

УДК 548.5; 548.73; 538.9; 544.77.023.55

на правах рукописи

Марченкова Маргарита Александровна

**ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЙ  
КРИСТАЛЛИЗАЦИИ ЛИЗОЦИМА И ПОЛУЧЕНИЕ  
ПЛАНАРНЫХ СТРУКТУР НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ  
ЦИТОХРОМА С И ЛИЗОЦИМА**

Специальность 01.04.18 – «Кристаллография, физика  
кристаллов»

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва 2016

Работа выполнена в лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Института кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

**Научный  
руководитель:**

**Ковальчук Михаил Валентинович**  
член-корреспондент РАН,  
доктор физико-математических наук,  
профессор, президент НИЦ  
«Курчатовский институт»,  
заведующий отделом рентгеновских и  
синхротронных исследований ФНИЦ  
«Кристаллография и фотоника» РАН

**Официальные оппоненты:**

Эрнест Витальевич Суворов, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник лаб. структурных исследований Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физики твердого тела Российской академии наук.

Светлана Викторовна Тищенко, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаб. структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка РАН.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»»

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г. в \_\_\_ ч. \_\_\_ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по адресу 119333, г. Москва, Ленинский пр. 59, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ИК РАН <http://crys.ras.ru/>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета  
к.ф.-м.н.

К.В. Фролов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность работы.** В настоящее время активно разрабатываются гибридные наносистемы (ГНС), которые представляют собой сочетание органических и неорганических компонент. Такие системы обладают новыми уникальными свойствами, зачастую не являющимися простой суммой свойств отдельных компонент. Этим обуславливается перспективность применения ГНС практически во всех областях промышленности и медицины, а также актуальность задачи поиска новых методов их создания.

Существует два подхода к созданию гибридных систем. Первый, наиболее популярный, представляет собой создание материалов, имеющих наномасштабные размеры и сочетающих органические и неорганические компоненты, распределенные в объеме. На таких размерах значительно меняются свойства составляющих и, как следствие, свойства гибридного наноматериала достаточно трудно предсказать. Особую трудность в такой системе представляет организация связей между органической и неорганической компонентами и организация 3D архитектуры всей системы.

Второй подход, используемый в настоящей работе, предполагает создание планарных органических подсистем на неорганических подложках, которые могут представлять собой готовые технологические решения с заданными связями и 2D архитектурой.

В настоящей работе выбран ранее не использованный вариант органической подсистемы в виде пленки белка, поэтому особое значение имеет получение наиболее полных данных о структуре таких систем и их компонентах на всех этапах их формирования. Для решения этой задачи необходимо привлечение неразрушающих прецизионных методов исследования структуры, в том числе развитых для изучения неорганических кристаллов, и их адаптация к исследуемым объектам.

В качестве материала органической подсистемы выбраны белки цитохром *c* (ЦитС) и лизоцим (Лиз). ЦитС – железосодержащий водорастворимый белок, выполняющий в клетке несколько функций. С одной стороны, он участвует в процессах внутриклеточного дыхания, поскольку способен к обратимому одноэлектронному взаимодействию:  $Fe^{3+} + e^- \leftrightarrow Fe^{2+}$ ; окисленную форму ЦитС можно рассматривать в качестве антиоксиданта:  $O_2^- + \text{Цит}(Fe^{3+}) \rightarrow O_2 +$

Цит( $\text{Fe}^{2+}$ ); с другой стороны, будучи связанным с фосфолипидом митохондриальной мембраны кардиолипином, играет ключевую роль в запуске процесса запрограммированной гибели клетки – апоптоза. Поэтому данный белок является перспективным для создания различных сенсоров на его основе. Лиз – небольшой водорастворимый белок, является одним из наиболее изученных белков. В частности, ему посвящено наибольшее число работ, по исследованию процессов роста кристаллов и влиянию условий на структуру кристалла. Это позволяет получить достаточно крупные (0.2-0.6 мм) кристаллы этого белка в достаточно большом диапазоне условий и использовать его в качестве модельного объекта для адаптации методов структурной диагностики органических компонент ГНС.

### **Цель работы:**

Развитие подходов к созданию и исследованию структуры гибридных наносистем, представляющих собой упорядоченные органические пленки белков цитохрома *c* и лизоцима на диэлектрических и полупроводниковых подложках; изучение особенностей различных стадий кристаллизации лизоцима.

В соответствии с поставленными целями в работе решались следующие задачи:

1. Разработка модификации метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволновой дифракции для изучения тонкой структуры приповерхностного слоя органических многослойных пленок;

2. Поиск условий для получения конденсированной пленки на основе белков цитохрома *c* и лизоцима;

3. Разработка специализированной ячейки для возможности проведения рентгеновских и оптических исследований пленок и кристаллов различных белков. Изучение *in situ* процесса роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии;

4. Исследование начальных стадий процесса кристаллизации белка лизоцима тетрагональной сингонии в растворах. Выявление закономерностей образования олигомеров в кристаллизационном растворе и их связи со структурой.

### **Научная новизна:**

1. Разработан модифицированный метод на основе метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового

взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей. Его эффективность была показана на примере изучения тонкой структуры приповерхностного слоя органических многослойных пленок на неорганической подложке;

2. Впервые получены пленки белка цитохрома *c* с липидом тетраолеил кардиолипином, изучена кинетика взаимодействия данного белка с ленгмюровскими липидным монослоями, получены константы связывания белка цитохрома *c* с монослоями бычьего и тетраолеил кардиолипина. Выдвинуто предположение об изменении конформации белка («стратификация») при его адсорбции на границе раздела вода-воздух или при встраивании в монослой кардиолипина на поверхности жидкости: одна половина глобулы белка становится преимущественно гидрофобной, а другая – гидрофильной;

3. Разработана специализированная герметичная кристаллизационная ячейка с замкнутой атмосферой, позволяющая рентгеновскими и оптическими методами в режиме *in situ* исследовать рост белковых кристаллов и других подобных высокомолекулярных соединений. Проведены *in situ* исследования процессов зарождения, роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии на различных подложках, в том числе на проводящем подслое оксида индия-олова (ИТО), что позволяет изучать их структуру в условиях внешних воздействий (электрические поля, акустические волны);

4. Впервые установлена связь между комплексами молекул лизоцима, образующимися в растворе на ранней стадии кристаллизации, и структурой полученного при данных условиях белкового кристалла;

5. Впервые методом молекулярного моделирования из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии выделены возможные олигомеры, которые могут являться элементарным строительным блоком соответствующего кристалла, существование которых подтверждено методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

#### **Практическая значимость:**

Развитая в данной работе модификация метода стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия

позволяет исследовать структуру тонких приповерхностных слоев органических многослойных систем.

Полученные пленки цитохром *c*-кардиолипидов можно использовать для изучения процессов, происходящих в митохондриальной мембране (в том числе ранние стадии апоптоза), и создания различных сенсоров на их основе.

Разработанная ячейка позволяет проводить рентгеновские и оптические *in situ* исследования пленок и кристаллов различных белков, в том числе изучать процессы роста и деградации кристаллов, и может быть использована для отработки технологии создания сенсоров на основе белковых структур.

Полученные результаты о взаимосвязи образования олигомеров с началом процесса кристаллизации позволяют предложить новый алгоритм поиска условий кристаллизации путем исследования кристаллизационных растворов и обнаружения в них олигомеров на самых ранних стадиях кристаллизации.

**На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:**

1. Модифицированный метод стоячих рентгеновских волн без регистрации вторичных процессов в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей для изучения тонкой структуры приповерхностного слоя органических многослойных пленок;

2. Результаты кинетики формирования конденсированной пленки цитохром *c*-кардиолипидов на поверхности жидкости в процессе адсорбции белка на липидном Ленгмюровском монослое;

3. Результаты исследования *in situ* процессов роста и деградации кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии на кристаллической подложке с помощью специализированной кристаллизационной измерительной ячейки;

4. Подход к изучению начальной стадии кристаллизации лизоцима, основанный на анализе структуры белкового кристалла, выделении его возможных элементарных строительных блоков и исследовании растворов в условиях кристаллизации методом МУРР с целью обнаружения этих блоков;

5. Результаты исследования методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей изменения состояния молекул лизоцима в

растворе на начальной стадии процесса кристаллизации: определение взаимосвязи между условиями роста и количеством октамеров, образовавшихся в кристаллизационном растворе.

**Личный вклад автора:**

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

Автором лично изготовлены все изученные образцы – монослои на поверхности жидкости, многослойные пленки, кристаллы белков.

Автором исследованы стадии формирования пленок кардиолипина на поверхности жидкости, кинетика адсорбции цитохрома *c* на липидном монослое, упругие свойства сформированных белково-липидных пленок. Произведена обработка полученных данных.

Автор принимала участие в разработке кристаллизационной ячейки с замкнутой атмосферой и рентгенопрозрачным окном и использовала ее для роста кристаллов.

Автор принимала участие в проведении молекулярного моделирования различных олигомеров, выделенных из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, а также структуры пленки стеарата свинца. Полученные модели использовались для интерпретации экспериментальных данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей от раствора лизоцима и стоячих рентгеновских волн в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей от пленки стеарата свинца.

Автор непосредственно участвовала в проведении всех описанных в диссертационной работе рентгеновских экспериментах в лабораторных условиях и на источнике синхротронного излучения методами рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, рентгеновской дифрактометрии и малоуглового рассеяния рентгеновских лучей.

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

**Апробация результатов работы:**

Материалы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на молодежных конкурсах научных работ ИК РАН в 2013 и 2015 годах, а также на международных и национальных конференциях (см. [6-13] в списке основных работ).

### Публикации:

В диссертацию включены результаты, опубликованные в 13 публикациях, из которых 5 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК.

### Структура и объем диссертации:

Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 144 страницы, включая 66 рисунков, 3 таблицы и список литературы из 138 наименований.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** содержится обоснование актуальности проводимых исследований, и излагаются цели диссертационной работы. Отмечены новизна и практическая значимость работы, представлены сведения об апробации результатов работы и публикациях.

В **главе 1** обозначена важность и перспективность ГНС за счет сочетания органических и неорганических компонент. На сегодняшний день основными компонентами ГНС являются полимеры и красители, при этом белки являются крайне перспективными из-за широкого круга функциональных свойств, возможности формирования аморфных и кристаллических пленок с высокоупорядоченной структурой. Проведен анализ существующих методов создания органической части ГНС – органических тонких пленок (методы Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ), Ленгмюра-Шеффера (ЛШ), центрифугирования, печати, самосборки, послойной сборки) и кристаллов белков (кристаллизация в объеме, диффузия в парах, встречная диффузия, диализ).

Проведен анализ литературных данных, в которых описаны исследования получения пленок цитохрома *c* (ЦитС) с липидами, изучения различных стадий роста кристаллов лизоцима (Лиз), в том числе начальной стадии.

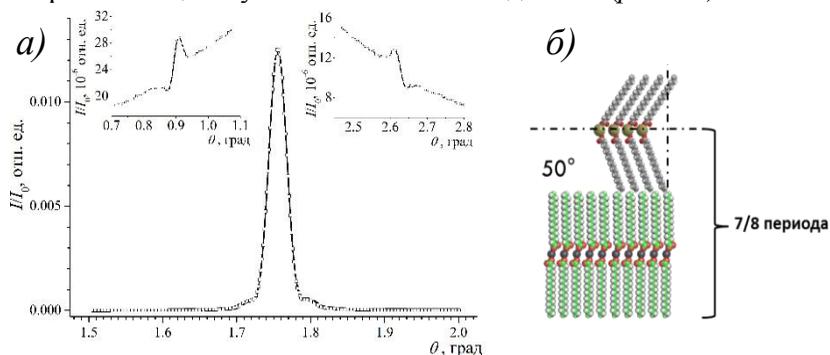
В **главе 2** описаны примененные в данной работе аппаратурно-методические подходы для создания планарных структур на основе белков на полупроводящих и диэлектрических подложках и их исследования на различных стадиях получения.

Особенностью органических структур являются на порядок большие по сравнению с неорганическими кристаллами межплоскостные расстояния. В связи с этим дифракционные

максимумы располагаются близко друг к другу, что приводит к их взаимодействию. Эта особенность позволила разработать модификацию метода стоячих рентгеновских волн (СРВ) без измерения вторичных процессов, в котором используется многоволновое взаимодействие рефлексов, соответствующих разным порядкам дифракции на одной и той же системе атомных плоскостей. Метод апробирован на примере структуры многослойной пленки стеарата свинца (40 периодов с межплоскостным расстоянием  $c = 50 \text{ \AA}$ ) на кремниевой подложке.

Сравнение измеренных с помощью  $\theta$ - $2\theta$  и  $\omega$ -сканирований картин рентгеновской дифракции в области многоволнового взаимодействия сильного и слабого рефлексов ((002, 001), (002, 003), *рис. 1а*) с теоретическими расчетами позволяет предположить, что слой ионов свинца, находящийся в приповерхностной области пленки, в усреднении по области засветки смещен относительно идеального расположения по нормали на  $c/8$ .

Такой сдвиг ионов свинца в приповерхностных слоях может быть связан с наклоном гидрофобных хвостов последнего слоя стеарата свинца на угол  $50^\circ$  считая от подложки (*рис. 1б*).



*Рис. 1. а) Экспериментальные зависимости дифракционных отражений многослойной пленки стеарата свинца: симметричное (в центре) и асимметричное отражение 002 в области 001 (слева) и 003 (справа), б) Изменение структуры приповерхностного слоя многослойной периодической пленки стеарата свинца, обусловленное наклоном молекул верхнего слоя относительно внешней нормали к ее поверхности*

Для проведения неразрушающих исследований структуры белкового кристалла непосредственно наложке, а также для изучения *in situ* процессов роста и деградации кристаллов, в ИК РАН

была разработана специализированная кристаллизационная ячейка с замкнутой атмосферой (рис. 2).

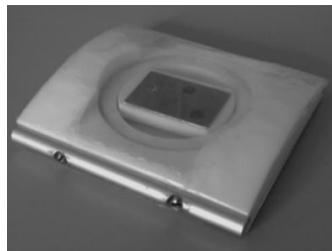
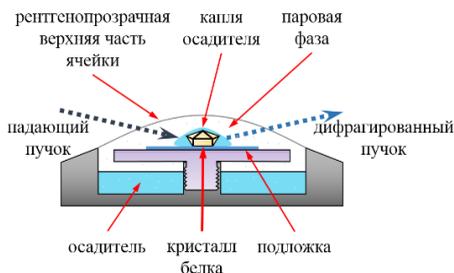


Рис. 2. Разработанная в ИК РАН герметичная кристаллизационная ячейка для получения белковых кристаллов на кристаллической подложке с рентгенопрозрачным окном. а) схематическое изображение; б) внешний вид

Конструкция ячейки позволяет реализовать различные рентгенодифракционные схемы. 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 слабо поглощающего в рентгеновском диапазоне. Таким образом, ячейка обеспечивает возможность получения изображений на оптическом микроскопе и проведения рентгенодифракционных *in situ* исследований.

Рентгенодифракционные эксперименты выполнялись на дифрактометре SmartLab Rigaku, оснащенный источником излучения с вращающимся молибденовым анодом ( $\lambda = 0.709 \text{ \AA}$ ) мощностью 9 кВт.

Для исследования структуры белковых растворов описаны методы рассеяния, примененные в данной работе: динамическое рассеяние света (ДРС) и МУРР, показана их применимость для изучения структуры кристаллизационного раствора Лиз.

Метод ДРС основан на анализе спектра рассеянного света. Используя этот метод при исследовании растворов можно получить информацию о размерах рассеивающих объектов. Исследование растворов Лиз и Лиз с осадителем в условиях кристаллизации Лиз тетрагональной сингонии методом ДРС проводили на приборе Zetasizer Nano – ZS (Malvern Instruments Ltd.) в ячейке с

поддержанием температуры  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  на длине волны  $\lambda = 633$  нм, при угле рассеяния  $173^\circ$ .

Малоугловое рассеяние – когерентное диффузное рассеяние мономатричных рентгеновских лучей и нейтронов вблизи первичного луча на аperiодических флуктуациях электронной плотности в материалах. Метод МУРР позволяет изучить поведение отдельных белковых молекул в растворе на самых ранних стадиях процесса кристаллизации, когда в растворе еще нет упорядоченных кластеров молекул [1].

Исследования кристаллизационного раствора Лиз методом МУРР проводились как на лабораторном дифрактометре Амур-К ( $\lambda = 0.1542$  нм), так и на синхротронной станции ДИКСИ, НИЦ КИ ( $\lambda = 0.162$  нм), на которой интенсивность пучка, падающего на исследуемый раствор в капилляре, составляла  $10^9$  квантов/сек., что на несколько порядков превышает интенсивность лабораторного источника.

Образцы помещали в тонкостенные стеклянные капилляры. Для реализации изменения кристаллизационных условий в растворе использовали специальную термостатируемую ячейку: капилляры помещали в латунный держатель с проточным теплоносителем, подключенный к водяному термостату. Температуру контролировали с помощью цифрового термодатчика, расположенного в непосредственной близости от образца.

**Глава 3** посвящена получению и исследованию белковых и белково-липидных пленок на основе ЦитС и Лиз.

Были изучены особенности формирования ленгмюровских монослоев липидов, входящих в состав митохондриальной мембраны. В качестве таких липидов были выбраны бычий кардиолипином (БКЛ), тетраолеил кардиолипин (ТОКЛ) (данные липиды отличаются составом жирных кислот: БКЛ содержит остатки полиненасыщенных жирных кислот в разном соотношении, ТОКЛ содержит 4 остатка олеиловой кислоты, в следствии чего является устойчивым к пероксидации). Получены изотермы сжатия (зависимость поверхностного давления от площади, приходящейся на одну молекулу) для каждого липида.

Подобраны условия формирования монослоя ЦитС, изучены особенности формирования и упругие свойства монослоя данного белка. Экспериментально показано, 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  $\pi_0$  – выбранное начальное поверхностное давление липидного монослоя, определяющее плотность упаковки липидов в монослое;  $\Delta\pi_\infty$  – конечное приращение поверхностного давления, отражающее степень сжатия липидного монослоя после встраивания белка;  $\beta$  – константа связывания ЦитС с липидным монослоем псевдо-первого 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 перекисидации, параметры адсорбции были примерно одинаковыми. Это показывает, что перекисидация БКЛ, вызванная воздействием воздуха, не влияет на процесс встраивания ЦитС в липидный монослой.

На кинетику адсорбции оказывало влияние количество центров связывания, а скорость встраивания ( $\beta$ ) была пропорциональна концентрации белка в субфазе. 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.

Основываясь на экспериментальных результатах в совокупности с литературными данными, выдвинуто предположение, что белок меняет свою конформацию во время его адсорбции на границе раздела вода-воздух или при встраивании в монослой КЛ на поверхности жидкости. По-видимому, одна половина глобулы белка становится преимущественно гидрофобной, а другая – гидрофильной, то есть формируется так называемый «стратифицированный» ЦитС. 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 (рис. 3). Именно такое изменение конформации ЦитС может объяснять его особенности взаимодействия с бислошной мембраной.

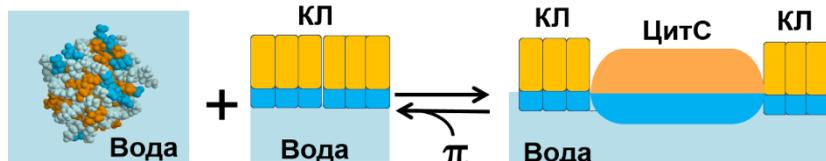


Рис. 3. Изменение конформации цитохрома с при встраивании в монослой кардиолипина. Слева – структура поверхности цитохрома с. Атомы показаны как сферы с радиусами Ван-дер-Ваальса. Положительно заряженные аминокислотные остатки, показанные синем, полярные – голубым, другие – коричневым

Поскольку данная система представляет собой сложный объект, адаптацию существующих прецизионных методов исследования структуры белковых пленок на всех этапах формирования проводили на модельных системах белка Лиз.

Были апробированы и развиты разные методы создания сплошной пленки Лиз, наилучшая пленка формируется «ножевым» методом, оценочная толщина пленки по данным рентгеновской рефлектометрии составляет  $70 \pm 10 \text{ \AA}$ .

В главе 4 на примере кристалла Лиз тетрагональной сингонии получены первые результаты *in situ* исследований стадий зарождения, роста и деградациии белкового кристалла на подложках кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии.

Кристаллизацию белка проводили методом диффузии в парах в варианте «сидячей капли» [2] на монокристаллах кремния (Si) с графоэпитексиальным рельефом и с гладкой поверхностью. Подложки размещались в центральной зоне пьедестала кристаллизационной ячейки, возвышающегося над резервуаром с осадителем (рис. 1).

Кристаллы формировались за 48–96 ч, и достигали максимальных размеров через ~7–9 сут (~190 ч) после начала кристаллизации. Линейные размеры кристаллов составляли от 350 до

800 мкм, высота кристаллов составляла в среднем 300 мкм (от 150 до 450 мкм).

Первоначально ячейка с каплями растворов белка и осадителя помещалась в оптический микроскоп для наблюдения процесса зарождения и начального этапа кристаллизации лизоцима. На указанных стадиях кристаллизации фиксировались размеры, количество образовавшихся в каждой капле кристаллов и индексировались их грани.

На стадии формирования кристаллов, начиная с размеров ~ 200–300 мкм, кристаллизационная ячейка устанавливалась на гониометр рентгеновского дифрактометра и проводилась серия рентгенодифракционных *in situ* экспериментов, заключающихся в измерении  $\theta$ - $2\theta$  кривых дифракционного отражения с узкой щелью перед детектором в широком диапазоне углов  $\theta$ . Получающийся в результате такого эксперимента набор пиков соответствует дифракционным максимумам отражения различных порядков от одной системы атомных плоскостей, на которую предварительно настраивается образец. Угловое положение этих пиков позволяет с высокой точностью определить величину параметра решетки получившегося кристалла, а их полуширина – оценить степень его структурного совершенства.

Показано, что в отличие от рассеяния от подложки и «пустой» капли осадителя при рассеянии от капли с кристаллами через 96 ч начинает формироваться дифракционные пики от кристаллов Лиз.

В последующие 26 часов не только уменьшается полуширина и увеличивается интенсивность дифракционных пиков, но и происходит их смещение по шкале углов  $\theta$ - $2\theta$ . При этом некоторые пики по истечении указанного времени (96-122 ч) исчезают.

Проведенный анализ дифракционных пиков на стадии формирования кристалла показал, что уширение данных пиков связано с их сложной структурой и отражает малые размеры и неоднородную структуру кристаллов на стадии их зарождения. Аналогичный вид кривых дифракционного отражения (КДО) наблюдается в кристаллах с дефектами кристаллической структуры, такими как двойники, блоки, зерна и т.п.

Увеличение интенсивности и уменьшение полуширины КДО, наблюдаемое с течением времени, может быть связано с увеличением размеров кристаллов Лиз, и с повышением качества их

структуры, которое обычно происходит при росте и формировании спонтанно зародившихся кристаллов.

Следующие измерения кривых качания и их индексация проводились через 192 часа, на стадии роста, когда кристаллы уже сформировались и достигали размеров  $\sim 500 - 700$  мкм.

Регистрируемые в эксперименте дифракционные отражения, соответствуют отражениям от системы атомных плоскостей (110), значения полуширин КДО (отражение 440, полуширина КДО составила 28.3 угл. с) свидетельствуют о высоком качестве выращенных кристаллов.

Регистрируемая дифракционная картина оставалась стабильной в течение длительного времени (более 100 часов). Это связано с тем, что кристаллы сохранялись до полного испарения осадителя, предотвращающего разложение белка. После испарения осадителя начиналась стадия деградации кристаллов.

Измерения  $\theta$ - $2\theta$  дифрактограмм (рис. 4) проводились с интервалом не менее 24 часов. В ходе эксперимента интенсивности дифракционных отражений резко уменьшаются, а полуширины – увеличиваются. Очевидно, что это связано с образованием дефектов кристаллической структуры и соответствует деформациям кристаллической решетки порядка  $\Delta d/d \sim 10^{-3}$ .

Деградация кристаллов Лиз наблюдалась также методом оптической микроскопии. По фотографиям (рис. 4б) видно, что изменение формы происходит неоднородно.

На примере кристалла Лиз показаны возможности комплементарного применения методов рентгеновской дифракции и оптической микроскопии для получения важных сведений о стадиях зарождения, роста и деградации белкового кристалла на неорганической подложке.

Качество получаемых кристаллов Лиз тетрагональной сингонии (полуширина КДО рефлекса (220) составила 28.8 угл. с) соответствует качеству лучших образцов кристаллов, выращенных в условиях земной гравитации [3,4] (полуширина КДО 24–45 угл. с), но уступает кристаллам, выращенным в условиях невесомости [4] (полуширина КДО 10–17 угл. с).

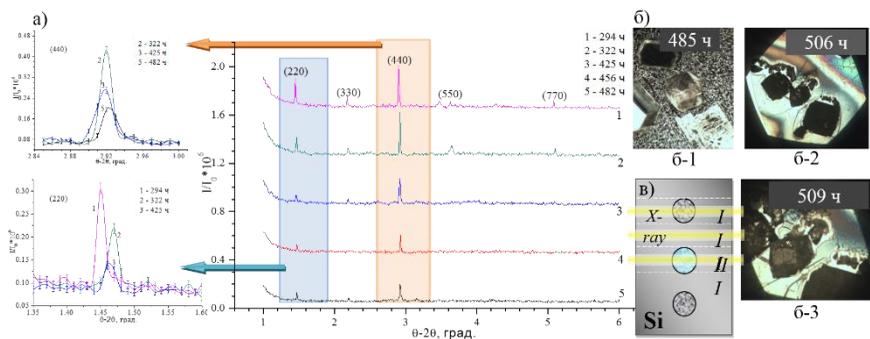


Рис. 4. а) Серия дифракционных пиков, кривых  $\theta$ - $2\theta$ -сканирования (1 – 5), соответствующих семейству отражений (110) кристаллов тетрагонального лизоцима после испарения осадителя в процессе их деградации. На вставке – изменения кривых дифракционного отражения (440) и (220). На графиках для каждой кривой 1 – 5 указано время после загрузки кристаллизационной ячейки. (б) – Изображения, полученные на оптическом микроскопе на стадии деградации кристаллов. Фото б-3 получено после вскрытия ячейки. (в) – Схематично показаны расположение на подложке Si капель, в которых происходит кристаллизация белка (k1 и k3), «реперной» капли осадителя без белка (k2), и положения рентгеновского пучка при проведении измерений (I – III)

Глава 5 представлены результаты *in situ* исследования состояния молекул Лиз на стадии начала процесса кристаллизации методом МУРР.

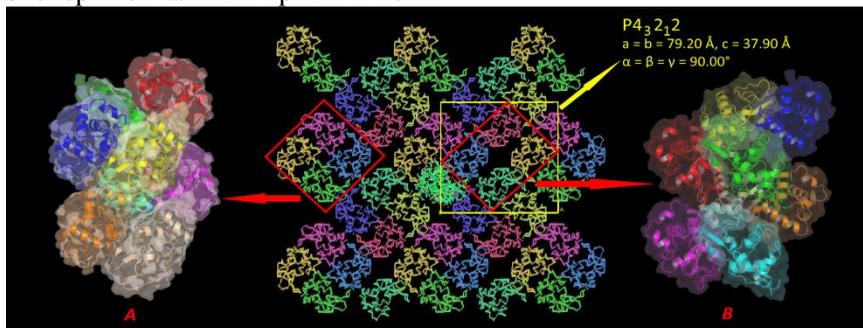
Методом ДРС было показано, что максимум распределения частиц по радиусам приходится на 2.1 нм, что примерно соответствует гидродинамическому радиусу молекулы Лиз (1.9 нм). При добавлении осадителя наблюдалась тенденция к укрупнению частиц в растворе, так же как в [5]. Было показано, что максимум распределения смещается на 4.0 нм, что может соответствовать образованию агрегатов из 8 молекул. Однако существующий на сегодняшний день математический аппарат обработки данных для данного метода не позволяет определить ни тип образующихся частиц, ни их концентрацию.

Предварительные результаты исследования растворов белка Лиз методом МУРР были проведены на лабораторном источнике. Показано, что при добавлении осадителя в растворе появляются олигомеры, размер которых соответствует октамеру. Более

детальное изучение процесса кристаллизации проводили на станции ДИКСИ, НИЦ КИ.

На основе анализа структуры упаковки молекул в кристалле Лиз тетрагональной сингонии был выделен октамер, из которого можно полностью построить кристалл. В структуре такие октамеры можно выбрать различными способами. Выбранные олигомеры отличаются по размерам, плотности и упаковке молекул Лиз в них. Октамер наименьшего объема (октамер А) ( $117 \text{ нм}^3$ ) имеет винтовую ось симметрии  $4_3$ , наибольшего (октамер В) ( $140 \text{ нм}^3$ ) – ось симметрии 2 порядка.

На *рис. 5* представлена проекция структуры кристалла Лиз тетрагональной сингонии, перпендикулярная оси 4 порядка (по центру). Кластеры, состоящие из 8 молекул, формирующие кристалл выделены красным (слева и справа). Модели двух выбранных октамеров, а также других олигомеров, являющихся их составляющими, были использованы для обработки полученных экспериментальных кривых МУРР.



*Рис. 5. Проекция структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии (PDB ID: 4WLD), перпендикулярная оси 4 порядка (по центру). Два октамера (А и В), которые могут быть единицами роста кристалла. Молекулы раскрашены в разные цвета для большей наглядности*

Были исследованы пересыщенный раствор белка в смеси с осадителем, раствор чистого белка в том же буфере и при той же концентрации, раствор осадителя и буферный раствор. Рассеяние от последнего вычитали из данных после приведения измерений к нулевому поглощению. Исследования состояния молекул Лиз в смеси с осадителем проводили при разных температурах в диапазоне  $10\text{--}40^\circ \text{C}$ .

Результаты исследования растворов белка Лиз методом МУРР на синхротронной станции ДИКСИ (НИЦ КИ) показали, что раствор белка является монодисперсным с максимумом распределения частиц по диаметрам 3.5 нм (рис. 6).

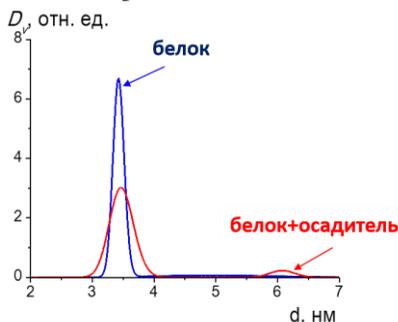


Рис. 6. Объемные распределения по диаметрам сферических частиц от раствора лизоцима (синим) и от раствора лизоцима с осадителем (красным)

При добавлении осадителя появляется второй максимум: образуются частицы с эффективным размером 6 нм. Объем таких агрегатов соответствуют восьми молекулам Лиз (октамеру).

Полученные кривые рентгеновского рассеяния для раствора белка с концентрацией 40 мг/мл, при температурах 10, 25 и 35 °С представлены на рис. 7а.

Кривые зависимости интенсивности рассеяния рентгеновского излучения от величины вектора рассеяния при разных температурах для белкового раствора без осадителя не отличаются друг от друга. По форме кривых от раствора белка без осадителя видно, что наблюдается влияние межчастичной интерференции, приводящей к относительному уменьшению интенсивности рассеяния в начальных углах. При добавлении осадителя форма кривых рассеяния меняется, уменьшается концентрационный эффект, что говорит об изменении состояния белковых молекул в пересыщенном растворе с осадителем.

Добавление осадителя к раствору белка приводит к изменению взаимодействия между молекулами [6]. В условиях кристаллизации кривые рассеяния значительно отличаются друг от друга при различных температурах. Таким образом, распределение олигомеров в растворе меняется при изменении температуры. На кривых

рассеяния от аналогичных по концентрации растворов белка с осадителем эффект межчастичной интерференции становится заметен при повышении температуры в кристаллизационных условиях, что свидетельствует о меньшей степени агрегации макромолекул (рис. 7б). Наличие агрегатов приводит к увеличению интенсивности на самых малых углах, что компенсирует спад кривых рассеяния при интерференции.

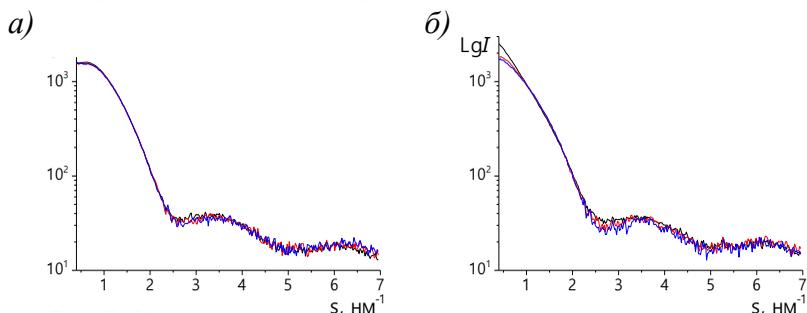


Рис. 7. Кривые малоуглового рассеяния, полученные при различных температурах. 10 °С (черным), 25 °С (красным), 35 °С (синим). Данные получены для образцов: а) раствор лизоцима 40 мг/мл; б) раствор лизоцима (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл)

Для каждого олигомера были рассчитаны модельные кривые МУРР. Экспериментальные данные были интерполированы методом наименьших квадратов, как сумма интенсивностей рассеяния от модельных компонентов: мономеров, димеров, тетрамеров, гексамеров и октамеров лизоцима. Коэффициенты, определяющие вклады рассеяния от каждого олигомера в общую картину рассеяния, при которых наблюдается наилучшее совпадение экспериментальной и расчетной кривых МУРР, отвечают концентрациям соответствующих олигомеров (Таблица 1).

Обработка экспериментальных данных, с учетом двух различных моделей октамеров и их составляющих показала, что в растворах в предкристаллизационном состоянии кроме мономеров образуются димеры и октамеры. Не зависимо от выбранной модели олигомеров тетрамеры и гексамеры в кристаллизационном растворе не обнаружены. При этом по мере повышения температуры, то есть удаления от области кристаллизации на фазовой диаграмме, количество олигомеров в растворе уменьшается.

Таблица 1. Относительная концентрация олигомеров лизоцима (типа А) для различных температур, полученная из кривых малоуглового рассеяния от раствора лизоцима (40 мг/мл) с осадителем (25 мг/мл).

Вид кластера	Концентрация, %		
	T=10°C	T=25°C	T=35°C
Мономер	83±4	95±4	97.9±0.6
Димер	8±4	1±4	0
Тетрамер	0	0	0
Гексамер	0	0	0
Октамер	8.8±1.0	3.8±1.0	2.1±0.3
$\chi^2$	3.2	2.2	1.6

Полученные результаты указывают на высокую вероятность правильности предложенной модели кристаллизации, когда элементарным кластером, образующим кристалл, является структурный блок, состоящий из восьми молекул Лиз, – октамер.

### Выводы и основные результаты работы:

1. Предложен новый способ определения структуры поверхностного слоя на основе разработанного модифицированного метода СРВ без регистрации вторичных процессов в условиях многоволнового взаимодействия различных порядков дифракционного отражения от одного семейства атомных плоскостей. Метод был апробирован на многослойной пленке стеарата свинца. Показано, что структура верхнего слоя значительно отличается от структуры остального объема образца: гидрофобные хвосты последнего слоя стеарата свинца наклонены по отношению к нормали к поверхности под углом 40°;

2. Проведена отработка условий формирования лентмюровских монослоев и получены пленки ЦитС, липидов, входящих в состав митохондриальной мембраны (БКЛ, ТОКЛ) и белково-липидные пленки на их основе. Исследована кинетика адсорбции ЦитС на липидных монослоях. Основываясь на экспериментальных результатах в совокупности с литературными данными, выдвинуто предположение, что белок меняет свою конформацию во время его адсорбции на границе раздела вода-воздух или при встраивании в монослой КЛ на поверхности жидкости: одна половина глобулы белка становится преимущественно гидрофобной, а другая – гидрофильной («стратифицированный» ЦитС);

3. В разработанной специализированной ячейке проведены оптические и рентгеновские исследования *in situ* процессов роста и деградации кристалла Лиз тетрагональной сингонии на неорганических подложках, в том числе, на проводящей. Благодаря контролю роста удалось вырастить кристаллы (полуширина КДО отражения (220) составила 28.8 угл. с), которые по качеству соответствуют лучшим кристаллам, выращенным в условиях земной гравитации (полуширина КДО 24–45 угл. с). На примере выращенного кристалла Лиз тетрагональной сингонии на проводящем подслое ИТО показано, что данный подслои не оказывает влияния на структуру получаемого кристалла;

4. Предложен и экспериментально подтвержден новый подход к исследованию начальной стадии процесса кристаллизации белков, основанный на выделении основных мотивов в структуре белковых кристаллов, определяющих образование комплексов в растворе. На основе анализа структуры упаковки молекул в кристалле Лиз тетрагональной сингонии были выделены октамеры, из которых можно полностью построить кристалл. Объем таких октамеров составляет  $\sim 120 \text{ нм}^3$ . 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, соответственно, большего отклонения условий кристаллизации от оптимальных, количество олигомеров в растворе уменьшалось вплоть до полного их исчезновения (в пределах погрешности). Полученные результаты указывают на высокую вероятность предложенной модели кристаллизации, когда элементарным кластером, образующим кристалл, является структурный блок, состоящий из восьми молекул Лиз. Таким образом, обнаружение олигомеров в растворе может явиться критерием поиска оптимальных условий кристаллизации белков.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМЫХ РАБОТ

1. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. New York: Plenum Press, 1987. 176 p.
2. McPherson A. Introduction to protein crystallization. // *Methods*. 2004. Vol. 34, № 3. P. 254–265.
3. Volz H.M., Matyi R.J. Triple-axis X-ray diffraction analyses of lysozyme crystals // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2000. Vol. 56, № 7. P. 881–889.
4. Snell E.H. et al. Improvements in lysozyme protein crystal perfection through microgravity growth // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1995. Vol. 51, № 6. P. 1099–1102.
5. Cui H.L. et al. Study of Growth Mechanism of Lysozyme Crystal by Batch Crystallization Method // *Chinese Chem. Lett.* 2006. Vol. 17, № 1. P. 101–104.
6. Ducruix A. et al. Protein interactions as seen by solution X-ray scattering prior to crystallogenesis // *J. Cryst. Growth*. 1996. Vol. 168, № 1-4. P. 28–39.

**Список основных авторских публикаций по теме диссертации:**

1. А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, М.В. Ковальчук, В.Г. Кон, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков. *Кристаллография*. 2016. Том 61. № 3. С. 1 – 9.

2. M.V. Kovalchuk, A.E. Blagov, Yu.A. Dyakova, A.Yu. Gruzinov, М.А. Marchenkova, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevskiy, V.I. Timofeev and V.V. Volkov. *Crystal Growth & Design*. 2016. Doi: 10.1021/acs.cgd.5b01662.

3. 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. *Кристаллография*. 2016. Том 61. № 1. С. 14 – 19.

4. М.А. Marchenkova, Yu.A. Dyakova, E.Yu. Tereschenko, M.V. Kovalchuk and Yu.A. Vladimirov. *Langmuir*. 2015. 31 (45). P. 12426.

5. М.В. Ковальчук, П.А. Просеков, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, Е.Ю. Терещенко, Ю.В. Писаревский, О.А. Кондратьев. *Кристаллография*. 2014. том 59. № 5. С. 679–684.

6. А.Е. Благов, В.В. Волков, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, М.В. Ковальчук, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, Е.Ю. Терещенко «Исследования начальной стадии кристаллизации белка лизоцима методом малоуглового рентгеновского рассеяния» / XIII Курчатовская молодежная научная школа, Москва, 27-30 октября 2015, С. 62.

7. М.А. Марченкова, А.С. Бойкова, К.Б. Ильина, Ю.А. Дьякова, А.Ю. Серегин, Е.Ю. Терещенко, Ю.А. Владимиров, М.В. Ковальчук «Изучение структуры и свойств комплексов цитохрома с с монослоями бычьего природного кардиолипина и тетраолеилкардиолипина на поверхности жидкости» / Седьмой международный научный семинар и пятая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики», В.Новгород, 24-30 августа 2015, С. 146.

8. К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, Ю.А. Дьякова, В.В. Волков, Е.Ю. Терещенко, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследования методом малоуглового рентгеновского рассеяния процесса кристаллизации белка лизоцима» / Седьмой международный научный семинар и пятая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики», В.Новгород, 24-30 августа 2015, С. 82.

9. Yu.A. Dyakova, **M.A. Marchenkova**, V.V. Volkov, P.A. Prosekov, A.E. Blagov, K.B. Ilina, V.I. Timofeev, Yu.V. Pisarevsky., E.Yu. Tereschenko, M.V. Kovalchuk «*In situ* study of the lysozyme crystallization process by saxs and high-resolution xrd methods» / Международная летняя школа для молодых ученых «Исследования материалов с высоким разрешением: основы и приложения», Германия, Зеллин 22-28 августа 2015.

10. А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, О.А. Кондратьев, **M.A. Марченкова**, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, Е.Ю. Терещенко, М.В. Ковальчук. «*In situ* исследование процессов роста и деградации кристаллов лизоцима на подложке кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии» / Совещание российских пользователей источников синхротронного и нейтронного излучений Москва, 2-3 июля 2015.

11. **M.A. Марченкова**, А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, К.Б. Ильина, А.Ю. Серегин, С.Н. Якунин, Ю.А. Владимиров, Е.Ю. Терещенко, М.В. Ковальчук. «Изучение комплексов цитохрома *c* с монослоем кардиолипина» / Совещание по использованию рассеяния нейтронов и синхротронного излучения в конденсированных средах, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, 27-31 октября 2014, С.81.

12. P.A. Prosekov, **M.A. Marchenkova**, A.E. Blagov, Yu.A. Dyakova, E.Yu. Tereschenko, L.A. Zadorozhnaya, Yu.V. Pisarevsky, O.A. Kondratev, N.V. Marchenkov, M.V. Kovalchuk. «*In situ* study of growth and degradation processes in tetragonal lysozyme crystals on silicon substrates by High-Resolution X-ray Diffraction» / 12th Biennial Conference on High-Resolution X-Ray Diffraction and Imaging (ХТОР 2014), Grenoble & Villard-de-Lans, September 14-19, 2014, P. 166

13. П.А. Просеков, **M.A. Марченкова**, А.Е. Благов, Ю.А. Дьякова, Е.Ю. Терещенко, Л.А. Задорожная, Ю.В. Писаревский, О.А. Кондратьев, Н.В. Марченков, М.В. Ковальчук. «Исследования *in situ* процессов зарождения, роста и деградации кристаллов лизоцима методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии» // VIII международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация как форма самоорганизации вещества», Иваново, 24-27 июня 2014, С. 189.