уточнение (Refinement)					
Разрешение, диапазон (Å)	27.84-1.35 (1.39-1.35)	27.28-1.35 (1.39-1.35)	27.28-1.35 (1.39-1.35)	27.81-1.35 (1.39-1.35)	27.85-1.35 (1.39-1.35)
Заполнение (%)	99.2 (100)	100 (100)	100 (100)	98.8 (100)	92.7 (99.84)
Количество рефлексов, рабочий набор	24459 (1788)	23921 (1727)	23918 (1283)	24493 (1802)	23092 (1828)
Количество рефлексов, тестовый набор	1338 (92)	1280 (89)	1283 (81)	1802 (92)	1206 (86)
Итоговый Rcryst	16.0 (14.0)	15.8 (17.0)	15.8 (15.5)	16.8 (21.6)	16.4 (30.5)
Итоговый Rfree	19.0 (21.9)	19.3 (23.2)	19.9 (23.4)	21.7 (29.8)	21.0 (33.7)

Количество атомов не Н					
Белок	1000	1000	1000	1000	1000
Катион	4	2	3	-	-
Анион	6	4	4	5	3
Вода	141	143	141	134	142
RMS					
связи (Å)	0.01	0.011	0.011	0.012	0.013
углы (°)	1.463	1.534	1.599	1.585	1.578

Восстановление модели было выполнено с использованием интерактивной графической программы Coot [397], а карты электронной плотности были рассчитаны с коэффициентами $2|F_o|-|F_c|$ и $|F_o|-|F_c|$. Некоторое количество молекул воды и несколько ионов хлора и металла были обнаружены на разностных картах электронной плотности в каждой из структур. Позиции ионов металлов и хлоридов были уточнены при полной заселенности. Координаты уточненных моделей были размещены в Международном банке белковых структур (PDB ID: 6QWW, 6QWX, 6QWY, 6QWZ, 6QX0).

Построение (моделирование) октамеров. Координаты исходного октамера, образованного трансляцией кристаллической асимметричной единицы вдоль оси 4_3 тетрагонального лизоцима, были определены с использованием программного обеспечения Coot и PyMOL [397, 444] (Разделы 3.2, 3.3 Главы 3). Белковые мономеры, образующие октамерный кластер, обозначены как А, В, С, D, Е, F, G, Н. (Рис.4.6). Расположение и ближайшее окружение ионов, связанных с молекулой лизоцима во всех типах кристаллов, были проанализированы с использованием программ PyMOL, Coot и LigPlot. Ближайшее окружение ионов, связанных с молекулой лизоцима, приведено в Табл. 4.4.

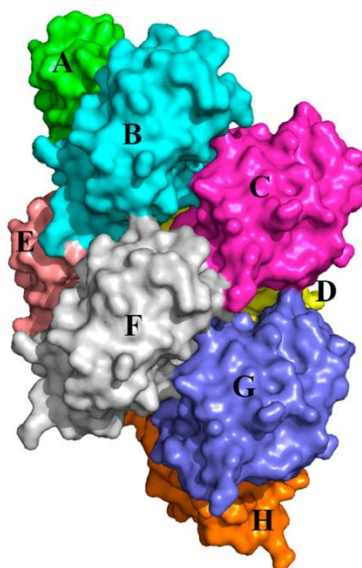


Рис.4.6 – Октамерный кластер, построенный путем трансляции асимметричной единицы вдоль оси 4_3 тетрагонального лизоцима.

Табл. 4.4 – Ближайшее окружение (≥ 4 Å) ионов металла и хлора в молекулах лизоцима в тетрагональных кристаллах, выращенных с использованием различных осадителей.

CuCl ₂ -octamer		
	Остатки связаны напрямую	Остатки, связанные через молекулы воды
Cl202	Gly26N, Ser24 O γ , Gln121	
Cl203	Thr 69 O, N; Pro70, Asn65 N, Gly67 N H ₂ O 423, 358, 389; CL207 (4.8Å)	Cu 208 Asp 66 N, OD1; Asp66 N, OD1
Cl204	Leu88 N, Phe3, Ser86 O, H ₂ O 421, 328	Ser86 O, Lys1NZ, His15 (4.28Å)
Cl205	NZ Lys33, Phe38, Trp123 CZ3; H ₂ O 328, 395	Gly4N, Arg5 NE
Cl206	Lys 13NZ, Cu 209 (278), Leu129 O; H ₂ O 344	
Cl207	Gly71N, H ₂ O 439	
Cu201	Asp52, OD2; H ₂ O: 303, 348, 327, 352, 425	Gln57 O, Glu35 OE1
Cu208	Ser 60 O, Cys64 O, Ser72O γ , Arg73 O, H ₂ O 358, 389	Asn65 OD1(389); Asp66 OD1, OD1, CL 203, Thr69 O
Cu209	Cl 206 (135), Leu129 O; H ₂ O 410, 344	Ala 10 O; Lys13O, Asp18 O Gly16 N
Cu210	H ₂ O: 301, 334, 382, 426, 337, 338.	Lys13 O; Asp 18 N, O
Октаэдр	Asp18 OD2	

NiCl₂ октамер		
Cl203	Ser24Oγ; Gly26; Glu121 N	Leu25, Val129, Gln121, Ile124
Cl204 (B)	Arg68 N; Thr69 N; Ser72 Oγ	Asn 65
Cl205	Ile88 N; Phe3; Asp 87 O; H ₂ O 327	Lys1, Ser86, Asp87, Arg14, His15
Cl206	Lys33NZ; Trp123 CZ3; Phe38 CE2	Trp123
Ni 202	Ser60 O; Cys64 O; Ser72 Oγ, Arg73 O; H ₂ O 364, 406	Asn 65 OD1; Asn65 OD1; Cl204
Ni201	Asp52 OD1; H ₂ O 307, 352, 343, 431, 315,	Glu35, Gln57 O; Glu35 OE1;
NaCl октамер		
Na201	Ser72 Oγ; Cys64 O; Ser60 O; Arg 73 O; H ₂ O 361, 404	Asp66 OD1, N; Cl206; Arg 73 O; Cl 206
Na 202	Thr40 Oγ; Leu84 O; H ₂ O 306, 374	Lys1 N; Ser86 O
Na203	Asp52 OD2; H ₂ O 352, 353, 341, 315, 427	Gln57 O, Glu57 OE1; Arg21B,
Cl204	Tyr23 OH; H ₂ O 346, 392; Asn 113 ND2 Ala110 N	
Cl205	Ser 24 Oγ; Glu26 N; Gln121N	
Cl206	Glu67 N; Asn65 ND; Arg68 N, Ser72 Oγ; 2 H ₂ O	Thr69 Oγ; Na201
Cl207	Phe 38; Lys33 NZ; H ₂ O424;	
KCl октамер		
Cl 201	Tyr23 O; H ₂ O 328, 398 Asn113ND2 (A); Ala110 O (A)	Asn113 ND2 (A)
Cl202 (B)	Ser 24); Glu26 N; Cln121 N	
Cl203(B)	Ser72) γ; Arg68 N, Thr69 O; H ₂ O376, 384,410; Gly67 N;	Ser72 Oγ, O
Cl204	Ile88 N, Asp87, H ₂ O 412, 323	His15 NE2
Cl205	Lys33NZ; Phe38 CE2; Trp123 CZ3	
LiCl октамер		
Cl201	Gly26 N; Ser24 Oγ; Gln121 OE1; Ile24 C;	
Cl202	Gly67 N; Asn65 OD1; Arg68 N; H ₂ O 372, 420	Thr69 N
Cl203	Trp123 CZ3; Phe38 CZ; Lys33 Nz	

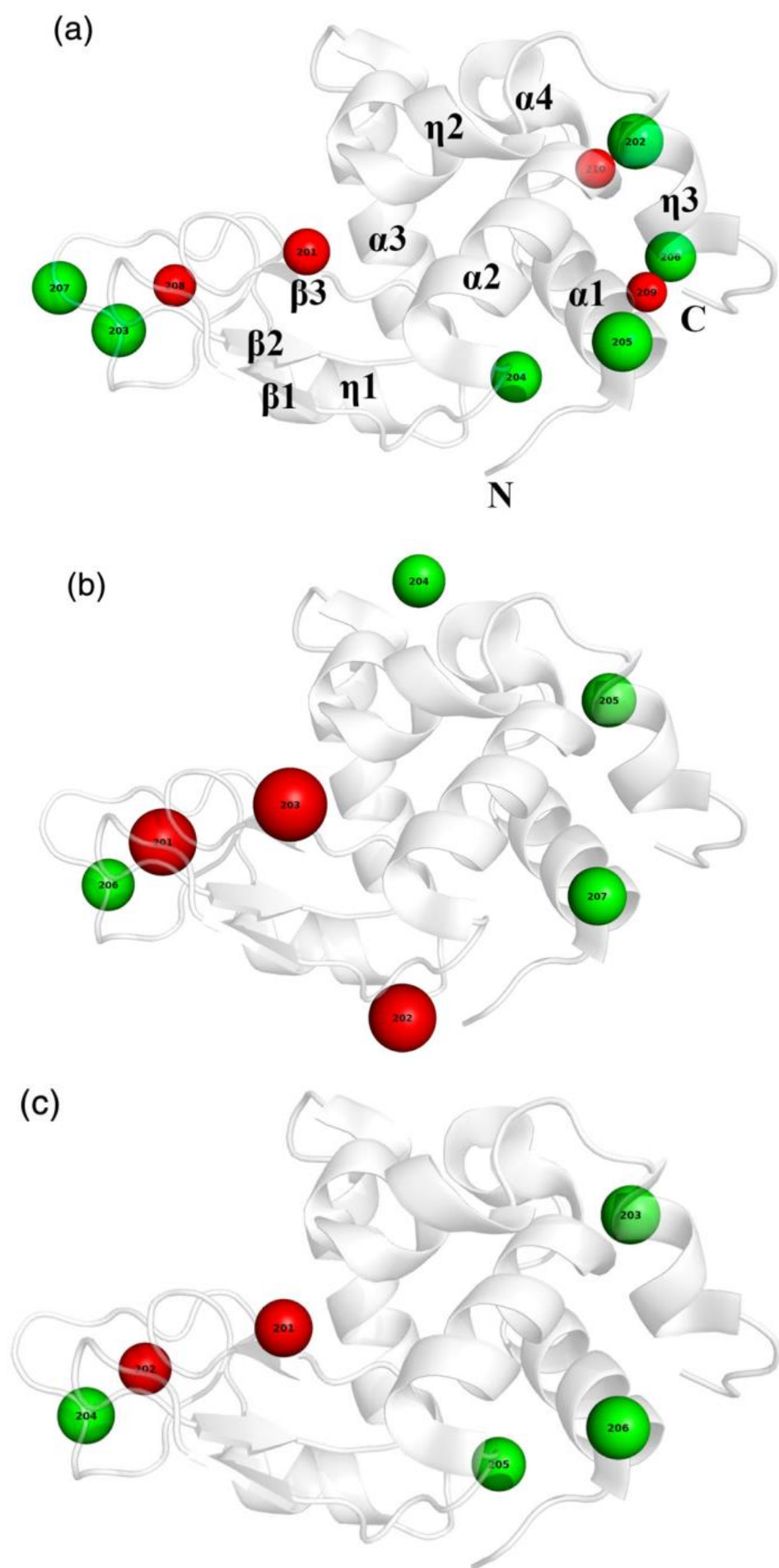
Экспериментальные результаты. Исследования методами МУРР и МУРН олигомерного состава предкристаллизационной фазы тетрагонального лизоцима в растворе показали, что в этой фазе раствор состоит из мономеров белка, димеров и двух типов октамеров, в то время как другие типы

олигомеров отсутствуют (Разделы 3.3, 3.4 Главы 3 и Раздел 4.2 Главы 4). В качестве «начального» элемента роста кристалла тетрагональной сингонии был предложен наиболее стабильный (в условиях кристаллизации) октамер белка, который может быть построен путем поворота асимметричной единицы тетрагонального кристалла относительно кристаллографической винтовой оси четвертого порядка (Раздел 3.2, 3.3.2) (Рис.4.6).

Согласно результатам, представленным в предыдущем разделе, концентрация димеров и «исходных» октамеров в кристаллизационном растворе зависит от типа катионов металлов Na^+ , K^+ , Li^+ , Ni^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} при использовании хлоридов в качестве осадителя для кристаллизации лизоцима. Равновесная концентрация димеров была выше в случае использования солей щелочных металлов, тогда как концентрация октамеров была почти одинаковой для щелочных и переходных металлов, но при этом она была значительно ниже в растворах, содержащих хлорид меди.

С целью изучения взаимодействия ионов осадителя с димерами и октамерами лизоцима, предложенными в качестве элементов роста кристалла, была установлена трехмерная структура кристаллов лизоцима с разрешением 1,35 Å, выращенных с использованием NaCl, KCl, LiCl, NiCl₂, CuCl₂ в качестве осадителей (кристаллы обозначаются соответствующим образом K-, Li-, Na-кристаллы и т.д.) (Рис.4.3).

Ионы хлора, связанные с молекулой лизоцима, были обнаружены во всех типах кристаллов. Катионы, связанные с молекулой белка, были обнаружены в Cu-, Ni- и Na-кристаллах, но не были обнаружены в K- и Li-кристаллах. Положение ионов хлора и металла, находящихся в молекуле белка в соответствующих кристаллах, показано на Рис.4.7, *a-e*. Ближайшее окружение ионов (≥ 4 Å), связанных с молекулой лизоцима в разных типах кристаллов, представлено в Рис.4.4.



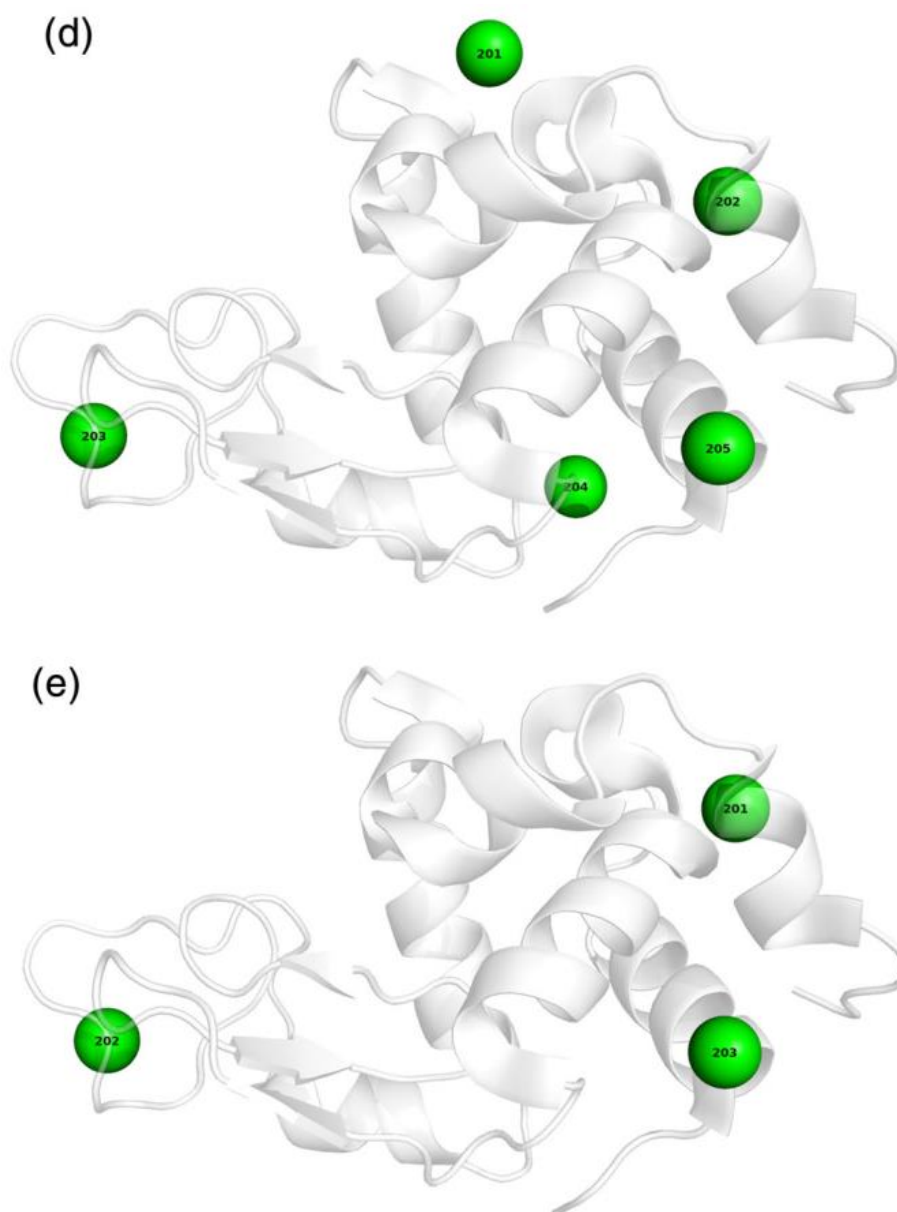


Рис.4.7 – Расположение ионов металла (красные сферы) и хлора (зеленые сферы), связанных с молекулой лизоцима (а) в Cu-, (b) в Ni-, (c) в Na-, (d) в K-кристаллах, (e) в Li-кристаллах.

Было определено, что количество ионов хлора и металлов, связанных с молекулой лизоцима, для кристаллов, выращенных с использованием ряда осадителей, различно. Наибольшее количество ионов – 4 Cu⁺² и 6 Cl⁻ – связано с молекулой лизоцима в Cu-кристаллах (Рис.4.7а).

Известно, что молекула лизоцима способна присоединять некоторые катионы, в особенности ионы Na⁺ [459 – 462]. Однако ионы меди и никеля, связанные с молекулой лизоцима, наблюдаются впервые. Как было показано в

предыдущем разделе, хлориды переходных металлов, используемые в качестве осадителей, снижают равновесную концентрацию октамерных кластеров в кристаллизационных растворах лизоцима.

Ионы металла и хлора локализуются в разных сегментах молекулы лизоцима. Полипептидная цепь лизоцима, состоящая из 129 аминокислотных остатков, содержит четыре α -спирали, три 3_{10} спирали и один β -лист [181, 183, 463, 464] (Рис.4.8).

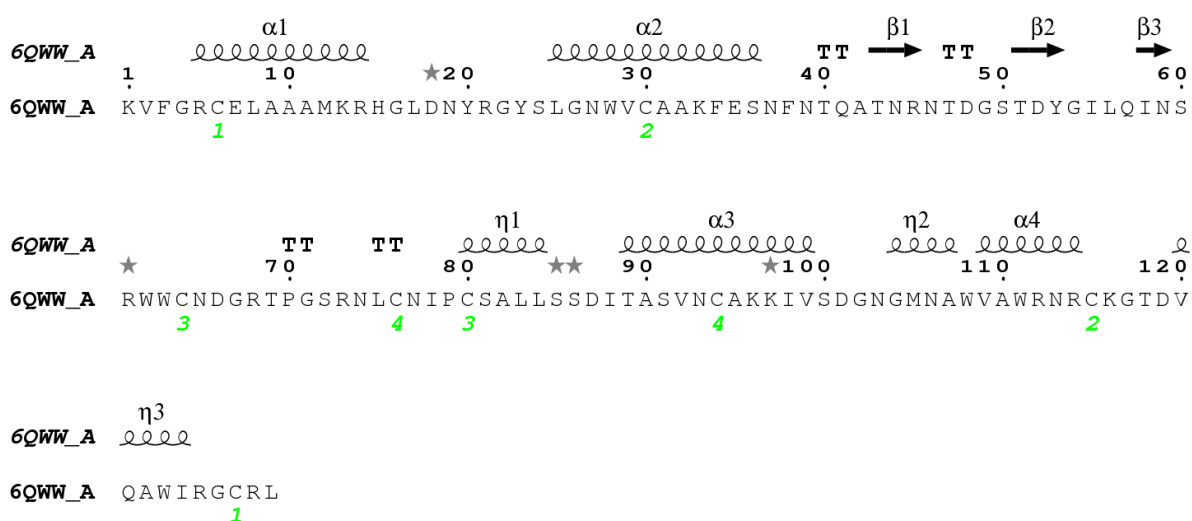


Рис.4.8 – Последовательности и элементы вторичной структуры молекулы лизоцима из куриного яйца (PDB ID 6QWW).

Четыре дисульфидных мостика, которые ограничивают гибкость разупорядоченных сегментов полипептидной цепи, делают молекулу более жесткой. Глубокая «расщелина» в активном центре делит молекулу на два домена [188, 464 – 467]. Большой домен, ограничивающий углубление в активном центре, включает N- и C-концевые остатки полипептидной цепи и состоит в основном из α -спиралей (остатки 1-39 и 101-129). Второй домен, охватывающий остатки 40-85, почти полностью представляет собой β -структуру (β -лист) и содержит три антипараллельные β -цепи. Остатки 41-45 и 50-54 образуют β -плиссированную структуру, причем соединительные

остатки 46-49 складываются в виде изогнутой шпильки между двумя длинами сравнительно вытянутой цепи [468]. Два домена соединены $\eta 1$ и $\alpha 3$ -спиралями (остатки 89-99) [181, 183, 463, 464, 468]. Область в углублении (расщелине) в активном центре открыта для взаимодействия с раствором и может вместить до шести сахарных единиц гликолевого сахаридного субстрата.

Когда молекулы лизоцима интегрированы в димер и октамер, между молекулами образуется несколько интерфейсных зон (AB, AD, AE и т.д. (Табл. 4.3) (Рис.4.9). Самая большая площадь интерфейса между парами мономеров, образующих димер (AB, BC, CD и т.д.) составляет $290,7 \text{ \AA}^2$. Площадь интерфейса AD (BE, CF, DG и т.д.) составляет $173,8 \text{ \AA}^2$, а AE (B-F и т.д.) – $69,0 \text{ \AA}^2$ (Табл. 4.5).

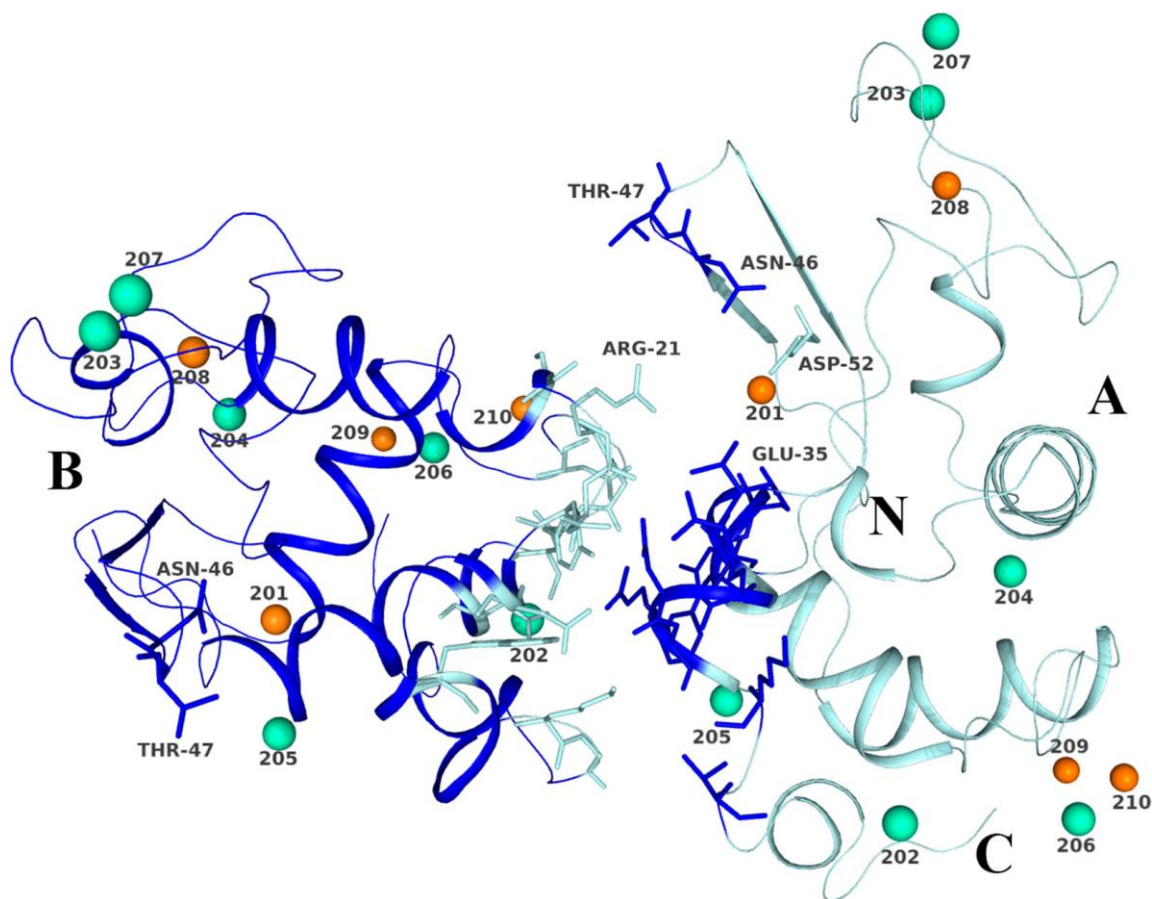


Рис.4.9 – Димер из симметрично-связанных молекул лизоцима *A* и *B* с позициями ионов меди (оранжевые сферы) и ионами хлора (зеленые сферы). Аминокислотные остатки на границе раздела показаны стержнями.

Димер лизоцима со связанными ионами Cu и Cl показан на Рис.4.9. Присоединенные ионы взаимодействуют с аминокислотными остатками молекулы белка как напрямую, так и через молекулы воды (Табл. 4.4). Молекулы в димере связаны таким образом, что вход в расщелину активного центра одного мономера (А) частично прикрыт второй, симметрично-связанной молекулой лизоцима (В). Площадь интерфейса между молекулами в димере равна 290,1 Å².

Табл. 4.5 – Площадь интерфейса между субъединицами октамера.

Пара субъединиц: AD, BE, CF, DG, EH, общая площадь 173,8 Å²	
ASN 46	ASP 119
THR 47 H	GLN 121
ASP 48	ILE 124
GLY 49	GLY 126 H
ARG 61	CYS 127
TRP 62	ARG 128
ASN 103	
Пара субъединиц AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH. Общая площадь 290.7 Å²	
ASN 19	PHE 34
ARG 21	GLU 35
GLY 22 H	ASN 37
TYR 23	ASN 46
SER 24	THR 47
ASN 27	VAL 109
SER 100	ALA 110
GLY 102 H	ARG 112 H
ASN 103	ASN 113 H
GLY 104	ARG 114 H
ASN 106 H	LYS 116
TRP 111	THR 118
LYS 116	
GLY 117	
Пара субъединиц AE, BF, CG, DH. Общая площадь 69.0 Å²	
VAL 2	ARG 73
PHE 3	LEU 75
GLY 4	ASP 101
ARG 5	GLY 102
ASN 37	
ARG 125	

Внутри границы раздела между субъединицами лизоцима в димере и октамере нет ионов хлора. Только один ион меди Cu²⁺ связан внутри области интерфейса между субъединицами лизоцима. Большая часть катионов и анионов, связанных с димером, расположены на поверхности молекул белка,

удалены от 4_3 оси и достаточно доступны для контакта с растворителем. Однако, как описано ниже, при образовании октамера некоторые ионы становятся «скрытыми» и локализуются между белковыми субъединицами внутри октамерного кластера (Рис.4.10, а-с).

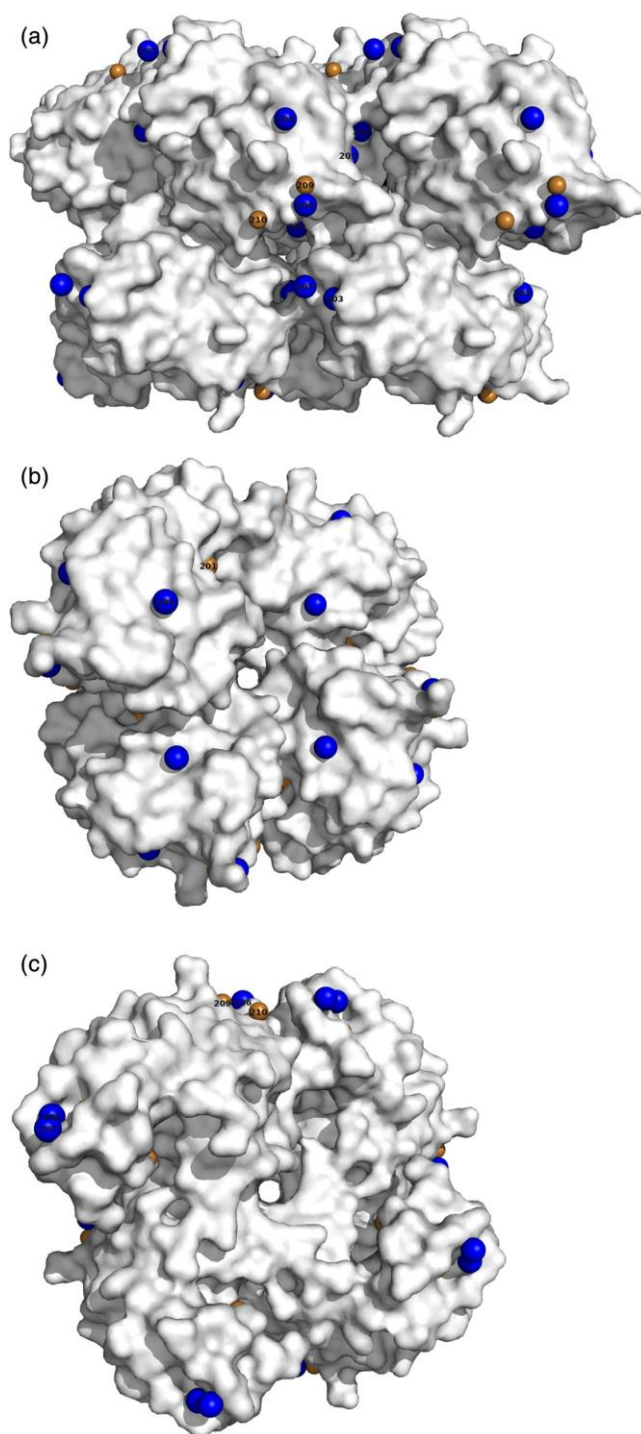


Рис.4.10 – Расположение ионов меди и хлора, связанных с октамерным кластером (а), поперек оси 4-го порядка; (b) по оси 4-го порядка верхняя сторона и (с) по оси 4-го порядка, нижняя сторона.

Ионы меди Cu201 и Cu208 в Cu-кристаллах занимают особое положение в молекуле лизоцима (Рис.4.7а, 4.9; Табл. 4.4). Cu201 расположен в расщелине активного центра молекулы и встроен в систему водородных связей между двумя доменами субъединиц (Рис.4.11). Он координируется непосредственно OD1 Asp52 и пятью молекулами воды и в качестве координационной сферы имеет искаженный октаэдр. Через молекулы воды Cu201 связывается с атомами кислорода основной цепочки Glu35, Glu57, Asn46, Ala110.

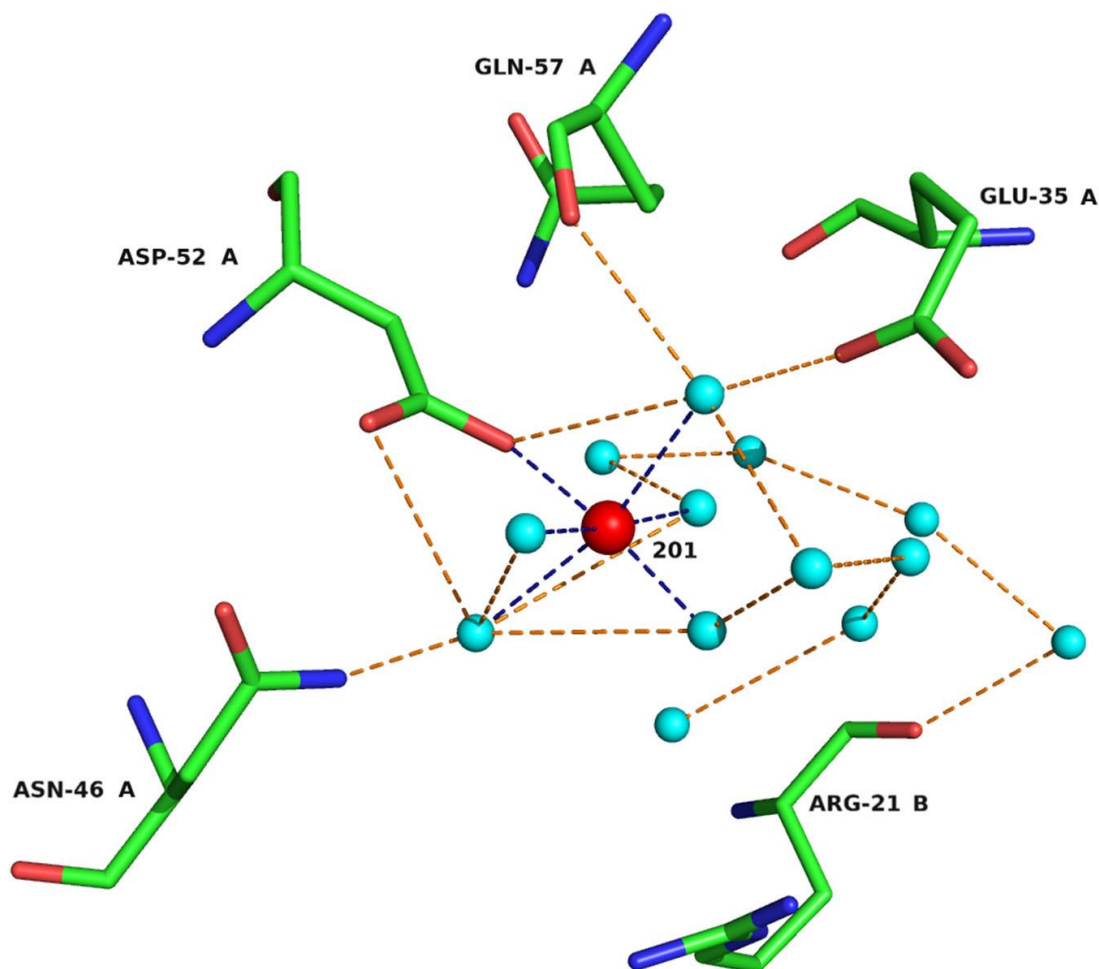


Рис.4.11 – Ближайшее окружение иона меди Cu201, размещенного в «расщелине» активного центра.

Остатки Asp52 и Glu35 играют важную роль в ферментативном катализе [469]. Согласно [181, 183, 464, 469, 470]. Они участвуют в расщеплении гликозидной связи во время каталитической реакции. Asp52 стабилизирует промежуточный продукт реакции, тогда как Glu35 служит донором протонов

[181, 183, 470]. Оба остатка входят в хорошо упорядоченную сеть водородных связей с остатками Asn46, Asp48, Ser50 и Asn59 антипараллельной β -структуры. Сеть водородных связей между аминокислотными остатками и молекулами воды внутри активного центра играет важную роль в действии фермента. Остатки антипараллельной β -структуры служат «платформой» для связывания субстрата. Положение Cu201 в активном центре должно препятствовать связыванию субстрата и ингибировать действие фермента. Ионы металлов в аналогичном положении, например ионы натрия и гадолиния, наблюдались в других структурах HEWL [471 – 473]. Когда две молекулы лизоцима объединяются в димер, ион Cu201 посредством двух молекул воды связывается с Arg 21 второй, симметрично-связанной молекулы (Рис.4.9). Последняя молекула частично перекрывает вход в активный центр субъединиц А (А-В, расстояние ArgB21-Cu 201А равно 8,41 Å).

Ион меди Cu 208 находится во второй известной катион-связанной части молекулы HEWL, описанном ранее в некоторых структурах лизоцима (Рис.4.12). Эта часть образована сегментами полипептидной цепи малого домена. Конфигурация полипептидной цепи в этой области очень благоприятна для связывания ионов металлов [474, 475]. Cu 208 координируется атомами кислорода главной цепи остатков Ser 60, Cys64, Arg73 и O γ Ser72. Ser60 и Cys64 являются частью изогнутой β -шпильки, образованной остатками 59-64 (Рис.4.12). Остатки 72 и 73 являются частью длинной петли сложной конфигурации (остатки 60-80), которая проходит между β -структурой и спиралью η_1 и соединяет два домена. Два дисульфидных мостика между Cys64-Cys80 и Cys76-Cys94 ограничивают гибкость этой петли. Два лиганда Cu208, Ser 60 и Ser72, имеют очень низкие термические В-факторы. В результате Cu 208 имеет гексагональную координационную геометрию и наименее доступен для растворителя в сравнении с другими ионами меди. Кроме того, три кислорода молекул воды соединяют Cu 208 с Asn65, Asp66 и противоионом Cl 203. Расстояние Cu208-Cl203 равно 4,65 Å. Cl203 связан также с остатками малого домена Thr69,

Asn65, Gly 67 и находится на расстоянии 4,81 Å от Cl207, будучи связанным с последним через другую молекулу воды. Cl207 координируется с белком только через один аминокислотный остаток Gly71 и взаимодействует через молекулу воды с ионом меди Cu 208.

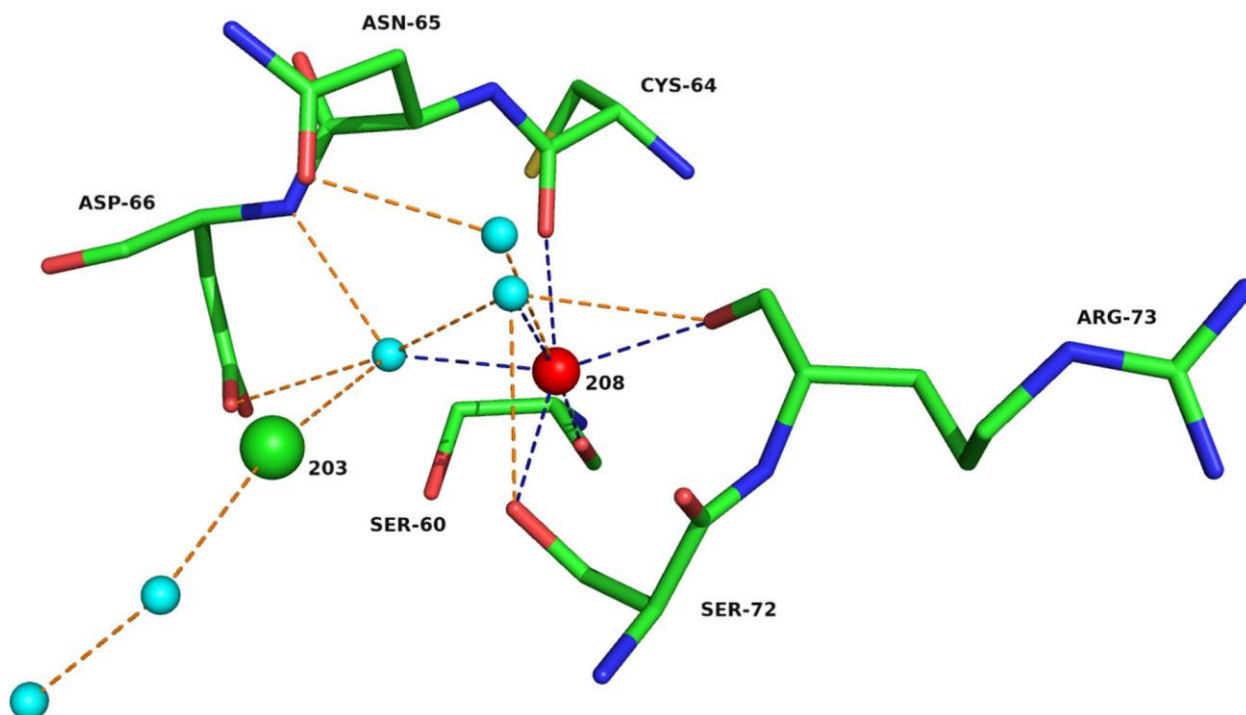


Рис.4.12 – Ближайшее окружение иона меди Cu208 размещенного в малом домене молекулы.

Все три иона (Cu208, Cl203 и Cl207) расположены близко друг к другу и вместе с соседними молекулами воды образуют единый кластер (Рис.4.7а, 4.27). В отличие от иона меди Cu208 оба иона хлора Cl203 и Cl207 находятся на поверхности октамера (Рис.4.10а). Положение, подобное позициям Cu201 и Cu208, занимают ионы никеля (Ni 201 и Ni202) в Ni -кристаллах и ионы натрия (Na203 и Na 201) в Na-кристаллах (Рис.4.7b, c). Соответствие положений двухвалентных и одновалентных катионов в сходных частях молекулы лизоцима также наблюдалось в некоторых других структурах лизоцима [476 – 478]. Ион гадолиния также был связан с молекулой в аналогичной ее части [474, 475, 479, 480].

Третий ион натрия в Na-кристаллах (Na202) расположен между остатками Leu84 из β 1-цепи и Thr40 из β 1-цепи (Табл. 4.4, Рис.4.7с). Эта позиция иона натрия уникальна и отсутствует в кристаллах Cu и Ni. Ионы K^+ и Li^+ не локализованы в соответствующих кристаллах. Ионы хлора в позициях, подобных Cl203, обнаружены во всех изученных кристаллах, тогда как ион хлора Cl207 наблюдается только в Cu-кристаллах.

Ионы меди 209 и 210 связаны с молекулами лизоцима на поверхности октамерного кластера (Рис.4.10с). С-концевой остаток Leu129, две молекулы воды и противоион Cl206 образуют тетраэдрическую сферу вокруг Cu209 (Рис.4.13). Cu209 связывается с Ala10 через молекулу воды, обеспечивая взаимодействие между N-концевыми и С-концевыми сегментами молекулы. Cl 206, кроме прямой связи с Cu209 (расстояние Cu209-Cl206 составляет 2,97 Å), связывается с Lys13 NZ α 1-спирали. Оба эти иона расположены на поверхности октамера и усиливают взаимодействие между N- и С-концами молекулы белка.

Cu210 располагается между спиралями α 1 и α 2 и координируется шестью молекулами воды. Лигандная сфера иона меди Cu210 представляет собой искаженный октаэдр. Через молекулы воды Cu210 связан с Lys 13 O и Asp18 OD2 (Рис.4.14).

Ионы Cu210, Cu209 и Cl206 расположены на периферии октамерного кластера довольно близко друг к другу (Рис.4.10с). Они образуют отдельную группу на поверхности октамера и могут обеспечивать связывание с ним следующих единиц роста. Такая группа ионов существует только в Cu-кристаллах и отсутствует в других рассматриваемых в настоящем исследовании кристаллах.

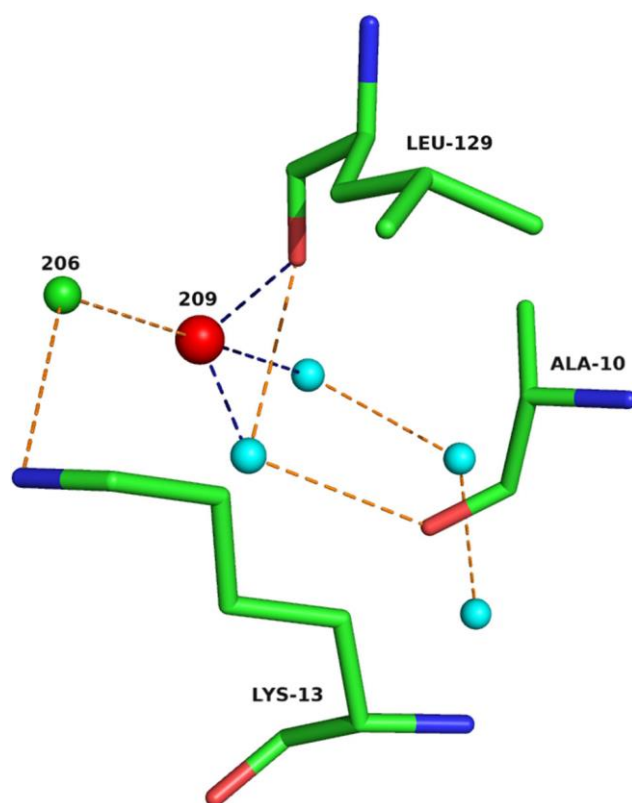


Рис.4.13 – Ближайшее окружение иона меди Cu209 размещенного около C-конца молекулы лизоцима.

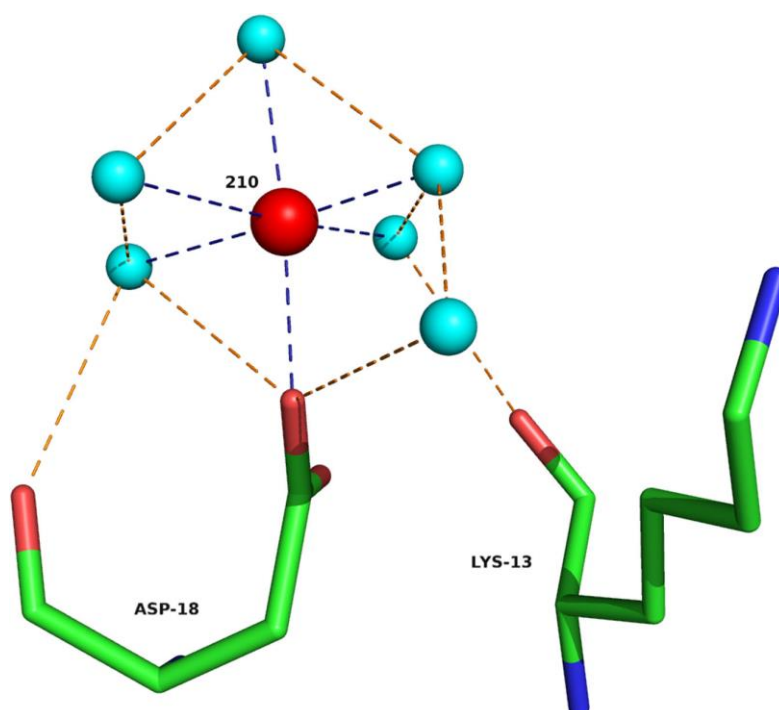


Рис.4.14 – Ближайшее окружение иона меди Cu210 размещенного около α 2-спирали молекулы лизоцима.

Молекула лизоцима в условиях кристаллизации (рН 4,5) имеет общий положительный заряд (около 17+), и отрицательно заряженные ионы хлора могут легко связываться с ней. Присоединенные ионы хлора уменьшают общий положительный заряд на поверхности белка, тем самым формируя среду из нейтральных молекул, что способствует их дальнейшей ассоциации. Анионные позиции в молекуле лизоцима были охарактеризованы для различных кристаллических модификаций лизоцима. Было обнаружено, что анионы способны модифицировать межмолекулярное взаимодействие и индуцировать полиморфизм кристаллов. В [461] было показано, что некоторые части связывания анионов сходны в ряде структур лизоцима.

Помимо трех ионов Cl (203, 206, 207), которые включены в белковые кластеры с ионами меди, существуют еще три иона хлора, связанные в Cu-кристаллах. Среди них две позиции, подобные Cl202 и Cl205 в Cu-кристаллах, заняты ионами Cl во всех типах кристаллов (рассматриваемых), тогда как позиции, подобные Cl204, отсутствуют в кристаллах Na и Li.

Cl202 в Cu-кристаллах координируется остатками Gly26N, Ser24 O γ , которые принадлежат спирали α_2 , и Gln12, расположенными на C-конце молекулы (Рис.4.10a). Так, Cl202 образует новую связь между двумя сегментами молекулы белка. В отличие от других позиций хлора Cl202 располагается ближе к оси 4-го порядка октамера и через две молекулы воды взаимодействует с аминокислотным остатком симметрично-связанной субъединицы внутри октамерного кластера. Например, Cl 202 в A-субъединице находится на расстоянии 6,68 Å от группы NH₂ Arg 61 в D-субъединице. Cl202 частично недоступен для растворителя и может рассматриваться как ион интер-субъединиц октамера. Cl 204 взаимодействует непосредственно с Ser86 O γ и Ile88 N. Оба остатка принадлежат сегменту 86-89 полипептидной цепи, которая образует поворот между спиралями η_1 и α_3 на дне расщелины активного центра. Через молекулы воды Cl204 взаимодействует с Lys1 на N-конце белка и His15 спирали α_2 , и располагается вблизи поверхности октамера (Рис.4.7a).

Cl 205 связан непосредственно с NZ Lys33 спирали $\alpha 2$ и имеет гидрофобные контакты с Phe38 и Trp123, которые расположены вблизи поверхности молекулы и через две молекулы воды взаимодействуют с соседней субъединицей октамера (Рис.4.15). Как и Cl202, он находится близко к оси 4-го порядка и расположен внутри октамера в субъединицах E, F, G, H и на поверхности октамера в субъединицах A, B, C, D (Рис.4.10с). Три иона хлора, обнаруженные в Cu-кристаллах (Cl204, 205, 206), содержат в ближайшем окружении остатки лизина.

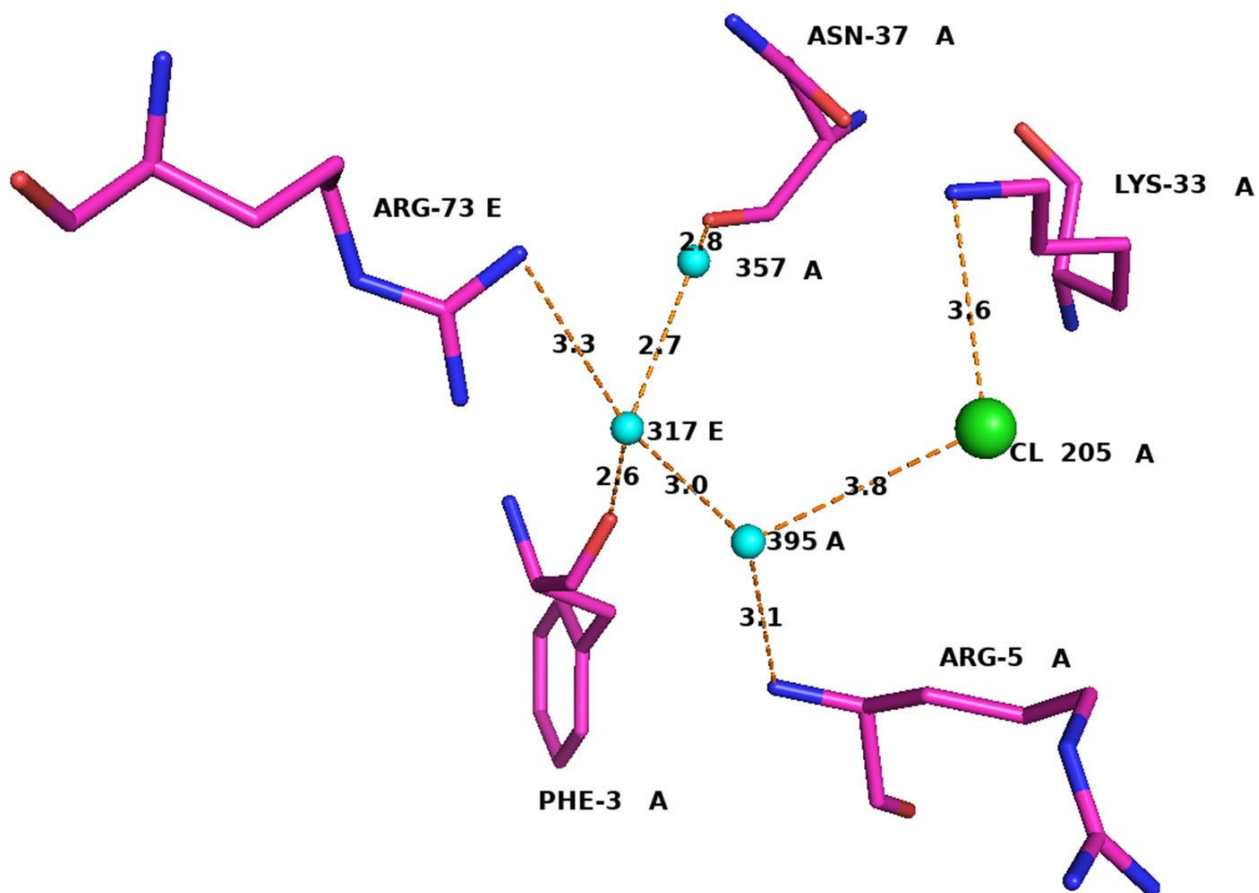


Рис.4.15 – Cl205 в интерфейсе между субъединицами A и E.

Четыре хлор-связанные позиции Ni-кристаллах (Ni 203-206) аналогичны позициям 202-205 в Cu-кристаллах. Хлор-связанные позиции, подобные Cl202, Cl203 и Cl205 в Cu-кристаллах, являются общими для всех рассматриваемых кристаллов. Пятая позиция хлора Cl204 в K-кристаллах аналогична Cl204 в Cu-кристаллах. В Li-кристаллах только три иона хлора связаны с молекулой лизоцима. Дополнительные хлор-связанные позиции

имеются в Na- и K-кристаллах (Cl201 в K- и Cl204 в Na-кристаллах) (Рис.4.16). Эта часть, образованная остатками Ala110, Tyr23 и Asn113, а также позициями ионов, подобными Cl202, Cl204, Cl205 (согласно нумерации в Cu-кристалле), существует во многих структурах лизоцима [461, 462].

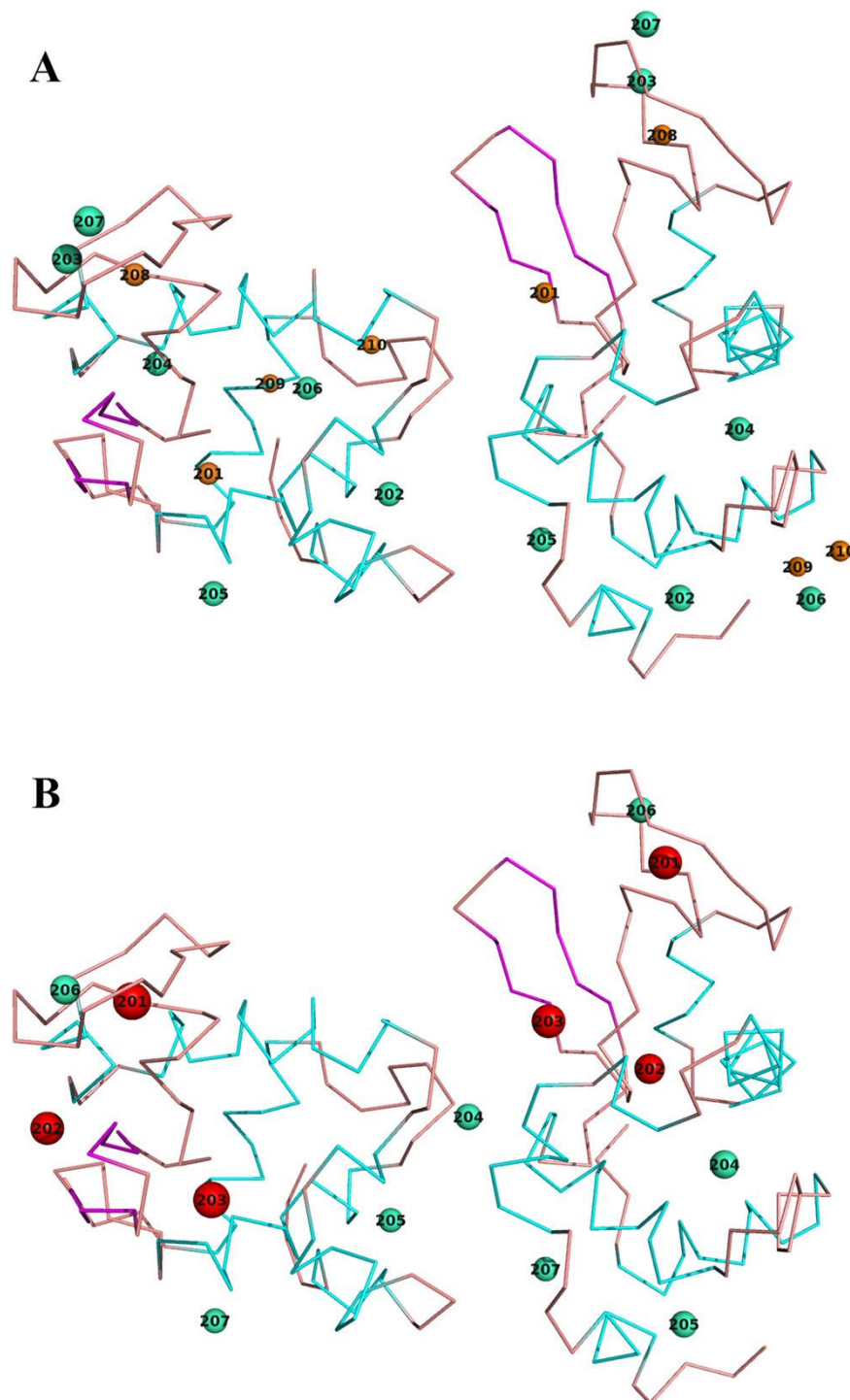


Рис.4.16 – Димеры A-B кристаллов Cu и Na.

Катионы меди и никеля в двух позициях в молекуле лизоцима (201 и 208 в Cu-кристаллах) имеют то же положение, что и ион натрия в Na-кристаллах,

поэтому эти позиции являются общими для моно- и двухвалентных катионов. Связанные в этих позициях катионы были обнаружены во многих структурах лизоцима. Ионы хлора, связанные с молекулой лизоцима, для всех типов кристаллов уменьшают общий положительный заряд белка и обеспечивают оптимальное распределение заряда, что способствует упорядоченной ассоциации молекул и дальнейшему росту кристаллов. Ионы хлора и металла внутри исходного октамерного кластера взаимодействуют с аминокислотными остатками, которые входят в состав удаленных (на периферии) сегментов полипептидной цепи, и тем самым вносят значительный вклад в конформационную стабильность октамера. Ионы, связанные на поверхности октамера, способны влиять на образование связей между ним и последующими единицами роста. Было показано, что кристаллы, выращенные с использованием различных осадителей, различаются по количеству связанных ионов металла и хлора. Ионы металлов и хлора, образующие связи с молекулами лизоцима, обеспечивают распределение поверхностного заряда белка, благоприятное для образования октамеров (единиц роста будущего кристалла) на начальной стадии процессов нуклеации и кристаллизации, и, таким образом, влияют на равновесную концентрацию октамеров в кристаллизационных растворах.

Существуют некоторые структурные особенности октамеров лизоцима, образующихся при добавлении CuCl_2 . Расположенная на поверхности октамера группа ионов, состоящая из катионов Cu^{2+} , Cu^{+} и иона хлора Cl^- , уникальна и наблюдается только в Cu -кристаллах. Эти особенности в структуре октамерного кластера коррелируют с особым составом кристаллизационного раствора лизоцима с CuCl_2 , в котором концентрация октамеров значительно ниже, чем в растворах с другими хлоридами. Данная группа ионов на поверхности октамера предкристаллизационной фазы может влиять на присоединение последующих элементов роста кристалла к исходному октамеру, а также на равновесную концентрацию октамеров в соответствующем кристаллизационном растворе.

Кристаллы меди представляют собой замечательный пример внедрения ионов металла в кристаллическую решетку пористого белка непосредственно в процессе кристаллизации. Подобный подход может быть применен для приготовления, получения некоторых биоорганических материалов.

Кратчайшие расстояния между ионами Cu^{+2} внутри молекулы составляют 9,31 Å, между ионами Cu^{+2} в разных молекулах октамера около 18 Å, поэтому эти ионы могут взаимодействовать друг с другом. Связанные ионы Cu^{+2} образуют регулярную пространственную решетку в решетке белка и потенциально способны взаимодействовать друг с другом и влиять на физические свойства кристалла белка (Рис.4.17). Потенциальная возможность использования пористых белковых кристаллов для применений в гетерогенном катализе и системах доставки лекарств была показана в ряде работ [475, 481, 482].

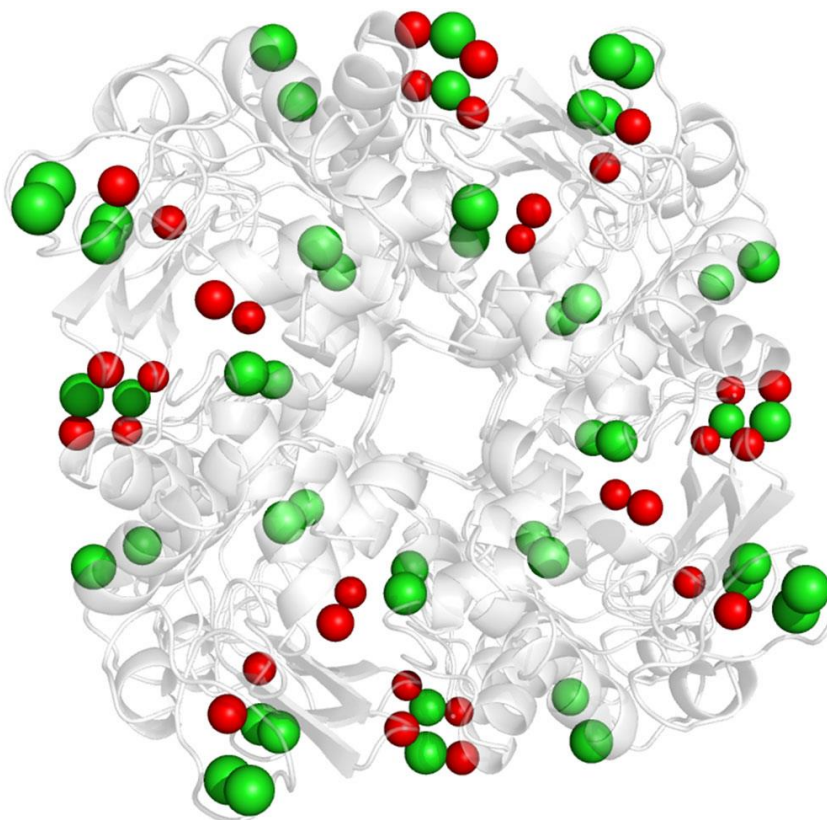


Рис.4.17 – *Распределение ионов металлов и хлора в октамере кристаллической решетки лизоцима. Пространственная сетка, созданная ионами хлора и меди в октамере кристаллической решетки лизоцима.*

4.4. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА ОЛИГОМЕРОВ В РАСТВОРЕ ЛИЗОЦИМА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ NaCl В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Теоретический подход (Раздел 3.6 Главы 3), разработанный в целях исследования молекулярной динамики (МД) олигомеров лизоцима в растворах и определения структуры октамера (А или В, Рис.3.29), образующегося в кристаллизационном растворе, был применен для изучения температурной стабильности октамера А, димера А, который является фрагментом октамера А, и мономера лизоцима.

Исходные модели олигомеров и мономеров были получены из двух кристаллических структур лизоцима, различающихся количеством связанных ионов:

- PDB ID: 4WLD, которая включает ионы натрия, встроенные в кристалл;
- PDB ID: 6QWY, в решетке которой были определены позиции ионов хлора и дополнительных ионов натрия, по результатам исследований взаимодействия ионов (металлов и хлора) с молекулами лизоцима и их роли в образовании кристалла тетрагональной сингонии (Раздел 4.3).

С целью изучения влияния ионов осадителя NaCl, связанных с лизоцимом, на стабильность белковых молекул, олигомеры, относящиеся к структуре 4WLD, моделировались как с ионами натрия, встроенными в молекулы лизоцима, так и без них, в то время как олигомеры, полученные из структуры 6QWY, моделировались только со связанными с белком ионами натрия и хлора. Расчеты МД димеров и октамеров проводились только в растворе NaCl, тогда как расчеты для мономеров проводились, также, в растворе без осадителя.

Расчеты были проведены для нескольких характерных температур от 5 °С, при которой, согласно экспериментальным данным МУРР, концентрация димеров и октамеров максимальна, до 40 °С, при которой экспериментальная концентрация олигомеров падает (Разделы 3.4.1, 3.4.3 Главы 3).

Материалы и методы. Подготовка моделей олигомеров. Модели олигомеров, соответствующие структуре PDB ID: 4WLD, использовались те же, что и в исследованиях МД ранее (Раздел 3.6 Главы 3), за исключением случаев моделирования с ионами натрия, связанными с белком. В этом случае такие ионы были добавлены в PDB файлы олигомеров. В структуре 4WLD на один мономер приходится только один ион натрия, связанный с подвижной петлей 37–72 (в октамере 8 ионов натрия, в димере – 2).

Новые молекулярные модели возможных единиц роста кристаллов лизоцима были выделены из кристаллической структуры лизоцима тетрагональной сингонии из PDB ID: 6QWY, определённой с разрешением 1.35 Å (см. предыдущий раздел). Кристалл принадлежит к пространственной группе $P4_32_12$ с параметрами элементарной ячейки $a = b = 77.147$ Å, $c = 37.139$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$. Независимая часть элементарной ячейки (асимметричная единица) содержит одну молекулу лизоцима.

В файле 6QWY PDB присутствуют остатки (ASN 19, ASN 59 и SER 85), которые существуют в кристалле в двух альтернативных конформациях (А и В) с одинаковыми коэффициентами заполнения 0.5, из которых была оставлена конформация А. С помощью программы PyMOL [483], применяя соответствующие операторы симметрии ($-X, -Y, Z+1/2$; $-Y+1/2, X+1/2, Z+3/4$; $Y+1/2, -X+1/2, Z+1/4$; $-X+1/2, Y+1/2, -Z+3/4$; $X+1/2, -Y+1/2, -Z+1/4$; $Y, X, -Z$; $-Y, -X, -Z+1/2$) к асимметричной единице решетки лизоцима, были получены координаты октамера и димера. В структуре олигомеров были оставлены ионы осадителя, связанные с лизоцимом (на одну молекулу белка приходится 3 иона натрия и 4 иона хлора), и удалены молекулы воды кристаллической решетки.

Материалы и методы. Моделирование молекулярной динамики. Методики моделирования МД описаны в Разделе 2.4.3 Главы 2. Длина ребра ячейки для октамера А составила 13.7 нм, димера А – 8.6 нм, мономера – 7 нм.

Моделирование МД мономера лизоцима при 10 °С было проведено для шести различных систем: три из них были построены с осадителем в растворе,

а остальные три – в отсутствие ионов натрия и хлорида в растворе. Для каждого из этих двух наборов (с осадителем в растворе и без него) проводилось моделирование с использованием моделей мономера: (1) с ионами Na и Cl, связанными с мономером; (2) только с ионами Na, связанными с белком, и (3) без ионов, встроенных в структуру лизоцима (Табл. 4.6).

Табл. 4.6 – Число независимых вычислений (симуляций) для каждой температуры.

Температура, °C		5	10	15	20	25	30	35	40
Без ионов осадителя, связанных с белком (PDB ID: 4WLD)	Октамер	0	1	1	1	1	1	1	1
	Димер	0	1	1	1	1	1	1	1
	Мономер	0	3	0	0	0	0	0	0
	Мономер без добавления осадителя в раствор	0	3	0	0	0	0	0	0
С учетом ионов Na в структуре белка (PDB ID: 4WLD)	Октамер	0	1	1	1	1	1	1	1
	Димер	0	1	1	1	1	1	1	1
	Мономер	0	3	0	0	0	0	0	0
	Мономер без добавления осадителя в раствор	0	3	0	0	0	0	0	0
С учетом ионов Na и Cl, связанных с белком (PDB ID: 6QWY)	Октамер	3	3	0	3	0	3	0	3
	Димер	3	3	0	3	0	3	0	3
	Мономер	0	3	0	0	0	0	0	0
	Мономер без добавления осадителя в раствор	0	3	0	0	0	0	0	0

Примечание: для всех случаев моделирование олигомеров и мономеров проводилось в присутствии ионов осадителя (Na и Cl) в растворе, если не указано обратное.

Расчет МД димеров и октамеров, соответствующих структуре 4WLD, проводился однократно при 10, 15, 20, 25, 30, 35 и 40 °C. При каждой температуре проводилось моделирование динамики как с ионом натрия, связанным с подвижной петлей, так и без него.

Расчет МД октамера А и димера А, выделенных из структуры 6QWY, дополненной позициями ионов натрия и хлора, проводился три раза для каждой из температур 5, 10, 20, 30 и 40 °C. Ионы осадителя всегда присутствовали в водном растворе в ходе моделирования МД олигомеров.

По результатам МД моделирования были рассчитаны значения и построены графики RMSF (root mean square fluctuation, среднеквадратичные флуктуации) атомов олигомеров и мономеров, т.е. флуктуации координат

атомов, усреднённые по всему времени моделирования (100 нс), характеризующие подвижность атома и, соответственно, стабильность или нестабильность олигомеров и мономеров или их частей (остатков, участков цепей, петель и т.д.).

Результаты моделирования молекулярной динамики. В результате настоящего исследования было проведено моделирование молекулярной динамики мономера, октамера и димера, выделенных из двух кристаллических структур лизоцима (PDB ID: 4WLD, 6QWY), в растворе в присутствии осадителя, а в случае мономеров и в его отсутствие, при различных температурах в диапазоне от 5 до 40 °C. Критерием стабильности олигомеров была выбрана величина RMSF флуктуаций атомов C α .

Для мономера лизоцима с целью установить влияние связанных с ним ионов натрия и хлора, в особенности в подвижной петле 37-72, на стабильность молекулы было проведено сравнение RMSF атомов C α при 10 °C в 6 различных системах (Рис.4.18).

На Рис.4.19 цветом показаны участки с различными значениями RMSF атомов мономера: синим цветом обозначены наиболее стабильные (т.е. наименее гибкие) области белка; зеленым – менее стабильные; красным – наиболее подвижные участки, соответствующие самым высоким значениям RMSF [444]. С использованием VMD [484] были построены изображения одновременно нескольких кадров траектории, представленные на Рис.4.20.

Для обоих случаев (Рис.4.18, с добавлением (а) и без (b) осадителя в растворе) значение RMSF превышает «фон» для групп атомов C α 30 – 130, 660 – 760, 900 – 1200, 1450 – 1950. Самая стабильная молекула – это молекула без связанных ионов. Чем больше связанных ионов учитывается в моделировании, тем выше значения RMSF и ниже стабильность атомов наблюдаются для области C α 1450 – 1950 молекулы лизоцима. Добавление осадителя в раствор несколько стабилизирует молекулу и значительно снижает RMSF лишь в области C α 1850 – 1950, снижая величины флуктуаций

более чем в 2,5 раза (синяя линия). Однако в целом наличие или отсутствие связанных с белком ионов, а также присутствие или отсутствие осадителя не оказывает существенного влияния на подвижность атомов лизоцима.

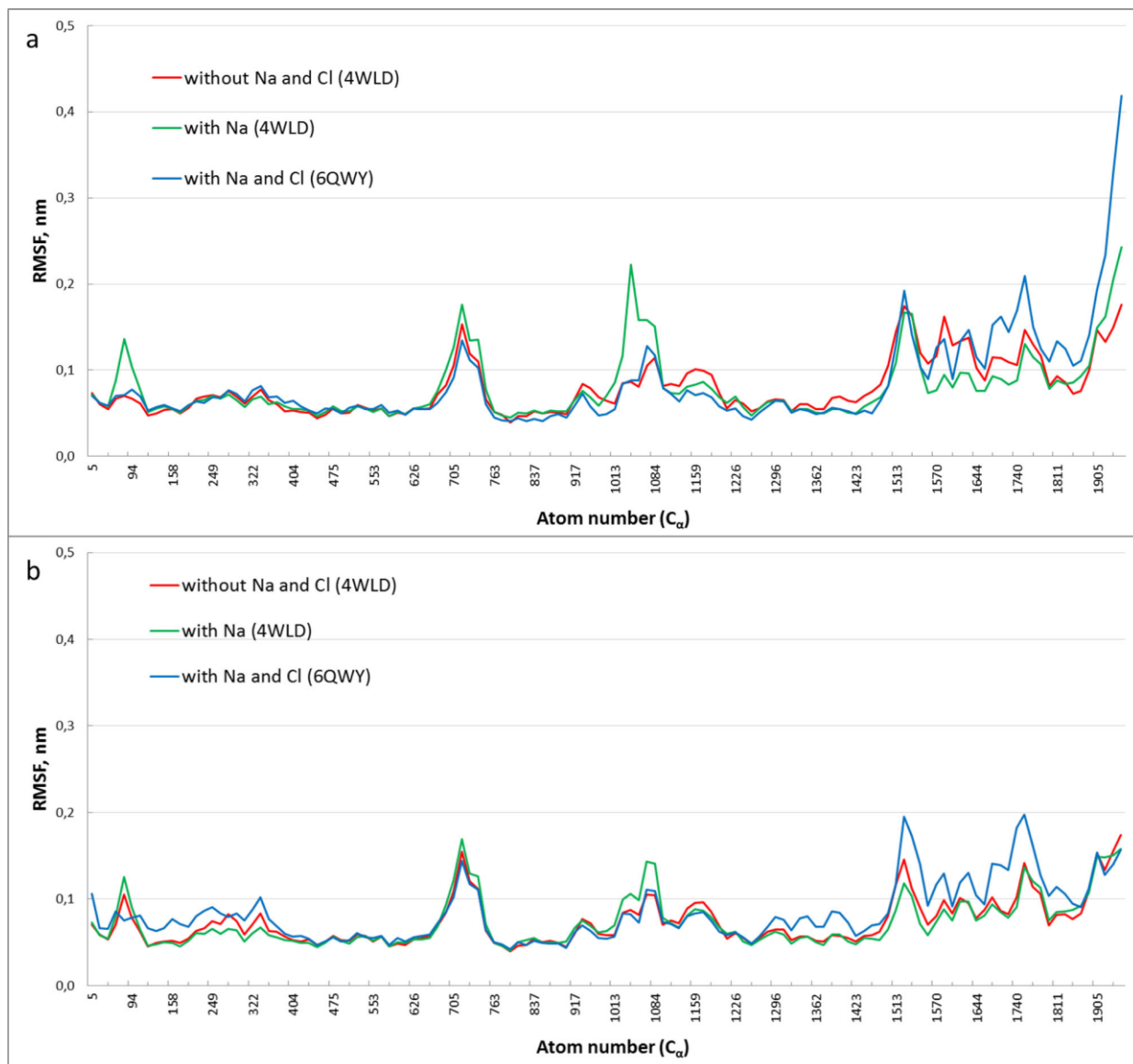


Рис.4.18 – Зависимость величины флуктуаций RMSF от номера C_{α} атомов мономера лизоцима при моделировании с добавлением (а) и без (б) осадителя в растворе. Кривые, соответствующие мономерам без связанных с ними ионов, показаны красным цветом; зеленым – кривые, иллюстрирующие RMSF моделей с ионами Na, связанными с белком; синим – кривые, соответствующие моделированию мономеров с ионами Na и Cl, встроенными в их структуру. Каждая кривая представляет значения RMSF, усредненные по трем независимым симуляциям.

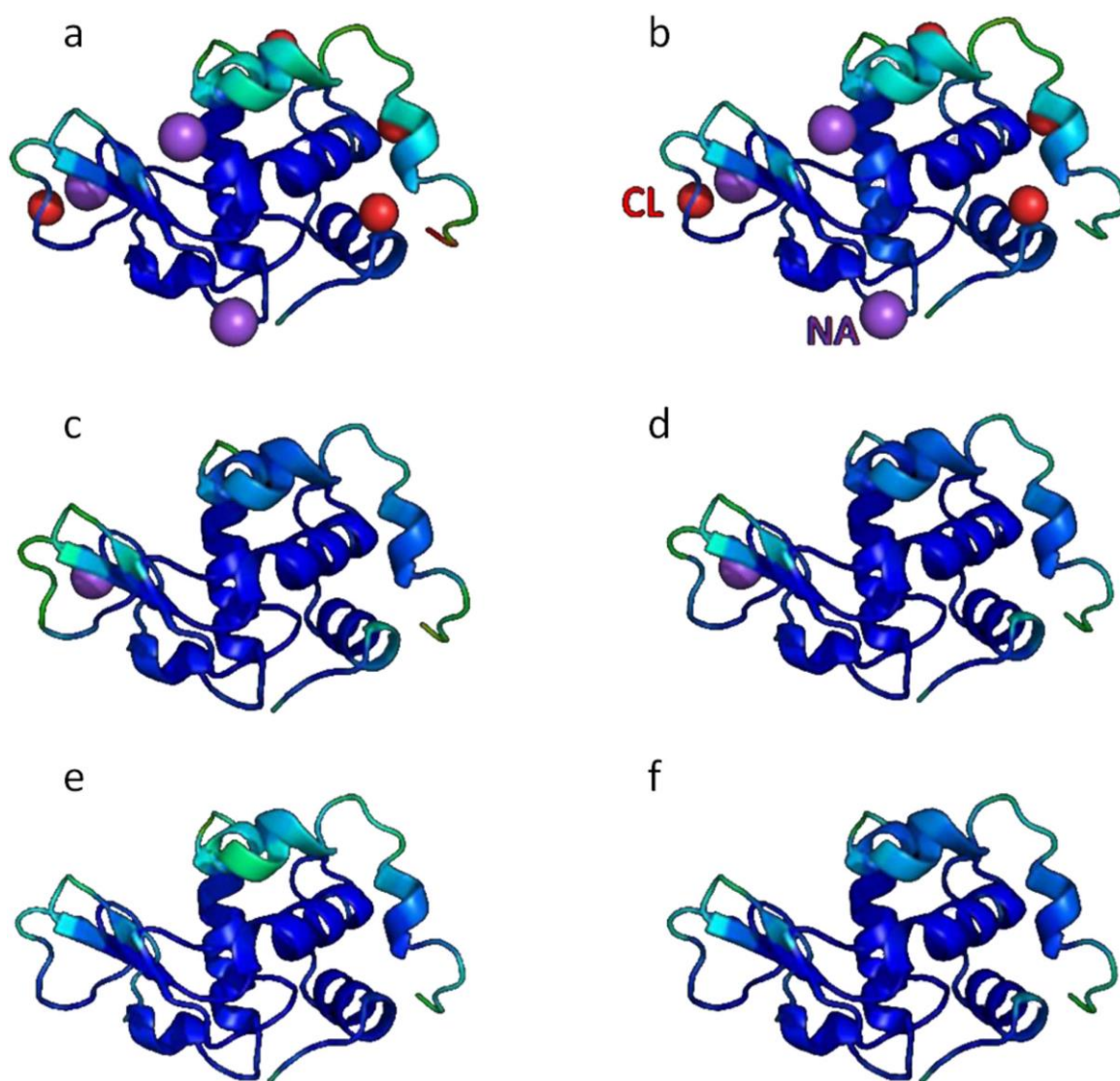


Рис.4.19 – В соответствии с величинами RMSF цветом (см. в тексте) показана подвижность атомов мономера при 10 °C с добавлением (a), (c), (e) и без (b), (d), (f) осадителя в растворе. Ионы, связанные с мономером: (a), (b) – Na и Cl; (c), (d) – Na; (e), (f) – без ионов.

Из Рис.4.19, 4.20 видно, что молекула лизоцима характеризуется относительно стабильным «ядром», а также рядом подвижных участков, из которых прежде всего следует выделить петлю 37 – 72, которая связывает ион металла (Ca 564 – 1091). Из структурных данных, приведенных в Разделе 4.3, известно, что, хотя сама петля является относительно подвижной, связанный ион металла характеризуется низким В-фактором, что говорит о консервативности данного сайта связывания и, возможно, его решающей роли в процессе кристаллизации.

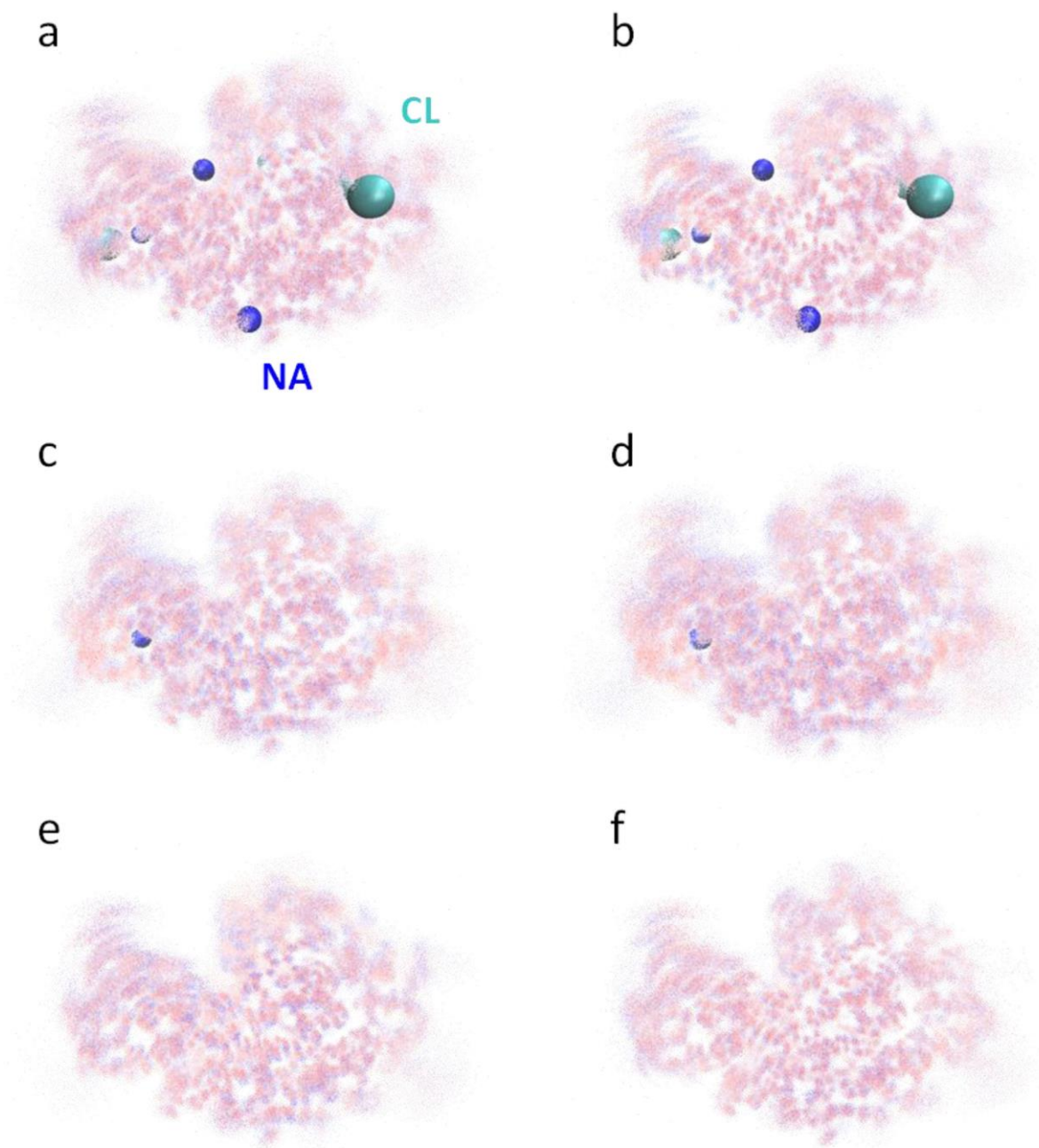


Рис.4.20 – Движение атомов мономера при 10 °C: (a), (b) - с ионами Na и Cl, (c), (d) - с ионом Na, (e), (f) - без связанных ионов; (a), (c), (e) - с осадителем в растворе, (b), (d), (f) - без осадителя в растворе. Точки представляют положения атомов белка каждые 100 пс их траектории в 100 нс (после структурного выравнивания). Начало траектории обозначено красным цветом, середина - белым, а конец - синим.

Тот факт, что на подвижность атомов мономера наличие или отсутствие ионов не оказывает существенное влияние, может свидетельствовать о том, что решающее значение в процессе кристаллизации имеет перераспределение

зарядов на поверхности молекулы лизоцима, очевидно имеющее место при связывании положительно и отрицательно заряженных ионов. Это предположение подтверждается образованием положительно заряженной поверхности при формировании пленки лизоцима в ленгмюровской ванне при нанесении на поверхность субфазы небольшого количества предкристаллизационного раствора, включающего лизоцим и хлорид щелочного металла (см. Раздел 5.4). Было показано, что к образующейся в ванне, на поверхности водной субфазы, пленке из октамеров примыкает тонкий слой отрицательно заряженных ионов хлора.

На Рис.4.21 представлены температурные зависимости величины RMSF для различных моделей олигомеров в растворе лизоцима с осадителем NaCl: (a) без связанных с белком ионов осадителя; (b) с учетом встраивания в молекулу белка ионов натрия; (c) с учетом связывания с белком как ионов натрия, так и ионов хлора. В результате экспериментальных исследований кристаллизационных растворов лизоцима при добавлении осадителя NaCl было показано, что концентрация октамеров снижается с ростом температуры (Раздел 3.4 Главы 3).

Из Рис.4.21 видно, что регулярная и соответствующая эксперименту зависимость, когда с повышением температуры увеличиваются значения RMSF (т.е. стабильность олигомеров снижается), наблюдается только в случае (c). Следовательно, результаты МД согласуются с экспериментом только тогда, когда моделирование проводится с использованием моделей октамеров с учетом всех ионов осадителя, связанных с лизоцимом.

На Рис.4.22 приведено сравнение экспериментальной температурной зависимости концентрации олигомеров в 0,4 М растворе NaCl с результатами моделирования для октамера (a) и димера (b) со связанными ионами осадителя, для которых значения RMSF были усреднены по всем позициям Ca и независимым вычислениям (симуляциям) при каждой моделируемой температуре.

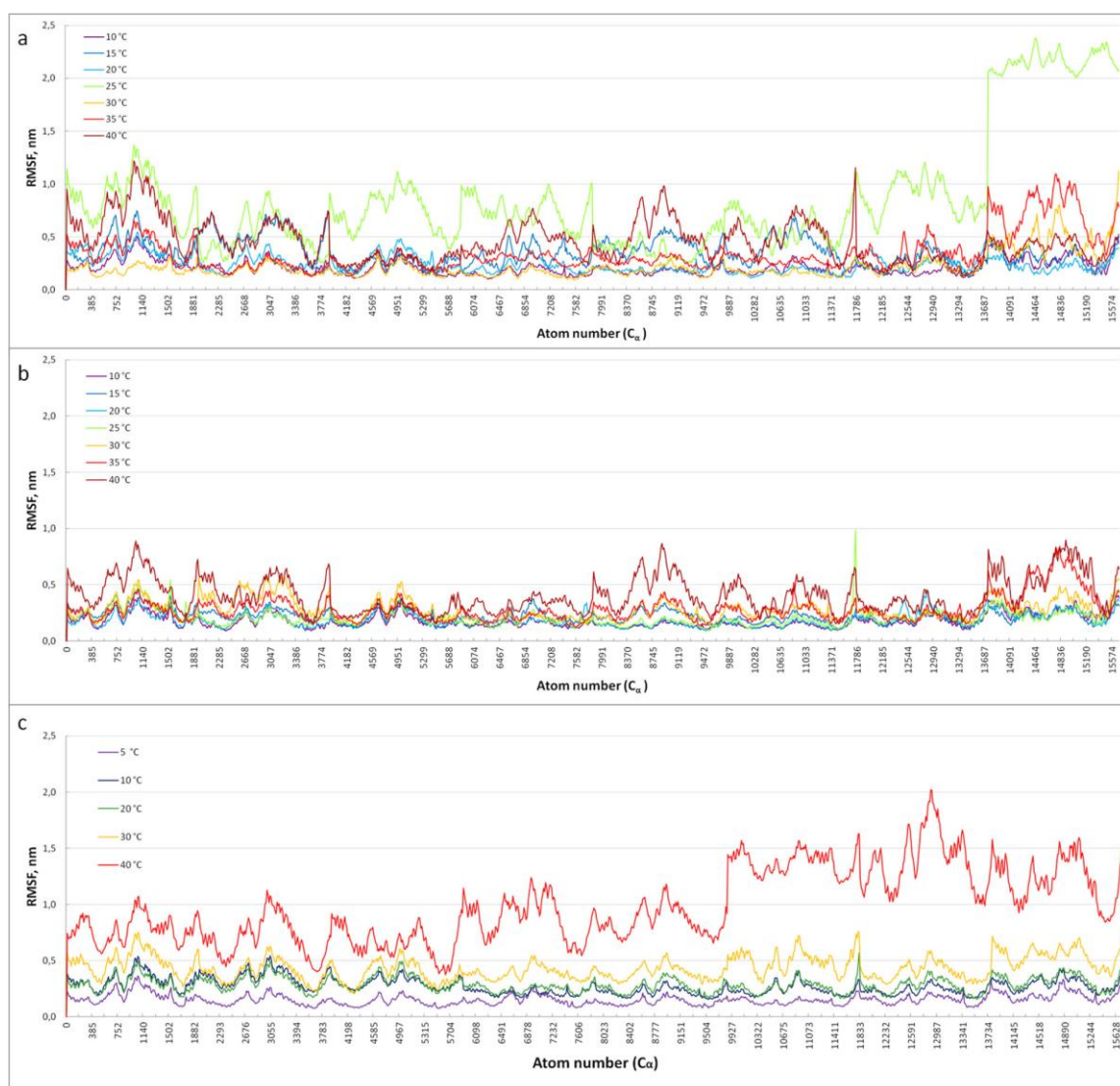


Рис.4.21 – Значения *RMSF* атомов октамера лизоцима, полученные в результате моделирования в растворе с осадителем: (а) без ионов *Na* и *Cl*, связанных с белком, (б) с ионами *Na*, но без ионов *Cl*, (с) с ионами *Na* и *Cl* в структуре молекул белка. Каждая температура представлена отдельным цветом. Каждое значение *RMSF* на (с) усредняется по трем независимым симуляциям.

Из Рис.4.22 видно, что расчеты МД в целом согласуются с экспериментом. Однако температурные зависимости усредненного значения *RMSF* имеют существенно более нелинейный характер, чем экспериментальные зависимости.

В настоящем исследовании была изучена стабильность различных олигомеров, которые являются кластерами-прекурсорами будущего кристалла тетрагонального лизоцима. Проведено моделирование молекулярной

динамики мономера, димера и октамера лизоцима в растворе, варьируя количество ионов осадителя NaCl, связанных с молекулой белка.

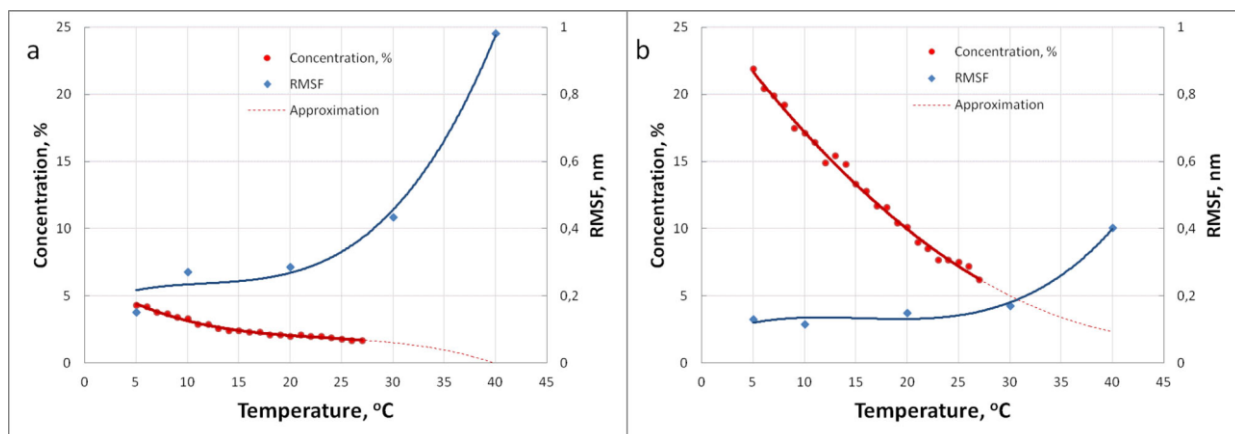


Рис.4.22 – Температурные зависимости концентрации олигомеров в водном растворе лизоцима и усредненных значений RMSF атомов C α октамера (a) и димера (b), полученные в результате моделирования в растворе с осадителем и с учетом ионов Na и Cl, связанных с молекулами белка.

Показано влияние ионов натрия и хлора, связанных с лизоцимом или присутствующих в растворе, на стабильность олигомеров в кристаллизационном растворе. При рассмотрении мономеров учет в моделировании большего количества ионов приводит к росту значений RMSF в области C α 1450 – 1950 молекулы лизоцима. Добавление осадителя в раствор белка значительно снижает RMSF только в области C α 1850 – 1950, что в целом не оказывает существенного влияния на подвижность атомов в молекуле лизоцима.

В случае димеров и октамеров только при учете всех связанных с белком ионов осадителя NaCl наблюдается соответствие результатов МД экспериментальным температурным исследованиям растворов в условиях кристаллизации тетрагонального лизоцима методом МУРР. Это указывает на то, что важную роль в механизме кристаллизации играют как ионы осадителя, присутствующие в растворе, так и ионы, образующие связи с молекулами белка и встраивающиеся в его структуру. Поскольку при добавлении осадителя гибкость молекулы лизоцима (за счет подвижности ее частей) не меняется существенным образом, взаимодействие между молекулами, по-

видимому, осуществляется за счет перераспределения заряда на ее поверхности.

Следует отметить, что предложенный ранее подход, основанный на выделении олигомера, элемента роста будущего кристалла, в виде специфического 3D-фрагмента кристаллической решетки, и изучении его поведения в кристаллизационном растворе методами МД позволяет получить новую, важную информацию о динамике белковых молекул и олигомеров в растворе, в частности, о конформации мономера, меж- и внутримолекулярных связях и взаимодействии молекул белка с ионами осадителя. Продемонстрирована важность использования кристаллической структуры белка, полученной с достаточно высоким разрешением (чтобы позиции ионов осадителя, связанных с белком, были определены) для проведения моделирования МД.

4.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 4

Представлены результаты исследований роли ионов осадителя в механизме кристаллизации белков по результатам анализа структуры растворов, кристаллов лизоцима и моделирования молекулярной динамики.

Исследовано влияние ионного состава осадителя на образование олигомеров разного типа. Показано, что замена аниона приводит к изменению сингонии кристалла лизоцима. Исследовано влияние типа катиона и концентрации осадителя в ряду хлоридов (NaCl , KCl , LiCl , NiCl_2 , CuCl_2 , CoCl_2) на объемную долю олигомеров (димеров, октамеров), образующихся перед началом кристаллизации белка. Объемные доли димеров и октамеров возрастают с увеличением концентрации осадителя и понижением температуры. В ряду одновалентных ионов объемная доля октамеров увеличивается в порядке: $\text{K}^+ - \text{Na}^+ - \text{Li}^+$, а для двухвалентных: $\text{Cu}^{2+} - \text{Ni}^{2+} - \text{Co}^{2+}$, что соответствует ряду Гофмейстера увеличения энергии гидратации.

На основе структурных данных, полученных с высоким разрешением, были проанализированы связи между молекулами лизоцима в кристалле

ионами хлоридов – осадителей (NaCl , KCl , LiCl , NiCl_2 , CuCl_2). Ионы металлов и хлора можно разделить на три группы: 1 – связанные непосредственно с молекулой белка; 2 – связанные с молекулами белка в прекурсор кристалла (димере и октамере); 3 – расположенные на границе октамеров в кристалле.

Было показано, что кристаллы, выращенные с различными осадителями, различаются по количеству связанных ионов металла и хлорида.

Для всех осадителей было показано, что:

- ионы группы 1 обеспечивают распределение поверхностного заряда, приводящее к упорядоченной ассоциации молекул и образованию прекурсоров кристалла - октамеров, влияют на равновесную концентрацию октамеров в кристаллизационных растворах, и обеспечивают дальнейший рост кристаллов;

- ионы хлора и металла группы 2 вносят вклад в конформационную стабильность октамера, посредством взаимодействия с аминокислотными остатками, принадлежащими удаленным сегментам полипептидной цепи;

- ионы группы 3 способны различным образом влиять на связывание октамеров между собой. Так для ионов Cu , расположенных на границе октамера, обнаружены особенности, которые оказывают влияние на равновесную концентрацию октамеров. Ионы Cu образуют регулярную пространственную сетку в кристалле белка и потенциально способны взаимодействовать друг с другом и влиять на физические свойства кристалла белка.

С учетом позиций ионов осадителя NaCl в структуре лизоцима было проведено моделирование молекулярной динамики (МД) мономеров и олигомеров (мотивов кристаллической структуры) в условиях, в которых ранее проводились эксперименты по исследованию процесса кристаллизации методами МУРР и МУРН (Глава 3).

Из кристаллической структуры лизоцима тетрагональной сингонии (PDB ID: 6QWY) были выделены молекулярные модели возможных единиц роста кристалла лизоцима. В структуре олигомеров были оставлены ионы осадителя

NaCl, связанные с лизоцимом (на одну молекулу белка приходится 3 иона натрия и 4 иона хлора), вода была удалена.

Проведено сравнение результатов, полученных методом МД в трех случаях: использовались модели олигомеров с ионами натрия и хлора, связанными с молекулой лизоцима; модели только с ионами натрия, связанными с лизоцимом; олигомеры без связанных с белком ионов. Показано, в случае олигомеров (димеров и октамеров) только при учете всех связанных с белком ионов осадителя NaCl наблюдается соответствие результатов МД экспериментальным температурным исследованиям растворов в условиях кристаллизации тетрагонального лизоцима методом МУРР (Раздел 3.4 Главы 3).

Определено, ионы натрия и хлора, связанные с молекулой лизоцима в кристалле, играют важную роль в формировании кристалла тетрагональной сингонии, а также вносят существенный вклад в обеспечение стабильности основной «единицы роста» – октамера специфической структуры (типа А).

ГЛАВА 5. Формирование ленгмюровских пленок на основе растворов лизоцима в условиях кристаллизации

5.1. АННОТАЦИЯ К ГЛАВЕ 5

Настоящая глава посвящена исследованию взаимодействия ионов осадителя с белком в слабоупорядоченных системах и формированию ленгмюровских пленок на основе кристаллизационных растворов лизоцима.

С целью получения информации о связях, образующихся между молекулами белка и осадителя, в слабоупорядоченных (частично упорядоченных) системах было предложено сформировать ленгмюровские пленки из растворов белка с добавлением осадителя. Это позволило:

- исследовать взаимодействия белка с осадителем в ленгмюровских монослоях;
- разработать методы управляемого создания слабоупорядоченных белковых пленок.

Раздел 5.2 посвящен описанию развитой в работе методики исследования взаимодействия ионов осадителя с белками на основе ленгмюровских методов, АСМ и рентгеновских методов рефлектометрии и СРВ в ПВО.

Разработана новая модификация метода Ленгмюра-Шеффера (ЛШ) для получения белковых пленок на твердых подложках, основанная на использовании кристаллизационного раствора лизоцима, содержащего октамеры, для формирования монослоя на поверхности водной субфазы [485].

Развиты и адаптированы *in situ* методики рентгеновских и синхротронных измерений с использованием ячеек измерительного комплекса окружения образца для исследования белковых систем в нативном состоянии. Представлены результаты исследований пленок лизоцима, полученных (модифицированным методом ЛШ) при добавлении NaCl методами рентгеновской рефлектометрии (РР) и СРВ в ПВО.

В Разделе 5.3 представлены результаты структурных исследований пленок лизоцима, полученных при добавлении осадителя KI , методами РР и СРВ в ПВО.

В Разделе 5.4 представлены результаты структурных исследований монослоев лизоцима, полученных при добавлении осадителя KCl , методом СРВ в ПВО на поверхности воды.

Установлено, что при нанесении на поверхность водной субфазы раствора лизоцима с осадителем, ионы осадителя не диссоциируют равномерно в объем субфазы, а формируют тонкий слой на границе раздела белок/субфаза. При этом структура «слой белка/слой осадителя/субфаза» остается стабильной в течение длительного времени (не менее 12 часов в случае KCl).

5.2. МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИОНОВ ОСАДИТЕЛЯ С БЕЛКАМИ

5.2.1. Получение ленгмюровских пленок лизоцима

Описание ленгмюровской технологии получения органических тонких пленок представлено в Разделе 1.5.1 Главы 1, описание экспериментальных методик – в Разделе 2.7.1 Главы 2.

Преимуществом метода ЛБ является то, что процесс переноса монослоя легче автоматизировать, добиваясь воспроизводимых результатов, метод ЛБ позволяет переносить на подложку большое количество слоев, а ориентацию слоя можно менять путем выбора направления движения подложки. Но не все типы монослоев могут быть успешно перенесены методом ЛБ, в то время как метод *ЛШ* позволяет добиваться переноса на твердые подложки монослоев практически любого типа молекул.

Качество переноса оценивают по коэффициенту переноса, который равен отношению изменения площади монослоя на поверхности ванны к площади покрытия подложки.

В целом подбор типа подложки и метода обработки ее поверхности, метода переноса, давления переноса и других параметров является экспериментальной задачей, требующей иногда для ее решения большого количества времени и попыток. Также, важно для определения качества полученных органических слоев на твердых подложках и коррекции параметров получения проводить их структурные исследования, в том числе *in situ*.

Было показано, что добавление осадителя (NaCl) к раствору белка лизоцима при соблюдении условий кристаллизации (концентрация белка и осадителя, pH, состав буфера и температура) приводит к процессу образования олигомеров. При этом в растворе почти половина молекул лизоцима (~44%), согласно данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, может собираться в октамеры (см. Главу 4). Эти октамеры, предположительно, принимают непосредственное участие в построении кристалла белка и представляют собой упорядоченные мотивы данного кристалла.

На основе указанных выше данных был предложен способ модификации метода Ленгмюра–Шеффера (ЛШ) получения пленок белка лизоцима. Для формирования монослоя белка следует использовать такой раствор, параметры которого соответствуют условиям кристаллизации лизоцима, что должно приводить к предварительному образованию октамеров в растворе (Рис.5.1). Высказано предположение, что образующиеся в растворе октамеры являются весьма устойчивыми образованиями и принимают участие в процессе формирования монослоя как единые структурные элементы, что должно повлиять на структуру пленки.

Предложенный способ заключается в использовании предварительно подготовленного белкового раствора, параметры которого соответствуют условиям кристаллизации. В формировании ленгмюровского монослоя лизоцима участвуют образовавшиеся в таком растворе комплексы, представляющие собой димеры и октамеры молекул белка, которые, по-видимому, сохраняют свою структуру при нанесении раствора белка на

поверхность водной субфазы в ленгмюровской ванне. При переносе монослоя, сформированного предложенным способом, на твердую подложку, пленка является плотной, сплошной и равномерной.

Описание материалов и методик формирования монослоев лизоцима с осадителями NaCl, KCl и KI представлено в Разделах 2.3 и 2.7.1 Главы 2.

Получение пленок белков, в том числе на твердых подложках, вызывает большой интерес как с точки зрения изучения механизмов их функционирования, так и разработки технологий создания новых гибридных систем [486].

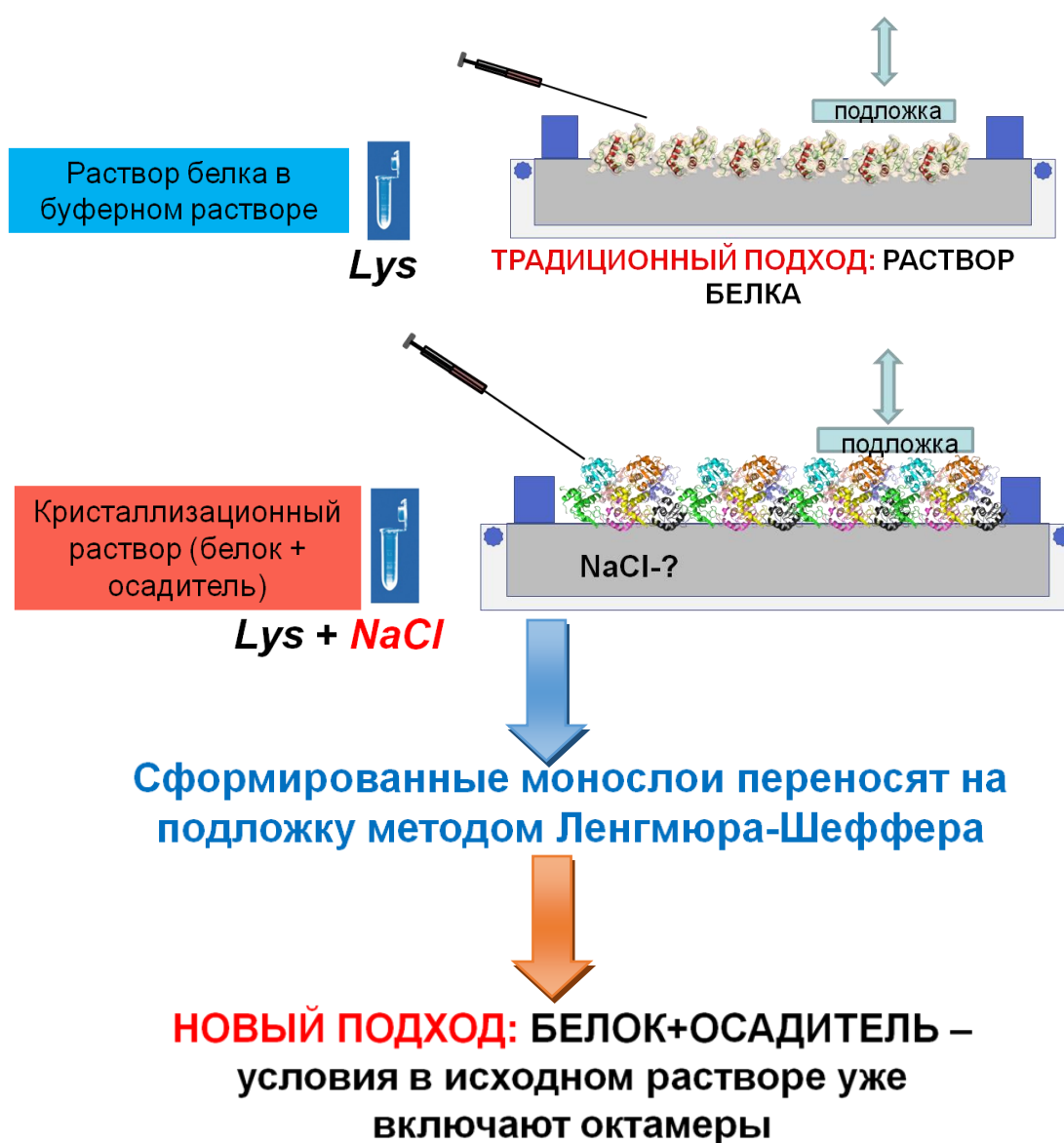


Рис.5.1 – Схема предложенного способа получения упорядоченных пленок белка на твердых подложках.

Основной проблемой при получении таких пленок на твердых подложках остается отсутствие подробных исследований их структуры [487 – 489] и данных о воспроизводимости пленок. Контролируемое качество полученных белковых пленок и их структурные особенности являются важными аспектами, определяющими возможности их практического применения. Для разработки методов создания белковых пленок, характеристики которых соответствуют заданным параметрам, необходимо установить взаимосвязь структурных особенностей созданной пленки с условиями ее формирования на различных этапах.

5.2.2. Определение толщины пленок лизоцима методом рентгеновской рефлектометрии

Для исследования влияния осадителя на формирование монослоя были сопоставлены данные о толщине и качестве поверхности пленок лизоцима, синтезированных из растворов как чистого белка, так и белка с осадителем, полученные методами рентгеновской рефлектометрии и АСМ.

Эксперименты методом рентгеновской рефлектометрии проводились *in situ* с использованием герметичной ячейки, описанной в Разделе 2.5 «Специализированная ячейка для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов», рентгеновского лабораторного дифрактометра SmartLab Rigaku и методик измерений, описанных в Разделе 2.7.2 Главы 2.

На Рис.5.2 и 5.3 представлены кривые рентгеновской рефлектометрии – угловые зависимости зеркальной компоненты отражения рентгеновского излучения от полученной белковой пленки и соответствующие ей профили распределения электронной плотности по толщине. Профиль нормирован на электронную плотность подложки.

Относительная интенсивность отражения от подложки без белковой пленки (Рис.5.2, кривая 1) в области дальних углов (2° – 3°) несколько выше, чем от пленок лизоцима (кривые 2, 3). Это может быть связано как с наличием диффузного рассеяния вследствие менее упорядоченной (менее гомогенной) структуры пленки (в сравнении с пленкой из белкового раствора с осадителем), так и с большей толщиной переходного слоя подложка–пленка в данном образце.

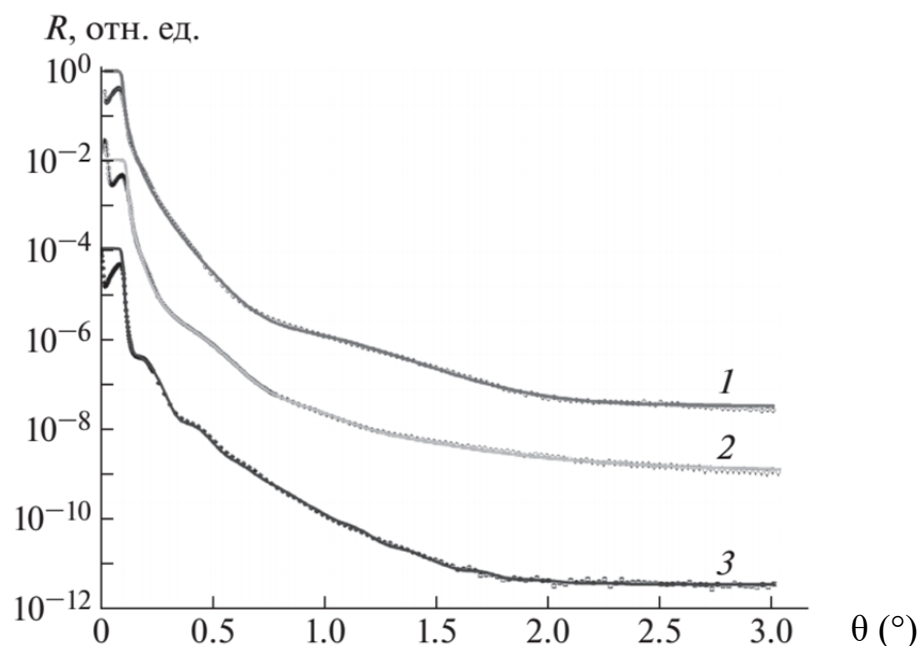


Рис.5.2 — Угловая зависимость зеркальной компоненты рентгеновского отражения (точки — эксперимент, сплошные линии — расчет): от подложки Si без белковой пленки (1); от пленки лизоцима, сформированной из чистого раствора белка без осадителя (2); в случае предварительно приготовленного белкового раствора с осадителем (3).

Толщина пленки лизоцима с осадителем почти в 2 раза больше толщины пленки без осадителя (73 и $40 \text{ \AA}$ соответственно), которая соответствует усредненному диаметру мономера лизоцима. Сравнение профилей распределения электронной плотности показывает, что монослой лизоцима с осадителем, перенесенный на подложку, является более однородным и плотноупакованным: его плотность почти в 5 раз превышает плотность монослоя лизоцима без осадителя, а шероховатость в 2.5 раза меньше. Возможно присутствие слоя H_2O между подложкой и пленкой белка.

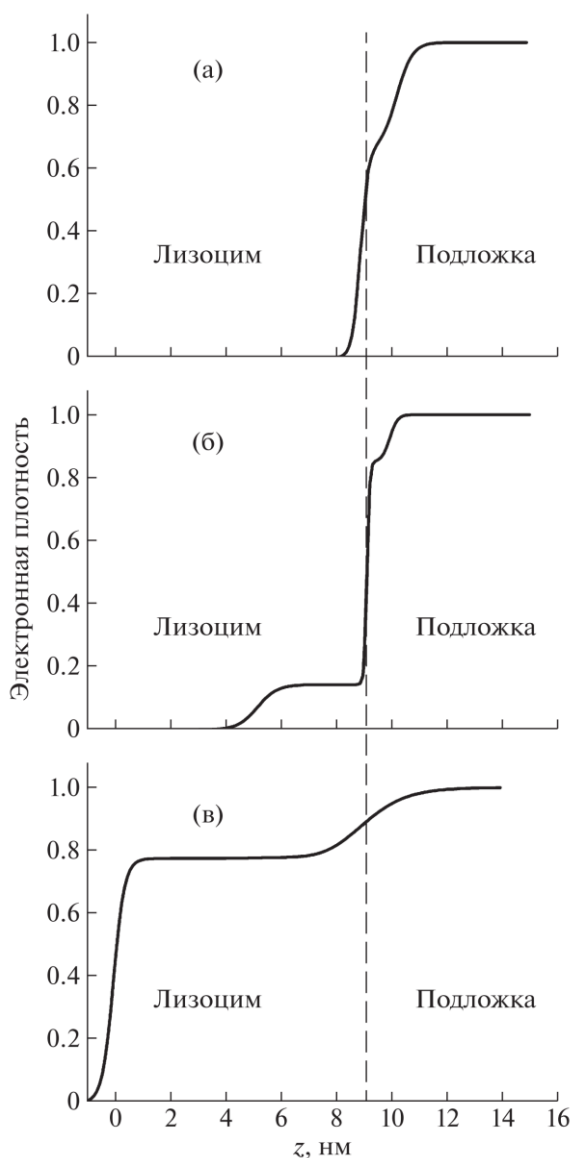


Рис.5.3 – Рассчитанный профиль электронной плотности (нормированный на электронную плотность подложки) для: кремниевой подложки без белковой пленки (а); пленки лизоцима, сформированной из чистого раствора белка без осадителя (б); пленки лизоцима, полученной из предварительно приготовленного белкового раствора с осадителем (в).

На Рис.5.4 представлены профили распределения электронной плотности по толщине пленок лизоцима, полученные по результатам экспериментов *in situ* с использованием герметичной кристаллизационной ячейки (Раздел 2.5 «Специализированная ячейка для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов»).

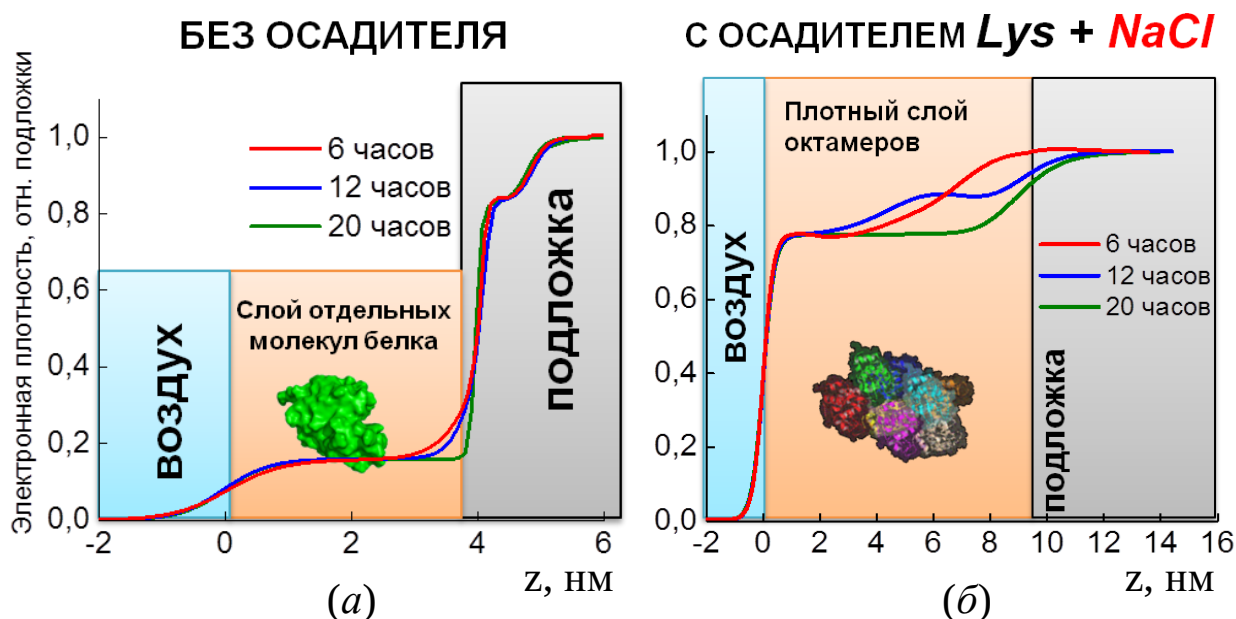


Рис.5.4 – Профили распределения электронной плотности по толщине пленок лизоцима, полученные по результатам экспериментов *in situ* с использованием герметичной кристаллизационной ячейки. Рассчитанные профили электронной плотности (нормированные на электронную плотность подложки) для: пленки лизоцима, сформированной из чистого раствора белка без осадителя (а); пленки лизоцима, полученной из предварительно приготовленного белкового раствора с осадителем (б).

5.2.3. Определение толщин пленок лизоцима методом атомно-силовой микроскопии

Описанные в предыдущем разделе результаты были также подтверждены методом АСМ. Описание методики измерений представлено в Разделе 2.7.2 Главы 2.

На Рис.5.5 представлены морфология и профиль поверхности пленок лизоцима. Толщина пленки лизоцима без осадителя составляет 3.5 нм, сама пленка имеет островковую структуру.

Пленка лизоцима с осадителем имеет однородную структуру, а ее толщина составляет 7.5 нм. Такая толщина соответствует размеру октамеров, образующихся в растворе в условиях кристаллизации, диаметр которых (в приближении сферической формы), согласно данным малоуглового рассеяния

рентгеновских лучей, составляет 6.02 нм ($V = 117 \text{ нм}^3$) плюс толщина тонких слоев буфера между пленкой и подложкой и на поверхности пленки. Таким образом, формирование плотноупакованной пленки лизоцима с осадителем двойной толщины можно объяснить участием октамеров в формировании ленгмюровского монослоя (Рис.5.6).

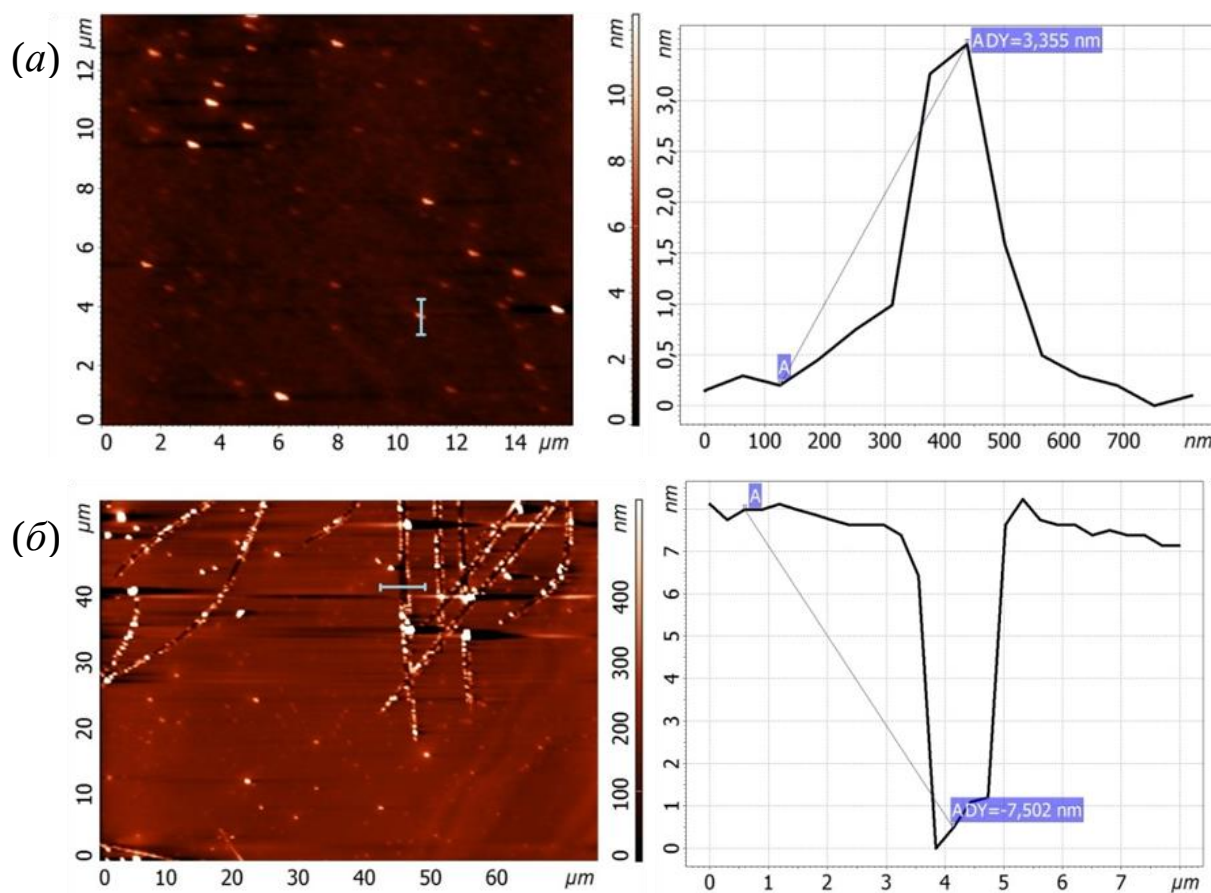


Рис.5.5 – АСМ-изображения (слева) и профиль изменения высоты (справа) монослоев лизоцима (а) и лизоцима с хлоридом натрия (б), перенесенных на кремниевые подложки методом Ленгмюра-Шеффера.

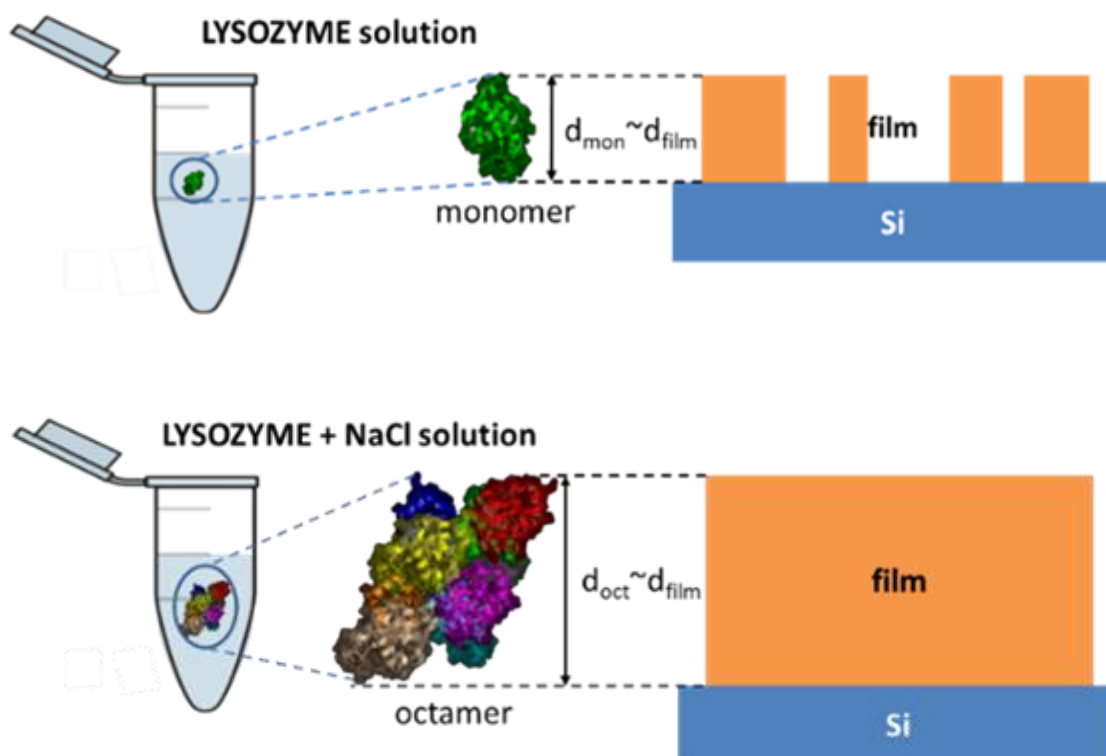


Рис.5.6 – Предполагаемая структура ЛШ-пленок лизоцима в зависимости от структуры исходного белкового раствора: а – раствор мономеров лизоцима приводит к формированию островковой пленки толщиной 3 нм; б – раствор с октамерами (которые образуются в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии – при использовании).

5.2.4. Результаты исследования пленки лизоцима с добавлением NaCl методом СРВ в ПВО

Формированию октамеров должно предшествовать изменение гидратной оболочки белковых молекул под воздействием ионов осадителя. При нанесении раствора белка с осадителем на поверхность водной субфазы концентрация ионов осадителя, не связанных с молекулами белка, может существенно снизиться за счет диффузии ионов осадителя в водную субфазу. Это может привести к изменению эффективной концентрации осадителя вблизи монослоя белка и разрушению октамеров.

Для определения положения ионов осадителя в пленке, полученной модифицированным методом ЛШ, пленку исследовали методом СРВ в

области ПВО. Эксперименты методом CPV в ПВО проводились на синхротронной станции РКФМ (ККСНИ, НИЦ «Курчатовский институт»), описание станции и методик измерений приведено в Разделе 2.7.2 Главы 2.

На Рис.5.7а представлены угловые зависимости выхода флуоресценции для элементов S, Cl, а на Рис.5.7б – соответствующие им профили распределения этих элементов по толщине пленки. Профили распределения элементов S и Cl приведены к единице. К сожалению, в данных условиях эксперимента отделить ионы Na^+ буфера от ионов Na^+ осадителя невозможно.

По полученной кривой распределения атомов S можно сделать вывод о том, что сера распределена достаточно равномерно в слое, толщина которого составляет 6.5 нм, что соответствует диаметру октамеров, образующихся в растворе. Полученный результат подтверждает данные рентгеновской рефлектометрии и АСМ: толщина слоя серы соответствует диаметру октамеров, формирующихся в растворе при добавлении осадителя.

Так как атомы серы распределены в молекуле лизоцима достаточно равномерно (содержатся в аминокислотах Cys-6, Met-12, Cys-30, Cys-64, Cys-76, Cys-80, Cys-94, Met-105, Cys-115, Cys-127), можно предположить, что при использовании раствора белка с осадителем (в котором предварительно образовались октамеры) для формирования ленгмюровского монослоя на подложку переносится пленка, толщина которой превосходит высоту мономера вдвое и соответствует диаметру октамера. То есть при нанесении пленки на поверхность водной субфазы октамеры не разрушаются.

Из кривой распределения атомов Cl по толщине пленки видно, что наибольшее количество ионов Cl^- располагается в тонком слое на поверхности пленки, перенесенной на подложку. Ионы Cl^- как бы “закрывают” собой белковую пленку.

На Рис.5.8 схематично представлена модель полученной белковой пленки, построенная на основании экспериментальных данных. Отметим, что на угловой зависимости флуоресценции хлора (Рис.5.7а) в области малых углов наблюдается расхождение между расчетными и экспериментальными

данными, что может быть обусловлено наличием над поверхностью пленки “разреженного” слоя с плотностью порядка нескольких процентов от плотности слоя ионов Cl^- (Рис.5.7б, кривая 1). Также отметим, что на распределениях Cl и S по глубине белковой пленки могут присутствовать дополнительные особенности. Для их выявления необходимы дальнейшие исследования.

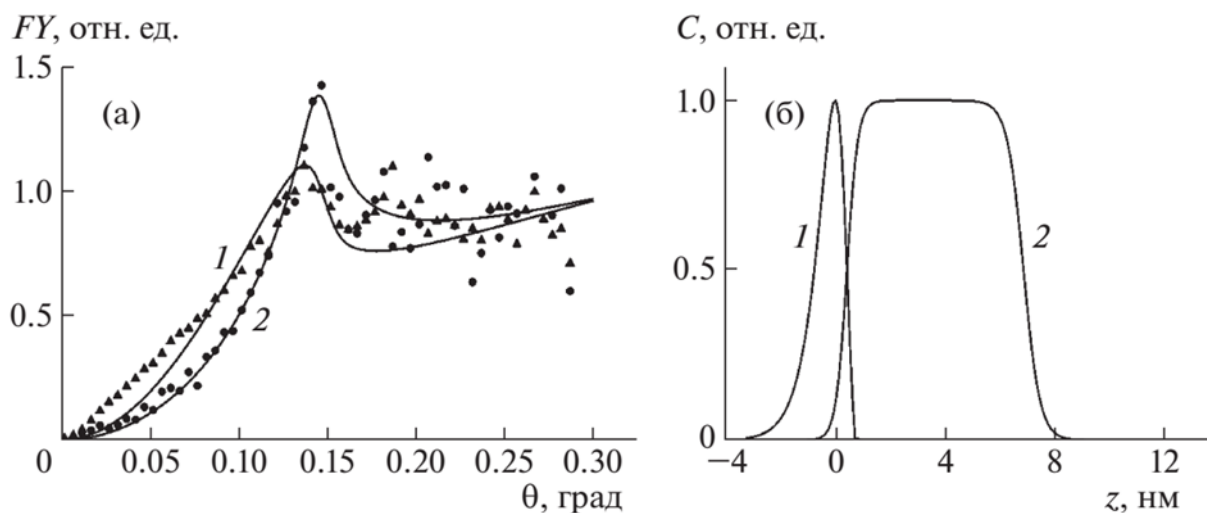


Рис.5.7 – Результаты исследования пленки белка лизоцима, перенесенной на кремниевую подложку методом ЛШ: а – угловые зависимости выхода флуоресценции FY для Cl (треугольники, 1), S (кружки, 2); б – профили распределения Cl (1) и серы (2) по толщине пленки z .

Полученные в настоящей работе результаты могут быть полезны как для выяснения особенностей взаимодействия осадителя с белками, так и для получения белковых пленок с упорядоченной структурой.

Хорошо известно, что добавление хлористого натрия в раствор лизоцима меняет взаимодействие между молекулами белка – вместо отталкивания возникает притяжение [204, 490]. При благоприятных для кристаллизации условиях это приводит к образованию устойчивых комплексов – октамеров (см. Главы 3, 4).

Эти октамеры остаются стабильными и при нанесении раствора на поверхность водной субфазы ленгмюровской ванны. Максимальная

концентрация молекул осадителя наблюдается в тонком слое непосредственно под ленгмюровским слоем белка. Этот тонкий слой, по-видимому, переносится с пленкой лизоцима на подложку.

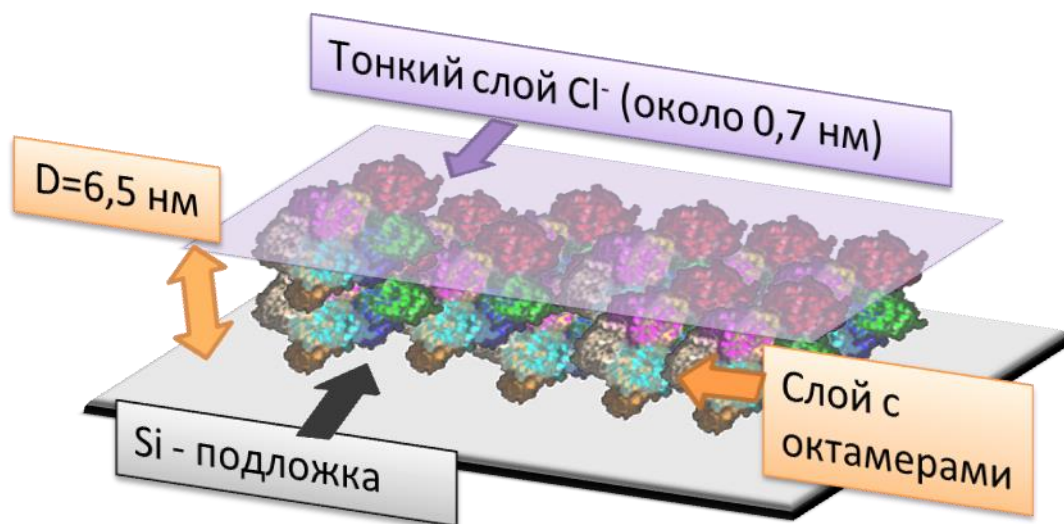


Рис.5.8 – Схема пленки лизоцима, полученной модифицированным методом ЛШ, построенная на основе данных исследования СРВ в области ПВО.

Таким образом, использование раствора белка с добавлением осадителя для формирования монослоя оказывает существенное влияние на структуру конечной пленки – ее толщина превосходит толщину пленки, полученной из раствора белка без осадителя, в 2 раза, а плотность – в 4 раза.

Механизмы влияния осадителя на процесс формирования и структуру пленки можно объяснить следующими факторами. При добавлении осадителя меняется гидратная оболочка молекул, что приводит к изменению характера взаимодействия молекул в растворе – вместо отталкивания возникает притяжение. Также изменение гидратной оболочки может приводить к изменению взаимодействия мономеров белка с субфазой и изменению взаимодействия между молекулами при формировании пленки.

В растворе при добавлении осадителя образуются октамеры, в которых в зависимости от условий может собираться около половины всех молекул белка. Октамеры могут принимать участие в формировании монослоя как единое целое, что также приведет к изменению структуры пленки.

Экспериментальные данные показывают, что пленка имеет толщину и плотность, соответствующие тому, как если бы пленка формировалась из октамеров. Однако нельзя исключать возможность, что при формировании монослоя из раствора белка с осадителем отдельные мономеры под действием давления барьеров (с учетом взаимного притяжения, обусловленного наличием осадителя) формируют более плотную структуру, чем в отсутствие осадителя. Момеры и димеры также могут принимать участие в формировании монослоя, но таким образом, что они упаковываются в слой толщиной две молекулы.

Полученные экспериментальные данные однозначно подтверждают, что использование предложенного в работе способа модификации метода ЛШ позволяет получать белковые пленки, обладающие принципиально новой структурой. Для более детального описания механизмов формирования таких пленок предполагается проведение дополнительных исследований.

В результате проведенных исследований был предложен и на примере лизоцима апробирован способ модификации метода Ленгмюра-Шеффера для получения упорядоченных белковых пленок, заключающийся в том, что для формирования монослоя лизоцима на поверхности водной субфазы используется раствор белка с осадителем (NaCl). Параметры такого раствора соответствуют условиям роста кристаллов тетрагональной сингонии, что приводит к образованию октамеров в растворе.

С помощью предложенного способа модификации метода Ленгмюра-Шеффера получены пленки лизоцима на кремниевых подложках. Методами рентгеновской рефлектометрии и атомной силовой микроскопии показано, что толщина таких пленок соответствует диаметру октамеров, обнаруженных ранее в растворах, использованных для формирования монослоев лизоцима. Показано, что электронная плотность и однородность пленок, полученных предложенным способом, существенно выше, чем пленок лизоцима, полученных “традиционным” способом из раствора белка, содержащего только момеры. Такое различие в структурных характеристиках пленок

можно объяснить тем, что в случае использования раствора, содержащего октамеры, они участвуют в формировании монослоя лизоцима как единое целое.

Анализ данных, полученных методом СРВ в ПВО, о распределении атомов серы, входящих в молекулы лизоцима, подтвердил, что такие пленки имеют толщину, соответствующую диаметру октамеров. При этом наблюдается тонкий слой осадителя на границе раздела между воздухом и белковой пленкой.

5.3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЛЕНКИ ЛИЗОЦИМА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ KI

Проведенные структурные исследования пленок лизоцима, полученных из растворов белка с осадителем NaCl, с применением разработанной методики на основе методов рентгеновской рефлектометрии, АСМ, СРВ в ПВО (Разделы 5.2.2, 5.2.3, 5.2.4, соответственно) показали, что ионы хлора образуют над поверхностью исследуемой пленки тонкий слой. К сожалению, определение положения атомов Na затруднено из-за сильного поглощения флуоресцентного сигнала от этого элемента в окружающей среде.

В настоящей работе в целях исследования взаимодействия ионов осадителя с белком проведен анализ слоистой структуры пленки лизоцима, полученной на Si подложке из раствора белка, в котором в качестве осадителя вместо хлорида натрия (NaCl) использован йодид калия (KI). Использование KI позволило определить положение в белковой пленке как аниона, так и катиона.

На примере указанной пленки лизоцима отработан метод получения белковой пленки на Si подложке с применением модифицированного ЛШ-метода (Раздел 5.2.1).

Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2. Описание методики формирования монослоев лизоцима с осадителем KI представлено в Разделе 2.7.1 «Получение монослоев лизоцима с осадителем», Главы 2.

Рентгеновские исследования проводились на лабораторном дифрактометре SmartLab Rigaku. Описание установки, методик измерений и анализа данных приведены в Разделе 2.7.2 Главы 2.

Эксперименты методом рентгеновской рефлектометрии проводились *in situ* с использованием герметичной ячейки, описанной в Разделе 2.5 «Специализированная ячейка для структурных *in situ* исследований слабоупорядоченных и кристаллических белковых систем на стадиях зарождения и роста кристаллов».

Эксперименты методом СРВ в ПВО проводились с использованием специализированной ячейки, описанной в Разделе 2.5 «Специализированная ячейка для исследований белковых структур методом СРВ в ПВО».

Для исследования влияния, которое оказывает осадитель КІ на формирование монослоя лизоцима, сопоставлены данные о толщине и качестве поверхности пленок лизоцима, сформированных из растворов как чистого белка, так и белка с добавлением соли.

Экспериментальные результаты. На Рис.5.9, 5.10 представлены экспериментальные кривые РР для двух образцов и соответствующие им профили распределения электронной плотности по толщине.

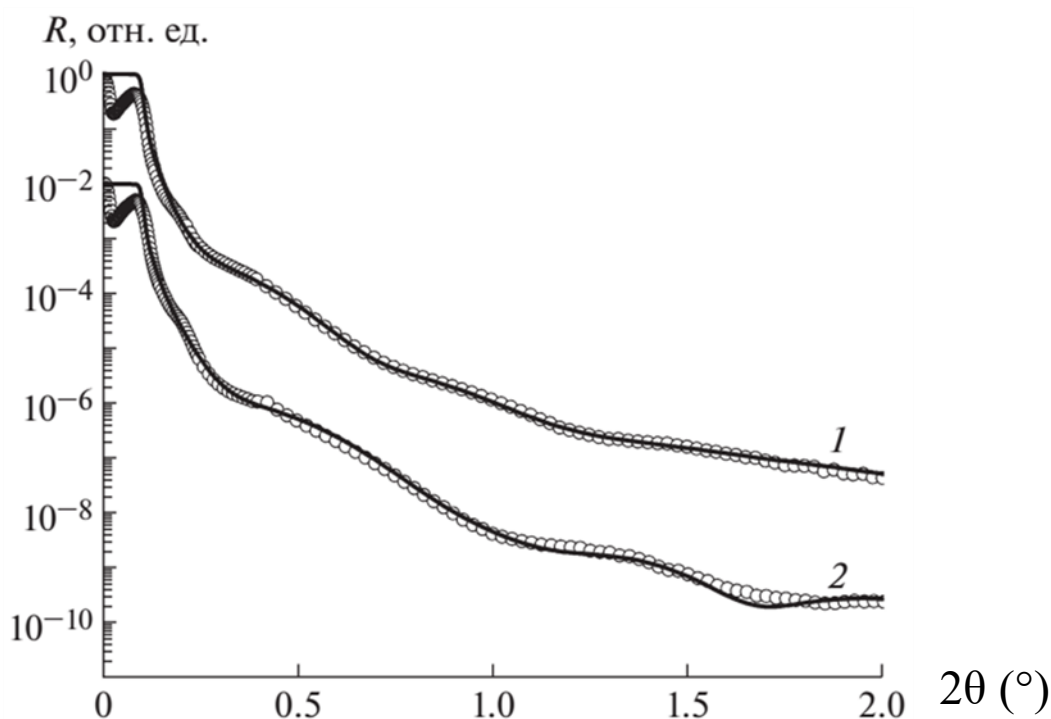


Рис.5.9 – Угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения (точки – эксперимент, сплошные линии – расчет): от пленки лизоцима, сформированной из раствора чистого белка (1) и от пленки лизоцима, сформированной из раствора с добавлением осадителя КІ (2).

Анализ профилей электронной плотности показывает, что полученные пленки имеют толщину порядка 3 нм. Данная толщина соотносится с усредненным значением диаметра молекулы лизоцима, размеры которой приблизительно равны $30 \times 30 \times 45 \text{ \AA}^3$ [361]. Однако в значениях электронной

плотности имеются существенные различия. Электронная плотность пленки лизоцима, полученной из раствора с добавлением KI, превышает значение плотности пленки чистого белка почти в 4 раза (Рис.5.10). Результаты РР показывают, что при использовании кристаллизационного раствора в условиях существования промежуточной олигомерной фазы образуется более плотная и олигомерной фазы образуется более плотная и однородная пленка по сравнению с пленкой, образуемой из раствора чистого белка без добавления осадителя.

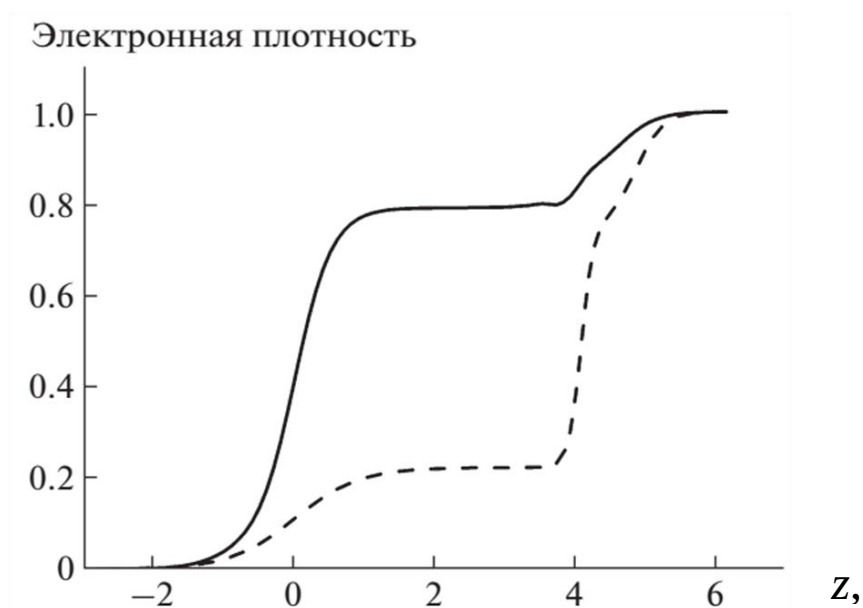


Рис.5.10 – Рассчитанные профили электронной плотности, нормированные на электронную плотность подложки. Пунктирная кривая соответствует пленке лизоцима без осадителя, сплошная кривая – пленке лизоцима с KI.

Для определения наличия и месторасположения ионов соли проведены исследования пленки методом СРВ в ПВО.

Атомы серы в молекуле лизоцима распределены достаточно равномерно (содержатся в аминокислотах Cys-6, Met-12, Cys-30, Cys-64, Cys-76, Cys-80, Cys-94, Met-105, Cys-115, Cys-127). Таким образом, определяя положение атомов серы, можно оценить толщину пленки лизоцима на кремниевой подложке. Отметим, что в условиях данного эксперимента определить положения ионов натрия, которые входят в состав буфера, не представляется

возможным, так как энергия флуоресцентной линии $\text{NaK}\alpha$ составляет 1.041 кэВ.

На Рис.5.11, 5.12 представлены результаты исследования пленки белка лизоцима, полученной из раствора с KI, перенесенной на кремниевую подложку методом ЛШ. На Рис.5.11 приведены угловые зависимости выхода флуоресценции от элементов S, K и I, а на Рис.5.12 – соответствующие им профили распределения этих элементов по толщине исследуемой пленки. Профили распределения элементов приведены к единице.

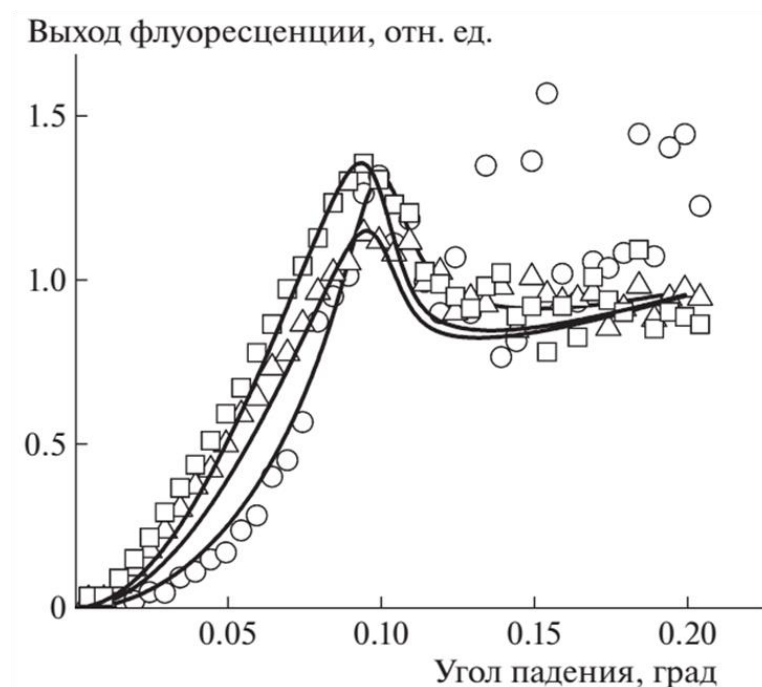


Рис.5.11 – Угловые зависимости выхода флуоресценции для атомов S ($\circ$), K (Δ) и I ($\square$).

Анализ данных СРВ в ПВО показывает, что толщина пленки, формируемой атомами серы, согласуется с данными о толщине пленки, полученной в результате РР. При этом толщина слоя, формируемого ионами калия, составляет 2 нм, тогда как толщина слоя ионов йода составляет 1 нм. Слои калия и йода располагаются вблизи поверхности пленки лизоцима, при этом сильно перекрываясь, однако центр распределения калия смещен к пленке белка. Интересно сравнить полученные результаты с образованием пленок из растворов лизоцима с предкристаллизационной олигомерной фазой

из октамеров, характерной для тетрагональной фазы лизоцима (Раздел 5.2). В этом случае анионы и катионы разделены резко, и к белку примыкают отрицательные ионы хлора, что свидетельствует о преимущественно положительном заряде пленки белка на границе с субфазой. В случае предкристаллизационного состояния моноклинной фазы пленка, по всей видимости, имеет слабый отрицательный заряд.

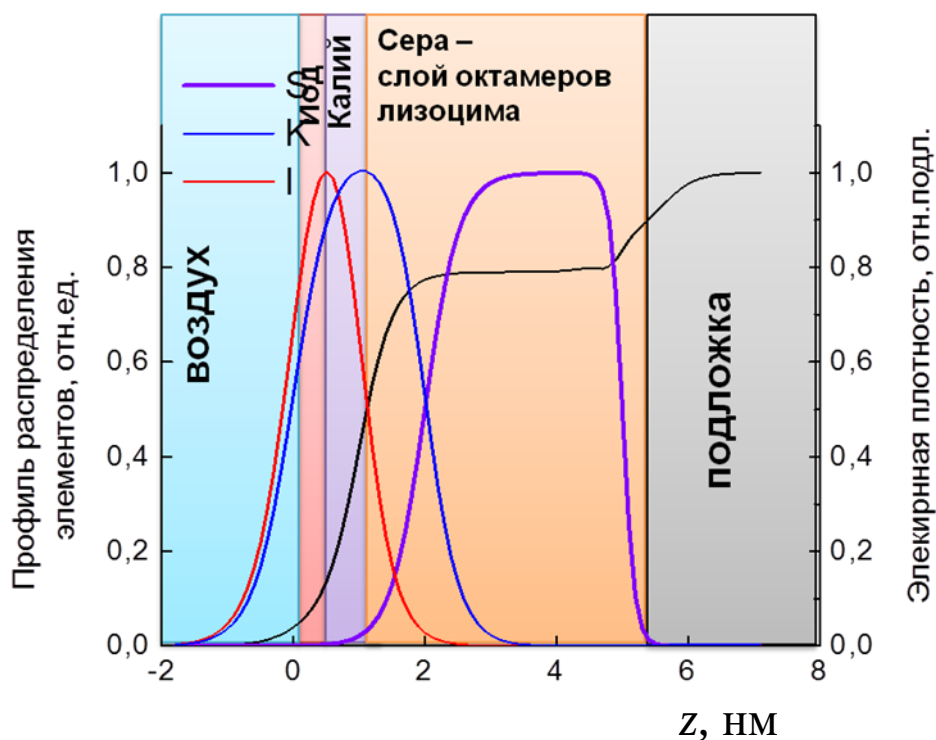


Рис.5.12 – Профили распределения атомов S, K и I по толщине пленки z.

В результате проведенных исследований методами рентгеновской рефлектометрии и СРВ в ПВО показано, что толщина полученной предложенным способом пленки белка равна порядка 3 нм, а электронная плотность пленки в 4 раза превышает плотность, рассчитанную для пленки, сформированной из раствора чистого белка без добавления осадителя.

Обнаружено, что ионы осадителя формируют над поверхностью пленки тонкие слои, образуя многослойную структуру (Рис.5.13).

В целом, настоящая работа подтверждает результаты исследования пленки лизоцима, полученной из раствора с параметрами, соответствующими кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии, описанные в

предыдущем разделе, что свидетельствует об эффективности предложенного метода получения упорядоченных белковых пленок на твердой подложке.

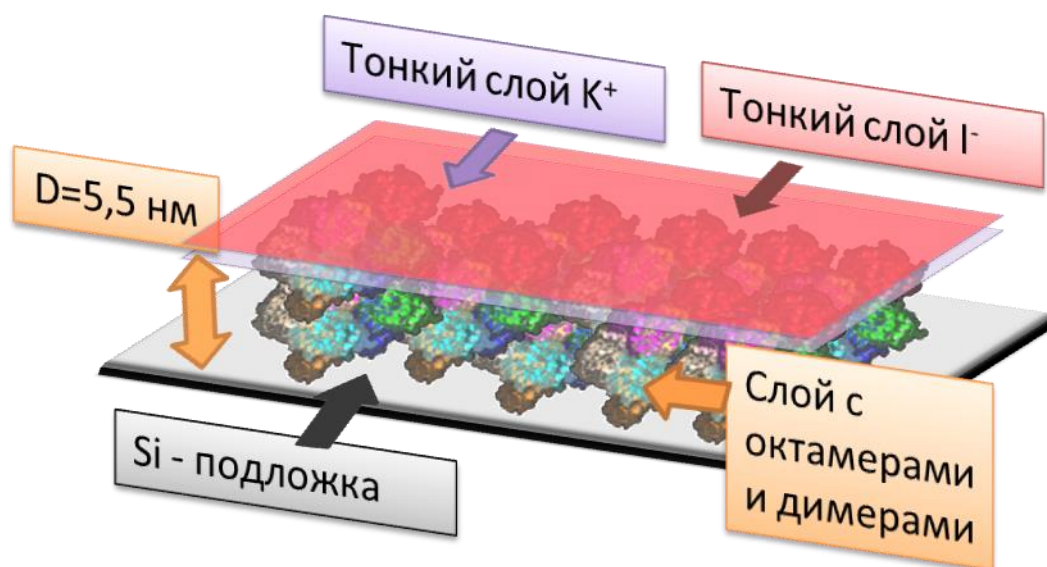


Рис.5.13 – Схема пленки лизоцима, полученной модифицированным методом ЛШ, построенная на основе данных исследования СРВ в области ПВО.

5.4. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОНОСЛОЯ ЛИЗОЦИМА С ДОБАВЛЕНИЕМ ОСАДИТЕЛЯ KCl НА ПОВЕРХНОСТИ ВОДЫ

С применением предложенного подхода к получению частично упорядоченных белковых пленок, описанного в Разделе 5.2.1, была получена пленка лизоцима из раствора белка с осадителем KCl в соответствии с условиями оптимальными для роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии.

С целью экспериментального подтверждения предположения о формировании стабильной слоистой ионной структуры пленки лизоцима были проведены исследования указанной пленки лизоцима методом СРВ в ПВО непосредственно на поверхности водной субфазы в ленгмюровской ванне с использованием синхротронного излучения.

Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2. Описание методики формирования монослоев лизоцима с осадителем KCl на поверхности воды представлено в Разделе 2.7.1 «Получение монослоев лизоцима с осадителем», Главы 2.

Эксперименты методом СРВ в ПВО проводились на синхротронной станции «Ленгмюр» (ККСНИ, НИЦ «Курчатовский институт»), описание станции, методик измерений и обработки данных приведено в Разделе 2.7.2 Главы 2.

На первом этапе настоящего исследования были проведены эксперименты с применением метода МУРР, аналогичные описанным в Разделе 4.2 Главы 4.

По результатам исследований методом МУРР было показано, что в чистом растворе (в отсутствие осадителя) лизоцима присутствовали только мономеры.

Добавление KCl к раствору лизоцима приводило к росту кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в условиях, рассмотренных в данной работе и используемых при приготовлении растворов для получения исследуемых ленгмюровских монослоев. В этом случае структура раствора

белка изменяется уже на ранней стадии кристаллизации. Добавление осадителя изменяет тип взаимодействия между молекулами лизоцима – отталкивание на притяжение, что в свою очередь приводит к образованию димеров и октамеров. Изменения в структуре раствора белка контролировались с течением времени после добавления KCl.

Анализ экспериментальных данных МУРР показал, что наряду с мономерами в растворе белок-осадитель образуется около 10% димеров и 2% октамеров. Тетрамеры, гексамеры и олигомеры в растворе не обнаружены (Рис.5.14).

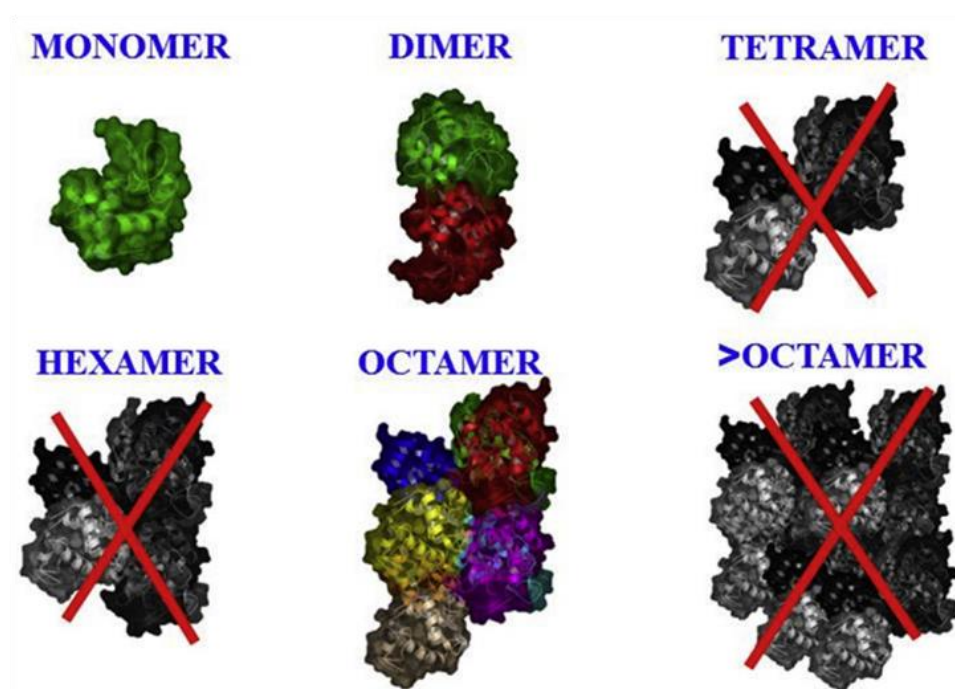


Рис.5.14 – Модели мономера, димера, тетрамера, гексамера и октамера, выделенные из кристаллической структуры лизоцима. Методика получения моделей олигомеров белка описана в Разделе 3.2 Главы 3.

Для формирования ленгмюровской пленки из раствора лизоцим-осадитель использовался раствор с более высокой концентрацией белка. Таким образом, растворы белок-осадитель, используемые впоследствии для формирования ленгмюровского монослоя, содержали, по меньшей мере, 2.3% октамеров (объемная доля). Другими словами, согласно данным МУРР, значительная доля молекул лизоцима ($> 10\%$) в растворе присутствовала в виде димеров и октамеров.

Важно отметить, что в условиях, соответствующих приготовлению белковых растворов, используемых для нанесения на поверхность воды в ленгмюровской ванне и для независимого контроля методом МУРР, образование кристаллов белка в процессе проведения экспериментов не ожидалось. Согласно результатам, представленным в Разделе 3.4.2, рост кристаллов в таких условиях (концентрация белка 20 мг/мл и температура 20°C) наблюдается через 36 ч после смешивания растворов белка и осадителя. Соответственно, за время экспериментов МУРР (около 3 часов) кристаллы лизоцима с заметными размерами или в достаточном количестве не образовывались.

Характеризация монослоя лизоцима, сформированного из октамеров в кристаллизационном растворе. На Рис.5.15 показаны π/A -изотермы монослоя чистого лизоцима и монослоя лизоцим-KCl, полученные после поджатия кристаллизационных растворов.

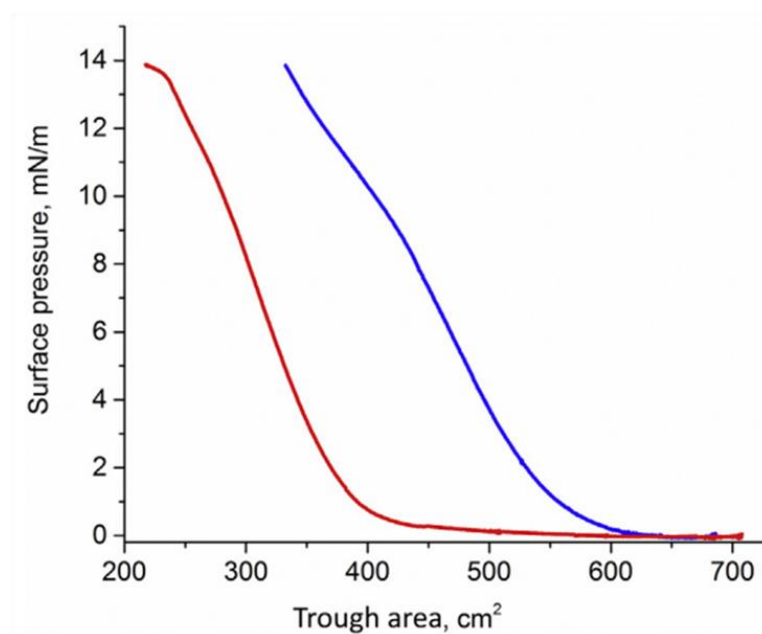


Рис.5.15 – Изотермы сжатия, π/A -изотермы ленгмюровских монослоев, сформированных на поверхности водной субфазы: монослоя лизоцима (красный) и монослоя лизоцим/KCl (синий).

Для монослоя, сформированного из раствора белка с осадителем, повышение давления началось раньше (с большей площади ванны), возможно, из-за того, что осадитель препятствовал переходу молекул в субфазу.

Добавление осадителя изменило распределение заряда на поверхности молекул белка, что привело к их взаимному притяжению. Следовательно, нахождение молекул в ленгмюровском слое стало более вероятным (благоприятным), чем переход в субфазу. Это предположение согласуется с результатами, описанными выше.

На Рис.5.16 приведены угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения и выхода рентгеновской флуоресценции, а также, соответствующие профили распределения электронной плотности и химических элементов К, Cl и S по толщине слоя.

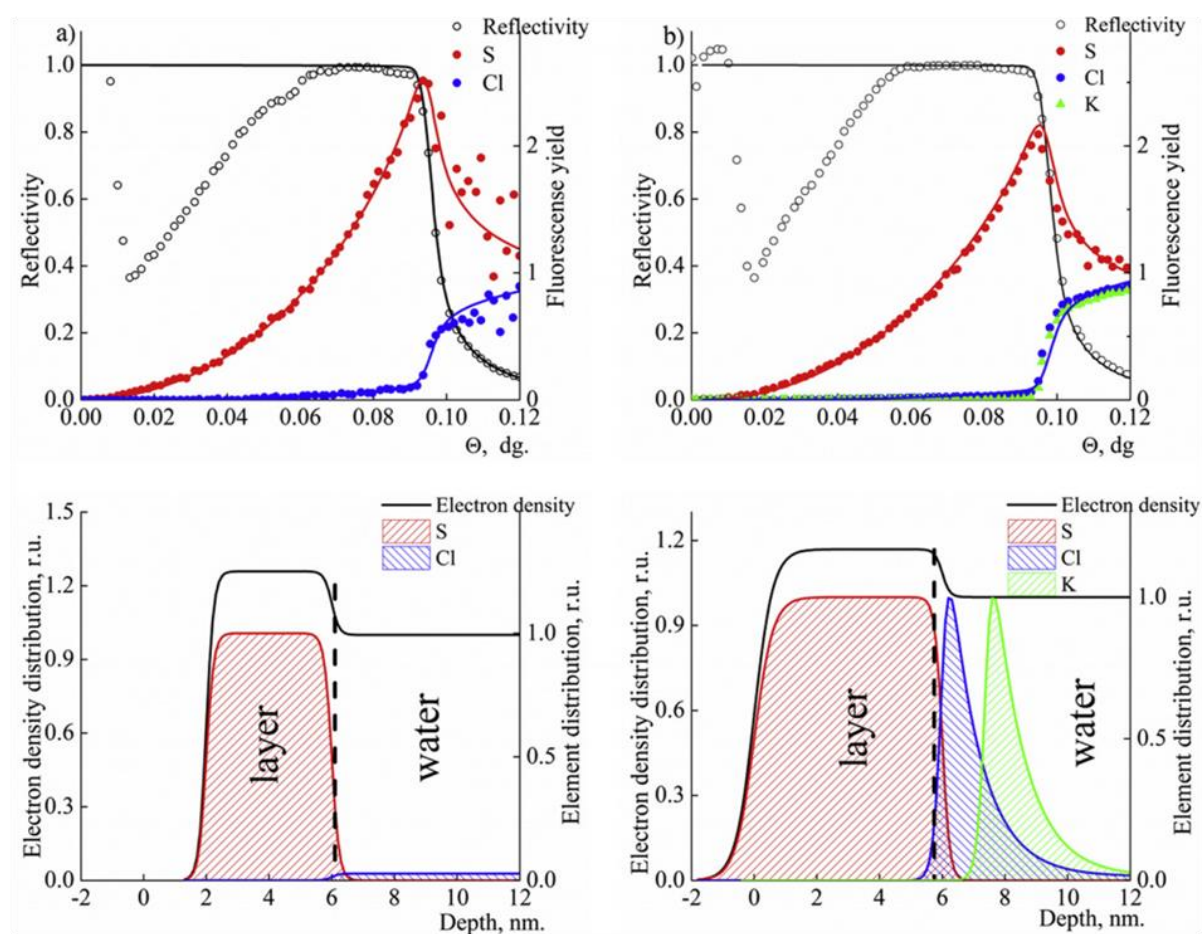


Рис.5.16 – Угловые зависимости зеркальной компоненты рентгеновского отражения и выхода рентгеновской флуоресценции (сверху) и соответствующие профили распределения электронной плотности и химических элементов К, Cl, S по толщине слоя (снизу). (а) – Ленгмюровский слой, сформированный из раствора лизоцима без осадителя. Толщина слоя лизоцима составляет около 3 нм. (б) – Ленгмюровский слой, сформированный из раствора лизоцима с осадителем. Толщина слоя лизоцима составляет около 6 нм.

Кривые показаны для ленгмюровских слоев, сформированных из раствора лизоцима без осадителя (Рис.5.16а) и раствора лизоцима, содержащего осадитель (Рис.5.16б). Примечательно, что в обоих случаях наблюдается присутствие атомов хлора в структуре слоя. Следовое присутствие хлора в системе без осадителя может быть связано с примесями воды, остающимися после предварительной очистки ленгмюровской ванны хлороформом. Сигнал от ионов К наблюдался только от монослоя, образованного из раствора белка, содержащего осадитель KCl.

Для анализа экспериментальных данных использовалась двухслойная структура, первый слой представлял собой подложку из водной субфазы, а второй – пленку лизоцима. Шероховатость границы раздела воды предполагалась равной $\sigma = 0.33$ нм, что обусловлено наличием термически индуцированных капиллярных волн [491]. По экспериментальной величине критического угла полного внешнего отражения (т.е. угла, под которым отражалась приблизительно половина интенсивности) была проведена оценка базового значения электронной плотности пленки, которое составило величину примерно в 1.3 раза превышающую величину электронной плотности воды. Предполагалось, что атомы серы равномерно распределены по толщине пленки. Толщина пленки, полученная путем аппроксимации теоретических кривых, составила 4.0 ± 0.5 нм.

В общем виде, форму угловой зависимости выхода флуоресценции от атомов в системе пленка/субфаза можно свести к двум типам кривых. Для атомов, преимущественно распределенных в пленке или в приповерхностной области (на глубине нескольких нанометров, что соответствует глубине проникновения рентгеновского излучения до критического угла), на кривой наблюдается пик. Кривая для атомов, распределенных в субфазе, выглядит как кривая инверсии рентгеновского отражения. То есть интенсивность выхода флуоресценции начала быстро увеличиваться, по достижении критического угла, и продолжила расти с увеличением угла. Эта форма кривой наблюдалась потому, что с увеличением глубины проникновения рентгеновских лучей с

нескольких нанометров до сотен нанометров число возбужденных атомов увеличивалось. Данные флуоресценции, представленные на Рис.5.16, усреднялись по повторяющимся измерениям в течение 10 часов.

В случае, когда атомы были распределены как в пленке, так и в субфазе, наблюдалась суперпозиция двух типов описанных выше кривых. В этом случае форма кривой была связана с отношением числа атомов в пленке и в приповерхностном слое, толщина которого определялась глубиной проникновения рентгеновских лучей в субфазу.

В этом случае, поскольку засвеченный объем субфазы увеличился на несколько порядков (из-за увеличения глубины проникновения излучения), общий сигнал от атомов, находящихся в субфазе, может преобладать над сигналом от атомов на поверхности, даже при намного более низкой концентрации, чем в приповерхностном слое. Поскольку критический угол увеличился из-за увеличения глубины проникновения рентгеновского излучения в субфазу на несколько порядков, выход флуоресценции атомов в субфазе может превышать сигнал от атомов в пленке, даже если их концентрация в субфазе ниже.

Угловая зависимость выхода флуоресценции атомов Cl отражала суперпозицию двух сигналов: сигнала от атомов, распределенных в субфазе (имеющего форму инверсной кривой рентгеновского отражения), и сигнала от атомов в приповерхностном слое. Сигнал от атомов в субфазе преобладал, указывая на то, что существенное количество атомов хлора распределено в субфазе.

Форма угловой зависимости выхода флуоресценции атомов K также имела вид своего рода инверсной кривой рентгеновского отражения. Это указывает на то, что подобно атомам Cl, большинство атомов K покинули поверхность слоя и были распределены в объеме субфазы.

Сравнение формы угловых зависимостей выхода флуоресценции Cl и K позволяет допустить, что максимум профиля распределения Cl по глубине лежит в субфазе, но расположен ближе к белковой пленке, чем максимум

профиля распределения К. Распределение этих элементов является асимметричным, присутствует «хвост», уходящий вглубь субфазы. Можно предположить, что это распределение является результатом растворения атомов осадителя в объеме субфазы. Максимум распределения хлора находился вблизи границы раздела пленка/субфаза, тогда как максимум распределения калия находился на глубине примерно 2 – 3 нм.

Использование KCl в качестве осадителя вместо стандартного NaCl позволило определить положение как катиона K^+ , так и аниона Cl^- в структуре ленгмюровского слоя.

Угловая зависимость выхода флуоресценции атомов S, которая имеет острый пик за критическим углом, указывает на преимущественную локализацию этих атомов в слое на поверхности жидкости. Атомы серы достаточно равномерно распределены в молекулах лизоцима (содержатся в аминокислотах Cys-6, Met-12, Cys-30, Cys-64, Cys-76, Cys-80, Cys-94, Met-105, Cys-115, and Cys-127). Следовательно, по локализации атомов S, можно непосредственно установить положение молекул лизоцима на поверхности воды.

Различия в интенсивности выхода флуоресценции для слоев лизоцима с осадителем и без осадителя на энергиях около 2.7 (Cl_{Ka}) и 3.3 (K_{Ka}) кэВ были определены с высоким отношением сигнал/шум, как показано на Рис.5.17.

Приведенные выше результаты подтверждают вывод о том, что молекулы лизоцима не переходят в объем субфазы, а остаются в слое на ее поверхности. Большинство ионов осадителя (K и Cl), напротив, локализовано в субфазе, но при этом тесно прилегают к белковой пленке, образуя тонкие слои сначала Cl, а затем K. Толщина ленгмюровского слоя лизоцима примерно в два раза превышает размер одной молекулы белка и соответствует диаметру октамера лизоцима, что было ранее продемонстрировано методами МУРР и МУРН в растворах лизоцима при добавлении осадителя NaCl (Рис.5.18).

Важно отметить, что белковые молекулы, расположенные на границах раздела жидкость-твердое вещество и жидкость-воздух, особенно подвержены

разворачиванию и денатурации. Поэтому реальный состав раствора белка может иметь более сложную структуру, чем приближение олигомерной смеси в полуразбавленном растворе, используемое при анализе данных МУРР.

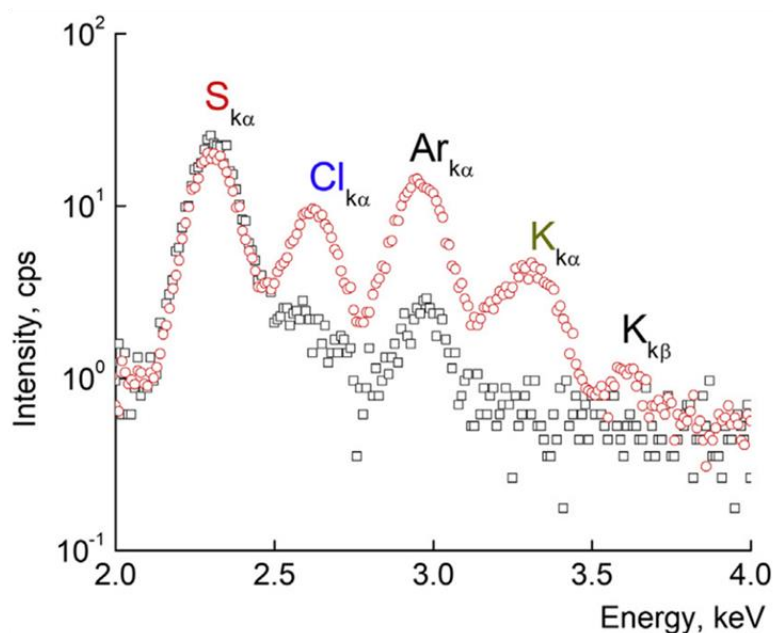


Рис.5.17 – Область флуоресцентного спектра для ленгмюровских слоев, сформированных из раствора лизоцима без осадителя (черный) и раствора лизоцима, содержащего осадитель KCl (красный).

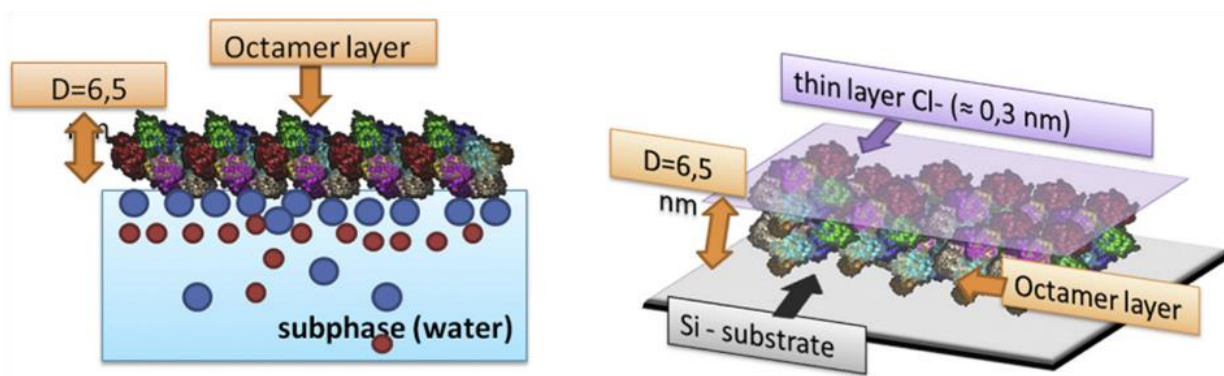


Рис.5.18 – Модель монослоя, сформированного из октамеров лизоцима, полученного из раствора лизоцим-NaCl на поверхности субфазы.

Кроме того, по данным МУРР не было обнаружено доказательств наличия развёрнутых молекул, что видно из безразмерных графиков Кратки (Рис.5.19) со спадающим колоколообразным профилем, типичным для

глобулярных структур, которые имеют плато на дальних углах как для чистого лизоцима, так и для лизоцима с добавленным KCl.

Результаты показали, что октамеры, образовавшиеся в растворе белка после добавления осадителя, не разрушаются после нанесения раствора лизоцим-KCl на поверхность водной субфазы в ленгмюровской ванне, и сохраняют свою структуру при формировании ленгмюровского слоя. В этом случае ионы осадителя образуют тонкие слои (с толщиной, соответствующей ионному радиусу) непосредственно под ленгмюровским слоем белка.

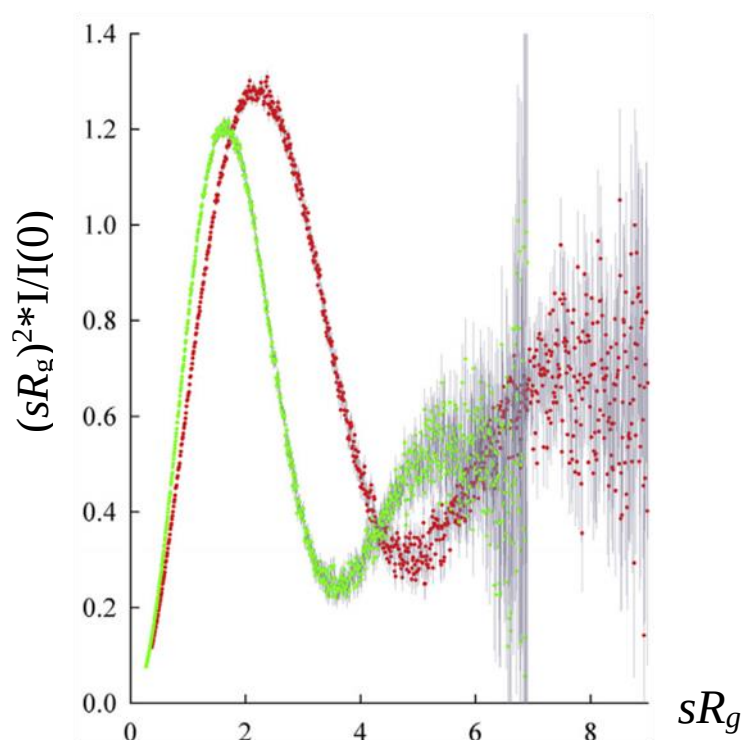


Рис.5.19 – Безразмерные графики Кратки раствора чистого лизоцима (зеленая кривая) и раствора лизоцим-KCl при 0 мин. Колоколообразные профили и наличие плато на дальних углах, указывают на отсутствие в растворе молекул лизоцима в развернутом состоянии в экспериментальных условиях.

Система слоев белка и ионов осадителя, сформированная на поверхности жидкости в ленгмюровской ванне, была очень стабильной и не разрушалась в течение длительного времени. Это хорошо видно из практически идентичных данных рефлектометрии и выхода флуоресценции, полученных в начале измерений и спустя 10 ч после первого измерения (Рис.5.20).

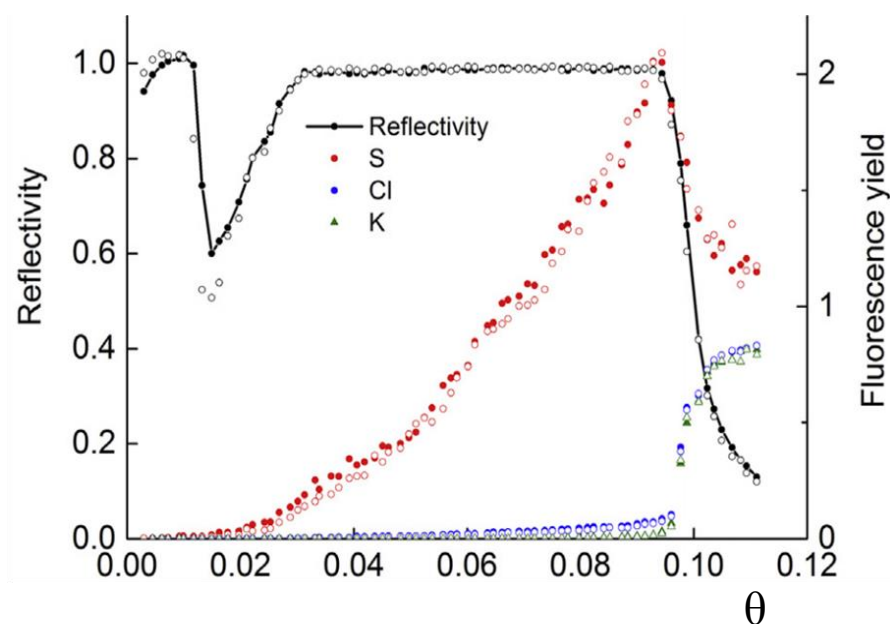


Рис.5.20 – Сравнение зависимостей зеркальной компоненты рентгеновского отражения и выхода рентгеновской флуоресценции серии последовательных измерений. Пустые кружки – первое измерение, закрашенные кружки – последнее (одиннадцатое) измерение.

Полученные результаты хорошо согласуются с результатами предыдущих исследований пленок Ленгмюра-Шеффера (ЛШ), полученных после переноса раствора лизоцим-NaCl на Si подложки (см. Разделы 5.2.2, 5.2.3, 5.2.4). Также, было показано, что толщина пленки, полученной методом ЛШ из раствора белок-NaCl (содержащего октамеры и димеры), составила 6 нм, что соответствует диаметру октамера. После переноса на Si подложки также был обнаружен тонкий слой ионов Cl, расположенный непосредственно над белковой пленкой, что соответствует сохранению структуры белкового слоя и относительного положения белков и ионов осадителя при переносе слоя на подложку методом ЛШ.

В результате настоящих исследований был изучен частный случай формирования белкового слоя лизоцима на поверхности водной субфазы в ленгмюровской ванне. Для формирования ленгмюровского слоя лизоцима был применен подход к получению монослоя раствора лизоцима на поверхности субфазы в ленгмюровской ванне, основанный на том, что молекулы белка в растворе находились в предкристаллизационной фазе, когда значительная

часть молекул ($> 10\%$) были локализованы в структуре октамеров. Было показано, что октамеры участвуют в формировании пленки, что влияет на ее структуру.

Толщина ленгмюровского слоя лизоцима, полученного и исследуемого в данной работе, в два раза превышала размер отдельной белковой молекулы и была близка по размеру к диаметру октамера лизоцима, образующегося в растворе белка в предкристаллизационной фазе. Полученные результаты позволили сделать вывод, что октамеры, образовавшиеся в растворе белка при добавлении осадителя KCl, не разрушаются при нанесении раствора на поверхность субфазы, а вместо этого сохраняют свою структуру при формировании ленгмюровского слоя. В этом случае ионы соли образуют тонкие слои (с толщиной, соответствующей ионному радиусу) непосредственно под ленгмюровским слоем белка. Толщина слоя хлора составляла 0.5 ± 0.3 нм, а толщина слоя калия – 0.7 ± 0.4 нм.

Несмотря на длительный контакт с дистиллированной водой ионы калия и хлора не диффундируют в субфазу. Это факт подтверждается практически полным совпадением данных рефлектометрии и выхода флуоресценции для калия, хлора и серы, полученных в начале эксперимента и спустя 10 ч после его начала (Рис.5.20).

Подход к формированию ленгмюровских пленок на основе растворов белок-осадитель позволил получить дополнительную информацию о принципах взаимодействия белка с ионами осадителя. Также, предложенный подход к формированию белковой пленки позволил (с помощью метода Ленгмюра-Шеффера) перенести описанную многослойную структуру с плотной упаковкой на твердые подложки, что может быть использовано для разработки технологий создания гибридных и природоподобных систем.

5.5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 5

В настоящей главе приведены результаты исследований процесса формирования ленгмюровских пленок на основе растворов лизоцима в условиях кристаллизации (кристаллизационных растворов).

Исследование такой модельной системы позволило уточнить степень стабильности промежуточной фазы кристаллизации и роль ионов осадителя в образовании такой фазы. Было сделано предположение, что если для формирования ленгмюровских монослоев на поверхности жидкости использовать растворы белка с добавлением осадителя, то в процессе формирования монослоя будут принимать участие октамеры, что окажет влияние на структуру полученных пленок. Данное предположение было экспериментально подтверждено – методами АСМ и рентгеновской рефлектометрии показано, что при формировании ленгмюровского монослоя из раствора белка лизоцима с добавлением осадителя NaCl на подложке образуется сплошная однородная пленка, толщиной около 7 нм, что соответствует усредненному диаметру октамера.

Методом СРВ в ПВО были проведены исследования расположения ионов осадителя в полученных пленках белка.

Исследования процесса формирования ленгмюровского монослоя на поверхности водной субфазы непосредственно в ленгмюровской ванне методом СРВ в ПВО показали, что уже на поверхности субфазы формируется монослой толщиной в две молекулы, что соответствует тому, что в формировании монослоя принимают участие октамеры лизоцима. Показано, что под монослоем образуется тонкий слой ионов хлора и калия.

Было показано, что при использовании для формирования ленгмюровского монослоя раствора лизоцима с добавлением KCl, при переносе монослоя на подложку также образуется пленка, толщина которой соответствует диаметру октамера, при этом на поверхности пленка/воздух формируется тонкий слой ионов калия и хлора.

Таким образом, установлено, что тонкие слои ионов осадителя, связанные с монослоем белка, сохраняются при переносе белкового монослоя на подложку.

В случае пленок, сформированных из растворов лизоцима с добавлением KI (условия образования кристаллов моноклинной сингонии) показано, что толщина полученной пленки белка составляет около 3 нм, а электронная плотность в 4 раза превышает плотность, рассчитанную для пленки, сформированной из раствора чистого белка, при этом ионы осадителя формируют над поверхностью пленки тонкие слои, образуя слоистую (многослойную) структуру.

ГЛАВА 6. Структура предкристаллизационной фазы для белков

Протеиназа К и Термолизин

6.1. АННОТАЦИЯ К ГЛАВЕ 6

Настоящая глава посвящена результатам исследования начальной стадии кристаллизации и определения структуры предкристаллизационной фазы белков протеиназа К и термолизин.

В Разделе 6.2 представлены результаты структурных исследований предкристаллизационной фазы протеиназы К методом МУРР в интервале температур 10 – 30 °С при добавлении разных осадителей. В условиях, соответствующих росту кристаллов тетрагональной сингонии, определен олигомерный состав предкристаллизационной фазы протеиназы К в растворе.

В Разделе 6.3 представлены результаты структурных исследований предкристаллизационной фазы термолизина методом МУРР при различных температурах (10 – 20 °С) и концентрациях осадителя. В условиях, соответствующих росту кристаллов гексагональной сингонии, определен олигомерный состав предкристаллизационной фазы термолизина в растворе.

6.2. БЕЛОК ПРОТЕИНАЗА К

Протеиназа К – сериновая протеаза широкого спектра. Обнаружена в 1974 году в экстракте грибка *Engyodontium album* (*Tritirachium album*) [492].

В состав протеиназы К входят 384 аминокислотных остатка, молекулярная масса равна 28.79 кДа.

В молекулярной биологии протеиназа К широко применяется для удаления белковой примеси в препаратах нуклеиновых кислот. Кроме этого, протеиназа К быстро расщепляет и инактивирует нуклеазы в препаратах ДНК или РНК. Одним из свойств протеиназы К так же является способность расщеплять кератин, основной белок волос.

Основные участки в пептиде, распознаваемые и гидролизуемые протеиназой, – пептидные связи, соседствующие с карбоксильной группой алифатических и ароматических аминокислот с закрытой альфа-аминогруппой.

Протеиназа К стабильна в широком интервале рН, температур и концентраций солей, и также способна сохранять ферментативную активность в присутствии сильных детергентов, таких как SDS, додецилсульфат натрия (*sodium dodecyl sulfate*, SDS).

Структура протеиназы К (Рис.6.1) была впервые определена методом рентгеновской кристаллографии Бетцелом и др. (1988) [493]. Группа симметрии $P4_32_12$, параметры элементарной ячейки представлены в Табл. 6.1.

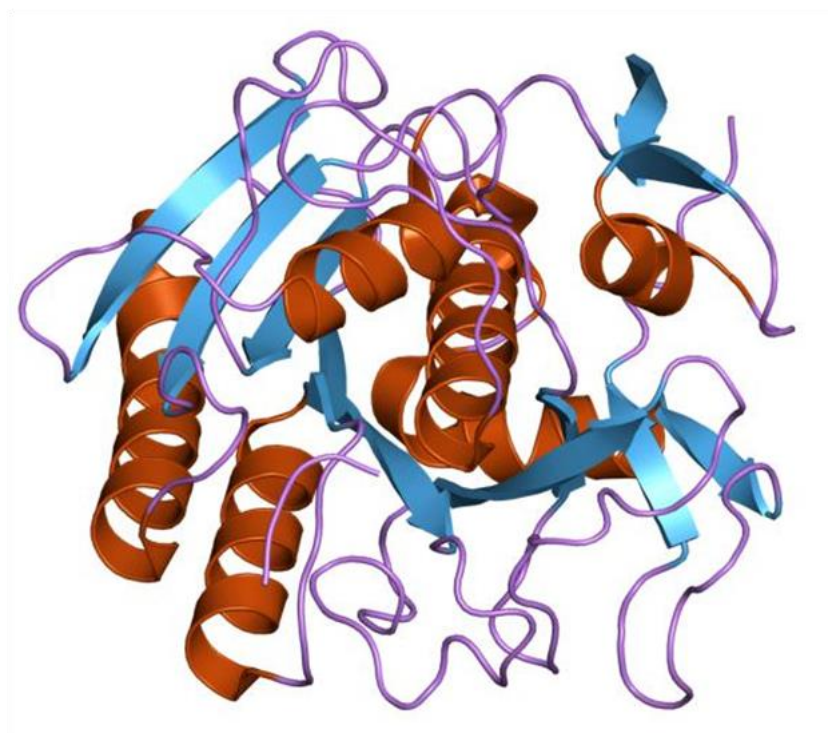


Рис.6.1 – Структура белка протеиназа К.

Табл. 6.1 – Параметры элементарной ячейки кристаллизованного белка протеиназы К [494].

Пространственная группа	Параметры элементарной ячейки (Å)	Параметры элементарной ячейки (°)
$P4_32_12$	$a = 68.05$	$\alpha = 90$
	$b = 68.05$	$\beta = 90$

	$c = 102.55$	$\gamma = 90$
--	--------------	---------------

В молекулярной биологии протеиназа К широко применяется для удаления белковой примеси в препаратах нуклеиновых кислот. Кроме этого, протеиназа К быстро расщепляет и инактивирует нуклеазы в препаратах ДНК и РНК [495].

6.2.1. Моделирование структуры олигомеров протеиназы К

Молекулярное моделирование, основанное на анализе структуры протеиназы К тетрагональной сингонии, проводилось следующим образом.

Для построения молекулярных моделей возможных олигомеров, являющихся фрагментами кристаллической структуры протеиназы К тетрагональной сингонии, была использована кристаллическая структура из Базы данных белков (PDB ID: 2ID8), определенная с разрешением 1.27 Å.

Кристалл принадлежит к пр. гр. $P4_32_12$ с параметрами элементарной ячейки $a = b = 67.55$, $c = 106.88$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90.00^\circ$. Содержание растворителя в кристалле составляет 41.55%, в асимметричной ячейке – одна молекула протеиназы К. Анализ кристаллической упаковки молекул протеиназы К проведен с помощью программ Coot [397] и PyMOL [444]. Фрагмент (октамер) кристаллической структуры получен с использованием операторов симметрии ($X, Y, Z; -X, -Y, 1/2 + Z; 1/2 - Y, 1/2 + X, 3/4 + Z; 1/2 + Y, 1/2 - X, 1/4 + Z; 1/2 - X, 1/2 + Y, 3/4 - Z; 1/2 + X, 1/2 - Y, 1/4 - Z; Y, X, -Z; -Y, -X, 1/2 - Z$) и элементов трансляции кристаллической решетки $P4_32_12$. В результате были получены координаты атомов октамера.

Пространственные структуры гексамера, тетрамера и димера получены из структуры октамера путем удаления димеров белка (Рис.6.2). Координаты атомов каждого из полученных кластеров были сохранены в файлах.

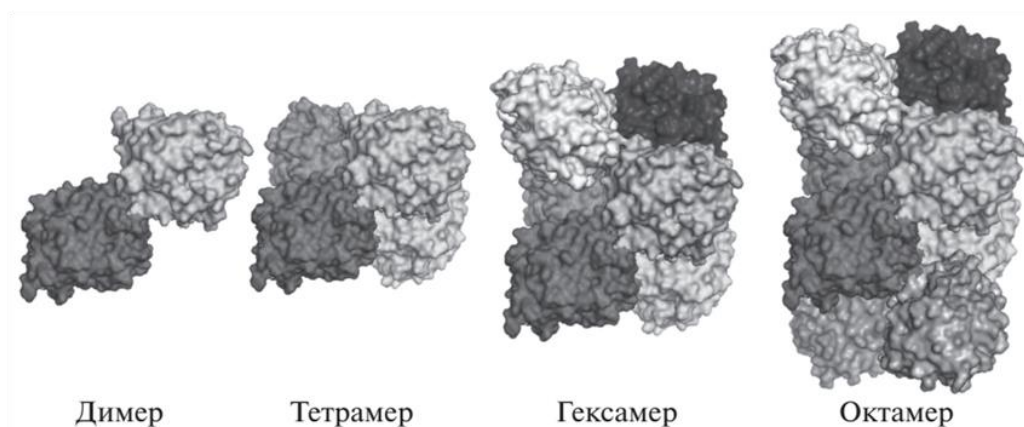


Рис.6.2 – Структуры октамера, гексамера, тетрамера и димера протеиназы К, полученные на основе структурных данных (PDB ID: 2ID8) и использованные для обработки экспериментальных данных МУРР.

6.2.2. Образование димеров в кристаллизационном растворе протеиназы К

Методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения с использованием синхротронного излучения проведено исследование структуры раствора протеиназы К на предкристаллизационной стадии при различных температурах и типах осадителя.

Измерения проведены на станции BM29 BioSAXS Европейского источника синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция). Методики МУРР-измерений и обработки экспериментальных данных, а также описание станции BM29@ESRF представлены в Разделе 2.4.1, Главы 2).

Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2. Растворы белка и осадителя смешивали в объемном соотношении 1:1 за час до начала проведения измерений МУРР.

Результаты молекулярного моделирования олигомеров на основе анализа структуры кристалла протеиназы К тетрагональной сингонии приведены в предыдущем разделе. Полученные модели олигомеров (Рис.6.2) использовались при обработке экспериментальных данных МУРР.

Определение условий роста кристаллов протеиназы К. Первичный скрининг условий кристаллизации проводили методом диффузии паров [131,

422] с использованием растворов для кристаллизации Hampton Research (наборы Crystal screen и Crystal screen 2). В результате скрининга для кристаллизации протеиназы К были выбраны осадители сульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и нитрат натрия NaNO_3 . Оптимизацию условий проводили путем варьирования концентраций белка и осадителя, выбранных в результате скрининга. Конечные концентрации протеиназы К, сульфата аммония и нитрата натрия составляли 10 мг/мл, 0.5 и 1 М соответственно. Выросшие при данных условиях кристаллы представлены на Рис.6.3.

Полученные кристаллы тестировались методом РСА на лабораторном рентгеновском дифрактометре с источником с вращающимся анодом (Bruker, США). Исследования показали, что кристаллы принадлежат тетрагональной сингонии, параметры кристаллической решетки совпадают с параметрами структуры PDB ID: 2ID8.

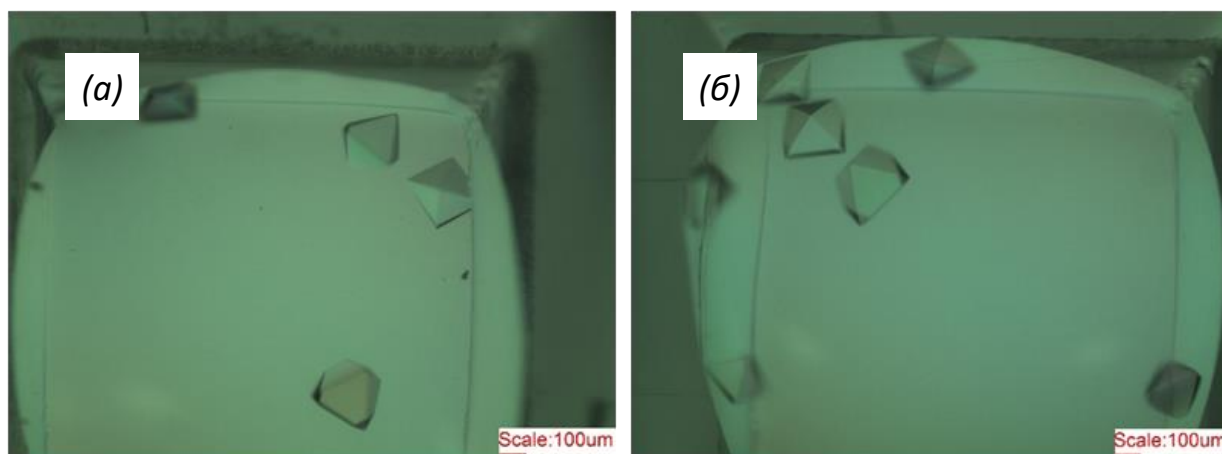


Рис.6.3 – Кристаллы протеиназы К, выращенные с использованием осадителями нитратом натрия (а) и сульфатом натрия (б).

Результаты измерений МУРР. Экспериментальные кривые МУРР, измеренные для растворов белка и белка с осадителем (сульфатом аммония (а) и нитратом натрия (б)) при температуре 10°C, представлены на Рис.6.4. Видно, что при добавлении осадителя интенсивность рассеяния возрастает в области малых углов (Рис.6.4, вставка), что указывает на образование частиц большего (по сравнению с мономерами) размера.

Результаты обработки экспериментальных данных, полученных для разных осадителей и температур, программой OLIGOMER представлены на Рис.6.5 и в Табл. 6.2, 3.

Показано, что при всех значениях температур в кристаллизационных растворах протеиназы К присутствуют только мономеры и димеры (количество димеров находится в пределах 5 – 9 %). Более крупных образований, в частности, тетрамеров, гексамеров и октамеров не обнаружено ни при каких условиях. Выявлено, что количество димеров при понижении температуры возрастает для всех осадителей (с 5.3 до 8.3 % для нитрата натрия и с 6.8 до 8.7 % для сульфата аммония).

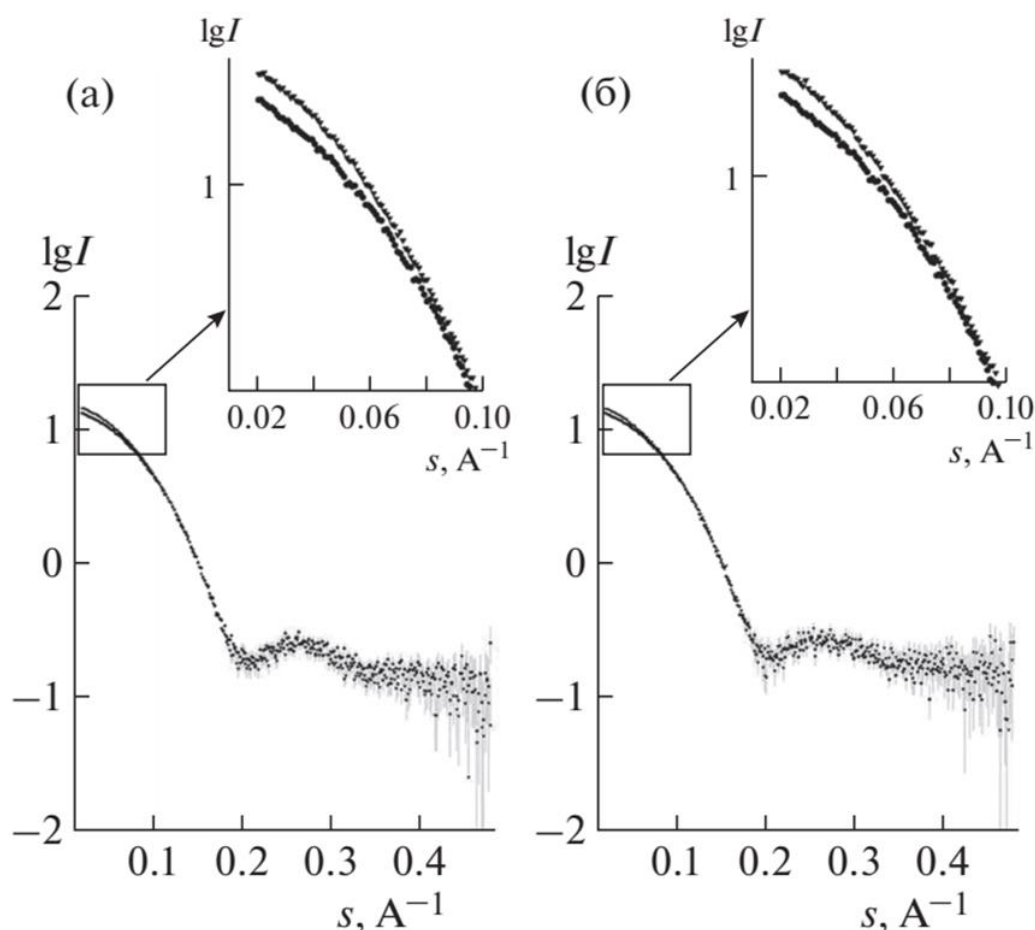


Рис.6.4 – Экспериментальные кривые интенсивности МУРР от растворов протеиназы К (концентрация 10 мг/мл) при температуре 10°C (кружки) и растворов протеиназы К с осадителями сульфатом аммония с концентрацией 0.5 М (треугольники, (а)) и нитратом натрия с концентрацией 1.0 М (треугольники, (б)). На вставках изображены начальные участки кривых.

Отметим, что обработка экспериментальных данных малоуглового рассеяния показывает, что при температуре 10°C в растворе чистого белка (без добавления осадителей) также образуются димеры (Табл. 6.3). Однако их количество в процентном отношении (1.6 %) указывает на то, что лишь незначительная часть мономеров протеиназы К объединяется в димеры. Следовательно, в отсутствие осадителей понижение температуры приводит к уменьшению растворимости белка и способствует незначительной агрегации молекул протеиназы К в буферном растворе.

Табл. 6.2. Процентное содержание мономеров и димеров, выраженное в объемной доле, а также качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 для растворов протеиназы К с осадителями сульфатом аммония и нитратом натрия

t, °C	(NH ₄) ₂ SO ₄			NaNO ₃		
	Объемная доля		χ^2	Объемная доля		χ^2
	мономер, %	димер, %		мономер, %	димер, %	
30	93.0 ± 0.4	6.8 ± 0.1	1.05	94.5 ± 0.4	5.3 ± 0.1	1.15
20	92.2 ± 0.3	7.6 ± 0.1	0.68	92.9 ± 0.3	6.9 ± 0.1	0.91
10	91.2 ± 0.3	8.7 ± 0.2	0.69	91.5 ± 0.3	8.3 ± 0.2	0.95

Если сравнить поведение промежуточной олигомерной фазы в кристаллизационных растворах белков протеиназы К и лизоцима, описанное в Главе 3, можно отметить, что в том и другом случае наблюдается увеличение процентного содержания кристаллообразующих олигомеров в растворах (октамеров для лизоцима и димеров для протеиназы К) при понижении температуры. В целом эффект влияния температуры на изменение количества олигомерных частиц в случае протеиназы К выражен слабее, чем для лизоцима.

Несмотря на то, что исследуемые условия кристаллизации для обоих белков соответствовали условиям роста кристаллов тетрагональной сингонии,

типы образующихся олигомеров, которые предположительно принимают участие в росте кристаллов, различаются. Следовательно, тип олигомера определяется не столько симметрией будущего кристалла, сколько характером связей между молекулами в олигомерных частицах.

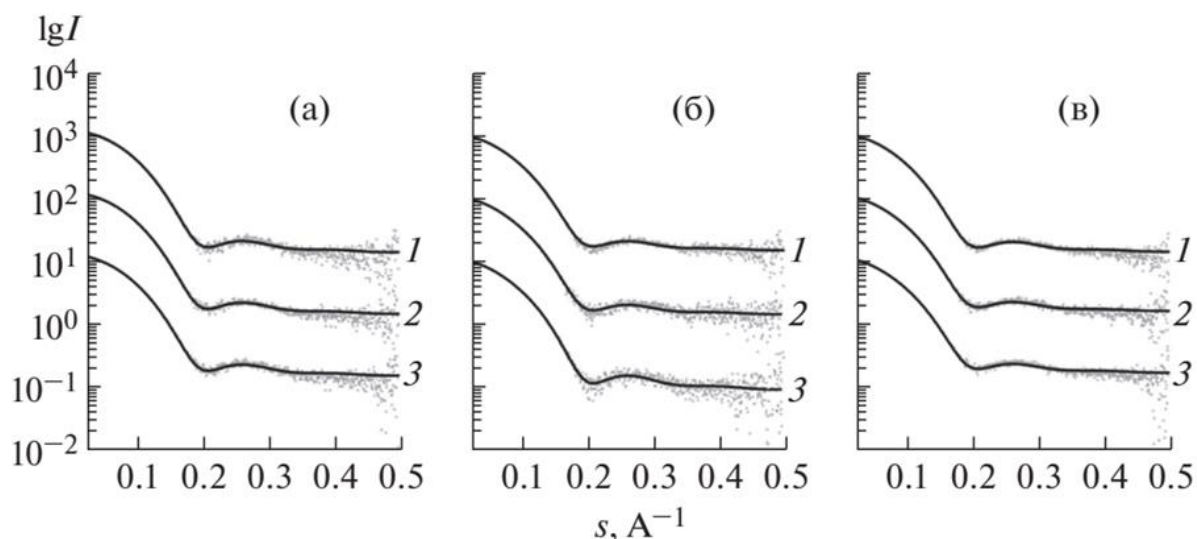


Рис.6.5 – Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой OLIGOMER, при температурах 30 (1), 20 (2), 10°С (3) от растворов протеиназы К (а) и протеиназы К с сульфатом аммония (б), нитратом натрия (в). Концентрация белка составляла 10 мг/мл, концентрации осадителей – 0.5 М (сульфат аммония) и 1.0 М (нитрат натрия). Рис.6.3. Кристаллы протеиназы К, выращенные с использованием осадителей нитрата натрия (а) и сульфата натрия (б).

Табл. 6.3. Процентное содержание мономеров и димеров, выраженное в объемной доле, а также качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 для растворов протеиназы К без осадителя

t, °C	Без осадителя		
	Объемная доля		χ^2
	мономер, %	димер, %	
30	100.0 ± 0.3	0 ± 0.1	1.28
20	99.6 ± 0.4	0.4 ± 0.1	1.29
10	98.2 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.09

6.2.3. Моделирование механизма роста кристалла протеиназы К

Анализ контактов между молекулами протеиназы К в кристалле проведен с помощью сервиса PISA [496] (Proteins, Interfaces, Structures and Assemblies).

Показано, что наибольшее количество водородных связей образуется между двумя молекулами в области аминокислотных остатков с 112 по 114 (выделено черным на Рис.6.6а).

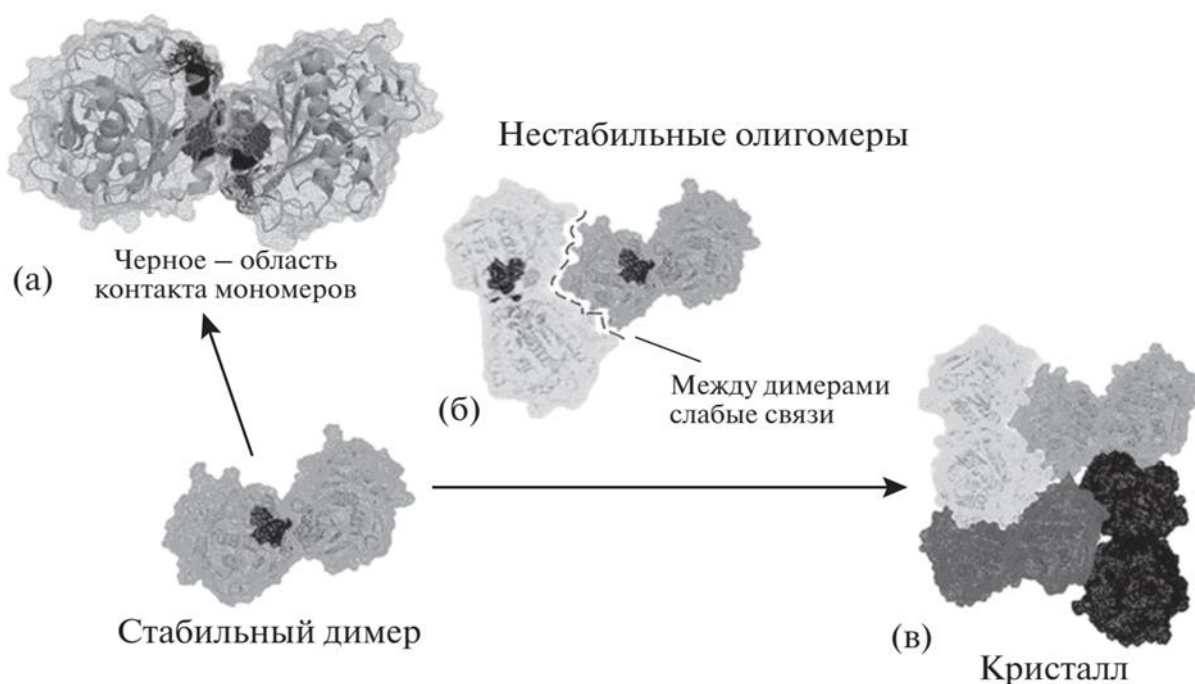


Рис.6.6 – Структура димера (а) и относительное положение димеров в кристаллической решетке протеиназы К (в). Черным цветом выделена область с наибольшим количеством водородных связей между двумя молекулами белка. Связи между димерами в нестабильных олигомерах (тетрамер, гексамер, октамер) существенно слабее, чем между молекулами в самом димере (б).

Связи между димерами в кристаллической решетке слабее (меньше площадь контакта, энергия связей), чем между молекулами, образующими димер (Рис.6.6б). Каждый димер контактирует в кристалле еще с восемью димерами (Рис.6.7). Димеры выстраиваются в кристалле таким образом, что формируется кристаллическая решетка, имеющая симметрию $P4_32_12$ (Рис.6.6в).



Рис.6.7 – Положение димеров в кристаллической решетке протеиназы К. По результатам молекулярного моделирования.

Результаты исследований кристаллизационных растворов методом МУРР (Раздел 6.2.2) показали, что в приведенных в работе условиях кристаллизации протеиназы К, помимо изначально имеющих в растворе чистого белка мономеров, при добавлении в раствор осадителя образуются димеры. Других олигомеров не было обнаружено ни при каких условиях.

На основании проведенных исследований сделано предположение, что наиболее вероятным является образование димера, представляющего собой предкристаллизационную фазу при росте кристалла протеиназы К.

В результате проведенных исследований было подтверждено ранее выдвинутое предположение, что началу кристаллизации предшествует самоорганизация молекул белков в олигомеры определенного типа. При этом тип олигомера определяется не только симметрией будущего кристалла, но и самим белком, т.е. характером существующих в нем связей. Так, для лизоцима,

также кристаллизующегося в тетрагональной сингонии, кристаллообразующим олигомером является октамер, а для протеиназы К – димер.

Эффект влияния изменения температуры на процентное содержание олигомеров в кристаллизационных растворах протеиназы К значительно слабее выражен по сравнению с наблюдаемым эффектом для лизоцима, исследованного ранее.

6.3. БЕЛОК ТЕРМОЛИЗИН

Термолизин – термостабильный фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз пептидных связей, образованных главным образом остатками гидрофобных аминокислот (изолейцином, лейцином, валином, фенилаланином, метионином, аланином), однако со значительно меньшими скоростями катализирующий гидролиз связей, образованных остатками тирозина, глицина, треонина и серина и не расщепляющий пептидные связи, образованные с участием аминокислотного остатка пролина [497].

В состав протеиназы К входят 384 аминокислотных остатка, молекулярная масса равна 28.79 кДа.

Структура молекулы термолизина показана на Рис.6.8.

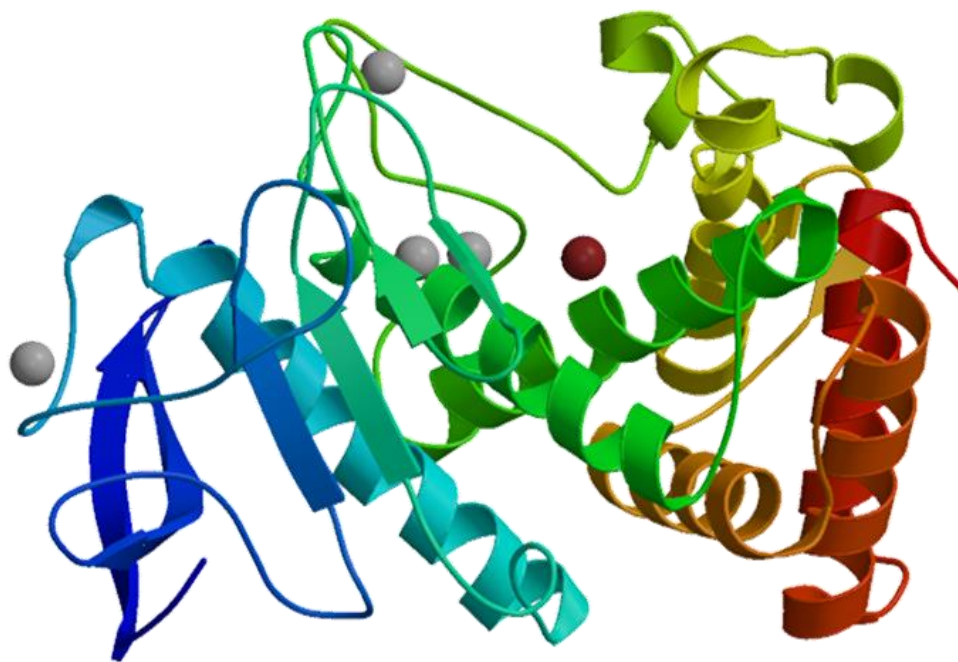


Рис.6.8 – Структура белка термолизин.

Термолизин продуцируется бактерией *Bacillus thermoproteolytics*. Одна молекула термолизина содержит один ион Zn^{2+} , необходимый для проявления ферментативной активности, и четыре иона Ca^{2+} , ответственных за стабильность фермента [498].

Одним из основных применений термолизина является установление первичной структуры белков. Он служит инструментом для дополнительной фрагментации продуктов химического и ферментативного гидролиза белков. Часто используется для первичного расщепления белков небольшой и средней молекулярной массы [499].

Кристалл термолизина относится к гексагональной сингонии, группа симметрии и параметры элементарной ячейки приведены в Табл. 6.4.

Табл. 6.4. Параметры элементарной ячейки кристаллизованного белка термолизина.

Пространственная группа	Параметры элементарной ячейки (Å)	Параметры элементарной ячейки (°)
$P6_122$	$a = 92.535$	$\alpha = 90$
	$b = 92.535$	$\beta = 90$
	$c = 128.628$	$\gamma = 120$

6.3.1. Моделирование структуры олигомеров термолизина

Для построения молекулярных моделей возможных олигомеров, являющихся фрагментами кристаллической структуры термолизина гексагональной сингонии, была использована кристаллическая структура из Базы данных белков (PDB ID: 3DNZ), определенная с разрешением 1.20 Å. Кристалл принадлежит к пр. гр. $P6_122$ с параметрами элементарной ячейки $a = b = 92.54$ Å, $c = 128.63$ Å, $\alpha = \beta = 90.00^\circ$, $\gamma = 120.00^\circ$.

На основе анализа кристаллической структуры возможные димерные и гексамерные структуры были идентифицированы с использованием программы PISA. Водородные связи Gly 199 O... Asn 37 ND2 (3,86 Å) и Gln 246 O... Gln 273 NE2 (3,47 Å) образуют границу раздела димеров (Рис.6.9). Те же водородные связи принимают участие в образовании гексамеров в кристаллической матрице (Рис.6.10, 6.11).

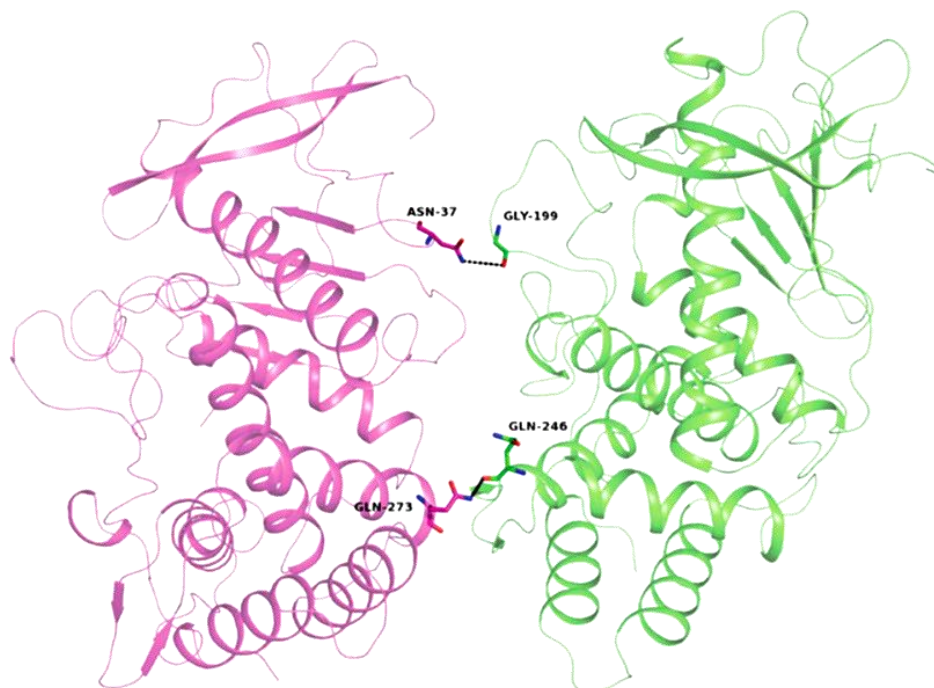


Рис.6.9 – Интерфейс димера, образованный мономерами термолизина, наблюдается в кристаллической решетке термолизина (PDB ID: 3DNZ; $P6_122$). Мономер асимметричной единицы показан пурпурным, а его симметричная единица - зеленым. Водородные связи на границе раздела димера представлены пунктирными линиями. Изображение было создано с использованием программы PyMol.

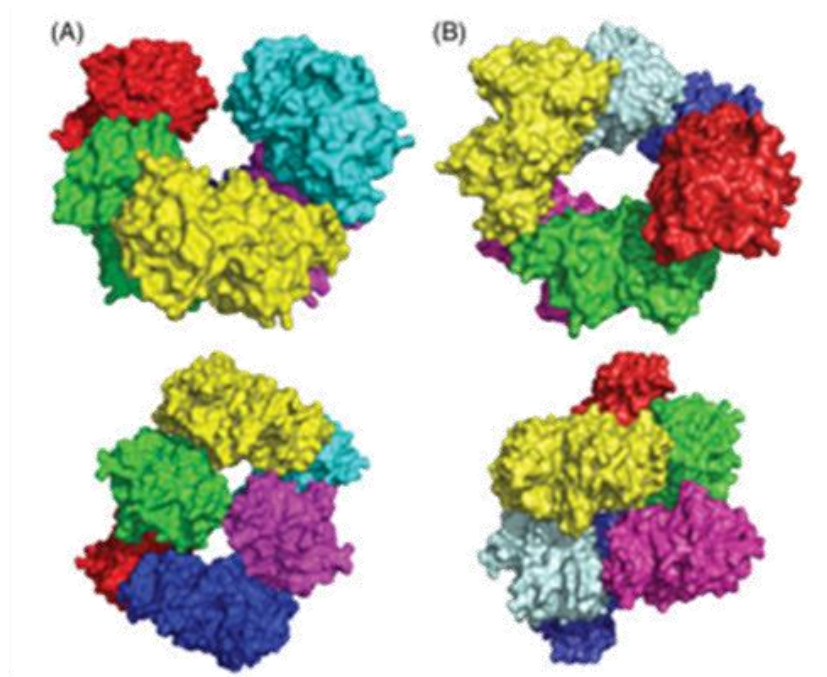


Рис.6.10 – Гексамеры кристаллической решетки термолизина, используемые для анализа данных МУРР. Для наглядности молекулы термолизина отображаются разными цветами. Изображение было создано с использованием программы PyMol.

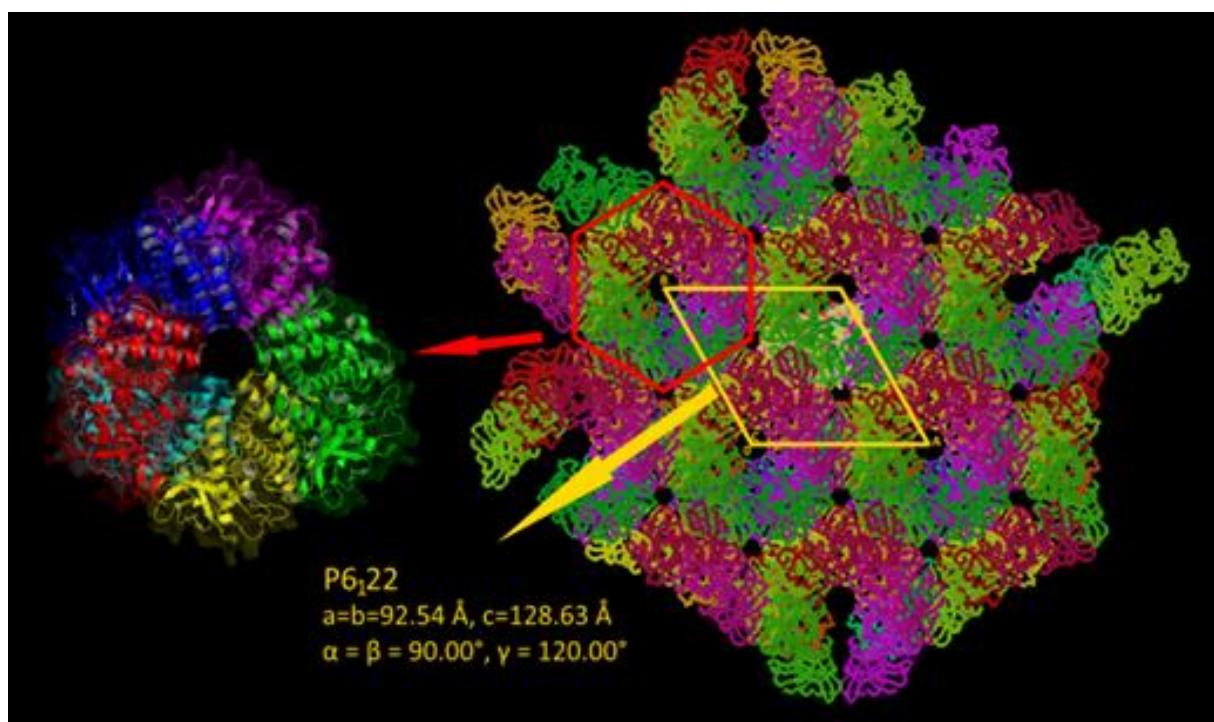


Рис.6.11 – Гексамеры в кристаллической решетке термолизина (PDB ID: 3DNZ; $P6_122$).

6.3.2. Олигомеры в кристаллизационных растворах термолизина при различных условиях

Методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) с использованием СИ проведено исследование структуры раствора термолизина на предкристаллизационной стадии при различных температурах и концентрациях осадителя.

Измерения проведены на станции BM29 BioSAXS Европейского источника синхротронного излучения (ESRF, Гренобль, Франция) (Раздел 2.4.1, Главы 2). Описание материалов и подготовки растворов для исследуемых образцов приведено в Разделе 2.3, Главы 2.

Исходные растворы белка и осадителя смешивали с различным соотношением количества белка с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Табл. 6.5) (без образования пузырьков). Рассеяние МУРР от образца белка в концентрации 12,5 мг/мл без осадителя регистрировалось в качестве контроля. Соответствующие растворы буфера или растворителя готовили аналогичным образом, что и образцы растворов термолизина, за исключением того, что фильтрованный (размер пор 0.22 мкм) NaOH (0.025 M) был использован вместо белка.

Табл. 6.5. – *Исследуемые растворы термолизина при различных концентрациях осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и температурах.*

Исследуемые образцы растворов		
Термолизин (мг/мл)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M)	T (°C)
12.5	0	20
12.5	0.75	20
12.5	0.5	10
		20
12.5	0.35	10
		20
12.5	0.75	10
		15
		20
9.0	0.75	10
		15
		20
6.0	0.75	10
		15
		20

При обработке данных МУРР использовались модели олигомеров, полученные по результатам молекулярного моделирования на основе анализа структуры кристалла термолизина гексагональной сингонии (Раздел 6.3.1).

Наряду с вышеуказанным, методики МУРР-измерений и обработки данных имели ряд особенностей.

Измерения проводились в два этапа, две независимых серии экспериментов, с использованием автоматизированного устройства/робота для смены образцов и проточного кварцевого капилляра толщиной 1.8 мм. В первой серии измерений исследовались растворы термолизина в концентрации 12.5 мг/мл и соответствующие образцы растворителя в 0.0125 М NaOH / 0,05 М Трис-буфере с добавлением осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и без него при двух температурах (10 и 20 °C) и при трех различных концентрациях осадителя (0.35, 0.50 и 0.75 М). Во время второй серии экспериментов исследовались растворы буфера и белка при трех различных концентрациях последнего (12.5, 9.0 и 6.0 мг/мл) при трех температурах (10, 15 и 20 °C) с добавлением 0.75 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Проводилось сравнение профилей рассеяния собранных кадров данных: эффектов радиационного повреждения не наблюдалось в течение 10 с общего времени облучения рентгеновским пучком.

После нормировки на интенсивность прошедшего пучка и радиального усреднения кадры данных усреднялись для каждого исследуемого образца белка и буфера. Вычитание вклада рассеяния от буфера и дальнейшие этапы обработки выполнялись с использованием программы PRIMUS из пакета программ ATSAS 2.8.0 [500]. Экстраполированное прямое рассеяние под нулевым углом $I(0)$ и радиус инерции R_g оценивались с использованием приближения Гинье, предполагая, что при очень малых углах ($s < 1.3/R_g$), интенсивность имеет вид $I(s) = I(0)\exp(-(R_g s)^2/3)$. Оценка экспериментальной величины молекулярной массы (MW) проводилась путем сравнения расчетного прямого рассеяния $I(0)$ исследуемых образцов со стандартным

образцом, раствором бычьего сывороточного альбумина ($MW = 66$ кДа), с учетом концентраций исследуемого и стандартного образцов.

С использованием программы SVDPLOT [500] проводилось сингулярное разложение (SVD) экспериментальных данных. Выделенные сингулярные значения, соответствующие неслучайно осциллирующим сингулярным векторам, определяют минимальное количество независимых компонентов, достаточных для описания каждой из систем образцов.

Результаты измерений МУРР. Экспериментальные данные МУРР раствора термолизина в отсутствие осадителя приведены на Рис.6.12 (при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и концентрации белка 12.5 мг/мл).

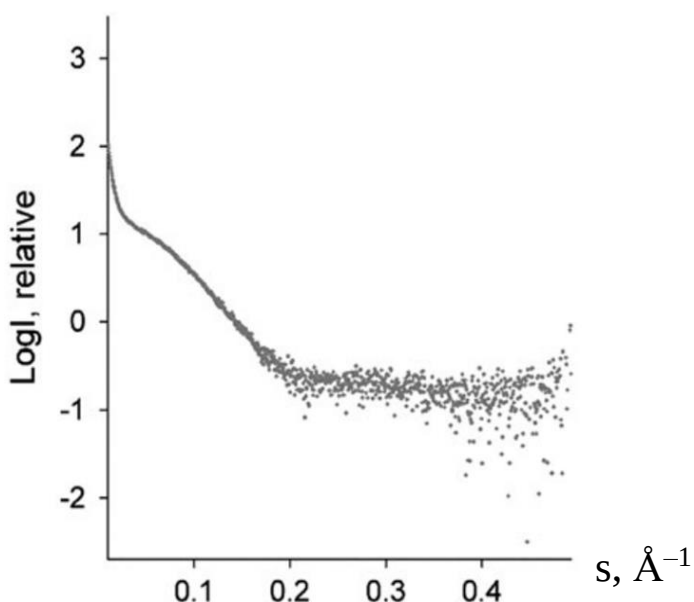


Рис.6.12 – Экспериментальные данные МУРР раствора термолизина в 0.0125 M NaOH , $pH\ 8.5$ без добавления осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при температуре 20°C и концентрации белка 12.5 мг/мл . Резкое увеличение интенсивности рассеяния при малых углах ($s < 0.03\text{ Å}^{-1}$), указывает на то, что в системе присутствуют большие неспецифические агрегаты. Значение R_g агрегатов оценивается в пределах $300 - 350\text{ Å}$.

Резкое увеличение интенсивности рассеяния, наблюдаемое при очень малых углах ($s < 0.03\text{ Å}^{-1}$), обусловлено наличием крупных ассоциированных неспецифических агрегатов, для которых R_g варьируется от 300 до 350 Å . Присутствие таких агрегатов можно объяснить неполной растворимостью

термолизина в данных условиях (0.0125 М NaOH, pH 8.5). При добавлении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в раствор белка повышается его растворимость, что приводит к диссоциации крупных агрегатов (Рис.6.13).

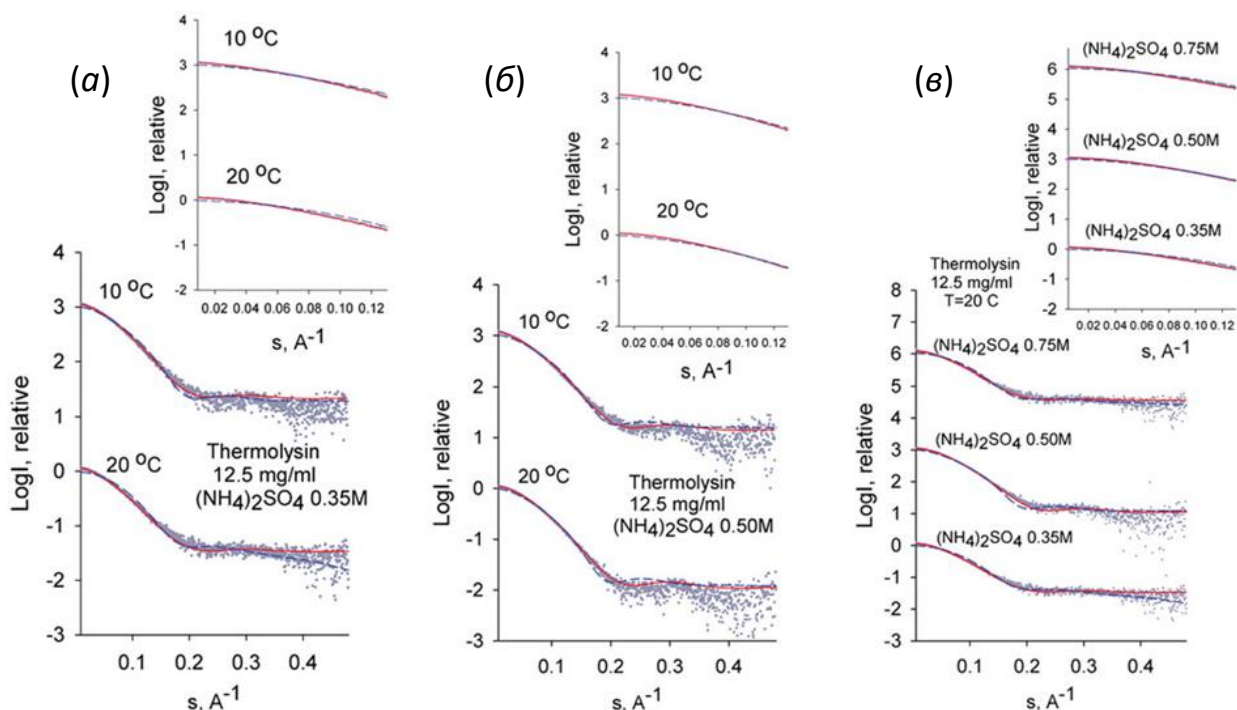


Рис.6.13 – Экспериментальные данные МУРР (точки), полученные для образцов термолизина с концентрацией 12.5 мг/мл с добавлением осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в конечных концентрациях 0.35, 0.50 и 0.75 М при температурах 20 и 10 °С. (а) – 0.35 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 °С; (б) – 0.5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 °С; (в) – показаны кривые МУРР термолизина при различных концентрациях $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.35, 0.50 и 0.75 М) при 20 °С. Кривые, соответствующие наилучшей аппроксимации данных (наилучший фит), получены с помощью программы OLIGOMER и показаны красными сплошными линиями. Кривые, соответствующие наилучшему фиту с учетом структурных факторов межчастичного притяжения между мономерами, получены с использованием программы MIXTURE и показаны синим пунктиром. Для наглядности кривые рассеяния на некоторых образцах смещены на три порядка по оси $\log I(s)$. На вставках показана интенсивность рассеяния при малых углах (область Гинье).

Экспериментальные зависимости МУРР образцов термолизина 12.5 мг/мл с добавлением $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до конечных концентраций 0.35, 0.50 и 0.75 М при 10 и 20 °С, а также для растворов, содержащих 0.75 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, при 10, 15 и 20 °С с концентрациями белка 12.5, 9.0 и 6.0 мг/мл, показаны на

Рис.6.13, 6.14, соответственно. Экспериментальные значения R_g и расчетные величины MW , определенные по данным МУРР термолизина при добавлении осадителя $(NH_4)_2SO_4$ в различных условиях, приведены в Табл. 6.6.

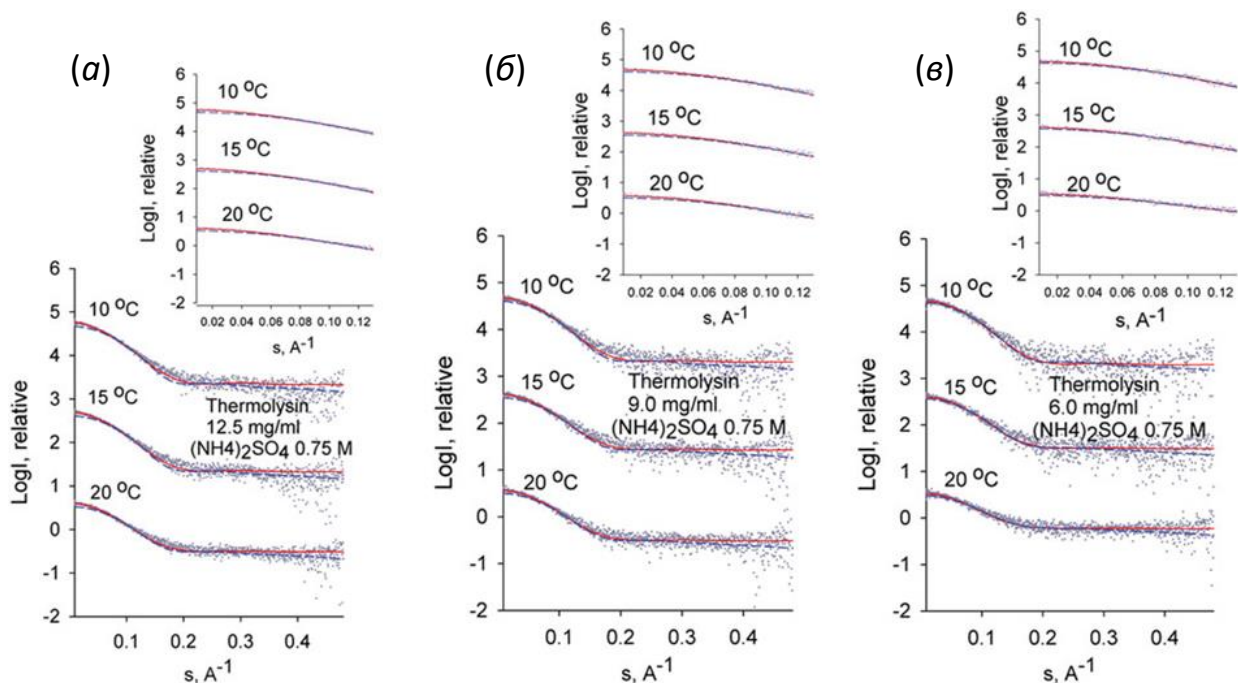


Рис.6.14 – Экспериментальные данные МУРР (точки) растворов термолизина с 0.75 M $(NH_4)_2SO_4$ при различных концентрациях белка и температурах 10, 15 и 20 °C. (а) – 12.5 мг/мл; (б) – 9.0 мг/мл; (в) – 6.0 мг/мл. Кривые, соответствующие наилучшей аппроксимации данных (наилучший фит), получены с помощью программы OLIGOMER и показаны красными сплошными линиями. Кривые, соответствующие наилучшему фиту с учетом структурных факторов межчастичного притяжения между мономерами, получены с использованием программы MIXTURE и показаны синим пунктиром. Для наглядности кривые рассеяния на некоторых образцах смещены на три порядка по оси $\log I(s)$. На вставках показана интенсивность рассеяния при малых углах (область Гинье).

Экспериментальные значения R_g и MW для образцов термолизина с добавлением $(NH_4)_2SO_4$ значительно превышают величины, рассчитанные для мономера в кристаллической структуре (мономер $R_g^{cryst} = 20.6 \text{ \AA}$, $MW^{cryst} = 34.5 \text{ кДа}$). В частности, R_g термолизина увеличивается с ростом концентрации осадителя или при понижении температуры (то в условиях, приводящих к перенасыщению раствора, что является благоприятным для

процесса кристаллизации). Эти наблюдения свидетельствуют о межчастичном притяжении, что способствует ассоциации мономеров термолизина и приводит к образованию олигомеров более высокого порядка. Степень олигомеризации и ее влияние на расчетные структурные параметры частиц зависят от температуры, концентрации $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и стабильности олигомерных форм молекул термолизина (то есть тех, которые не вызывают неспецифическую агрегацию). Полученные значения радиуса инерции, однако, значительно отличаются от ранее наблюдавшихся в [501] по данным МУРН ($75.5 \text{ \AA}$).

Табл. 6.6. – Сводная таблица структурных параметров растворов термолизина при различных концентрациях осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и температурах по данным МУРР.

Состав раствора		Т, °C	Rg ($\text{\AA}$)	MW (кДа)	Мономер (%)	Димер (%)	Гексамер (%)	χ^2 (olig)	χ^2 (mixt)
С (мг/мл)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (М)								
12.5	0	20	$330 \pm 10^*$	2500 ± 200	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
12.5	0.75	20	23.8 ± 0.2	45 ± 3	93.0 ± 0.5	4.1 ± 0.3	2.9 ± 0.2	1.04	6.17
12.5	0.5	10	24.1 ± 0.2	46 ± 3	92.0 ± 0.5	5.1 ± 0.3	2.9 ± 0.2	2.65	35.71
		20	23.6 ± 0.2	45 ± 3	89.2 ± 0.5	8.7 ± 0.3	2.1 ± 0.2	1.14	12.28
12.5	0.35	10	23.1 ± 0.2	43 ± 3	92.6 ± 0.5	5.2 ± 0.3	2.1 ± 0.2	1.77	20.72
		20	22.7 ± 0.2	42 ± 3	90.3 ± 0.5	7.4 ± 0.3	1.9 ± 0.2	1.14	12.53
12.5	0.75	10	24.0 ± 0.2	45 ± 3	91.6 ± 0.5	5.1 ± 0.3	3.3 ± 0.2	1.12	10.74
		15	23.7 ± 0.2	45 ± 3	92.6 ± 0.5	4.4 ± 0.3	3.0 ± 0.2	1.03	8.52
		20	23.6 ± 0.2	44 ± 3	93.0 ± 0.5	4.2 ± 0.3	2.8 ± 0.2	0.96	6.96
9.0	0.75	10	22.8 ± 0.3	43 ± 4	92.0 ± 0.5	6.1 ± 0.3	1.9 ± 0.2	0.96	6.12
		15	22.5 ± 0.3	42 ± 4	93.5 ± 0.5	4.9 ± 0.3	1.6 ± 0.2	0.97	5.88
		20	22.1 ± 0.3	40 ± 4	94.9 ± 0.5	4.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.82	5.11
6.0	0.75	10	22.3 ± 0.3	42 ± 4	94.0 ± 0.5	4.8 ± 0.3	1.2 ± 0.2	0.86	4.68
		15	22.0 ± 0.3	40 ± 4	95.0 ± 0.5	4.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.79	4.62
		20	21.8 ± 0.3	39 ± 4	96.0 ± 0.5	3.3 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.80	5.04

Соответствующие расхождения фита экспериментальных данных, полученных с использованием программы OLIGOMER, χ^2 (olig) или программы MIXTURE, χ^2 (mixt).

Для более детального анализа растворов термолизина данные МУРР были обработаны с использованием программы OLIGOMER для оценки объемных

долей олигомеров термолизина в растворе. Кривые, соответствующие наилучшему модельному фиту и соответствующие объемные доли олигомеров в растворах термолизина при добавлении осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при различных температурах представлены на Рис.6.13, 6.14 (сплошные линии) и представлены в Табл. 6.6, соответственно.

Анализ с использованием программы OLIGOMER, который позволяет определить отдельные весовые вклады в рассеяние от объемных долей компонентов системы, показал, что наряду с мономерами термолизина (с объемной долей от 80 до 90%) все образцы раствора содержат димеры термолизина (объемные доли находятся в пределах 4 – 8%) и гексамеры (объемные доли варьируются в пределах 1 – 3%). Соответствующие структуры олигомеров показаны на Рис.6.9, 6.10.

Следует отметить, что образование тетрамеров не было выявлено. Кроме того, при 20 °C объемная доля гексамеров увеличивается с увеличением концентрации осадителя (с 1.9% при 0.35 М до 2.1% при 0.50 М и 2.9% при 0.75 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), в то время как доля гексамеров достигает максимума при понижении температуры до 10 °C.

Альтернативный подход с использованием программы MIXTURE, который учитывает объемные доли и SHS потенциал, отвечающий за взаимодействие притяжения между мономерами, продемонстрировал результаты значительно хуже по сравнению с программой OLIGOMER с точки зрения подгонки данных МУРР. Результаты фита MIXTURE содержат систематические отклонения от экспериментальных данных, особенно при очень низких углах в области Гинье кривых МУРР (см. вставки на Рис.6.13, 6.14). Таким образом, учет межчастичных взаимодействий на коротких расстояниях между мономерами, по-видимому, оказывает ограниченное влияние на тестируемые концентрации белка и недостаточен для адекватного описания экспериментальных данных. Действительно, даже при более низкой концентрации термолизина (6 мг/мл), где эффекты межчастичных взаимодействий незначительны из-за эффектов простого разбавления, для

подгонки данных требуется включение в состав системы небольшой, но значимой объемной доли гексамеров (1%).

Чтобы дополнительно исследовать нашу гипотезу относительно образования олигомеров при добавлении осадителя, все кривые рассеяния, полученные при разных концентрациях белка/осадителя и разных температурах, были проанализированы с использованием модельно-независимого SVD. SVD указывает на наличие трех основных компонентов, которые вносят вклад в данные рассеяния, что согласуется с присутствием мономеров, димеров и гексамеров в растворе термолизина (Рис.6.15).

В целом, результаты исследования показывают, что существует тонкий баланс между долями различных олигомеров, образующихся в растворе, в ответ на степень перенасыщения раствора, т.е. концентрацию осадителя и температуру.

Результаты проведенного исследования могут быть интерпретированы с точки зрения образования предкристаллизационной фазы гексамеров термолизина в растворе при добавлении осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Объемная доля гексамеров в растворе увеличивается, когда выполняются условия пересыщения, то есть, когда температура снижается и концентрация $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ растет. Анализ упаковки молекул в кристаллической структуре показывает, что гексамеры являются наиболее вероятными единицами роста кристаллов термолизина. Данные хорошо коррелируют с некоторыми систематическими исследованиями предкристаллизационной фазы в растворах лизоцима, а также с исследованиями МУРР бычьего ингибитора панкреатического трипсина (где было показано, что декамеры являются предкристаллизационными строительными блоками [502]).

Хотелось бы обратить внимание на различия между результатами настоящих исследований и предыдущих исследований, в которых образование олигомеров в предкристаллизационной фазе было связано (теоретически предсказано) с каскадной серией образования димеров, тетрамеров, гексамеров, октамеров, декамеров и др. [5, 209]. Несмотря на указанные

предположения, исследования лизоцима (результаты Главы 3) и теперь термолизина показывают, что олигомеры, которые образуют части кристаллической матрицы белка, образуются в растворе и стабильны в предкристаллизационных условиях. Полагается, что образование олигомерной предкристаллизационной фазы, состоящей из единиц роста кристалла, в конечном итоге связано с упорядоченной симметрией кристаллической матрицы выросшего кристалла. Формирование модульной олигомерной иерархии в растворе может быть промежуточной фазой для белков (по крайней мере, имеющих глобулярную форму), которая запускает процесс кристаллизации. Однако необходимы дальнейшие аналогичные эксперименты, чтобы установить, применимы ли определенные иерархии олигомеризации белка, обнаруженные в предкристаллизационной фазе, к кристаллизации белков в целом или являются одним из нескольких механизмов, посредством которых осуществляется кристаллизация белка. Следует отметить, что необходимо учитывать наличие возможных агрегатов белка в последующих олигомерных смесях. Однако во многих случаях эти агрегаты имеют размер порядка сотен нм, и их можно легко отличить от олигомеров предкристаллизационной фазы.

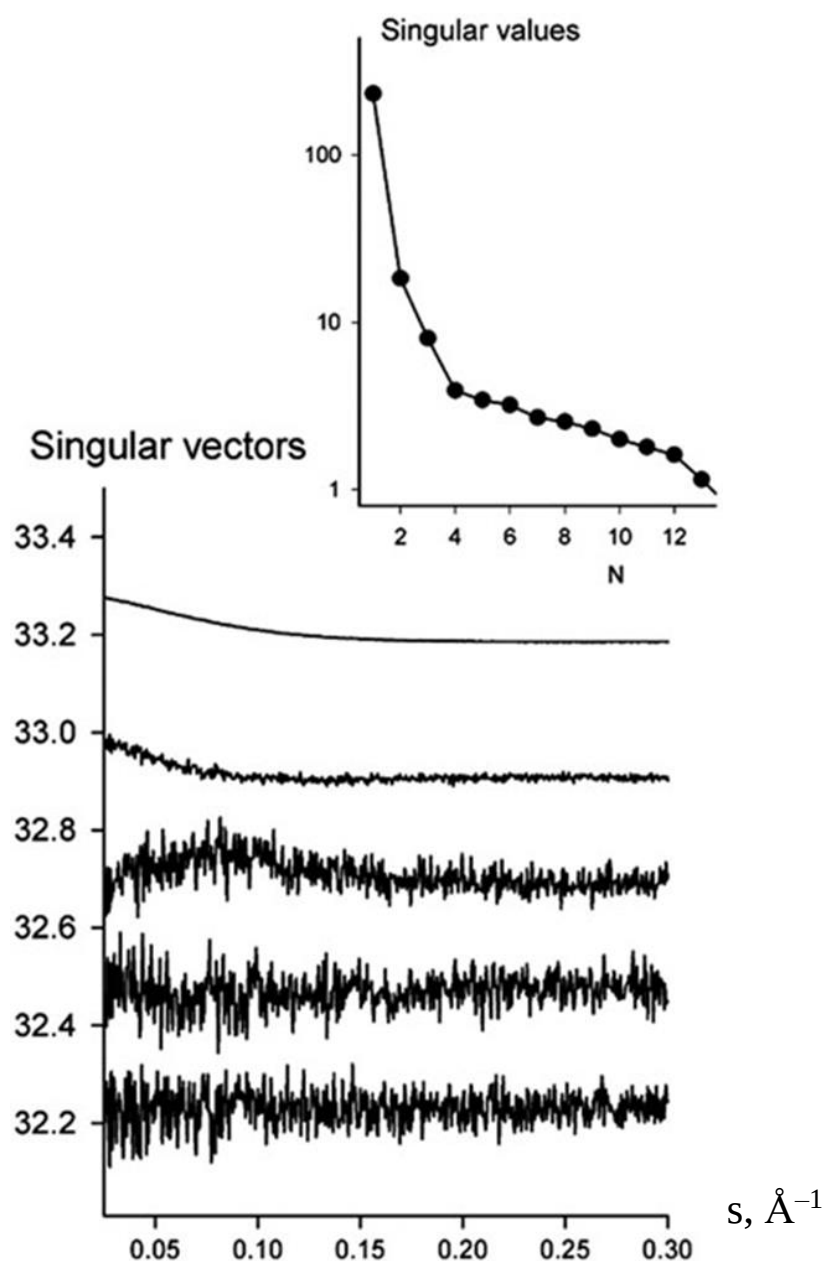


Рис.6.15 – SVD разложение данных МУПП, полученных от растворов термолизина при различных концентрациях белка (12.5, 9.0 и 6.0 мг/мл) и осадителя (0.35, 0.50 и 0.75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) при трех различных температурах (10, 15 и 20 °C). На вставке показаны сингулярные значения, отсортированные в порядке убывания, а основной график отображает соответствующие сингулярные векторы. Были идентифицированы только три неслучайно осциллирующих сингулярных вектора (первые три вектора в верхней части основного графика), что свидетельствует о том, что система термолизина может быть описана тремя независимыми компонентами рассеяния. Это подтверждает гипотезу о том, что образцы термолизина состоят из мономеров, димеров и гексамеров (в соответствии с моделированием в программе OLIGOMER, Рис.6.13, 6.14 и Табл. 6.6).

Обнаружение олигомеризации белка с применением МУРР, когда олигомеры связаны с «единичными частями» модульной структуры упаковки кристалла белка, может быть эффективным подходом для скрининга условий кристаллизации.

Важно отметить, что онлайн-эксклюзионная хроматография (SEC) может быть полезна в некоторых случаях для разделения олигомеров и их последующего обнаружения. Однако следует учитывать, что во время этого процесса концентрация белка снижается в 5–10 раз, контроль температуры затруднен, а метод обычно занимает довольно много времени (15 мин – 2 ч). Как следствие, образование или обнаружение предкристаллизационной олигомерной фазы может быть не выгодным или труднодостижимым с использованием методик на основе SEC.

Возможно, выгодно использовать описанный в настоящей работе подход на основе высокой пропускной способности МУРР, который чувствителен к обнаружению олигомерных частиц и оценке изменений в состоянии(-ях) олигомеризации посредством скрининга образца в различных условиях в отношении добавления осадителя и изменения температуры.

В таком случае можно использовать МУРР для идентификации предкристаллизационных фаз белков, кристаллы которых уже получены, чтобы помочь в поиске более благоприятных условий кристаллизации, или использовать в качестве поиска начальных условий кристаллизации для белков с неизвестной кристаллической структурой.

Несмотря на то, что в последнем случае выявление образования олигомеров с применением МУРР является прямым (благодаря расхождению между ожидаемой молекулярной массой белка и экспериментальной, полученной из данных), намного сложнее предсказать структуру следовых олигомеров в априорном случае. Это связано, в частности, с неоднозначностью присущей данным МУРР и необходимостью независимой проверки объема или количества фракций компонентов найденного решения.

В последнее время было разработано несколько алгоритмов, использующих мульти-разрешающий альтернативный метод наименьших квадратов [503] и анализ факторов развития [504] для восстановления как компонентов, так и их объемных долей в случае многокомпонентных систем.

Их сочетание вместе с реконструкцией формы *ab initio* с использованием программ GASBORMX [500] и DAMMIX [505] – в случае двух- и/или трехкомпонентных систем, соответственно – представляется многообещающей стратегией для выяснения направлений олигомеризации, которые могут позволить уменьшить как времязатраты, так и расход образцов, посредством применения рационального подхода к попыткам кристаллизации и скринингу растворов.

6.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ГЛАВЕ 6

Представлены результаты верификации предположения о том, что механизм кристаллизации водорастворных белков включает формирование промежуточной фазы – образование олигомеров – «единиц роста» будущего кристалла посредством изучения начальной стадии кристаллизации белков протеиназы К и термолизина.

Показано, что при добавлении к раствору протеиназы К сульфата аммония или нитрата натрия в качестве осадителей в растворе образуется существенная доля димеров белка, причем содержание димеров в растворе слабо возрастает с уменьшением температуры. Образование димеров обусловлено тем, что в кристалле именно между димерами наблюдаются наиболее сильные связи, а сами димеры связаны друг с другом слабее.

В растворе термолизина при добавлении осадителя $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на начальной стадии кристаллизации в растворе обнаружено формирование димеров и гексамеров. При этом количество гексамеров растет при понижении температуры и повышении концентрации осадителя. Кристалл термолизина имеет гексагональную сингонию. Анализ связей между отдельными молекулами в кристалле показал, что наиболее вероятным прекурсором для образования кристалла могут являться димеры и один из двух гексамеров.

Таким образом, результаты исследования механизмов кристаллизации протеиназы К и термолизина еще раз подтвердили, что образование олигомеров в растворе на начальной стадии кристаллизации, обусловлено определенным для каждого белка и осадителя взаимодействием между молекулами белка и ионами, обеспечивающем формирование прекурсоров определенного типа и дальнейшую «сборку» из них кристалла.

Образование в растворе белка прекурсоров – олигомеров определенного типа, являющихся элементами будущего кристалла, представляет собой дополнительную промежуточную фазу между беспорядком молекул белка в растворе и упорядоченной структурой в кристалле. Взаимодействия между отдельными молекулами белка, которые возникают при добавлении осадителя

приводят к образованию таких прекурсоров, процентное содержание которых в свою очередь зависит от условий и взаимосвязано с условиями, способствующими росту кристалла.

ВЫВОДЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Разработан и апробирован подход к многомасштабному исследованию механизмов организации и структуры белковых систем, основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования. Разработаны и созданы специализированные измерительные ячейки, позволяющие проводить *in situ* исследования процессов формирования белковых кристаллов и пленок методами рентгеновской рефлектометрии, дифрактометрии, а также методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения в условиях гелиевой атмосферы, специальная микрофлюидная ячейка для проведения исследований методами малоуглового рассеяния. Создан измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре измерительные ячейки.

2. Взаимодополняющими методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов и дифракционными методами в серии экспериментов, выполненных на различных установках (дифрактометр АМУР-К, источники синхротронного излучения КИСИ-Курчатов (ДИКСИ, БиоМУР, РСА, «Белок») и ESRF (BM29 BioSAXS, ID23-1), источник нейтронов ИБР 2 (ЮМО)), установлено, что растворы лизоцима в условиях образования кристаллов тетрагональной сингонии содержат только три компоненты – мономеры (от 90 до 96 %), димеры (от 1 до 6 %) и октамеры (от 3 до 9 %).

3. Предложен подход к моделированию механизмов формирования кристаллов, основанный на проведении вычислительного эксперимента методом молекулярной динамики по определению стабильности белковых комплексов с определенной структурой, представляющих собой элемент белкового кристалла, при различных условиях. Рассчитана динамика олигомеров в растворе с осадителем и без. Показано, что в присутствии осадителя стабилен только один из исследуемых типов октамеров (содержащий ось 4-ого порядка), при этом другие типы октамеров, а также

тетрамеры и гексамеры диссоциируют. В растворе без осадителя все олигомеры нестабильны.

4. Установлено, что концентрация октамеров в растворе лизоцима, содержащего осадитель, растет с увеличением концентрации белка и осадителя, а также с уменьшением температуры и при замене обычной воды на тяжелую. Показано, что при добавлении хлоридов металлов к раствору лизоцима степень увеличения концентрации октамеров в растворе коррелирует с положением иона металла в лиотропном ряду.

5. На основе анализа структуры кристаллов лизоцима, полученных при использовании в качестве осадителя хлоридов различных металлов, установлено взаимодействие ионов осадителя и молекулами белка. Показано, что ионы осадителя обеспечивают оптимальное распределение поверхностного заряда молекулы лизоцима, приводящее к образованию прекурсоров кристалла – октамеров; определено влияние различных ионов осадителя на равновесную концентрацию и конформационную стабильность октамеров, а также связывание прекурсоров между собой при дальнейшем росте кристаллов.

6. Апробирован подход к исследованию взаимодействия белковых молекул с ионами осадителя в модельной системе – ленгмюровского монослоя, сформированного на поверхности водной субфазы из кристаллизационного раствора. Показано, что такие монослои и пленки лизоцима имеют толщину, равную диаметру октамера, высокую плотность и однородность. Установлено, что при формировании монослоя ионы осадителя формируют тонкий слой на границе раздела белок/субфаза, при этом структура «слой белка/слой осадителя/субфаза» остается стабильной не менее 12 часов, а также сохраняется при переносе монослоя на твердую подложку.

7. На основе анализа взаимодействий между молекулами протеиназы К в кристалле было предсказано, что наиболее вероятными единицами роста кристалла, которые могут устойчиво существовать в кристаллизационных растворах, являются димеры. Методом МУРР подтверждено, что растворы

протеиназы К в условиях кристаллизации включают только две компоненты – мономеры и димеры.

8. На основе анализа взаимодействий между молекулами белка в кристалле термолизина сделано предположение, что наиболее вероятными единицами роста кристалла, которые могут устойчиво существовать в кристаллизационных растворах, являются димеры и гексамеры. Методом МУРР подтверждено, что растворы термолизина в условиях кристаллизации включают только три компоненты – мономеры, димеры и гексамеры.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование влияния на начальную стадию кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии замены растворителя с обычной воды на тяжелую методом малоуглового рентгеновского рассеяния» // Кристаллография, 2017, том 62, № 6, с. 876–881.
2. Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, В.В. Волков, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование условий образования единиц роста белкового кристалла в растворах лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей» // Кристаллография, 2017, том 62, № 3, с. 364–369
3. М.В. Ковальчук, А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, А.М. Ополченцев, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, А.Ю. Серегин «Модификация метода Ленгмюра–Шеффера для получения упорядоченных белковых пленок» // Кристаллография, 2017, том 62, № 4, с. 650–656
4. A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, K.B. Ilina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, A.I. Kuklin, M.A. Marchenkova, V.V. Nabatov, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevskya, M.V. Kovalchuk «Octamer formation in lysozyme solutions at the initial crystallization stage detected by small-angle neutron scattering» // Acta Cryst., D73, 2017, P. 591-599.
5. М.А. Марченкова, В.В. Волков, А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, Е.Ю. Терещенко, В.И. Тимофеев, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук, «In situ - исследования состояния молекул лизоцима на стадии начала процесса кристаллизации методом малоуглового рентгеновского рассеяния», Кристаллография, 2016, Том 61, № 1, С. 14 – 19.
6. M.V. Kovalchuk, A.E. Blagov, Yu.A. Dyakova, A.Yu. Gruzinov, M.A. Marchenkova, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevskiy, V.I. Timofeev and V.V. Volkov,

«Investigation of the initial crystallization stage in lysozyme solutions by small-angle X-ray scattering». *Crystal Growth & Design*. 2016. 16 (4). P. 1792.

7. **Ю.А. Дьякова**, М.А. Марченкова, «Создание частично упорядоченных органических планарных систем на основе *in situ* контроля их структурной организации», *Кристаллография*, 2016, Т. 61, № 5, С. 718–735.

8. Marchenkova M.A., **Dyakova Y.A.**, Tereschenko E.Y., Kovalchuk M.V., Vladimirov Y.A. «Cytochrome c complexes with cardiolipin monolayer formed under different surface pressure» // *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2015. Т. 31. № 45. С. 12426-12436.

9. М.В. Ковальчук, П.А. Просеков, М.А. Марченкова, А.Е. Благоев, **Ю.А. Дьякова**, Е.Ю. Терещенко, Ю.В. Писаревский, О. А. Кондратьев, «Исследование *in-situ* процессов роста и деградации кристаллов тетрагонального лизоцима на подложке кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии», *Кристаллография*, 2014, Т. 59, №5, С. 749-754.

10. M.V. Kovalchuk, A.S. Boikova, **Y.A. Dyakova**, K.B. Ilina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, M.A. Marchenkova, Y.V. Pisarevsky, V.I. Timofeev «Pre-crystallization phase formation of thermolysin hexamers in solution close to crystallization conditions» *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019, V. 37(12), P. 3058-3064.

11. А.С. Бойкова, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, А.Ю. Серегин, П.А. Просеков, Ю.А. Волковский, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Получение многослойных пленок на основе белка лизоцима и ионов осадителя (йода и калия) на кремниевой подложке модифицированным методом Ленгмюра–Шеффера» // *Кристаллография*, 2018, том 63, № 5, с. 703–707.

12. М.В. Ковальчук, А.С. Бойкова, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П. В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский «Исследование предкристаллизационной стадии раствора (влияния температуры и типа

осадителя) протеиназы к методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения» Кристаллография 2018т.63 № 6, с. 857-862

13. Ю.В. Кордонская, В.И. Тимофеев, **Ю.А. Дьякова**, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский, Д. Подшивалов, М.В. Ковальчук «Исследование поведения олигомеров белка лизоцима, образующихся в растворах на ранней стадии кристаллизации методом молекулярной динамики.» Кристаллография 2018 Т 63 №6, с. 902-905.

14. **Ю.А. Дьякова**, А.С. Бойкова, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, В.И. Тимофеев, М.В. Ковальчук «Исследование влияния иона осадителя на образование олигомеров в кристаллизационных растворах белка лизоцима», Кристаллография 2019 64 №1, с. 15-19

15. А.М. Попов, А.С. Бойкова, В.В. Волков, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П. В. Конарев, М.А. Марченкова, Г.С. Петерс, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Микрофлюидная ячейка для изучения структуры предкристаллизационной стадии растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей», Кристаллография, 2018. том 63 № 5, с. 697-702.

16. Kovalchuk M.V., Boikova A.S., **Dyakova Y.A.**, Ilina K.B., Konarev P.V., Marchenkova M.A., Pisarevskiy Y.V., Prosekov P.A., Rogachev A.V., Seregin A.Y. “Structural characteristics of lysozyme Langmuir layers grown on a liquid surface from an oligomeric mixture formed during the stages of lysozyme crystallization”, Thin Solid Films 2019. V. 677. P. 13–21

17. М.А. Marchenkova, I.P. Kuranova, V.I. Timofeev, A.S. Boikova, P.V. Dorovatovskii, **Y.A. Dyakova**, K.B. Ilina, Y.V. Pisarevskiy, M.V. Kovalchuk, «The binding of precipitant ions in the tetragonal crystals of hen egg white lysozyme» // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2020, Vol. 38, № 17, 5159 – 5172. DOI: 10.1080/07391102.2019.1696706.

18. М.А. Marchenkova, P.V. Konarev, T.V. Rakitina, V.I. Timofeev, A.S. Boikova, **Yu.A. Dyakova**, K.B. Ilina, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk.

«Dodecamers derived from the crystal structure were found in the pre-crystallization solution of the transaminase from the thermophilic bacterium *Thermobaculum terrenum* by small-angle X-ray scattering», *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020, V. 38(10), P. 2939-2944.

19. Y.V. Kordonskaya, M.A. Marchenkova, V.I. Timofeev, **Y.A. Dyakova**, Y.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk, «Precipitant ions influence on lysozyme oligomers stability investigated by molecular dynamics simulation at different temperatures» *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Published online: 08 Aug 2020. DOI: 10.1080/07391102.2020.1803138.

20. 30th European Crystallographic Meeting, 28th August - 1st September 2016, Congress Center Basel, Switzerland. **Y.A. Dyakova**, A.E. Blagov, M.A. Marchenkova, Y.V. Pisarevskiy, P.A. Prosekov, V.V. Volkov, M.V. Kovalchuk, «New approach to protein crystallization. Investigation of various crystallization stages of lysozyme» // *Acta Cryst. A: Foundations and Advances*. (2016). A72. s238.

21. M. Marchenkova, A. Boikova, Y. Dyakova, A. Opolchentsev, P. Prosekov, Y. Pisarevsky, A. Seregin, M. Kovalchuk, «A new approach to ordered protein films formation» // *Acta Cryst.* (2017), A70, C1182.

22. Y. Dyakova, M. Marchenkova, Y. Pisarevsky, M. Kovalchuk, «A new approach to finding the protein crystal growth conditions» // *Acta Cryst.* (2017), A70, C1184.

ПАТЕНТЫ

1. Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Дьякова Ю.А., Марченкова М.А., Просеков П.А., Серегин А.Ю., Бойкова А.С., Заявка на патент «Способ получения упорядоченных белковых пленок на твердых подложках в ленгмюровской ванне». Патент № 2672410.

2. Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Благов А.Е, Дьякова Ю.А., Марченкова М.А., «Способ определения условий кристаллизации белков». Патент № 2626576.

3. Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Волков В.В., Дьякова Ю.А., Конарев П.В., Марченкова М.А., Попов А.М., «Микрофлюидная ячейка для определения условий кристаллизации белков методом малоуглового рассеяния». Патент на полезную модель № 182997.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор с огромной благодарностью посвящает эту работу своему учителю член-корр. РАН, д.ф.-м.н., проф. М.В. Ковальчуку.

Автор также выражает глубокую признательность Писаревскому Ю.В., Нарайкину О.С., Благову А.Е., Каневскому В.М., Фейгину Л.А., Волкову В.В., Конареву П.В., Марченковой М.А., Бойковой А.С., Ильиной К.Б., Курановой И.П., Тимофееву В.И., Просекову П.А., Самыгиной В.Р., Владимирову Ю.А., Новиковой Н.Н., Якунину С.Н., Терещенко Е.Ю., Задорожной Л.А., сотрудникам Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований (ККСНИ, НИЦ «Курчатовский институт»), Европейского центра синхротронных исследований (ESRF, Гренобль, Франция), Объединенного института ядерных исследований (ОИЯИ, Дубна, Россия), ответственным по экспериментальным станциям источника синхротронного излучения «КИСИ-Курчатов» «ДИКСИ» (Грузинов А.Ю.), «БиоМУР» (Петерс Г.С.), «РКФМ» (Серегин А.Ю.), «ЛЕНГМЮР» (Рогачев А.В.), БЕЛОК (Дороватовский П.В.), ЮМО@ИБР-2 (Куклин А.И.), BioSAXS@ESRF (Pernot P.), молодым сотрудникам Кордонской Ю.В., Волковскому Ю.А. за постоянную помощь в работе, а также всем своим коллегам из комплекса НБИКС-природоподобных технологий (НИЦ «Курчатовский институт») и лаборатории «Рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения» (РМАиСИ, ИК РАН, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН) за помощь, сотрудничество и конструктивное, теплое участие на разных стадиях работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

-
- [1] Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами: учебное пособие – 5-е изд., испр. и доп. – М.: КДУ, 2014. – 524 с. (Лекция 1)
- [2] Gebauer D., Kellermeier M., Gale J.D. et al, Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation // Chem. Soc. Rev., 2014 43, 2348
- [3] Boué F., Lefaucheux, F., Robert, M. C., & Rosenman, I. Small angle neutron scattering study of lysozyme solutions // J. Cryst. Growth. 1993. Vol. 133, № 3–4. P. 246–254.
- [4] Ducruix, A.; Guilloteau, J. P.; Riès-Kautt, M.; Tardieu, A., Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis. // Journal of Crystal Growth 1996, 168, (1-4), 28-39.
- [5] Li M., Nadarajah A., Pusey M.L. Growth of (101) faces of tetragonal lysozyme crystals: Determination of the growth mechanism // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 1999. Vol. 55. P. 1012–1022.
- [6] Coureux, P.-D., Wells, A.L., Menetrey, J., Yengo, C.M., Morris, C.A., Sweeney, H.L., Houdusse, A. A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. // Nature. (2003) V. 425, P. 419.
- [7] Ponomarenko E.A. et al. The Size of the Human Proteome: The Width and Depth // Int. J. Anal. Chem. 2016. Vol. 2016. P. 1–6.
- [8] Otterbein, L.R., Graceffa, P., Dominguez, R. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. // Science (2001) 293: 708-711.
- [9] Su R.S.C., Kim Y., Liu J.C. Resilin: Protein-based elastomeric biomaterials // Acta Biomater. Acta Materialia Inc., 2014. Vol. 10, № 4. P. 1601–1611.
- [10] Kramer, R.Z., Bella, J., Mayville, P., Brodsky, B., Berman, H.M. Sequence dependent conformational variations of collagen triple-helical structure. // Nat.Struct.Mol.Biol. (1999) 6: 454-457.

-
- [11] Encyclopedic Reference of Immunotoxicology (2005) // K. Resch. Cytokine Inhibitors, pp170-173.
- [12] Calandra T., Roger T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.*, 3 (10) 791–800.
- [13] Sun H.W., Bernhagen J., Bucala R., Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor // *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1996) V.93(11). 5191-6.
- [14] Dziedzic P., Cisneros J.A., Robertson M.J., Hare A.A., Danford N.E., Baxter R.H., Jorgensen W.L. // *J Am Chem Soc.* (2015), V.137, pp2996-3003.
- [15] Tame, J.R., Vallone, B. The structures of deoxy human haemoglobin and the mutant Hb Tyr α 42His at 120 K. // *Acta Crystallogr., Sect. D* (2000) 56: 805-811.
- [16] Pliotas C., Dahl A.C., Rasmussen T., Mahendran K.R., Smith T.K., Marius P., Gault J., Banda T., Rasmussen A., Miller S., Robinson C.V., Bayley H., Sansom M.S., Booth I.R., Naismith J.H. The role of lipids in mechanosensation // *Nat Struct Mol Biol.* (2015) 12: 991-8. doi: 10.1038/nsmb.3120.
- [17] Malinina L., Simanshu D.K., Zhai X., Samyгина V.R., Kamlekar R., Kenoth R., Ochoa-Lizarralde B., Malakhova M.L., Molotkovsky J.G., Patel D.J., Brown RE. (2015) Sphingolipid transfer proteins defined by the GLTP-fold // *Q Rev Biophys.* (2015) V48, pp281-322.
- [18] Suzuki H. *How Enzymes Work: From Structure to Function*. 1st Edition. Jenny Stanford Publishing (2015) 234 Pages. ISBN 9789814463928.
- [19] Polaina J., MacCabe A.P. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Springer; 2007 edition. 641 pages. ISBN-10: 1402053762. ISBN-13: 978-1402053764.

-
- [20] Holdgate G.A., Meek T.D. & Grimley R.L. Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective. *Nature Reviews Drug Discovery* (2018) V. 17, P. 115.
- [21] J.D. Bernal, D. Crowfoot, *Nature* 133, 794 (1934);
- [22] D.C. Hodgkin, *Nature* 188, 441 (1960).
- [23] W.T. Astbury, *Trans. Far. Soc.* 34, 378 (1938).
- [24] W.T. Astbury, *Proc. Roy. Soc. B* 141, 1 (1953).
- [25] M.M. Blum, G. Bodo, H.M. Dintzis, J.C. Kendrew, *Proc. Roy. Soc. A* 246, 369 (1958).
- [26] G. Bodo, H.M. Dintzis, J.C. Kendrew, H.W. Wyckoff, *Proc. Roy. Soc. A* 253, 70 (1959).
- [27] J.C. Kendrew et. al., *Nature* 185, No. 4711, 422 (1960).
- [28] J.C. Kendrew et. al., *Nature* 190, No. 4777, 669 (1961).
- [29] Дж. Кендрию, *Биофизика* 8, 273 (1963).
- [30] W.L. Bragg, M.F. Perutz, *Acta Cryst.* 5, 277, 323 (1952).
- [31] M.F. Perutz et. al., *Nature* 185, 416 (1960).
- [32] A.F. Gullis, H. Muirhead, A.F. Perutz, M.G. Rossmann, *Proc. Roy. Soc. A* 265, 15, 161 (1962).
- [33] M.F. Perutz, *Sci. Amer.* 211, 64 (1964).
- [34] M.F. Perutz, *Proteins and Nucleic Acids*. Elsevier, 1962.
- [35] Л.И. Татарина, Б.К. Вайнштейн, *Высокомолекулярные соединения* 4, 270 (1962).
- [36] Б.К. Вайнштейн, *Дифракция рентгеновых лучей на цепных молекулах* М., Изд-во АН СССР, 1963.
- [37] Б.К. Вайнштейн, И.М. Гельфанд, Р.Л. Каюшина, Ю.Г. Федоров, *ДАН СССР*, 153, II (1963).

-
- [38] Б.К. Вайнштейн, ДАН СССР 78, 1137 (1951).
- [39] Б.К. Вайнштейн, ЖЭТФ 27, 44 (1954).
- [40] Б.К. Вайнштейн, Н.А. Киселев, В.Л. Шпицберг, ДАН СССР, 197, № 1 (1966).
- [41] Б.К. Вайнштейн, УФН, Т. 88, Вып. 3, С. 527-565 (1966).
- [42] Б.К. Вайнштейн, И.П. Куранова // Кристаллография (1980). Т. 25: № 1. С. 80.
- [43] G.N. Murshudov, W.R. Melik-Adamyan, A.I. Grebenko, V.V. Barynin, A.A. Vagin, B.K. Vainshtein, Z. Dauter, K.S. Wilson «three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution» // FEBS Letters (1992) Vol. 312, Issue 2-3, PP. 127-131. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80919-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80919-8).
- [44] Свергун Д.И., Фейгин Л.А. Рентгеновское и нейтронное малоугловое рассеяние. М.: Наука. Гл. ред. физ. -мат. лит., 1986. – 280 с.
- [45] Членов М. Современные методы определения пространственной структуры белков // Мастер-класс для Пантоподы. Изд. КМК, Москва, 2006 г., ISBN 5-87 317-340-0, 2007. С. 202-207.
- [46] Владимиров Ю.А., Зачем нужна белковая кристаллография // Природа. 2003. №11. С.26-34.
- [47] Ковальчук М.В., Попов В.О. // Наука в России. 2013. № 3. С. 4.
- [48] <http://rc.nrcki.ru/pages/main/molbiotech/facilities/index.shtml>
- [49] <http://www.rc.nrcki.ru/pages/main/nanozond/facilities/12604/index.shtml>
- [50] <http://computing.nrcki.ru/pages/main/index.shtml>
- [51] Parker M.W. Protein Structure from X-Ray Diffraction // J. Biol. Phys. 2003. Vol. 29, № 4. P. 341–362.

-
- [52] Schlichting I. Serial femtosecond crystallography: The first five years // IUCrJ. International Union of Crystallography, 2015. Vol. 2, № 2013. P. 246–255.
- [53] Kovermann M., Ådén J., Grundström C., Elisabeth Sauer-Eriksson A., Sauer U.H., Wolf-Watz M., Structural basis for catalytically restrictive dynamics of a high-energy enzyme state // Nat Commun. – 2015. - V. 6 – P. 7644.
- [54] Raunser S. Cryo-EM Revolutionizes the Structure Determination of Biomolecules // Angew. Chemie - Int. Ed. 2017. Vol. 56, № 52. P. 16450–16452.
- [55] <https://www.wwpdb.org/>
- [56] Smyth M.S. and Martin J.H.J., x Ray crystallography // Mol Pathol (2000) 53(1), p 8–14. PMCID: PMC1186895.
- [57] Powell H.R., Molecular structure by X-ray diffraction. // Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C: Phys. Chem., (2013) 109, 240-265. DOI:10.1039/C3PC90004E.
- [58] Matthew P Blakeley, Paul Langan, Nobuo Niimura, and Alberto Podjarny. Neutron crystallography: opportunities, challenges, and limitations. // Curr Opin Struct Biol. 2008 Oct; 18(5): 593–600. DOI: 10.1016/j.sbi.2008.06.009.
- [59] Helliwell J.R. New developments in crystallography: exploring its technology, methods and scope in the molecular biosciences. // Bioscience Reports (2017) 37 BSR20170204. DOI: 10.1042/BSR20170204.
- [60] M. Budayova-Spano, K. Koruza, Z. Fisher, Chapter Two - Large crystal growth for neutron protein crystallography // Methods in Enzymology (Book series), Editor(s): Peter C.E. Moody, Academic Press, Volume 634, 2020, Pages 21-46, ISSN 0076-6879, ISBN 9780128192146. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.11.015>
- [61] Goodsell, D.S., Grzeskowiak, K., Dickerson, R.E.// Biochemistry (1995) 34: 1022-1029. PubMed: 7827018.

-
- [62] Pellegrini C. The history of X-ray free-electron lasers The European Physical Journal H, 2016, V 37, Issue 5, pp 659–708.
- [63] Pellegrini C. X-ray free-electron lasers: from dreams to reality 2016 Phys. Scr. 2016 014004.
- [64] Patterson B D, Abela R, Braun H H, Flechsig U G, Kim Y, Kirk E, Oppelt A, Pedrozzi M and Reiche S 2010 Coherent science at the SwissFEL x-ray laser New J. Physics 12 035012.
- [65] Jose M. Martin-Garcia, Chelsie E. Conrad, Jesse Coe et al, Serial femtosecond crystallography: A revolution in structural biology. // Archives of Biochemistry and Biophysics, (2016) Volume 602, Pages 32-47
- [66] Gaffney K.J., Chapman H.N. et al Imaging Atomic Structure and Dynamics with Ultrafast X-ray Scattering Science (2007) Vol. 316, Issue 5830, pp. 1444-1448.
- [67] Kurta R.P. et al Correlations in Scattered X-Ray Laser Pulses Reveal Nanoscale Structural Features of Viruses Phys. Rev. Lett. 119, 158102 – Published 12 October 2017.
- [68] Stohrer, C., Horrell, S., Meier, S., Sans, M., von Stetten, D., Hough, M., Goldman, A., Monteiro, D. C. F. & Pearson, A. R., Homogeneous batch micro-crystallization of proteins from ammonium sulfate // Acta Cryst. (2021). D77, 194-204. <https://doi.org/10.1107/S2059798320015454>
- [69] Schwalbe, H., Grimshaw, S.B., Spencer, A. et al, A refined solution structure of hen lysozyme determined using residual dipolar coupling data. // Protein Sci. (2001) 10: 677-688. DOI: 10.1110/ps.43301.
- [70] Refaee, M., Tezuka, T., Akasaka, K., Williamson, M., Pressure-Dependent Changes in the Solution Structure of Hen Egg-White Lysozyme. // J.Mol.Biol. (2003) 327: 857. PubMed: 12654268.

-
- [71] Ad Bax, G. Marius Clore, Protein NMR: Boundless opportunities // Journal of Magnetic Resonance, Volume 306, 2019, Pages 187-191. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.037>
- [72] Pande K., Hutchison C.D., Groenhof G. et al, Femtosecond structural dynamics drives the trans/cis isomerization in photoactive yellow protein. // Science (2016) Vol. 352, Issue 6286, pp. 725-729. DOI: 10.1126/science.aad5081.
- [73] Volkman, B.F., Alam, S.L., Satterlee, J.D., Markley, J.L., Solution structure and backbone dynamics of component IV Glycera dibranchiata monomeric hemoglobin-CO. // Biochemistry, 1998, 37 (31), pp 10906–10919 DOI: 10.1021/bi980810b.
- [74] Orlova E.V. and Saibil H.R. Structural Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy. // Chem. Rev. (2011) 111, 7710–7748.
- [75] Rebecca F. Thompson, Matt Walker, C. Alistair Siebert, Stephen P. Muench, Neil A. Ranson, An introduction to sample preparation and imaging by cryo-electron microscopy for structural biology. // Methods 100 (2016) 3–15.
- [76] Rasmus R. Schröder. Advances in electron microscopy: A qualitative view of instrumentation development for macromolecular imaging and tomography. // Archives of Biochemistry and Biophysics 581 (2015) 25–38.
- [77] Hans Hebert, CryoEM: a crystals to single particles round-trip // Current Opinion in Structural Biology, Volume 58, 2019, Pages 59-67, ISSN 0959-440X. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.05.008>
- [78] Boyko K.M., Baymukhametov T.N., Chesnokov Yu.M., Hons M., Lushchekina S.V., Konarev P.V., Lipkin A.V., Vasiliev A.L., Masson P., Popov V.O., Kovalchuk M.V., 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. // Biochimie 156 (2019) 196–205.

-
- [79] Bartesaghi, A., Merk, A., Banerjee, S. et al, 2.2 A Resolution Cryo-Em Structure of Beta-Galactosidase in Complex with a Cell-Permeant Inhibitor. // Science (2015) 348: 1147. DOI: 10.1126/science.aab1576.
- [80] Fischer N., Konevega A.L., Winterneyer W., Rodnina M.V., Stark H. // Nature 466 (2010) 329–333.
- [81] Яковлев А.А., Кросс-линкеры и их использование для исследования межмолекулярных взаимодействий. // Нейрохимия. (2009) Т. 26, № 2 С. 149-155.
- [82] <https://pdb-dev.wwpdb.org/>
- [83] Samygina V.R., Popov A.N., Cabo-Bilbao A., Ochoa-Lizarralde B., Goni-de-Cerio F., Zhai X., Molotkovsky J.G., Patel D.J., Brown R.E., Malinina L. Enhanced selectivity for sulfatide by engineered human glycolipid transfer protein // Structure. (2011) V.19, pp 1644-54.
- [84] Патент РФ №2096457, Гист-Брокейдс Н.В. (NL); Плант Дженетик системз Н.В. (BE).
- [85] Патент РФ №2362806, Общество с ограниченной ответственностью «Инновации и высокие технологии МГУ» (RU)
- [86] Pardo I., Camarero S., Laccase engineering by rational and evolutionary design // Cell Mol Life Sci. – 2015. – V. 72(5). - P. 897-910.
- [87] Kong X.D., Yuan S., Li L., Chen S., Xu J.H., Zhou J., Engineering of an epoxide hydrolase for efficient bioresolution of bulky pharmaco substrates // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 2014. - V. 111(44). - P. 15717-22.
- [88] Fang L., Chow K.M., Hou S., Xue L., Chen X., Rodgers D.W., Zheng F., Zhan C.G., Rational design, preparation, and characterization of a therapeutic enzyme mutant with improved stability and function for cocaine detoxification // ACS Chem Biol. -2014. - V. 9(8). - P. 1764-72.

-
- [89] Cherian M., Toone E.J., Fierke C.A. Improving upon nature: active site remodeling produces highly efficient aldolase activity toward hydrophobic electrophilic substrates // *Biochemistry*. – 2012 – V. 51(8). - P. 1658-68.
- [90] Windle C.L., Müller M., Nelson A., Berry A., Engineering aldolases as biocatalysts // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2014. - V. 19. P. 25-33.
- [91] Pierdominici-Sottile G., Palma J., Roitberg A.E., Free-energy computations identify the mutations required to confer trans-sialidase activity into *Trypanosoma rangeli* sialidase // *Proteins*. – 2014. – V. 82(3). - P. 424-35.
- [92] Buettner K., Kreisig T., Sträter N., Zuchner T., Protein surface charge of trypsinogen changes its activation pattern // *BMC Biotechnol.* – 2014. – V. 14. - P. 109.
- [93] Jiang W., Chen L., Hu N., Yuan S., Li B., Liu Z., A novel serine hydroxymethyltransferase from *Arthrobacter nicotianae*: characterization and improving catalytic efficiency by rational design // *BMC Biotechnol.* – 2014. - V. 14. - P. 93.
- [94] Jemli S., Ayadi-Zouari D., Hlima H.B., Bejar S., Biocatalysts: Application and engineering for industrial purposes // *Crit. Rev. Biotechnol.* – 2014. -V. 6. - P. 1–13.
- [95] Jager S. et al., Saturation mutagenesis reveals the importance of residues alphaR145 and alphaF146 of penicillin acylase in the synthesis of beta-lactam antibiotics // *J. Biotechnol.* – 2008. – V. 133. - P. 18–26.
- [96] Mate D.M., Alcalde M., Laccase engineering: from rational design to directed evolution // *Biotechnol. Adv.* – 2015. – V. 33. - P. 25–40.
- [97] Hedstrom L., Szilagyi L., Rutter W.J. // *Science*. – 1992. - V. 255. P. 1249-1253.
- [98] Kubinyi H. // *J Recept Signal Transduct Res.* –1999. – V. 19. – P. 15-39.
- [99] Reeves JD et al. // *Drugs*. – 2005. – V. 65. – P. 1747-66.

-
- [100] Druker BJ et al. // N Engl J Med. – 2001. – V. 344. – P. 1031.
- [101] Shen H et al. // FEBS J. – 2009. – V. 276. – P. 144-54.
- [102] Editorial. Costing drug development. // Nat Rev Drug Discov. – 2003. – V. 2 – P. 247.
- [103] Kalia S., Haldorai Y. Organic- Inorganic Hybrid Nanomaterials. 2015.
- [104] Sanchez C. et al. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: from laboratory to market // Chem. Soc. Rev. 2011. Vol. 40, № 2. P. 696.
- [105] Fraden J. Handbook of Modern Sensors. 2004.
- [106] Zhang X., Ju H., Wang J. Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications // Journal of Chemical Information and Modeling. 2008. Vol. 53, № 9. 1689-1699 p.
- [107] Hoppe H., Sariciftci N.S. Organic solar cells: An overview // J. Mater. Res. 2004. Vol. 19, № 07. P. 1924–1945.
- [108] Lambrianou A., Demin S., Hall E.A.H. Protein Engineering and Electrochemical Biosensors // Biosensing for the 21st Century. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. Vol. 109, № October 2007. P. 65–96.
- [109] Liu R. Hybrid Organic/Inorganic Nanocomposites for Photovoltaic Cells // Materials (Basel). 2014. Vol. 7, № 4. P. 2747–2771.
- [110] Oosterhout, S.D., Wienk, M.M., van Bavel, S.S., Thiedmann, R., Koster, L.J., Gilot, J., Loos, J., Schmidt, V., Janssen, R.A. The effect of three-dimensional morphology on the efficiency of hybrid polymer solar cells//Nat. Mater. 2009, 8, p. 818–824.
- [111] Tang C.W., VanSlyke S.A. Organic electroluminescent diodes // Appl. Phys. Lett. 1987. Vol. 51, № 12. P. 913.

-
- [112] Li F. et al. Blue polymer light-emitting diodes with organic/inorganic hybrid composite as hole transporting layer // *Org. Electron.* 2005. Vol. 6, № 5-6. P. 237–241.
- [113] Rieß W. et al. Organic–inorganic multilayer structures: a novel route to highly efficient organic light-emitting diodes // *Synth. Met.* 1999. Vol. 99, № 3. P. 213–218.
- [114] Xiao-hui Y. et al. Organic Light Emitting Diode Using Inorganic Material as Electron Transport Layer // *Chinese Phys. Lett.* 1997. Vol. 14, № 12. P. 946–948.
- [115] Mohana Reddy A.L. et al. Hybrid nanostructures for energy storage applications. // *Adv. Mater.* 2012. Vol. 24, № 37. P. 5045–5064.
- [116] Budyka M.F. et al. Hybrid system based on styrylquinoline ligand and CdS quantum dots // *Nanotechnologies Russ.* 2014. Vol. 9, № 3-4. P. 116–125.
- [117] Budyka M.F., Chaschikhin O. V., Nikulin P.A. Effect of coordinating ligand on spectral-luminescent properties of CdS quantum dots in microwave synthesis // *Nanotechnologies Russ.* 2015. Vol. 10, № 1-2. P. 13–17.
- [118] Ivanovskii A.L. Hybrid nanomaterials: structure and properties of carbon peapods and related nanosystems // *ISJAEE.* 2004. Vol. 7, № 15. P. 28–40.
- [119] Maniruzzaman M., Jang S.-D., Kim J. Titanium dioxide–cellulose hybrid nanocomposite and its glucose biosensor application // *Mater. Sci. Eng. B.* 2012. Vol. 177, № 11. P. 844–848.
- [120] Giess F., Friedrich M.G., Heberle J., Naumann R., Knoll W., The ProteinTethered Lipid Bilayer: A Novel Mimic of the Biological Membrane // *Biophys. J.* - 2004. - 87. - P.3213-3220.
- [121] Dultsev F.N., Fioroni M.T., Blackburn J.M., Abell C., Ostanin V.P., Klenerman D., Direct and quantitative detection of bacteriophage by "hearing" surface detachment using a quartz crystal microbalance. // *Anal.Chem.* – 2001 – V.73 – P. 3935-3939.

-
- [122] Kumar S.A. Eco-Friendly Nano-Hybrid Materials for Advanced Engineering Applications. 1st Edition. Apple Academic Press (2016) 436 Pages. ISBN 9781771882941.
- [123] Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. // Science (2000) 289: 739-745.
- [124] Wasilewski T. et al. Bioelectronic nose: Current status and perspectives // Biosens. Bioelectron. 2017. Vol. 87. P. 480–494.
- [125] Park S.J. et al. Ultrasensitive Flexible Graphene Based Field-Effect Transistor (FET)-Type Bioelectronic Nose // Nano Lett. 2012. Vol. 12, № 10. P. 5082–5090.
- [126] Habibi M., Fanaei M., Emtiazi G. Light-sensitive biosensors based on photoactive marine cultivated strains // Sens. Rev. 2014. Vol. 34, № 3. P. 297–303.
- [127] Nelson J. Organic photovoltaic films // Curr. Opin. Solid State Mater. Sci. 2002. Vol. 6, № 1. P. 87–95.
- [128] McCorvy J.D., Roth B.L. // Pharmacology & therapeutics (2015).
- [129] Defant A., Mancini I., Tomazzolli R., Balzarini J. // Archiv der Pharmazie. 348, 23 (2015).
- [130] Lilie H. Designer proteins in biotechnology // EMBO Reports (2003) V4. 346–351.
- [131] Бойко К.М., Попов В.О., Ковальчук М В. // Успехи хим. 2015. Т. 84 № 8. С. 853.
- [132] McPherson A., Cudney B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun. 2014. Vol. 70, № 11. P. 1445–1467.

-
- [133] Castagnolo D. et al. Analysis of the influence of coupled diffusion on transport in protein crystal growth for different gravity levels // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2002. Vol. 58, № 10. P. 1633–1637.
- [134] Day J., McPherson A. Macromolecular crystal growth experiments on international microgravity laboratory - 1 // *Protein Sci.* 1992. Vol. 1, № 10. P. 1254–1268.
- [135] Poodt P.W.G. et al. Simple Geometry for Diffusion Limited Protein Crystal Growth: Harnessing Gravity to Suppress Convection // *Cryst. Growth Des.* 2009. Vol. 9, № 2. P. 885–888.
- [136] Littke W., John C. Materials: Protein Single Crystal Growth Under Microgravity // *Science* (80). 1984. Vol. 225, № 4658. P. 203–204.
- [137] Fazio V.J., Peat T.S., Newman J. A drunken search in crystallization space // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 2014. Vol. 70, № 10. P. 1303–1311.
- [138] Qin, W., Xie, S., Zhang, J., Zhao, D., He, C., Li, H., Xing, L., Li, P., Jin, X., Yin, D., Cao, H., An Analysis on Commercial Screening Kits and Chemical Components in Biomacromolecular Crystallization Screening. *Crystal Research and Technology* 2019, 54, 1900076. <https://doi.org/10.1002/crat.201900076>
- [139] Luft J.R., Arakali S.V., Kirisits J., et al. A macromolecular crystallization procedure employing diffusion cells of varying depths as reservoirs to tailor the time course of equilibration in hanging drop and sitting drop vapour diffusion and microdialysis experiments. // *Journal of Applied Crystallography* 1994; 27:443–53.
- [140] Wilson L.J., Bray T.L., Suddath F.L. Crystallization of proteins by dynamic control of evaporation. // *Journal of Crystal Growth* 1991; 110:142–7.

-
- [141] Gernert K.N., Smith R., Carter D. A simple apparatus for controlling nucleation and size in protein crystal growth. // *Anal Biochem* 1988; 168:141–7.
- [142] Carter CW, Carter CW. Protein crystallization using incomplete factorial experiments. // *J Biol Chem* 1979; 254:12219–23.
- [143] Carter CW, Baldwin ET, Frick L. Statistical design of experiments for protein crystal growth and the use of a precrystallisation assay. // *Journal of Crystal Growth* 1988; 90:60–73.
- [144] Jancarik J, Kim S-H. Sparse-matrix sampling—a screening method for crystallisation of proteins. // *Journal of Applied Crystallography* 1991; 24:409–11.
- [145] Куранова И.П. Кристаллизация белков на Земле и в невесомости // *Поверхность*. 2004. №6. С.4—12.
- [146] Смирнова Е. А., Кислицын Ю. А., Сосфенов Н.И. и др. Выращивание кристаллов белков на российском сегменте Международной космической станции // *Кристаллография*. 2009. Т.54. №5. С.948—958.
- [147] Timofeev V.I., Chuprov-Netochin R.N., Samygina V.R. et al. X-ray investigation of gene-engineered human insulin crystallized from a solution containing polysialic acid // *Acta Cryst*. 2010. V.F66. P.259—263.
- [148] Mcpherson A., Delucas L.J. Microgravity protein crystallization. 2015. № July. P. 1–20.
- [149] Шабалин И.Г., Серов А.Е., Скиргелло О.Е. и др. Рекомбинантная формиатдегидрогеназа *Arabidopsis thaliana*. Получение, кристаллизация в условиях невесомости и предварительное рентгеновское исследование кристаллов // *Кристаллография*. 2010. Т.55. №5. С.855—859.
- [150] <http://www.rc.nrcki.ru/pages/main/molbiotech/facilities/index.shtml>

-
- [151] Tanaka H., Inaka K., Sugiyama Sh. et al. A simplified counter diffusion method combined with a 1D simulation program for optimizing crystallization conditions // J. Synchrotron Rad. 2004. V.11. P.45—48.
- [152] Hashizume, Y.; Inaka, K.; Furubayashi, N.; Kamo, M.; Takahashi, S.; Tanaka, H. Methods for Obtaining Better Diffractive Protein Crystals: From Sample Evaluation to Space Crystallization. Crystals 2020, 10, 78. <https://doi.org/10.3390/cryst10020078>
- [153] Hampel A, Labanauskas M, Connors PG, et al. Single crystals of transfer RNA from formylmethionine and phenylalanine transfer RNAs. // Science 1968; 162:1384–7.
- [154] Thomas DH, Rob A, Rice DW. A novel dialysis procedure for the crystallisation of proteins. // Protein Eng 1989; 2:489– 91.
- [155] Fitzgerald PMD, Madsen NB. Improvement of limit of diffraction and useful X-ray lifetime of crystals of glycogen debranching enzyme. // Journal of Crystal Growth 1986; 76:600–6.
- [156] Lee Fiona Alexander and Norbert Radacsi, Application of electric fields for controlling crystallization // CrystEngComm, 2019,21, 5014-5031. <https://doi.org/10.1039/c9ce00755e>
- [157] Kato, R., Hiraki, M., Yamada, Y., Tanabe, M. & Senda, T. A fully automated crystallization apparatus for small protein quantities. // Acta Cryst. F77, 29-36 (2021). <https://doi.org/10.1107/S2053230X20015514>
- [158] Song L, Gouaux JE. Membrane protein crystallisation: application of sparse matrices to the á-hemolysin heptamer. // Methods Enzymol 1997; 276:60–74.
- [159] Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, et al. Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. // Nature 1985; 317:145–53.
- [160] Smyth M, Tate J, Hoey E, et al. Implications for viral uncoating from the structure of bovine enterovirus. // Nat Struct Biol 1995; 2:224–31.

-
- [161] Ali A. Kermani, A guide to membrane protein X-ray crystallography // The FEBS Journal, 1742-464X. <https://doi.org/10.1111/febs.15676>
- [162] Alexandrov Dmitri V. and Nizovtseva Irina G., On the theory of crystal growth in metastable systems with biomedical applications: protein and insulin crystallization // Phil. Trans. R. Soc. A. (2019) 377:20180214. <https://doi.org/10.1098/rsta.2018.0214>
- [163] Chayen N.E., Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal // Nat. Methods. 2008. Vol. 5, № 2. P. 147–153.
- [164] Куранова И.П., Ковальчук М.В., Кристаллы для изучения белковых структур. // Природа. 2014. № 3. С. 12.
- [165] Cheraghian Radi, H., Hajipour-Verdom, B. & Molaabasi, F. Macromolecular crystallization: basics and advanced methodologies. // J IRAN CHEM SOC 18, 543–565 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13738-020-02058-y>
- [166] Matsumura H., Sugiyama S., Hirose M. Approach for growth of high-quality and large protein crystals. International Union of Crystallography, 2011. P. 16–19.
- [167] Givargizov E.I., Kliya M.O., Melik-Adamyan V.R., Grebenko A.I., DeMattei R.C., Feigelson R.S., Artificial epitaxy (graphoepitaxy) of proteins. // Journal of Crystal Growth. (1991) V. 112(4) P. 758.
- [168] Pechkova E., Nicolini C. Accelerated protein crystal growth by protein thin film template // J. Cryst. Growth. 2001. Vol. 231. P. 599–602.
- [169] Pechkova E. et al. In Situ μ GISAXS: I. Experimental Setup for Submicron Study of Protein Nucleation and Growth // Biophys. J. Biophysical Society, 2010. Vol. 99, № 4. P. 1256–1261.
- [170] Baskakova S.S. et al. New scientific equipment for protein crystallization in microgravity, BELKA, and its approbation on the Bion-M No. 1 spacecraft // Crystallogr. Reports. 2015. Vol. 60, № 1. P. 148–154.

-
- [171] Куранова И.П., Смирнова Е. А., Абрамчик Ю. А. и др. Выращивание кристаллов фосфопантетеин-аденилилтрансферазы, карбоксипептидазы Т и тимидинфосфорилазы на Международной космической станции методом встречной диффузии в капилляре // Кристаллография. 2011. Т.56. №5. С.941—948.
- [172] Erdemir D., Lee A.Y., Myerson A.S. Nucleation of crystals from solution: {Classical} and two-step models // Acc. Chem. Res. 2009. Vol. 42, № 5. P. 621– 629.
- [173] Vekilov P.G. The two-step mechanism of nucleation of crystals in solution // Nanoscale. 2010. Vol. 2, № 11. P. 2346–2357.
- [174] Chattopadhyay S. et al. SAXS Study of the Nucleation of Glycine Crystals from a Supersaturated Solution // Cryst. Growth Des. 2005. Vol. 5, № 2. P. 523–527.
- [175] Vorontsova M.A., Maes D., Vekilov P.G. Recent advances in the understanding of two-step nucleation of protein crystals // Faraday Discuss. 2015. Vol. 179, № 8. P. 27–40.
- [176] Cui Hai Liang, Yu Yong, Chen Wan-Chun et al. Study of Growth Mechanism of Lysozyme Crystal by Batch Crystallization Method // Chinese Chem. Lett. 2006. Vol. 17, № 1. P. 101–104.
- [177] Bonneté F. et al. Protein crystallization: Contribution of small angle X-ray scattering (SAXS) // J. Phys. IV. 2004. Vol. 118. P. 3–13.
- [178] Vivarès D., Bonneté F. X-ray scattering studies of *Aspergillus flavus* urate oxidase: towards a better understanding of PEG effects on the crystallization of large proteins // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2002. Vol. 58, № 3. P. 472–479.
- [179] Zhang F. et al. Protein interactions studied by SAXS: effect of ionic strength and protein concentration for BSA in aqueous solutions // J. Phys. Chem. B. 2007. Vol. 111, № 1. P. 251–259.

-
- [180] Jollès, P., & Jollès, J. (1984). What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63(2), 165–189. DOI:10.1007/bf00285225
- [181] Blake, C. C., Johnson, L. N., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., & Sarma, V. R. (1967). Crystallographic studies of the activity of hen egg-white lysozyme. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 167(1009), 378–388. DOI:10.1098/rspb.1967.0035
- [182] Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., & Sarma, V. R. (1965). Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature*, 206(4986), 757–761. DOI:10.1038/206757a0
- [183] Phillips, D. C. (1966). The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, 215(5), 78–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5978599>. DOI:10.1038/scientificamerican1166-78
- [184] Dobson, C. M., Evans, P. A., & Radford, S. E. (1994). Understanding how proteins fold: The lysozyme story so far. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(1), 31–37. DOI:10.1016/0968-0004(94)90171-6
- [185] Kirby, A. J. (2001). The lysozyme mechanism sorted – after 50 years. *Nature Structural Biology*, 8(9), 737–739. DOI:10.1038/nsb0901-737
- [186] Kuroki, R., Weaver, L. H., & Matthews, B. W. (1995). Structure-based design of a lysozyme with altered catalytic activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2(11), 1007–1011. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7583653> DOI:10.1038/nsb1195-1007
- [187] Matagne, A., & Dobson, C. M. (1998). The folding process of hen lysozyme: A perspective from the “new view. *Cellular and Molecular Life Sciences Cmls*, 54(4), 363–371. DOI:10.1007/s000180050165

-
- [188] Vocadlo, D. J., Davies, G. J., Laine, R., & Withers, S. G. (2001). Catalysis by hen egg-white lysozyme proceeds via a covalent intermediate. *Nature*, 412(6849), 835–838. DOI:10.1038/35090602
- [189] Mikol V., Hirsch E., Giegc R. Monitoring protein crystallization by dynamic light scattering // *Physics* (College. Park. Md). 1989. Vol. 258, № 1. P. 63–66.
- [190] Ataka M., Asai M. Systematic studies on the crystallization of lysozyme. Determination and use of phase diagrams // *J. Cryst. Growth*. 1988. Vol. 90, № 1–3. P. 86–93.
- [191] Mikol V., Hirsch E., Giegé R. Diagnostic of precipitant for biomacromolecule crystallization by quasi-elastic light-scattering // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 213, № 1. P. 187–195.
- [192] Tanaka S. et al. Size and number density of precrystalline aggregates in lysozyme crystallization process // *J. Chem. Phys.* 1999. Vol. 111, № 22. P. 10330–10337.
- [193] Skouri M. et al. Dynamic light scattering studies of the aggregation of lysozyme under crystallization conditions. // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 295, № 1–3. P. 84–88.
- [194] Georgalis Y. et al. Lysozyme aggregation studied by light scattering. I. Influence of concentration and nature of electrolytes // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 1997. Vol. 53, № 6. P. 691–702.
- [195] Price W.S., Tsuchiya F., Arata Y. Lysozyme aggregation and solution properties studied using PGSE NMR diffusion measurements // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. Vol. 121, № 49. P. 11503–11512.
- [196] Georgalis Y. et al. Formation dynamics of protein precrystallization fractal clusters // *J. Cryst. Growth*. 1993. Vol. 126, № 2–3. P. 245–260.

-
- [197] Georgalis Y. et al. Ordering of fractal clusters in crystallizing lysozyme solutions // J. Am. Chem. Soc. 1999. Vol. 121, № 8. P. 1627–1635.
- [198] Tanaka S. et al. Kinetic study on the early stage of the crystallization process of two forms of lysozyme crystals by photon correlation spectroscopy // J. Cryst. Growth. 1996. Vol. 168, № 1–4. P. 44–49.
- [199] Wakamatsu T. Forward-Light-Scattering Characterization of Pre-Crystalline Aggregates in Crystallizing Lysozyme Solutions // Am. J. Anal. Chem. 2014. Vol. 05, № 09. P. 581–588.
- [200] Yoshizaki I. et al. Investigation of the protein pre-crystallization solution using analytical ultracentrifugation // Acta Crystallogr. Sect. D. 2005. Vol. 61. P. 755–758.
- [201] Niimura N. et al. Small angle neutron scattering from lysozyme in unsaturated solutions, to characterize the pre-crystallization process // J. Cryst. Growth. 1994. Vol. 137, № 3–4. P. 671–675.
- [202] Niimura N. et al. Aggregation in supersaturated lysozyme solution studied by 82 time- resolved small angle neutron scattering // J. Cryst. Growth. 1995. Vol. 154, № 1/2. P. 136–144.
- [203] Ries-Kautt M.M., Ducruix A.F. Relative effectiveness of various ions on the solubility and crystal growth of lysozyme. // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264, № 2. P. 745–748.
- [204] Bonneté F., Finet S., Tardieu A. Second virial coefficient: variations with lysozyme crystallization conditions // J. Cryst. Growth. 1999. Vol. 196, № 2–4. P. 403–414.
- [205] Qi Han, Kate M. Smith, Connie Darmanin, Timothy M. Ryan, Calum J. Drummond, Tamar L. Greaves, Lysozyme conformational changes with ionic liquids: Spectroscopic, small angle x-ray scattering and crystallographic study // Journal of Colloid and Interface Science, Volume 585, 2021, Pages 433-443. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.10.024>

-
- [206] Pusey M.L., Naumann R. Growth kinetics of tetragonal lysozyme crystals // J. Cryst. Growth. 1986. Vol. 76, № 3. P. 593–599.
- [207] Pusey M.L., Snyder R.S., Naumann R. Protein crystal growth. Growth kinetics for tetragonal lysozyme crystals. // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261, № 14. P. 6524–6529.
- [208] Nadarajah A., Forsythe E.L., Pusey M.L. The averaged face growth rates of lysozyme crystals: the effect of temperature // J. Cryst. Growth. 1995. Vol. 151, № 1–2. P. 163–172.
- [209] Nadarajah A., Li M., Pusey M.L. Growth mechanism of the (110) face of tetragonal lysozyme crystals // Acta Cryst. D. 1997. V. 53. P. 524
- [210] Li M., Nadarajah A., Pusey M.L. Modeling the growth rates of tetragonal lysozyme crystals // J. Cryst. Growth. 1995. Vol. 156, № 1–2. P. 121–132.
- [211] Li H., Nadarajah A., Pusey M.L. Determining the molecular-growth mechanisms of protein crystal faces by atomic force microscopy // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 1999. Vol. 55(5). P. 1036–1045.
- [212] Nadarajah A., Pusey M.L. Growth Mechanism and Morphology of Tetragonal Lysozyme Crystals // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 1996. Vol. 52, № 5. P. 983–996.
- [213] Strom C.S., Bennema P. Combinatorial compatibility as habit-controlling factor in lysozyme crystallization I. Monomeric and tetrameric F faces derived graph-theoretically // J. Cryst. Growth. 1997. Vol. 173, № 1–2. P. 150–158.
- [214] Strom C.S., Bennema P. Combinatorial compatibility as habit-controlling factor in lysozyme crystallization II. Morphological evidence for tetrameric growth units // J. Cryst. Growth. 1997. Vol. 173, № 1–2. P. 159–166.
- [215] Durbin S.D., Feher G. Studies of crystal growth mechanisms of proteins by electron microscopy // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 212, № 4. P. 763–774.

-
- [216] Durbin S.D., Carison W.E., Carlson W.E. Lysozyme crystal growth studied by atomic force microscopy // *J. Cryst. Growth*. 1992. Vol. 122, № 1–4. P. 71–79.
- [217] Konnert J.H., D’Antonio P., Ward K.B. Observation of growth steps, spiral dislocations and molecular packing on the surface of lysozyme crystals with the atomic force microscope. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 1994. Vol. 50, № Pt 4. P. 603–613.
- [218] Li H. et al. Determining the molecular-packing arrangements on protein crystal faces by atomic force microscopy // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1999. Vol. 55, № 5. P. 1023–1035.
- [219] Forsythe E.L., Nadarajah A., Pusey M.L. Growth of (101) faces of tetragonal lysozyme crystals: measured growth-rate trends // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 1999. Vol. 55, № 5. P. 1005–1011.
- [220] Wiechmann M. et al. Analysis of protein crystal growth at molecular resolution by atomic force microscopy // *Ultramicroscopy*. 2001. Vol. 86, № 1–2. P. 159–166.
- [221] Dimitrov I.L., Koleva D.P., Hodzhaoglu F. V. A view on the aggregation issue in lysozyme crystallization // *CrystEngComm*. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 18, № 37. P. 7095–7103.
- [222] Ke S.C., DeLucas L.J., Harrison J.G. Computer simulation of protein crystal growth using aggregates as the growth unit // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 1998. Vol. 31, № 9. P. 1064–1070.
- [223] Vekilov P.G., Vorontsova M.A. Nucleation precursors in protein crystallization // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 2014. Vol. 70, № 3. P. 271–282.
- [224] Vekilov P.G. Dense Liquid Precursor for the Nucleation of Ordered Solid Phases from Solution // *Cryst. Growth Des.* 2004. Vol. 4, № 4. P. 671–685.

-
- [225] Pan W. et al. Nucleation of ordered solid phases of proteins via a disordered high-density state: Phenomenological approach Nucleation of ordered solid phases of proteins via a disordered high-density state: Phenomenological approach. 2005. Vol. 174905.
- [226] Filobelo L.F. et al. Spinodal for the solution-to-crystal phase transformation Spinodal for the solution-to-crystal phase transformation. 2005. Vol. 014904, № 2005.
- [227] Galkin O., Vekilov P.G. Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid – liquid phase boundary. 2000. Vol. 97, № 12. P. 6277–6281.
- [228] Garetz B.A., Matic J., Myerson A.S. Polarization Switching of Crystal Structure in the Nonphotochemical Light-Induced Nucleation of Supersaturated Aqueous Glycine Solutions. 2002. P. 1–4.
- [229] Vekilov P.G. Nucleation // Cryst. Growth Des. 2010. Vol. 10, № 12. P. 5007–5019.
- [230] Pan W., Vekilov P.G., Lubchenko V. Origin of anomalous mesoscopic phases in protein solutions // J. Phys. Chem. B. 2010. Vol. 114, № 22. P. 7620–7630.
- [231] Yaminsky I. V. et al. Atomic force microscopy study of lysozyme crystallization // Crystallogr. Reports. 2002. Vol. 47, № S1. P. S149–S158.
- [232] Givargizov E.I. Oriented Crystallization on Amorphous Substrates // Boston, MA: Springer US, 1991.
- [233] Givargizov E.I. et al. Growth of biocrystalline films of PVC catalase in space using artificial epitaxy (graphoepitaxy) // J. Cryst. Growth. 2008. Vol. 310, № 4. P. 847–852.
- [234] Задорожная Л.А. et al. Устройство для кристаллизации: pat. RU 2307204 USA. РФ, 2007.
- [235] Marron-Brignone L., Morélis R.M., Coulet P.R. Immobilization through Adsorption of Luciferase on Langmuir–Blodgett Films. Influence of the

Hydrophilicity or Hydrophobicity of the Surface on the Enzyme Kinetic Behavior // *Langmuir*. 1996. Vol. 12, № 23. P. 5674–5680.

- [236] Su T.J. et al. The Adsorption of Lysozyme at the Silica-Water Interface: A Neutron Reflection Study. // *J. Colloid Interface Sci.* 1998. Vol. 203, № 2. P. 419–429.
- [237] Moreira L.A. et al. Effect of the ion-protein dispersion interactions on the proteinsurface and protein-protein interactions // *J. Braz. Chem. Soc.* 2007. Vol. 18, № 1. P. 223–230.
- [238] Steadman B.L. et al. The effects of surface adsorption on the thermal stability of proteins // *Biotechnol. Bioeng.* 1992. Vol. 40, № 1. P. 8–15.
- [239] Wendorf J.R., Radke C.J., Blanch H.W. Reduced protein adsorption at solid interfaces by sugar excipients // *Biotechnol. Bioeng.* 2004. Vol. 87, № 5. P. 565–573.
- [240] Tie Y., Ngankam A.P., Van Tassel P.R. Probing macromolecular adsorbed layer structure and history dependence via the interfacial cavity function // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 24. P. 10599–10603.
- [241] Hähl H. et al. Subsurface Influence on the Structure of Protein Adsorbates as Revealed by in Situ X-ray Reflectivity // *Langmuir*. 2012. Vol. 28, № 20. P. 7747–7756.
- [242] Kondo A., Mihara J. Comparison of adsorption and conformation of hemoglobin and myoglobin on various inorganic ultrafine particles // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 177, № 1. P. 214–221.
- [243] Lassen B., Malmsten M. Structure of protein layers during competitive adsorption // *J. Colloid Interface Sci.* 1996. Vol. 180, № 2. P. 339–349.
- [244] Richter A.G., Kuzmenko I. Using in situ X-ray reflectivity to study protein adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces: benefits and limitations. // *Langmuir*. 2013. Vol. 29, № 17. P. 5167–5180.

-
- [245] Van De Weert M. et al. The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme // J. Control. Release. 2000. Vol. 68, № 3. P. 351–359.
- [246] Ramsden J.J., Prenosil J.E. Effect of Ionic Strength on Protein Adsorption Kinetics // J. Phys. Chem. 1994. Vol. 98, № 20. P. 5376–5381.
- [247] Lu J.R. et al. Lysozyme Adsorption Studies at the Silica/Water Interface Using Dual Polarization Interferometry // Langmuir. 2004. Vol. 20, № 5. P. 1827–1832.
- [248] Asanov A.N. et al. Interfacial aggregation of bovine serum albumin related to crystallization conditions studied by total internal reflection fluorescence // J. Colloid Interface Sci. 1997. Vol. 196, № 1. P. 62–73.
- [249] Baranov, M., Velichko, E., Greshnevikov, K. (2021). Analysis of Fractal Structures in Dehydrated Films of Protein Solutions. Symmetry, 13(1), 123. <https://doi.org/10.3390/sym13010123>
- [250] Peng J.B., Barnes G.T., Gentle I.R. The structures of Langmuir-Blodgett films of fatty acids and their salts. // Adv. Colloid Interface Sci. 2001. Vol. 91, № 2. P. 163–219.
- [251] Blodgett K.B., Langmuir I. Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties // Phys. Rev. 1937. Vol. 51, № 11. P. 964–982.
- [252] Blodgett K.B. Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface // J. Am. Chem. Soc. 1935. Vol. 57, № 6. P. 1007–1022.
- [253] Blodgett K.B. Monomolecular films of fatty acids on glass // J. Am. Chem. Soc. 1934. Vol. 56, № 2. P. 495.
- [254] Blodgett K.B. Film Structure and Method of Preparation. 1940. P. 5.
- [255] Langmuir I., Schaefer V.J. Composition of Fatty Acid Films on Water Containing Calcium or Barium Salts // J. Am. Chem. Soc. 1936. Vol. 58, № 2. P. 284–287.

-
- [256] Blinov L.M. Physical Properties and Applications of Langmuir Monomolecular and Multimolecular Structures // Russ. Chem. Rev. 1983. Vol. 52, № 8. P. 713–735.
- [257] Langmuir I., Schaefer V.J. Activities of Urease and Pepsin Monolayers // J. Am. Chem. Soc. 1938. Vol. 60, № 6. P. 1351–1360.
- [258] Neurath H. et al. Built-up films of proteins and their properties // Science (80-). 1937. Vol. 85, № 2203. P. 76–80.
- [259] Langmuir I., Schaefer V.J. Salted-Out Protein Films // J. Am. Chem. Soc. 1938. Vol. 60, № 11. P. 2803–2810.
- [260] Hamaguchi K. Studies on protein denaturation by surface chemical method: IV. On the structure of lysozyme monolayer // J. Biochem. 1956. Vol. 43(3). P. 355.
- [261] Ray B.R., Augenstine L.G. Trypsin Monolayers at the Water–Air Interface. I. Film Characteristics and the Recovery of Enzymatic Activity. // J. Phys. Chem. 1956. Vol. 60, № 9. P. 1193–1199.
- [262] Choi J.-W. et al. Fabrication of Cytochrome c Multi-Layers by Schaefer Technique // Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A. Mol. Cryst. Liq. Cryst. 2000. Vol. 349, № 1. P. 187–190.
- [263] Eremenko A. et al. Monomolecular enzyme films stabilized by amphiphilic polyelectrolytes for biosensor devices // Thin Solid Films. 1995. Vol. 260, № 2. P. 212–216.
- [264] Pechkova E. et al. Thermal stability of lysozyme Langmuir-Schaefer films by FTIR spectroscopy. // Langmuir. 2007. Vol. 23, № 3. P. 1147–1151.
- [265] Bertoncillo P. et al. Bacteriorhodopsin-based Langmuir-Schaefer films for solar energy capture // IEEE Trans. Nanobioscience. 2003. Vol. 2, № 2. P. 124–132.

-
- [266] Leblanc R.M., Huo Q. Langmuir and Langmuir–Blodgett Films of Proteins and Enzymes // Encyclopedia of Surface and Colloid Science, Third Edition. CRC Press, 2015. P. 3545–3571.
- [267] Erokhin V., Facci P., Nicolini C. Two-dimensional order and protein thermal stability: high temperature preservation of structure and function // Biosens. Bioelectron. 1995. Vol. 10, № 1–2. P. 25–34.
- [268] Dziri L., Puppala K., Leblanc R.M. Surface and Spectroscopic Properties of Acetylcholinesterase Monolayer at the Air/Water Interface // J. Colloid Interface Sci. 1997. Vol. 194, № 1. P. 37–43.
- [269] Pal P. et al. Protein monolayer formation at air–electrolyte interface: a Langmuir–Blodgett study // Surf. Rev. Lett. 2011. Vol. 18, № 06. P. 267–279.
- [270] Cabaj J. et al. Biosensing invertase-based Langmuir-Schaefer films: Preparation and characteristic // Sensors Actuators, B Chem. 2012. Vol. 166–167. P. 75–82.
- [271] Marchenkova M.A., Dyakova Y.A., Tereschenko E.Yu., Kovalchuk M.V., Vladimirov Yu.A. Cytochrome c Complexes with Cardiolipin Monolayer Formed under Different Surface Pressure // Langmuir. 2015. V. 31. P. 12426.
- [272] Sui S.-F. et al. Conformational Changes of Proteins at an Interface Induced by a Supported Planar Phosphatidic Acid Monolayer // J. Biochem. 1994. Vol. 115, № 6. P. 1053–1057.
- [273] Zaitsev S.Y. Polymeric Langmuir Films with Glucose-Oxidase as Prototype Biosensors // Sensors and Actuators B-Chemical. 1995. Vol. 24, № 1–3. P. 177–179.
- [274] Girard-Egrot A.A.P., Blum L.L.J. Langmuir-Blodgett Technique for Synthesis of Biomimetic Lipid Membranes // Nanobiotechnology of Biomimetic Membranes / ed. Martin D.K. Boston, MA: Springer US, 2007. Vol. 1. P. 23–74.

-
- [275] Xie D. et al. Study on Biological Molecular LB Films and Properties // Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol. Sect. A. Mol. Cryst. Liq. Cryst. 1999. Vol. 337, № 1. P. 453–456.
- [276] Hughes A. V. et al. Floating Lipid Bilayers Deposited on Chemically Grafted Phosphatidylcholine Surfaces // Langmuir. 2008. Vol. 24, № 5. P. 1989–1999.
- [277] Bodík, M., Krajčíková, D., Hagara, J., Majkova, E., Barák, I., & Šiffalovič, P. (2021). Diffraction pattern of *Bacillus subtilis* CotY spore coat protein 2D crystals. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 197. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111425>
- [278] Thanga Bhuvanesh, Rainhard Machatschek, Yue Liu, Nan Ma, Andreas Lendlein. (2019). Self-stabilized fibronectin films at the air/water interface. MRS Advances, 5(12-13). 609-620. <https://doi.org/10.1557/adv.2019.401>
- [279] Hammond P.T. Building biomedical materials layer-by-layer // Mater. Today. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 15, № 5. P. 196–206.
- [280] Keeney M. et al. Nanocoating for biomolecule delivery using layer-by-layer selfassembly // J. Mater. Chem. B. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 3, № 45. P. 8757–8770.
- [281] Anzai J. et al. Layer-by-Layer Construction of Multilayer Thin Films Composed of Avidin and Biotin-Labeled Poly(amine)s // Langmuir. 1999. Vol. 15, № 1. P. 221–226.
- [282] Lvov Y., Essler F., Decher G. Combination of polycation/polyanion self-assembly and Langmuir-Blodgett transfer for the construction of superlattice films // J. Phys. Chem. 1993. Vol. 97, № 51. P. 13773–13777.
- [283] Ariga K., Ji Q., Hill J.P. Enzyme-Encapsulated Layer-by-Layer Assemblies: Current Status and Challenges Toward Ultimate Nanodevices // Chinese Journal of Radiology. 2010. Vol. 34, № 4. P. 51–87.

-
- [284] Xiang Y., Lu S., Jiang S.P. Layer-by-layer self-assembly in the development of electrochemical energy conversion and storage devices from fuel cells to supercapacitors // Chem. Soc. Rev. 2012. Vol. 41, № 21. P. 7291.
- [285] <http://large.stanford.edu/courses/2007/ph210/hellstrom1/>
- [286] Burroughs J.H. et al., "Light-Emitting Diodes Based on Conjugated Polymers," Nature, **347**, 539 (1990).
- [287] Mihi A., Ocaña M., Míguez H., "Oriented Colloidal-Crystal Thin Films by Spin-Coating Microspheres Dispersed in Volatile Media" Adv. Mat., **18**, 2244 (2006).
- [288] Izumrudov V.A. Self-assembly and molecular “recognition” phenomena in solutions of (bio)polyelectrolyte complexes // Russ. Chem. Rev. 2008. Vol. 77, № 4. P. 401–415.
- [289] Szabó T. et al. Layer-by-layer construction of ultrathin hybrid films with proteins and clay minerals // J. Phys. Chem. C. 2007. Vol. 111, № 34. P. 12730–12740.
- [290] Cassierr T., Lowack K. Layer-by-layer assembled protein / polymer hybrid films: nanoconstruction via specific recognition // Supramol. Sci. 1998. Vol. 5, № 98. P. 309–315.
- [291] Борщёв О.В., Пономаренко С.А. Самоорганизующиеся органические полупроводники для монослойных полевых транзисторов // Высокомолекулярные соединения С. 2014. Vol. 56, № 1. P. 33–48.
- [292] Masuda Y. Self-assembly and Patterning of Nanocrystals // Nanocrystal. InTech, 2011.
- [293] Yeung S.Y. et al. Reversible Self-Assembled Monolayers (rSAMs) as Robust and Fluidic Lipid Bilayer Mimics // Langmuir. 2018. Vol. 34, № 13. P. 4107–4115.

-
- [294] Bishop A.R., Nuzzo R.G. Self-assembled monolayers: Recent developments and applications // Curr. Opin. Colloid Interface Sci. Current Science Ltd., 1996. Vol. 1, № 1. P. 127–136.
- [295] Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers // Prog. Surf. Sci. 2000. Vol. 65, № 5–8. P. 151–257.
- [296] Magnussen O.M. et al. Self-assembly of organic films on a liquid metal // Nature. 1996. Vol. 384, № 6606. P. 250–252.
- [297] Lee W. et al. Fabrication of self-assembled protein A monolayer and its application as an immunosensor // Biosens. Bioelectron. 2003. Vol. 19, № 3. P. 185–192.
- [298] Kivioja J.M. et al. Electrical transport through ordered self-assembled protein monolayer measured by constant force conductive atomic force microscopy // Appl. Phys. Lett. 2009. Vol. 94, № 18. P. 1–4.
- [299] Sergio-Miguel Acuña-Nelson, José-Miguel Bastías-Montes, Fabiola-Rossana Cerda-Leal,¹ Julio-Enrique Parra-Flores, Juan-Salvador Aguirre-García, Pedro G. Toledo. (2020). Nanocoatings of Bovine Serum Albumin on Glass: Effects of pH and Temperature. Journal of Nanomaterials, 40, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/8640818>
- [300] Katchalski-Katzir E. Immobilized enzymes - learning from past successes and failures // Trends Biotechnol. 1993. Vol. 11, № 11. P. 471–478.
- [301] Nguyen H., Kim M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization // Appl. Sci. Conver. Technol. 2017. Vol. 26, № 6. P. 157–163.
- [302] Neuhold A. et al. X-ray based tools for the investigation of buried interfaces in organic electronic devices // Org. Electron. physics, Mater. Appl. 2013. Vol. 14, № 2. P. 479–487.
- [303] Giannini C. et al. Molecular packing in new Langmuir-Blodgett systems investigated by X-ray specular reflectivity and grazing incidence X-ray diffraction // Thin Solid Films. 1996. Vol. 288, № 1–2. P. 272–278.

-
- [304] Pietsch U., Hoehne U., Moehwald H. Localization of a magnesium delta-sheet within a lead stearate Langmuir-Blodgett multilayer by x-ray reflectivity measurement // *Langmuir*. 1993. Vol. 9, № 1. P. 208–210.
- [305] Bukreeva T. V et al. X-ray reflectivity prove of Langmuir–Blodgett superlattice formation of lead and yttrium stearate alternative bilayers // *Mater. Sci. Eng. C*. 2002. Vol. 22, № 2. P. 129–133.
- [306] Foglia F., Lawrence M.J., Barlow D.J. Studies of model biological and biomimetic membrane structure: Reflectivity vs diffraction, a critical comparison // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* Elsevier Ltd, 2015. Vol. 20, № 4. P. 235–243.
- [307] Jones E.M. et al. Interaction of Tau Protein with Model Lipid Membranes Induces Tau Structural Compaction and Membrane Disruption // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51, № 12. P. 2539–2550.
- [308] Samajdar, R. N., Kumar, C., Viswanath, P., & Bhattacharyya, A. J. (2019). Studying Hemoglobin and a Bare Metal-Porphyrin Complex Immobilized on Functionalized Silicon Surfaces Using Synchrotron X-ray Reflectivity. *Journal of Physical Chemistry B*, 123(35), 7492–7503. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.9b03085>
- [309] Bosio L., Benattar J.J., Rieutord F. X-ray reflectivity of a Langmuir monolayer on water // *Rev.* 1987. Vol. 22, № 8. P. 775–778.
- [310] Cristofolini L. et al. Structural Study of the DNA Dipalmitoylphosphatidylcholine Complex at the Air–Water Interface // *Biomacromolecules*. 2007. Vol. 8, № 7. P. 2270–2275.
- [311] Sarmah, Raktim J., Sah, Bijay K., Kundu, Sarathi. (2020). Compact protein (bovine serum albumin/human serum albumin) layer under Langmuir-Blodgett deposition on hydrophilic Si (001) surface. *Thin Solid Films*, 715(35), 138419. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2020.138419>

-
- [312] Richter A.G. et al. Thickness and Interfacial Roughness Changes in Polymer Thin Films during X-Irradiation // *Macromolecules*. 2006. Vol. 39, № 4. P. 1545–1553.
- [313] Mezger M. et al. Water and ice in contact with octadecyl-trichlorosilane functionalized surfaces: A high resolution x-ray reflectivity study // *J. Chem. Phys.* 2008. Vol. 128, № 24. P. 244705.
- [314] Zheludeva S.I. et al. X-ray standing waves in bragg diffraction and in total reflection regions using langmuir-blodgett multilayers // *Thin Solid Films*. 1990. Vol. 193–194, № PART 1. P. 395–400.
- [315] Ковальчук М.В., Кон В.Г. // *Успехи физ. наук*. 1986. Т. 149. Вып. 5. С. 69–103.
- [316] Laue M. v. Die Absorption der Röntgenstrahlen in Kristallen im Interferenzfall // *Acta Crystallogr.* 1949. Vol. 2, № 2. P. 106–113.
- [317] Golovchenko J.A. et al. Solution to the Surface Registration Problem Using XRay Standing Waves // *Phys. Rev. Lett.* 1982. Vol. 49, № 8. P. 560–563.
- [318] Ghose S.K., Dev B.N. X-ray standing wave and reflectometric characterization of multilayer structures // *Phys. Rev. B*. 2001. Vol. 63, № 24. P. 245409.
- [319] Bedzyk M.J., Bommarito G.M., Schildkraut J.S. X-ray standing waves at a reflecting mirror surface // *Phys. Rev. Lett.* 1989. Vol. 62, № 12. P. 1376–1379.
- [320] Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., Novikova N.N. Total reflection X-Ray fluorescence study of organic nanostructures. // *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2001. V.56. P.2019-2026.
- [321] Желудева С.И., Новикова Н.Н., Коновалов О.В., Ковальчук М.В., Степина Н.Д., Юрьева Э.А., Мягков И.В., Годовский Ю.К., Макарова Н.Н., Рубцов А.М., Лопина О.Д., Ерко А.И., Толстихина А.Л., Гайнутдинов Р.В., Лидер В.В., Терещенко Е.Ю., Янусова Л.Г.

Возможности рентгеновской флуоресценции в области полного внешнего отражения для исследования ленгмюровских монослоев на поверхности жидкости и твердой подложке. // Кристаллография. 2003. Т.48. №6. С. 30-42.

- [322] Zheludeva S.I., Novikova N.N., Konovalov O.V., Kovalchuk M.V., Stepina N.D., Tereschenko E.Yu. Langmuir monolayers on water surface investigated by X-ray total reflection fluorescence. // Materials Science and Engineering. 2003. V.23. P.567-570.
- [323] Желудева С.И., Ковальчук М.В., Новикова Н.Н., Сосфенов А.Н., Харитонов И.Ю., Платонов Ю.Я., Ахсахалян А.Д., Салашенко Н.Н. Стоячие рентгеновские волны в многослойных синтетических структурах. // Письма в ЖТФ. 1989. Т. 15. Вып. 20, С.49-54.
- [324] Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., Novikova N.N., Sosphenov A.N. X-Ray standing waves in LSM for characterization of ultra-thin films. // J.Phys.D. Appl.Phys. 1993. V.26. P.A206-A209
- [325] Kovalchuk M.V., Kazimirov A.Yu., Zheludeva S.I. // Nuclear Instrum. and Methods in Phys. Research. 1995. V.101.
- [326] Kovalchuk M.V. S.I. Zheludeva, M.V. Kovalchuk, N.N. Novikova et. al., X-ray Standing Waves in X-ray Specular Reflection and Fluorescence Study of Nano-Films // J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography, 1997. Vol. 30, № 5. P. 833–838.
- [327] Kovalchuk M.V. Novikova N.N., Stepina N.D., Konovalov O.V. et al. Spectral-selective X-ray methods for structure diagnostics of ordered bioorganic nanosystems on a liquid surface // J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech. 2011. Vol. 5, № 5. P. 816–821.
- [328] Карайченцев В. Г., Ковальчук М. В., Кузнецов М. Г., Мозгин А. А., Серегин А. Ю., Терещенко Е. Ю., Чистюнин В. Ф., Якунин С. Н. Система автоматизированного управления синхротронной станцией и

особенности автоматизации эксперимента на станции «Ленгмюр» источника синхротронного излучения РНЦ «Курчатовский институт» // ПТЭ. 2011, №3. С. 33-45.

- [329] Серегин А.Ю., Дьякова Ю.А., Якунин С.Н., Махоткин И.А., Алексеев А.С., Ключковская В.В., Терещенко Е.Ю., Ткаченко Н.В., Лемметюйнен Х., Фейгин Л.А., Ковальчук М.В. Определение преимущественной ориентации молекул в монослоях порфирина-фуллереновой диады ZnDHD6е методами стоячих рентгеновских волн и рентгеновской рефлектометрии//Кристаллография. 2013. Т. 58, № 6. С.940-945.
- [330] Tiwari M.K., Sawhney K.J.S.S., Lodha G.S. Multilayer mirror as a substrate for total reflection X-ray fluorescence spectrometry // Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. Elsevier B.V., 2010. Vol. 65, № 6. P. 434–440.
- [331] Tiwari M.K. et al. Investigation of metal nanoparticles on a Si surface using an xray standing wave field // J. Appl. Phys. 2008. Vol. 103, № 5. P. 054311.
- [332] Shapovalov V.L. et al. Elemental Analysis within the Electrical Double Layer Using Total Reflection X-ray Fluorescence Technique // J. Phys. Chem. B. 2007. Vol. 111, № 15. P. 3927–3934.
- [333] Zheludeva S.I. et al. X-ray Standing Waves in X-ray Specular Reflection and Fluorescence Study of Nano-Films // J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography, 1997. Vol. 30, № 5. P. 833–838.
- [334] Zheludeva S.I. et al. X-ray total external reflection fluorescence study of LB films on solid substrate // J. Phys. D. Appl. Phys. 1993. Vol. 26, № 4A. P. A202–A205.
- [335] Daillant J. et al. Interaction of cations with a fatty acid monolayer. A grazing incidence x-ray fluorescence and reflectivity study // Langmuir. 1991. Vol. 7, № 4. P. 611–614.

-
- [336] Cristofolini L. Synchrotron X-ray techniques for the investigation of structures and dynamics in interfacial systems // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* Elsevier Ltd, 2014. Vol. 19, № 3. P. 228–241.
- [337] Novikova N.N., Yurieva E.A., Zheludeva S.I. et al. X-ray fluorescence methods for investigations of lipid/protein membrane models // *J. Synchrotron Radiat.* 2005. V. 12(4). P. 511.
- [338] Новикова Н.Н., Ковальчук М.В., Юрьева Э.А., Коновалов О.В., Рогачев А.В., Степина Н.Д., Сухоруков В.С., Царегородцев А.Д., Чухрай Е.С., Якунин С.Н. Рентгенофлуоресцентные измерения в условиях полного внешнего отражения для исследования взаимодействия белков с ионами металлов в биологических системах. // *Кристаллография*, 2012, том 57, № 5, с. 727–734.
- [339] Novikova N.N. et al. Spectral-selective X-ray methods for structure diagnostics of ordered bioorganic nanosystems on a liquid surface // *J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech.* 2011. Vol. 5, № 5. P. 816–821.
- [340] Levine J.R. et al. Grazing-incidence small-angle X-ray scattering: new tool for studying thin film growth // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 1989. Vol. 22, № 6. P. 528–532.
- [341] Yoneda Y. Anomalous Surface Reflection of X Rays // *Phys. Rev.* 1963. Vol. 131, № 5. P. 2010–2013.
- [342] Santoro G., Yu S. Grazing Incidence Small Angle X-Ray Scattering as a Tool for In- Situ Time-Resolved Studies // *X-ray Scattering. InTech*, 2017. P. 29–60.
- [343] Kjaer K., Some simple ideas on X-ray reflection and grazing-incidence diffraction from thin surfactant films // *Physica B* 198 (1994) 100-109.
- [344] Als-Nielsen J., Jacquemain D., Kjaer K. et al., Principles and applications of grazing incidence X-ray and neutron scattering from ordered molecular monolayers at the air-water interface. // *Physics Reports* 216 (1994) 251–313.

-
- [345] Kaganer V.M., Möhwald H., Dutta P., Structure and phase transitions in Langmuir monolayers. // *Reviews of Modern Physics*, (1999) Vol. 71, No. 3, pp. 779–819.
- [346] Renaud G., Lazzari R., Leroy F., Probing surface and interface morphology with Grazing Incidence Small Angle X-Ray Scattering. // *Surface Science Reports* 64 (2009) 255–380.
- [347] Berge B., Lenne P.-F., Renault A. X-ray grazing incidence diffraction on monolayers at the surface of water // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1998. Vol. 3, № 3. P. 321–326.
- [348] Pignat J. et al. Grazing Incidence X-ray Diffraction on Langmuir Films: Toward Atomic Resolution † // *J. Phys. Chem. B.* 2006. Vol. 110, № 44. P. 22178–22184.
- [349] Kmetko J. et al. Ordering in the Subphase of a Langmuir Monolayer: X-ray Diffraction and Anomalous Scattering Studies // *Langmuir*. 2001. Vol. 17, № 16. P. 4697–4700.
- [350] Haas H., Brezesinski G., Möhwald H. X-ray diffraction of a protein crystal anchored at the air/water interface // *Biophys. J.* 1995. Vol. 68, № 1. P. 312–314.
- [351] Verclas S.A.W. et al. X-ray diffraction from a single layer of purple membrane at the air/water interface // *J. Mol. Biol.* 1999. Vol. 287, № 5. P. 837–843.
- [352] Pechkova E., Tripathi S., Nicolini C. MicroGISAXS of Langmuir–Blodgett protein films: effect of temperature on long-range order // *J. Synchrotron Radiat. International Union of Crystallography*, 2009. Vol. 16, № 3. P. 330–335.
- [353] Erokhin V. et al. Synchrotron study of heat induced order in protein Langmuir–Blodgett films // *Thin Solid Films*. 1998. Vol. 327–329. P. 636–638.

-
- [354] Stapleton A. et al. The direct piezoelectric effect in the globular protein lysozyme // *Appl. Phys. Lett.* 2017. Vol. 111, № 14.
- [355] Ethève J., Déjardin P. Adsorption Kinetics of Lysozyme on Silica at pH 7.4: Correlation between Streaming Potential and Adsorbed Amount // *Langmuir*. 2002. Vol. 18, № 5. P. 1777–1785.
- [356] Felsovalyi F. et al. Reversibility of the adsorption of lysozyme on silica. // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, № 19. P. 11873–11882.
- [357] Kubiak-Ossowska K. et al. Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: effects of pH on protein layer structure // *Phys. Chem. Chem. Phys. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 17, № 37. P. 24070–24077.
- [358] Yano Y.F., Uruga T. Effect of salt ions on protein layers at the air-water interface under a crystallization condition // *Chem. Phys. Elsevier B.V.*, 2013. Vol. 419. P. 153–155.
- [359] Yano Y.F. Kinetics of protein unfolding at interfaces // *J. Phys. Condens. Matter*. 2012. Vol. 24, № 50. P. 503101.
- [360] Yano Y.F. et al. Hofmeister anion effects on protein adsorption at an air-water interface // *Langmuir*. 2016. Vol. 32, № 38. P. 9892–9898.
- [361] Yano Y.F. et al. Protein Salting Out Observed at an Air–Water Interface // *J. Phys. Chem. Lett.* 2011. Vol. 2, № 9. P. 995–999.
<https://doi.org/10.1021/jz200111q>
- [362] Hamaguchi K. Studies on protein denaturation by surface chemical method: I. The relationships between monolayer properties and urea denaturation of lysozyme // *J. Biochem.* 1955. Vol. 42(5). P. 449.
- [363] Miñones Conde M. et al. How to obtain a well-spread monolayer of lysozyme at the air/water interfaces // *J. Colloid Interface Sci.* 2011. Vol. 361, № 1. P. 351–360.

-
- [364] Zhang Y., Cremer P.S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006. Vol. 10, № 6. P. 658–663.
- [365] Baldwin R.L. How Hofmeister ion interactions affect protein stability // *Biophys. J.* Elsevier, 1996. Vol. 71, № 4. P. 2056–2063.
- [366] Tadeo X. et al. Protein stabilization and the hofmeister effect: The role of hydrophobic solvation // *Biophys. J.* 2009. Vol. 97, № 9. P. 2595–2603.
- [367] Jungwirth P., Cremer P.S. Beyond Hofmeister // *Nat. Chem.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 6, № 4. P. 261–263.
- [368] Kumar A., Venkatesu P. Does the stability of proteins in ionic liquids obey the Hofmeister series? // *Int. J. Biol. Macromol.* Elsevier B.V., 2014. Vol. 63. P. 244– 253.
- [369] Okur H.I. et al. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions // *J. Phys. Chem. B.* 2017. Vol. 121, № 9. P. 1997–2014.
- [370] Kunz W., Lo Nostro P., Ninham B.W. The present state of affairs with Hofmeister effects // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2004. Vol. 9, № 1–2. P. 1–18.
- [371] Sarah Alamdari, Steven J. Roeters, Thaddeus W. Golbek, Lars Schmüser, Tobias Weidner, and Jim Pfaendtner. (2020). Orientation and Conformation of Proteins at the Air–Water Interface Determined from Integrative Molecular Dynamics Simulations and Sum Frequency Generation Spectroscopy. *Langmuir* 2020, 36, 40, 11855 – 11865.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c01881>
- [372] Amarjeet Singh, Manabendra Mukherjee. (2019). Analysis of polypeptide inter-chain entanglements using swelling dynamics of a spin coated protein layer. *Thin Solid Films*. Volume 691, 1 December 2019, 137605.
<https://doi.org/10.1016/j.tsf.2019.137605>.

-
- [373] Досон Р, Эллиот Д, Эллиот У, Джонс К. Справочник биохимика. — Москва: Мир, 1991. — С. 357. — 544 с. — 30 000 экз. — ISBN 5-03-001032-7.
- [374] Бекренев А.Н., Миркин Л.И. «Малоугловая рентгенография деформации и разрушения материалов». Москва: МГУ, 1991. 247с.
- [375] Glatter O., Kratky O., “Small-Angle X-ray Scattering”. Academic Press Inc. (London) Ltd, 1982, 515p.
- [376] Guinier A. and Fournet G. “Small-Angle Scattering of X_Rays”. John Wiley & Sons, Inc. (New York), 1955, 268p.
- [377] Konarev P.V., Petoukhov M.V., Volkov V.V. et al. // J. Appl. Cryst. 2006. V. 39. № 2. P. 277.
- [378] <http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/oligomer.html>
- [379] Могилевский Л.Ю., Дембо А.Т., Свергун Д.И. и др. // Кристаллография. 1984. Т. 29. № 3. С. 587.
- [380] Korneev, V. N.; Shlektarev, V. A.; Zabelin, A. V.; Aul’chenko, V. M.; Tolochko, B. P.; Ariskin, N. I.; Lanina, L. F.; Vazina, A. A., X-ray stations based on cylindrical zoom lenses for nanostructural investigations using synchrotron radiation. // Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques 2012, 6, (5), 849-864.
- [381] Корнеев В.Н., Арискин Н.И., Герасимов В.С. и др. // Поверхность. Рентген., синхротр. и нейтрон. исслед. 2003. № 11. С. 15.
- [382] А.с. № 883725 (СССР). Установка для дифракционных исследований биологических объектов / ИБФ АН СССР. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. // Б.И. 1981. № 43. 8 с.
- [383] Johann H.H. // Z. Phys. 1931. В. 69. № 3–4. S. 185.
- [384] Корнеев В.Н., Сергиенко П.М., Шлектарев В.А. и др. // Поверхность. Рентген., синхротр. и нейтрон. исслед. 2008. № 12. С. 61.

-
- [385] Корнеев В.Н., Шлектарев В.А., Забелин А.В. и др. // Физика и химия стекла. 2010. Т. 36. № 1. С. 129.
- [386] Huang, T. C.; Toraya, H.; Blanton, T. N.; Wu, Y., X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. // Journal of Applied Crystallography 1993, 26, (2), 180-184.
- [387] Hammersley, A. P., FIT2D: An Introduction and Overview. In 1997.
- [388] Konarev, P. V.; Volkov, V. V.; Sokolova, A. V.; Koch, M. H. J.; Svergun, D. I.: PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. // Journal of Applied Crystallography (2003) V. 36, P. 1277.
- [389] G.S. Peters, O.A. Zakharchenko, P.V. Konarev, Y.V. Karmazikov, M.A. Smirnov, A.V. Zabelin, E.H. Mukhamedzhanov, A.A. Veligzhanin, A.E. Blagov, M.V. Kovalchuk «The small-angle X-ray scattering beamline BioMUR at the Kurchatov synchrotron radiation source» // Nuclear Inst. and Methods in Physics Research, A 945 (2019) 162616
- [390] H. Tajiri, H. Yamazaki, H. Ohashi, S. Goto, O. Sakata, T. Ishikawa, A middle energy-bandwidth X-ray monochromator for high-flux synchrotron diffraction: revisiting asymmetrically cut silicon crystals, J. Synchrotron Radiat. 26 (3) (2019) 750–755.
- [391] C. Pascual-Izarra, et al., Effortless creation of control & data acquisition graphical user interfaces with Taurus, in: 15th International Conference on Accelerator and Large Experimental Physics Control Systems, ICALEPCS 2015. Conference Proceedings, 2015.
- [392] Pernot P., Round A., Barrett R. et al. // J. Synchrotron Rad. 2013. V. 20. P. 660.
- [393] Round A., Felisaz F., Fodinger L. et al. // Acta Cryst. D. 2015. V. 71. P. 67.
- [394] Kuklin, A. I., Islamov, A. K. & Gordeliy, V. I. (2005). Neutron News, 16, 16–18.

-
- [395] Kirilov, A. S., Litvinenko, E. I., Astakhova, N. V., Murashkevich, S. M., Petukhova, T. B., Yudin, V. E., Gordelii, V. I., Islamov, A. K. & Kuklin, A. I. (2004). *Instrum. Exp. Tech.* 47, 334–345.
- [396] <http://flnph.jinr.ru/ru/facilities/ibr-2/instruments/yumo>
- [397] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. // *Acta Cryst. D.* 2010. V. 66. № 4. P. 486.
- [398] <http://pymol.org/>
- [399] ГОСТ Р 8.698–2010. Государственная система обеспечения единства измерений. Размерные параметры наночастиц и тонких пленок. Методика выполнения измерений с помощью малоуглового рентгеновского дифрактометра. М.: Стандартинформ. 2010. 41 с.
- [400] Svergun, D.; Barberato, C.; Koch, M. H., CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *Journal of Applied Crystallography* 1995, 28, 768-773.
- [401] Svergun, D. I.; Konarev, P. V.; Volkov, V. V.; Koch, M. H. J.; Sager, W. F. C.; Smeets, J.; Blokhuis, E. M. A small angle x-ray scattering study of the droplet-cylinder transition in oil-rich sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate microemulsions. *J. Chem. Phys.* 2000, 113, 1651-1665.
- [402] Brennich M.E., Kieffer J., Bonamis G. et al. // *J. Appl. Cryst.* 2016. V. 49. P. 203.
- [403] Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V. et al. // *J. Appl. Cryst.* 2012. V. 45. P. 342.
- [404] Soloviev, A. G., Solovieva, T. M., Stadnik, A. V., Islamov, A. H. & Kuklin, A. I. (2003). SAS. Package for Small-Angle Neutron Scattering Data Treatment, v.2.4. <http://wwwinfo.jinr.ru/programs/jinrlib/sas/indexe.html>
- [405] Ostanevich, Y. M. (1988). *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* 15, 91–103.

-
- [406] Kuklin, A. I., Islamov, A. X., Kovalev, Y. S., Utrobin, P. K. & Gordeliy, V. I. (2006). *Poverkhnost*, 2006, 74–83.
- [407] Guinier, A. (1939). *Ann. Phys.* 11, 161–237.
- [408] Yamada, H., Nagae, T. & Watanabe, N. (2015). *Acta Cryst.* D71, 742–753.
- [409] Svergun, D. I., Richard, S., Koch, M. H. J., Sayers, Z., Kuprin, S. & Zaccai, G. (1998). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 95, 2267–2272.
- [410] <http://ckp.nrcki.ru/>
- [411] Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1701–1718. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>
- [412] Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., & Shaw, D. E. (2010). Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 78(8), 1950–1958. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>
- [413] Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., & Baker, N. A. (2004). PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue), W665–W667. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>
- [414] Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. et al. // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. № 2. P. 926.
- [415] Horn, H. W., Swope, W. C., Pitner, J. W., Madura, J. D., Dick, T. J., Hura, G. L., & Head-Gordon, T. (2004). Development of an improved four-site water model for biomolecular simulations: TIP4P-Ew. *The Journal of Chemical Physics*, 120(20), 9665–9678. <https://doi.org/10.1063/1.1683075>
- [416] Berendsen, H. J., Postma, J. V., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. R. H. J., & Haak, J. R. (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath.

-
- The Journal of Chemical Physics, 81(8), 3684–3690.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
- [417] Parrinello, M., & Rahman, A. (1982). Strain fluctuations and elastic constants. The Journal of Chemical Physics, 76(5), 2662–2666.
<https://doi.org/10.1063/1.443248>
- [418] Hess B. et al. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations // J. Comput. Chem. 1997. Vol. 18. P. 1463–1472.
- [419] Van Gunsteren, W. F., & Berendsen, H. J. (1988). A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. Molecular Simulation, 1(3), 173–185.
<https://doi.org/10.1080/08927028808080941>
- [420] Essmann U. et al. A smooth particle mesh Ewald method // J. Chem. Phys. 1995. Vol. 103. P. 8577–8592.
- [421] А.М. Попов, А.С. Бойкова, В.В. Волков, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, М.А. Марченкова, Г.С. Петерс, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Микрофлюидная ячейка для изучения структуры предкристаллизационной стадии растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей», Кристаллография, 2018. том 63 № 5, с. 697-702.
- [422] Ковальчук М.В., Просеков П.А., Марченкова М.А., Благов А.Е., Дьякова Ю.А., Терещенко Е.Ю., Писаревский Ю.В., Кондратьев О.А. Исследование *in situ* процессов роста и деградации кристаллов тетрагонального лизоцима на подложке кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии // Кристаллография. 2014. Т. 59. № 5. С. 749.
- [423] McPherson A. // Methods. 2004. V. 34. P. 254.
- [424] <http://kcsni.nrcki.ru/pages/main/sync/beamlines/belok/index.shtml>
- [425] <http://kcsni.nrcki.ru/pages/main/sync/beamlines/rsa/index.shtml>

-
- [426] Battye T.G.G., Kontogiannis L., Johnson O., Powell H.R. and Leslie A.G.W. // Acta Cryst. 2011. D67. P. 271–281.
- [427] Harkins W.D., The Physical Chemistry of Surface Films, Reinhold, New York, 1952.
- [428] Saint-Pierre-Chazalet M., Billoudet F., Pileni M.P. // Colloid Polym. Sci. 1989. V. 79. P. 76.
- [429] Saint-Pierre-Chazalet M., Fressigné C., Billoudet F et al. // Thin Solid Films. 1992. V. 210–211. P. 743.
- [430] Emanuel Schneck, Erzsebet Papp-Szabo, Bonnie E. Quinn et al.// Journal of the Royal Society Interface.-2009.-Vol.6.-P.671-678.
- [431] Le-Thu T. Nguyen, Andrew J. Musser, Eltjo J. Vorenkamp et al.//Langmuir.-2010.-Vol. 17.-P.14073–14080.
- [432] Cristofolini L., Berzina T., Erokhin V. et al.// Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.-2008.-Vol. 321.-P.158–162.
- [433] Pedersen J.S., Hamley I.W. // J. Appl. Cryst. 1994 V. 27(1). P. 36.
- [434] Zegenhagen J. // Surf. Sci. Rep. 1993. V. 18. P. 202.
- [435] Batterman B.W., Cole H. // Rev. Mod. Phys. 1964. V. 36. № 3. P. 681.
- [436] Parratt L. // Phys. Rev. 1954. V. 95. № 2. P. 359.
- [437] <https://kif.ras.ru/ckp/instruments/x-ray-methods/rentgenovskiy-avtomatizirovanny-difraktometr-vysokogo-razresheniya-smartlab/>
- [438] The Rigaku J., V. 23, 2006, PP. 52-55.
- [439] Miho Yasaka // The Rigaku J., 26(2), 2010.
- [440] <http://kcsni.nrcki.ru/pages/main/12016/12076/12083/index.shtml>
- [441] Кон В.Г., Просеков П.А., Серегин А.Ю., Куликов А.Г., Писаревский Ю.В., Благоев А.Е., Ковальчук М.В. // Кристаллография, 2019, том 64, № 1, с. 29–34.

-
- [442] Neville, Y. Ishitsuka, C.S. Hodges, O. V. Konovalov, A.J. Waring, R.I. Lehrer, K.Y.C. Lee, D. Gidalevitz, Protegrin interaction with lipid monolayers: Grazing incidence X-ray diffraction and X-ray reflectivity study., *Soft Matter*. 4 (2008) 1665–1674. doi:10.1039/b718295c.
- [443] Nakagiri T., Sakai K., Iida A., Ishikawa T., Matsushita T., X-ray standing wave method applied to the structural study of Langmuir-Blodgett films, *Thin Solid Films*. 133 (1985) 219–225. doi:10.1016/0040-6090(85)90443-2.
- [444] Schrodinger LLC, & LLC, S. (2015). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.
- [445] Guilloteau, J.-P.; Ries-Kautt, M. M.; Ducruix, A. F., Variation of lysozyme solubility as a function of temperature in the presence of organic and inorganic salts. *Journal of Crystal Growth* 1992, 122, (1-4), 223-230.
- [446] Heijna, M. C. R.; Van Enkevort, W. J. P.; Vlieg, E.; Enkevort, W. J. P. V., Growth Inhibition of Protein Crystals: A Study of Lysozyme Polymorphs. *Crystal Growth & Design* 2008, 8, (1), 270-274.
- [447] Kuklin, A. I., Soloviov, D. V., Rogachev, A. V., Utrobin, P. K., Kovalev, Y. S., Balasoiu, M., Ivankov, O. I., Sirotin, A. P., Murugova, T. N., Petukhova, T. B., Gorshkova, Y. E., Erhan, R. V., Kutuzov, S. A., Soloviev, A. G. & Gordeliy, V. I. (2011). *J. Phys. Conf. Ser.* 291, 012013.
- [448] Gripon, C., Legrand, L., Rosenman, I., Vidal, O., Robert, M. C. & Boué, F. (1997). *J. Cryst. Growth*, 177, 238–247.
- [449] Jolles, P. & Berthou, J. (1972). *FEBS Lett.* 23, 21–23.
- [450] Pan, W., Galkin, O., Filobelo, L., Nagel, R. L. & Vekilov, P. G. (2007). *Biophys. J.* 92, 267–277.
- [451] Gliko, O., Neumaier, N., Pan, W., Haase, I., Fischer, M., Bacher, A., Weinkauff, S. & Vekilov, P. G. (2005). *J. Am. Chem. Soc.* 127, 3433–3438.
- [452] Sleutel, M. & Van Driessche, A. E. S. (2014). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 111, E546–E553.

-
- [453] Krissinel E., Henrick K. // J. Mol. Biol. 2007. V. 372. P. 774.
- [454] Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Благоев А.Е., Дьякова Ю.А., Марченкова М.А., «Способ определения условий кристаллизации белков». Патент № 2626576.
- [455] R.J. Baxter, Percus–Yevick equation for hard spheres with surface adhesion, J. Chem. Phys. 49 (1968) 2770–2774, <https://doi.org/10.1063/1.1670482>.
- [456] Hyde A.M., Zultanski S.L., Waldman J.H. et al. // Org. Process Res. Dev. 2017. V. 21. P. 1355.
- [457] McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). J. Appl. Crystallogr. 40, 658–674.
- [458] Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., & Murshudov, G. N. (2004). REFMAC 5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 60(12), 2184–2195.
- [459] Dauter, Z., Dauter, M., de La Fortelle, E., Bricogne, G., & Sheldrick, G. M. (1999). Can anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? Journal of Molecular Biology, 289(1), 83–92. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2743>
- [460] Sauter, C., Otálora, F., Gavira, J. A., Vidal, O., Giegé, R., García-Ruiz, J. M., ... Giegé, R. (2001). Structure of tetragonal hen egg-white lysozyme at 0.94 Å from crystals grown by the counter-diffusion method. Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography, 57(Pt 8), 1119–1126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468395>
- [461] Vaney, M. C., Broutin, I., Retailleau, P., Douangamath, A., Lafont, S., Hamiaux, C., ... RièsKautt, M. M. (2001). Structural effects of monovalent anions on polymorphic lysozyme crystals. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 57(7), 929–940. <https://doi.org/10.1107/S0907444901004504>

-
- [462] Vaney, M. C., Maignan, S., Riès-Kautt, M., & Ducruix, A. F. (1996). High-Resolution Structure (1.33 Å) of a HEW Lysozyme Tetragonal Crystal Grown in the APCF Apparatus. Data and Structural Comparison with a Crystal Grown under Microgravity from SpaceHab-01 Mission. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 52(3), 505–517. <https://doi.org/10.1107/S0907444499501674X>
- [463] Blake, C. C., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C., & Sarma, V. R. (1967). On the conformation of the hen egg-white lysozyme molecule. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 167(1009), 365–377. <https://doi.org/10.1098/rspb.1967.0034>
- [464] Phillips, David C. (1967). The hen egg-white lysozyme molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 57(3), 483–495. <https://doi.org/10.1590/1982-0194201400033>
- [465] Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, 35(1), 127–160. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413917>. DOI:10.1007/s12038-010-0015-5.
- [466] Cheetham, J. C., Artymiuk, P. J., & Phillips, D. C. (1992). Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen eggwhite lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 224(3), 613–628. doi:10.1016/0022-2836(92)90548-X
- [467] Johnson, L. N., Cheetham, J., McLaughlin, P. J., Acharya, K. R., Barford, D., & Phillips, D. C. (1988). Protein–oligosaccharide interactions: Lysozyme, phosphorylase, amylases. In Ahmed, R., Akira, S., Aktories, K., Casadevall, A., Compans, R. W., Galan, J. E., Garcia-Sastre, A., Malissen, B., Rappuoli, R. (Eds.), *Carbohydrate–protein interaction* (pp. 81–134). Berlin: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-46641-0_4
- [468] Strynadka, N. C., & James, M. N. (1991). Lysozyme revisited: Crystallographic evidence for distortion of an N-acetylmuramic acid residue

-
- bound in site D. *Journal of Molecular Biology*, 220(2), 401–424. doi:10.1016/0022-2836(91)90021-W
- [469] Ose, T., Kuroki, K., Matsushima, M., Maenaka, K., & Kumagai, I. (2009). Importance of the hydrogen bonding network including Asp52 for catalysis, as revealed by Asn59 mutant hen egg-white lysozymes. *Journal of Biochemistry*, 146(5), 651–657. doi:10.1093/jb/mvp110
- [470] Imoto, T., Johnson, L. N., North, A. C. T., Phillips, D. C., & Rupley, J. A. (1972). 21 Vertebrate Lysozymes. In *the Enzymes*, 7, 665–868. doi:10.1016/S1874-6047(08)60465-5
- [471] Dwek, R. A., Richards, R. E., Morallee, K. G., Nieboer, E., Williams, R. J., & Xavier, A. V. (1971). The lanthanide cations as probes in biological systems. Proton relaxation enhancement studies for model systems and lysozyme. *European Journal of Biochemistry*, 21(2), 204–209. doi:10.1111/j.1432-1033.1971.tb01457.x
- [472] Kurachi, K., Sieker, L. C., & Jensen, L. H. (1975). Metal ion binding in triclinic lysozyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(19), 7663–7667. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/240835>.
- [473] Schindler, M., Assaf, Y., Sharon, N., & Chipman, D. M. (1977). Mechanism of lysozyme catalysis: Role of ground-state strain in subsite D in hen egg-white and human lysozymes. *Biochemistry*, 16(3), 423–431. doi:10.1021/bi00622a013
- [474] De La Mora, E., Carmichael, I., & Garman, E. F. (2011). Effective scavenging at cryotemperatures: Further increasing the dose tolerance of protein crystals. *Journal of Synchrotron Radiation*, 18(3), 346–357. doi:10.1107/S0909049511007163
- [475] Tanley, S. W. M., Starkey, L. V., Lamplough, L., Kaenket, S., & Helliwell, J. R. (2014). The binding of platinum hexahalides (Cl, Br and I) to hen egg-white lysozyme and the chemical transformation of the PtI6 octahedral

-
- complex to a PtI3 moiety bound to His15. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 70, 1132–1134. doi:10.1107/S2053230X14014009
- [476] Funahashi, J., Takano, K., Yamagata, Y., & Yutani, K. (1999). Contribution of amino acid substitutions at two different interior positions to the conformational stability of human lysozyme. *Protein Engineering, Design and Selection*, 12(10), 841–850. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10556244>. doi:10.1093/protein/12.10.841
- [477] Inaka, K., Kuroki, R., Kikuchi, M., & Matsushima, M. (1991). Crystal structures of the apo- and holomutant human lysozymes with an introduced Ca²⁺ binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20666–20671. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939116>.
- [478] Takano, K., Ota, M., Ogasahara, K., Yamagata, Y., Nishikawa, K., & Yutani, K. (1999). Experimental verification of the “stability profile of mutant protein” (SPMP) data using mutant human lysozymes. *Protein Engineering, Design and Selection*, 12(8), 663–672. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469827>. doi:10.1093/protein/12.8.663
- [479] Girard, E., Chantalat, L., Vicat, J., & Kahn, R. (2002). Gd-HPDO3A, a complex to obtain high-phasing-power heavy-atom derivatives for SAD and MAD experiments: Results with tetragonal hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(1), 1–9. doi:10.1107/S0907444901016444
- [480] Holton, J. M., Classen, S., Frankel, K. A., & Tainer, J. A. (2014). The R-factor gap in macromolecular crystallography: An untapped potential for insights on accurate structures. *The FEBS Journal*, 281(18), 4046–4060. doi:10.1111/febs.12922

-
- [481] Abe, S., Tsujimoto, M., Yoneda, K., Ohba, M., Hikage, T., Takano, M., ... Ueno, T. (2012). Porous protein crystals as reaction vessels for controlling magnetic properties of nanoparticles. *Small*, 8(9), 1314–1319. doi:10.1002/smll.201101866
- [482] Margolin, A. L., & Navia, M. A. (2001). Protein crystals as novel catalytic materials. *Angewandte Chemie International Edition*, 40(12), 2204–2222. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11433482>. doi:10.1002/1521-3773(20010618)40:12<2204::AID-ANIE2204>3.0.CO;2-J
- [483] DeLano, W. L. (2002). The PyMOL molecular graphics system. <http://www.pymol.org>.
- [484] Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- [485] Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Дьякова Ю.А., Марченкова М.А., Просеков П.А., Серегин А.Ю., Бойкова А.С., Заявка на патент «Способ получения упорядоченных белковых пленок на твердых подложках в ленгмюровской ванне». Патент № 2672410.
- [486] Дьякова Ю.А., Марченкова М.А. // Кристаллография. 2016. Т. 61. № 5. С. 718.
- [487] Hamaguchi K. Studies on protein denaturation by surface chemical method: II. On the mechanism of surface denaturation of lysozyme // *J. Biochem.* 1955. V. 42(6). P. 705.
- [488] Hamaguchi K. Studies on protein denaturation by surface chemical method: III. The interaction of urea with lysozyme monolayer // *J. Biochem.* 1956. V. 43(1). P. 83.
- [489] Thakur G., Wang C., Leblanc R.M. // *Langmuir*. 2008. V. 24. № 9. P. 4888.

-
- [490] Bonneté F., Malfois M., Finet S. et al. // *Acta Cryst. D*. 1997. V. 53. № 4. P. 438.
- [491] Braslau A., P.S. Pershan, G. Swislow, B.M. Ocko, J. Als-Nielsen, Capillary waves on the surface of simple liquids measured by x-ray reflectivity, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 2457–2470, <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.2457>.
- [492] Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Orth HD, Lang H (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber // *European Journal of Biochemistry* **47** (1): 91–97.
- [493] Betzel C, Pal GP, Saenger W. Three-dimensional structure of proteinase K at 0.15-nm resolution. *Eur J Biochem.* 1988 Dec 1;178(1):155-71. doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb14440.x. PMID: 3203685.
- [494] PDB файл - 2V8B
- [495] Hilz H, Wiegers U, Adamietz P (1975). Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins // *European Journal of Biochemistry* **56** (1): 103–108.
- [496] “Protein interfaces, surfaces and assemblies’ service PISA at the European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/pdbe/prot_int/pistart.html).
- [497] Trusek-Holownia A. (2003). Synthesis of ZAlaPheOMe, the precursor of bitter dipeptide in the two-phase ethyl acetate-water system catalysed by thermolysin // *J. Biotechnol.* 102 (2): 153–163
- [498] Dahlquist FW, Long JW and Bigbee WL (1976). Role of Calcium in the thermal stability of thermolysin // *Biochemistry* 15 (5): 1103–1111
- [499] Yagasaki, Makoto; Hashimoto, Shin-ichi (November 2008) Synthesis and application of dipeptides; current status and perspectives // *Applied Microbiology and Biotechnology* 81 (1): 13–22.
- [500] Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., Mertens, H. D. T., ... Svergun, D. I. (2017). ATSAS 2.8: a comprehensive

-
- data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions. *Journal of Applied Crystallography*, 50(4), 1212–1225.
- [501] Ooshima, H., Igarashi, K., Kato, J., Fujiwara, S., Tanaka, I., & Niimura, N. (1993). Mechanism of crystallization of thermolysin: A small angle neutron scattering study (vol.2). Ibaraki: JAERI.
- [502] Hamiaux, C., Pérez, J., Prangé, T., Veessler, S., Riès-Kautt, M., & Vachette, P. (2000). The BPTI decamer observed in acidic pH forms pre-exists as a stable species solution. *Journal of Molecular Biology*, 297(3), 697–712.
- [503] Herranz-Trillo, F., Groenning, M., van Maarschalkerweerd, A., Tauler, R., Vestergaard, B., & Bernado, P. (2017). Structural analysis of multi-component amyloid systems by chemometric SAXS data decomposition. *Structure*, 25(1), 5–15.
- [504] Meisburger, S. P., Taylor, A. B., Khan, C. A., Zhang, S., Fitzpatrick, P. F., & Ando, N. (2016). Domain movements upon activation of phenylalanine hydroxylase characterized by crystallography and chromatography-coupled small-angle X-ray scattering. *Journal of the American Chemical Society*, 138(20), 6506–6516.
- [505] Konarev, P. V., & Svergun, D. I. (2018). Direct shape determination of intermediates in evolving macromolecular solutions from small-angle scattering data. *IUCrJ*, 5(4), 402–409.