

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

ИНСТИТУТ КРИСТАЛЛОГРАФИИ ИМ. А.В. ШУБНИКОВА РАН

На правах рукописи

Ильина Ксения Борисовна

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ БЕЛКА
ЛИЗОЦИМА ПРИ РОСТЕ КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ
СИНГОНИИ**

Специальность 01.04.07 – «Физика конденсированного состояния»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

член-корреспондент РАН, профессор Ковальчук Михаил Валентинович

Москва 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Методы получения кристаллов белков	13
1.1.1. Метод диффузии паров	14
1.1.2. Кристаллизация в объеме.....	15
1.1.3. Метод свободной диффузии	17
1.1.4. Диализ	17
1.1.5. Кристаллизация в невесомости.....	18
1.2. Методы исследования растворов белков	20
1.2.1. Динамическое и статическое рассеяние света.....	20
1.2.2. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей и нейтронов	23
1.3. Исследования процессов агрегации и кристаллизации лизоцима.....	29
1.4. Заключение.....	48
ГЛАВА 2. АППАРАТУРНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ.....	49
2.1. Получение кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Поиск условий кристаллизации.....	49
2.1.1. Подготовка растворов для кристаллизации и проведения малоугловых экспериментов.....	49
2.1.2. Кристаллизация лизоцима при добавлении в качестве осадителя хлорида натрия методом диффузии паров растворителя	50
2.1.3. Поиск условий роста кристаллов лизоцима	50
2.1.4. Исследование структуры кристалла лизоцима	51
2.2. Исследования растворов белков методом МУРР и МУРН.....	52
2.2.1. Исследование растворов белков методом МУРР с использованием синхротронного излучения на станции ДИКСИ.....	52
2.2.2. Исследование растворов белков методом МУРР с использованием синхротронного излучения на станции BioSAXS.....	54
2.2.3. Исследование растворов белков методом МУРН с использованием нейтронов на станции ЮМО ИБР-2	55

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ ЛИЗОЦИМА ПРИ РОСТЕ КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ МЕТОДОМ МУРР .	61
3.1. Кристаллизация лизоцима при использовании в качестве осадителя хлорида натрия	61
3.2. Структура кристалла лизоцима.....	62
3.3. Результат поиска условий роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии.....	64
3.4. Исследования структуры растворов лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРР на станции ДИКСИ	70
3.5. Структура растворов лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии.....	72
3.6. Заключение.....	81
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ ЛИЗОЦИМА ПРИ РОСТЕ КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ МЕТОДОМ МУРН	82
1.1. Структура растворов лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии.....	82
1.2. Заключение.....	93
ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ТИПА РАСТВОРИТЕЛЯ (H ₂ O НА D ₂ O) НА ОБРАЗОВАНИЕ ОЛИГОМЕРОВ В РАСТВОРАХ ЛИЗОЦИМА В УСЛОВИЯХ РОСТА КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ	94
5.1. Структура растворов лизоцима в D ₂ O при росте кристаллов тетрагональной сингонии.....	94
5.2. Влияние типа растворителя на структуру кристаллизационных растворов лизоцима	100
5.3. Заключение.....	108
ВЫВОДЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ	109
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее активно развивающихся разделов физики конденсированного состояния вещества является раздел, посвященный исследованию переходного состояния между жидкостью и твердым телом при формировании многофазной жидкости с образованием кластеров–прекурсоров твердотельной фазы.

Переходные состояния особо интересны в биологии. Так, например, современная биохимия клетки как наука сформировалась, основываясь как раз на исследованиях растворов белков, их взаимодействия в полидисперсных жидкостях. Белковые растворы также являются средой для получения кристаллов белков, на основе которых получено 90% информации об их структуре. Данные о структуре белков являются ключевыми для разработки лекарств, методов лечения и диагностики различных заболеваний и др.

Известно, что росту кристаллов белков предшествует самоорганизация молекул в растворе с образованием агрегатов, которые или являются зародышами будущего кристалла, или участвуют в его построении. Выявление закономерностей самоорганизации белковых молекул с образованием предкристаллизационной фазы в растворе позволит не только лучше понять механизмы перехода белков в конденсированное состояние (кристаллизация) кристаллизации белков, но и существенно сократить время поиска условий роста кристаллов.

Образование новой фазы в виде агрегатов в растворах белков было продемонстрировано методами динамического (ДРС) и статического (СРС) рассеяния света, а также методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН). С помощью этих методов удалось оценить размеры агрегатов, но не их структуру. Закономерности образования белковых кластеров, предшествующих кристаллизации, до конца не изучены.

Недавно было обнаружено, что при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в растворе образуются предкристаллизационная фаза из олигомеров, состоящих из восьми молекул белка и соответствующие структуре будущего кристалла. Присутствие таких олигомеров является необходимым условием для начала кристаллизации [1,2]. Сделать выводы о структуре олигомеров стало возможным при использовании комплексного подхода: анализа кристаллической структуры тетрагонального лизоцима, построения моделей возможных олигомеров и использования их при обработке данных малоуглового рассеяния. На примере концентрации белка 40 мг/мл [1,2] было показано образование октамеров в растворе лизоцима. Для подтверждения существования предкристаллизационной фазы, состоящей из октамеров лизоцима, при росте кристаллов тетрагональной сингонии, необходимо подтвердить и изучить тенденции образования октамеров белка в более широком диапазоне условий кристаллизации.

Цель и задачи работы

Цель работы:

Целью данной работы было определение закономерностей изменения структуры (фазового состояния) растворов белка в зависимости от условий, влияющих на рост кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, с применением методов малоуглового рассеяния рентгеновского излучения и нейтронов.

В соответствии с поставленной целью в работе решались следующие задачи:

1. Исследование структуры (фазового состояния) растворов лизоцима в H_2O в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии в зависимости от температуры и концентрации белка методом МУРР;
2. Исследование структуры (фазового состояния) растворов лизоцима в D_2O в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии в зависимости от температуры и концентрации белка методом МУРН;

3. Исследование методом МУРР влияния типа растворителя – D₂O и H₂O – на структуру (фазовое состояние) раствора лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии.

Научная новизна:

1. Качественно и количественно изучено изменение структуры (фазового состояния) раствора белка лизоцима при добавлении осадителя, приводящего к кристаллизации. Установлено, что в растворе лизоцима в условиях, соответствующих росту кристаллов тетрагональной сингонии, происходит образование устойчивой предкристаллизационной фазы из октамеров;

2. Показано, что в условиях роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в растворе помимо мономеров лизоцима образуются только димеры и октамеры, олигомеры другого типа отсутствуют;

3. Впервые исследовано влияние температуры, концентрации белка и типа растворителя (H₂O и D₂O) на структуру (фазовое состояние) раствора лизоцима в условиях, соответствующих росту кристаллов тетрагональной сингонии.

Практическая значимость:

Результаты работы могут быть использованы для разработки новой методики и технологии поиска условий кристаллизации белков, основанных на исследовании структуры кристаллизационного раствора и обнаружении формирования упорядоченных олигомеров белка в растворе. Такая методика позволит задолго до появления белкового кристалла определять, насколько условия подходят для кристаллизации, тем самым позволит существенно сократить время поиска условий кристаллизации, получения кристаллов и определения их трехмерной структуры.

На защиту выносятся следующие основные результаты и положения:

1. Экспериментальное подтверждение образования предкристаллизационной фазы из октамеров белка при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии;

2. Зависимость объемной доли октамеров от температуры при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в H₂O и D₂O;

3. Зависимость объемной доли октамеров от концентрации белка при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в H_2O и D_2O ;

4. Результаты исследования влияния растворителя – протонированной и дейтерированной воды – на образование фазы октамеров в растворе лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии.

Личный вклад автора:

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

Автором произведен подбор условий экспериментов, изготовлены все образцы для исследования структуры растворов белка лизоцима методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов.

Автор принимала участие в анализе кристаллической структуры тетрагонального лизоцима и моделировании упорядоченных олигомеров на ее основе.

Автор непосредственно участвовала в проведении всех описанных в диссертационной работе экспериментов на источниках синхротронного и нейтронного излучений методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов (ESRF BM29 BioSAXS, ЮМО ИБР-2).

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

Апробация результатов работ:

Основные результаты работы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на международных и национальных конференциях:

1. **К.Б. Ильина**, М.А. Марченкова, Ю.А. Дьякова, В.В. Волков, Е.Ю. Терещенко, А.Е. Благов, 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. 82–84.

2. 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 г., С. 62.

3. **К.Б. Ильина**, М.А. Марченкова, Ю.А. Дьякова, В.В. Волков, Е.Ю. Терещенко, А.Е. Благов, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследования начальной стадии кристаллизации белка лизоцима методом малоуглового рентгеновского рассеяния» / V Международная конференция по фотонике и информационной оптике, Москва, 3–5 февраля 2015 г., С. 91.

4. А.Е. Благов, А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, **К.Б. Ильина**, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, М.В. Ковальчук «Особенности различных стадий кристаллизации белка лизоцима и получение планарных структур на его основе» / Восьмой международный научный семинар и шестая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики», В. Новгород, 22 июня–2 июля 2016, С. 121–124

5. **К.Б. Ильина**, А.Е. Благов, А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Investigation of the preliminary crystallization stage in lysozyme solutions by small-angle X-ray scattering» / Летняя школа RACIRI 2016, Репино, 21–28 августа 2016 г., С. 24

6. **К.Б. Ильина**, А.Е. Благов, А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, А.И. Куклин, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование начальной стадии кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии методом малоуглового рассеяния нейтронов» / Первый Российский кристаллографический конгрессе. Москва, 21–26 ноября 2016 г., С. 236.

7. **К.В. Пина**, А.Е. Blagov, Yu.A. Dyakova, P.V. Konarev, А.Е. Kryukova, М.А. Marchenkova, А.Е. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk «The study of lysozyme

solutions at initial crystallization stage by small angle neutron scattering» / 4th European Crystallography School, 2–7 июля 2017 г., С. 43–44

8. **К.В. Пина**, A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, M.A. Marchenkova, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk «Formation of protein crystal growth units in lysozyme solution studied by small-angle x-ray scattering» / Летняя школа RACIRI 2017, Швеция, Роннебю, 19–26 августа 2017 г., С. 25

9. A.E. Blagov, A.S. Boikova, Yu.A. D'yakova, **К.В. Пина**, P.V. Konarev, A.G. Kulikov, A.E. Kryukova, M.A. Marchenkova, Yu. V. Pisarevskii, M.V. Koval'chuk «Small-Angle X-ray and Neutron Scattering Study of the Intermediate Protein Oligomer Phase on the Initial Crystallization Stage of Tetragonal Lysozyme» / International Conference on Electron, Positron, Neutron and X-Ray Scattering under the External Influences, Ереван, Армения, 16–22 октября 2017 г., С. 51

10. **К.Б. Ильина**, А.С. Бойкова, Ю.А. Дьякова, М.А. Марченкова, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование влияния дейтерированной воды на начальную стадию кристаллизации лизоцима методом малоуглового рентгеновского рассеяния» / VII Международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий», Москва, 16–21 апреля 2018 г., С. 107–108

11. **К.В. Пина**, A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk «Investigation of the influence type of solvents (H_2O and D_2O) on the formation of oligomers in lysozyme solution by small-angle x-ray scattering» / Biomembranes'18, Долгопрудный, 1–5 октября 2018 г., С. 219

12. **К.Б. Ильина**, А.С. Бойкова, М.А. Марченкова, П.В. Конарев, Ю.А. Дьякова, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Влияние замены растворителя – H_2O на D_2O – на образование олигомеров в растворе лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии» / VIII Международная конференция по фотонике и информационной оптике, г. Москве, 23–25 января 2019 г., С.105–106.

Основные результаты работы отражены в следующих публикациях:

A1. 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 // Кристаллография. 2017. Т. 62. № 3. С. 364–369.

A2. A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, **K.B. Iina**, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, A.I. Kuklin, M.A. Marchenkova, B.V. Nabatov, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk // Acta Crystallographica Section D. 2017. V. 73. №7. P. 591–599.

A3. 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 // Кристаллография. 2017. Т. 62. № 6. С. 876–881.

A4. **К.Б. Iina**, A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk // Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 2018. V. 50. № 6. P. 543–544.

Структура и объем диссертации:

Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка цитируемой литературы. Объем диссертации составляет 121 страницу, включая 45 рисунков, 11 таблиц и список литературы из 122 наименований.

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

В главе 1 отмечена важность и проблемы современной белковой кристаллографии. Особое внимание уделено проблеме поиска условий кристаллизации белков и возможные пути ее решения. Показана важность исследования самоорганизации макромолекул, начальных стадий роста белковых

кристаллов. Приведен обзор работ по изучению агрегации, кластеризации и кристаллизации белков, а также по методам кристаллизации и исследования растворов белков.

В главе 2 описаны процедура приготовления образцов и методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов, использованные в диссертационной работе.

В главе 3 показано образование олигомеров в растворе лизоцима в H_2O в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии по данным МУРР.

В главе 4 представлены результаты исследования структуры растворов белка лизоцима в D_2O в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРН.

В главе 5 показано влияние типа растворителя (с H_2O на D_2O) на образование олигомеров в растворах лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРР.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Биологические макромолекулы включают в себя белки, которые являются одним из основных молекулярных семейств живой материи, например, таких, как ферменты, токсины, гормоны и антитела. Другими биологическими макромолекулами являются нуклеиновые кислоты (например, ДНК, РНК) и их комплексы с белками, вирусами и рибосомами. Детальное понимание их структуры имеет большое значение при разработке новых лекарств и для создания молекул с усовершенствованными свойствами для их промышленного применения.

Рентгеноструктурный анализ (РСА) является одним из основных методов определения трехмерной структуры макромолекул высокого разрешения. Метод РСА можно применять, только если удалось получить кристаллы подходящего качества. Получение кристаллов высокого качества в настоящее время остается основным ограничением на пути определения структуры молекулы белка. Остается много вопросов, почему определенные белки плохо поддаются кристаллизации или не кристаллизуются совсем.

Кристаллизация белков, как и любая другая кристаллизация, представляет собой процесс, который зависит от большого количества параметров: температуры, типа растворителя, рН, концентрации и состава компонентов и т.д. [3–6]

Получение кристаллов белков представляет собой сложную и трудоемкую задачу, поскольку молекулы белков очень чувствительны к внешним условиям. Большинство белков может существовать в узком температурном диапазоне. Следовательно, обычные методы кристаллизации путем испарения, резкого изменения температуры или добавления сильных органических растворителей, которые применяются для выращивания неорганических кристаллов, исключаются и должны быть заменены другими методами.

1.1. Методы получения кристаллов белков

Белковые кристаллы растут из пересыщенных растворов. Обычно пересыщение достигается путем добавления осадителей, веществ, понижающих растворимость белка. В качестве осадителей как правило используются неорганические соли, высокомолекулярные полимеры и органические растворители. Классическое объяснение роста кристаллов показано на фазовой диаграмме растворимости (рис. 1.1.).

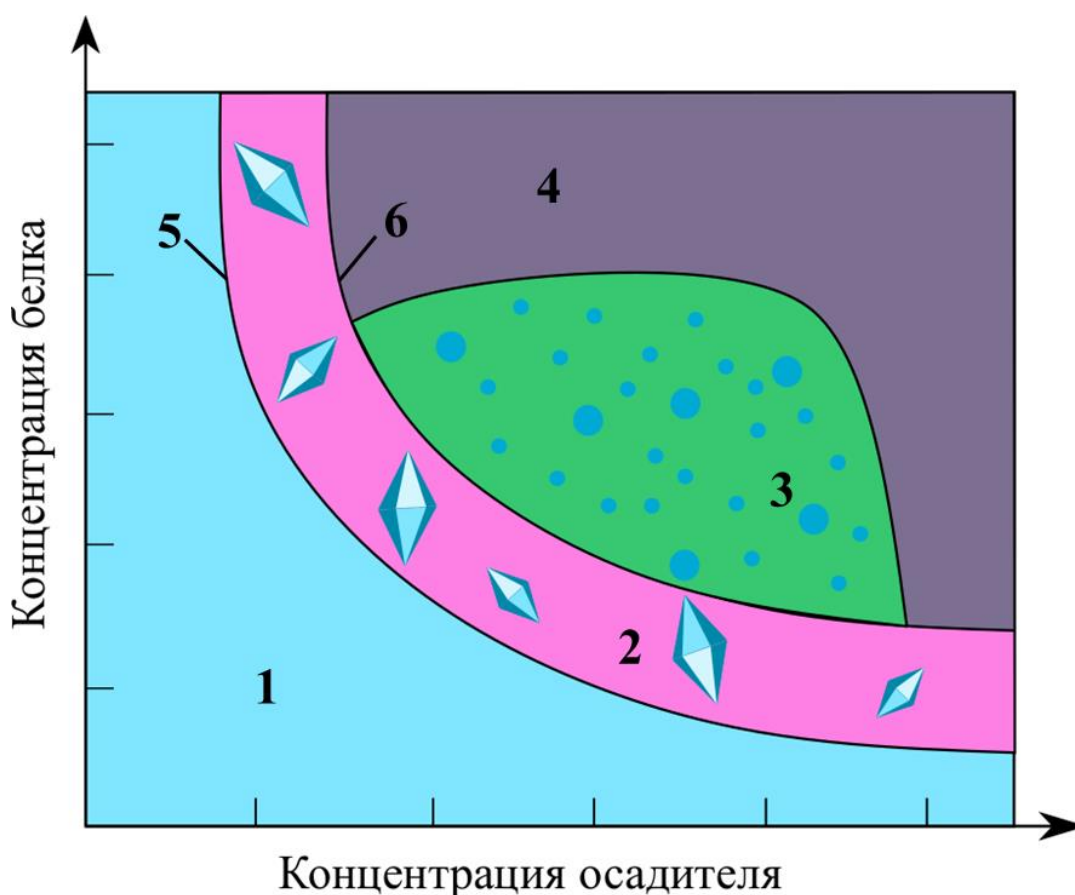


Рис. 1.1. Фазовая диаграмма, показывающая растворимость белка как функцию концентрации осадителя. 1 – ненасыщенный раствор, 2 – метастабильная зона, 3 – зона нуклеации, 4 – зона осаждения, 5 – кривая растворимости, 6 – кривая критического пересыщения

При кристаллизации, когда добавлено определенное количество осадителя, раствор переходит из ненасыщенного состояния (рис. 1.1., область 1) в состояние нуклеации (рис. 1.1., область 3), а затем переходит в метастабильное состояние (рис. 1.1., область 2), где и происходит рост кристаллов. При добавлении недостаточного количества осадителя раствор остается ненасыщенным (рис. 1.1., область 1), и кристаллы вырасти не могут, при добавлении избыточного количества осадителя, раствор переходит в состоянии высокого пересыщения (рис. 1.1., область 4), образуется осадок, из такого раствора кристаллы не смогут образоваться.

Существует большое количество методов кристаллизации белков. Наиболее доступные и часто используемые методы: диффузия паров растворителя, свободная диффузия, кристаллизация в объеме и диализ. Также используют более сложные методы такие, как кристаллизация с использованием затравочных кристаллов [7], графоэпитакции [8] и белковых пленок [9]. Самым сложным и дорогостоящим методом остается кристаллизация в условиях микрогравитации на международной космической станции [10].

1.1.1. Метод диффузии паров

Один из наиболее простых и удобных методов кристаллизации белков является метод диффузии паров растворителя (рис. 1.2. а). При использовании этого метода в резервуар кристаллизационной ячейки помещают раствор осадителя, а на поверхность покровного стекла наносят равные объемы растворов белка и осадителя, при этом концентрация осадителя в капле с белком становится в два раза ниже, чем в резервуаре. Затем покровным стеклом закрывают резервуар так, чтобы капля с белком и осадителем оказалась внутри ячейки. При этом сначала края ячейки смазывают вакуумной смазкой для герметизации ячейки.

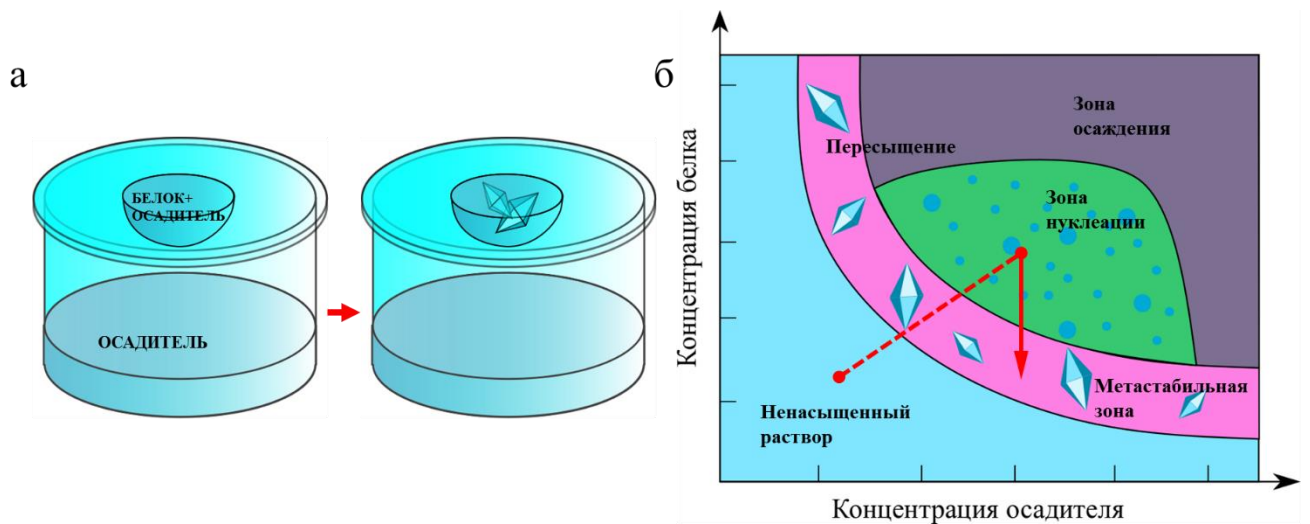


Рис. 1.2. Схематическое изображение кристаллизации методом диффузии паров (а) и фазовая диаграмма процесса кристаллизации (б)

Разница между концентрацией осадителя в капле и в резервуаре вызывает испарение воды из капли до тех пор, пока концентрация осадителя не будет равна концентрации осадителя в резервуаре. При испарении воды кристаллизационный раствор переходит сначала из ненасыщенного состояния в состояние нуклеации, а затем в метастабильное состояние, где и происходит рост кристаллов (рис. 1.2. б) [11].

1.1.2. Кристаллизация в объеме

Кристаллизация в объеме (рис. 1.3. а, б) является наиболее простым и доступным методом кристаллизации белков. Суть метода заключается в том, что в кристаллизационной ячейке смешиваются равные объёмы раствора белка и осадителя. Затем ячейку герметизируют.

При смешивании растворов белка с осадителем кристаллизационный раствор находится в состоянии нуклеации и при кристаллизации переходит в метастабильное состояние, при этом изменяется только концентрация белка, так как часть молекул белка переходит в кристалл (рис. 1.3. с) [11].

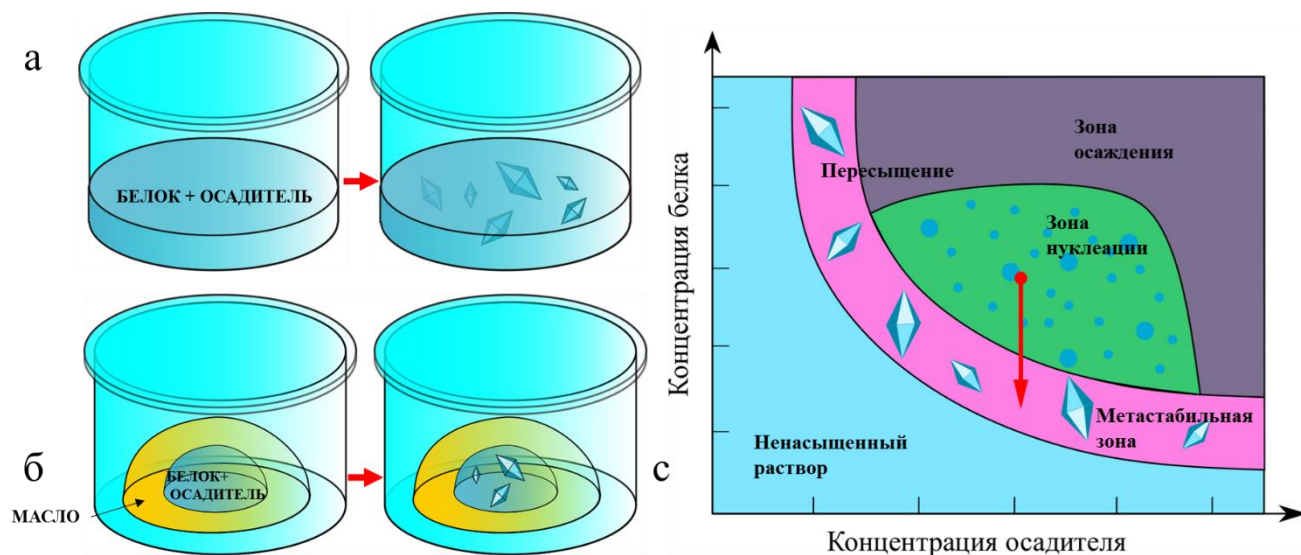


Рис. 1.3. Схематическое изображение кристаллизации методом кристаллизации в объеме (а, б) и фазовая диаграмма процесса кристаллизации (с)

Существует еще одна разновидность этого метода кристаллизации, в котором смешиваются малые объемы белка и осадителя, герметизация осуществляется нанесением на поверхность капли масла. Масло является хорошим барьером для испарений воды из кристаллизационного раствора. На скорость испарения воды из кристаллизационного раствора можно повлиять, сделав масляный барьер менее или более водопроницаемым, например, путем смешивания парафинового (менее водопроницаемого) и силиконового (более водопроницаемого) масла [12]. Было продемонстрировано, что при использовании смеси парафинового и силиконового масла в соотношении 1:1 или даже при использовании 100 % силиконового масла было больше успешных результатов кристаллизации, чем при использовании только парафинового масла [13]. Эксперименты с использованием метода кристаллизации в объеме под маслом хорошо совместимы с изменением температуры, так как при данном методе можно избежать конденсации водяного пара при переходе от более высоких к более низким температурам.

1.1.3. Метод свободной диффузии

В методе свободной диффузии раствор белка и осадителя последовательно загружается в капилляр так, чтобы один раствор располагался под другим (рис. 1.4. а). При медленной диффузии одного раствора в другой устанавливается градиент концентрации, который изменяется со временем. Постепенное изменение концентрации белка переводит раствор из ненасыщенного состояния в состояние пересыщения (рис. 1.4. б).

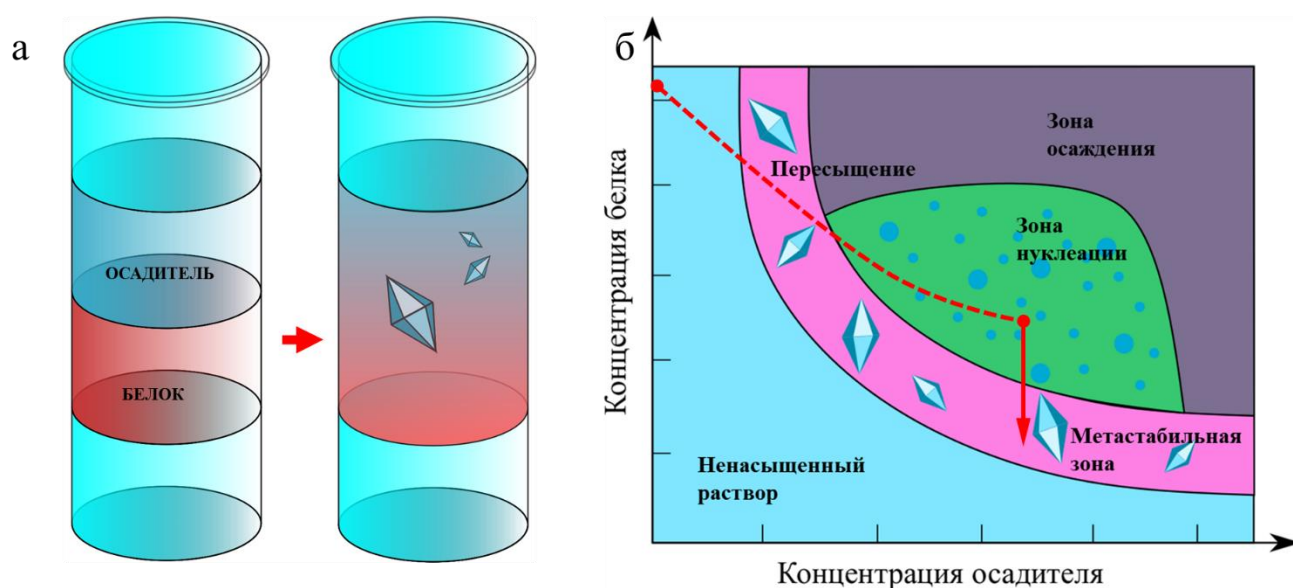


Рис. 1.4. Схематическое изображение кристаллизации методом свободной диффузии (а) и фазовая диаграмма процесса кристаллизации (б)

В капилляре устанавливаются разные условия, разное соотношение концентраций белка и осадителя, поэтому можно оценить оптимальные условия роста кристаллов [11].

1.1.4. Диализ

При кристаллизации белков методом диализа используют полупроницаемую мембрану, которая позволяет свободно проходить молекулам осадителя, но препятствует прохождению белка. Диализный мешок с раствором белка помещают

в раствор осадителя (рис. 1.5. а). Молекулы осадителя диффундируют сквозь стенку мембраны и смешиваются с раствором белка. Белковый раствор постепенно переходит из ненасыщенного в пересыщенное состояние, сначала переходит в зону нуклеации, а затем в метастабильную зону, где и будет происходить рост кристаллов (рис. 1.5. б).

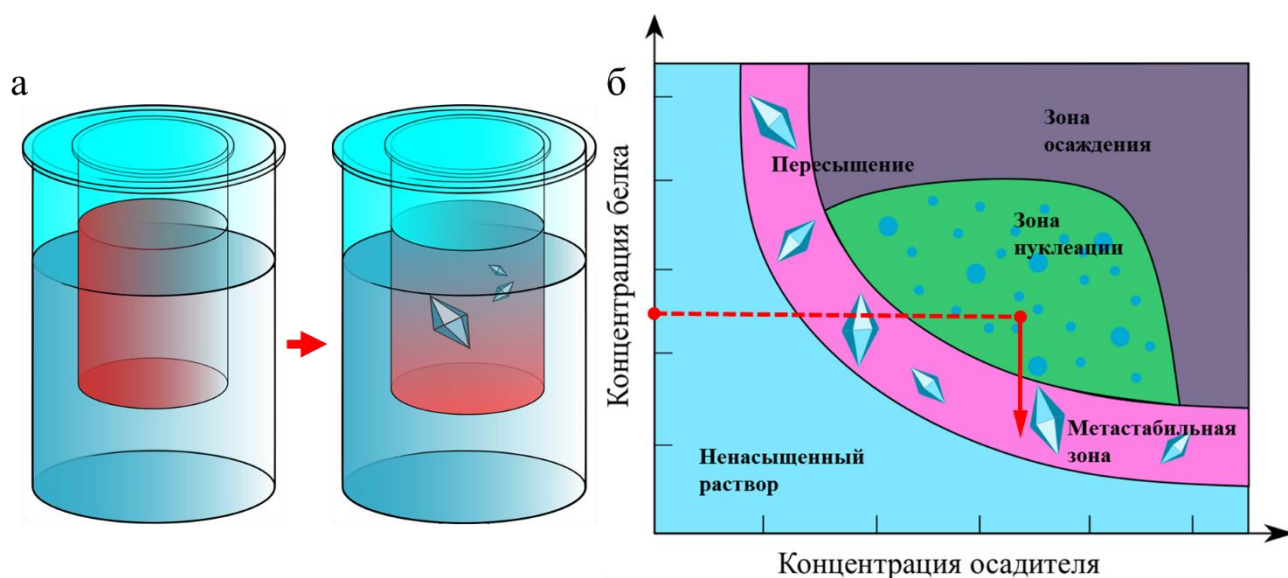


Рис. 1.5. Схематическое изображение кристаллизации методом диализа (а) и фазовая диаграмма процесса кристаллизации (б)

Преимущество этого метода заключается в том, что степень насыщения белкового раствора можно легко 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 [11].

1.1.5. Кристаллизация в невесомости

Одним из самых необычных и дорогостоящих методов получения кристаллов белков является кристаллизация в космосе, в условиях микрогравитации. Вращающиеся вокруг Земли космические аппараты не позволяют полностью исключить гравитацию, гравитационные силы достигают значений 10^{-3} – 10^{-7} g.

Метод роста кристаллов в условиях микрогравитации известен с 1969 года, сначала его применяли только для выращивания неорганических кристаллов, таких как германий. Ожидалось, что этот метод позволит получать совершенные монокристаллы полупроводников с минимальным количеством дефектов и примесей. Эту идею впоследствии перенесли и на кристаллизации белков. Первые эксперименты в космосе были проведены в 1986 году. Для этих экспериментов были выбраны хорошо изученные и поддающиеся кристаллизации белки, среди них были фермент лизоцим, канавалин, сывороточный альбумин и ряд других. Эксперимент проводили в специализированном кристаллизаторе, где раствор белка и осадителя смешивались в одной ячейке. Результаты первого космического эксперимента продемонстрировали, что кристаллы, выращенные в условиях микрогравитации, были достаточно однородными, более высокого качества и, как правило, большего размера. В последующих космических экспериментах 1988 года использовались более сложные кристаллизаторы, в которых были реализованы метод диффузии паров и метод свободной диффузии, при этом удалось сделать прибор полностью термостатируемым для поддержания постоянной температуры. В этих экспериментах изучался рост кристаллов вируса табачной мозаики, γ -интерферона, свиной эластазы, изоцитрат-лиазы и цитохрома с. С помощью метода рентгеноструктурного анализа удалось продемонстрировать высокое структурное совершенство и увеличенный размер кристаллов, выращенных в условиях микрогравитации. Эксперименты по космической кристаллизации сейчас проводятся американским, российским, европейским, канадским космическими агентствами и Китаем. Успешно развивается международное сотрудничество в этой области. Большое количество экспериментов проводится на российском спутнике «Фотон»[14,15].

1.2. Методы исследования растворов белков

1.2.1. Динамическое и статическое рассеяние света

Динамическое рассеяние света (ДРС), также известное как фотонная корреляционная спектроскопия, является очень мощным инструментом для изучения диффузионного поведения макромолекул в растворе. Коэффициент диффузии и, следовательно, рассчитанные из него гидродинамические радиусы зависят от размера и формы макромолекул. Метод позволяет изучать гомогенность белков, нуклеиновых кислот и белково-белковых комплексов, а также взаимодействия белков с малыми молекулами.

В основе метода ДРС лежит регистрация и анализ колебаний интенсивности рассеяния света, вызванного изменениями плотности среды, вследствие броуновского движения (рис. 1.6.).

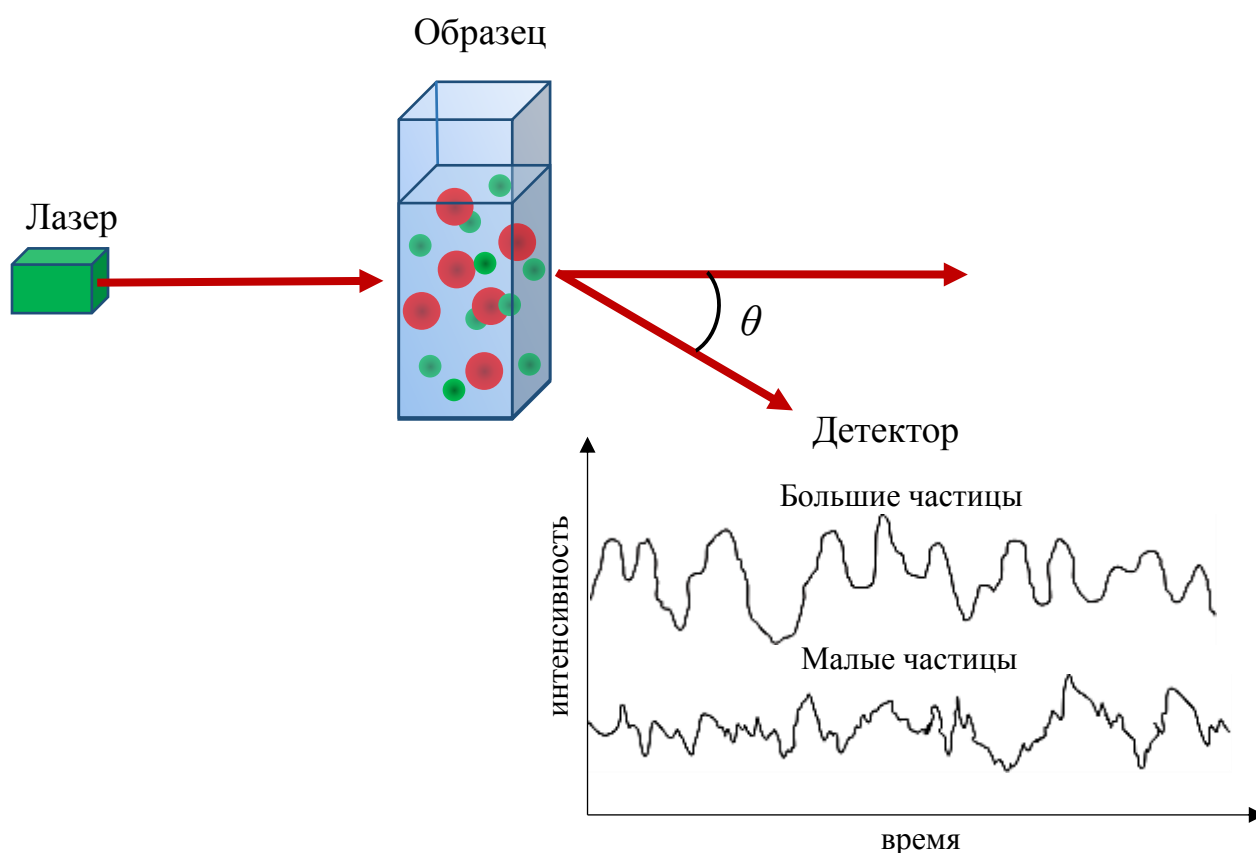


Рис. 1.6. Схематическое изображение метода ДРС

Характерной чертой броуновского движения является то, что маленькие молекулы движутся быстрее, чем крупные. При облучении видимым монохроматическим светом высокой пространственной и временной когерентности рассеивается небольшая часть света. Интенсивность рассеянного света колеблется в зависимости от времени из-за постоянно меняющихся расстояний между частицами. Зарегистрированные флуктуации интенсивности содержат информацию о времени движения рассеивающих частиц и описываются корреляционной функцией $G(\tau)$:

$$G(\tau) = 1 + be^{-2D_t q^2 \tau} \quad (1.1)$$

где b – постоянная величина, зависящая от оптики и геометрии прибора, D_t – коэффициент диффузии частиц, а τ – характерное время затухания. Вектор рассеяния q имеет вид:

$$|q| = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0 \sin \frac{\theta}{2}} \quad (1.2)$$

где n_0 – показатель преломления растворителя, λ_0 – длина волны в вакууме, а θ – угол рассеяния.

Из корреляционной функции флуктуаций интенсивности можно получить информацию о коэффициенте диффузии частиц D_t , а из коэффициента диффузии – размер частиц. В случае твердых сфер D_t связано с гидродинамическим радиусом частиц R_g через соотношение Стокса – Эйнштейна:

$$D_t = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_g} \quad (1.3)$$

где k_B – постоянная Больцмана, а η – динамическая вязкость растворителя. Таким образом, R_g пропорционально обратной релаксации времени затухания.

Особенностью метода является то, что его можно применять только при малых концентрациях частиц в растворе, когда расстояние между частицами превышает их размеры. В этом случае можно не учитывать вторичное рассеяние света [16].

Метод статического рассеяние света (СРС) основан на измерении интенсивности рассеянного света в зависимости от угла (рис. 1.7.).

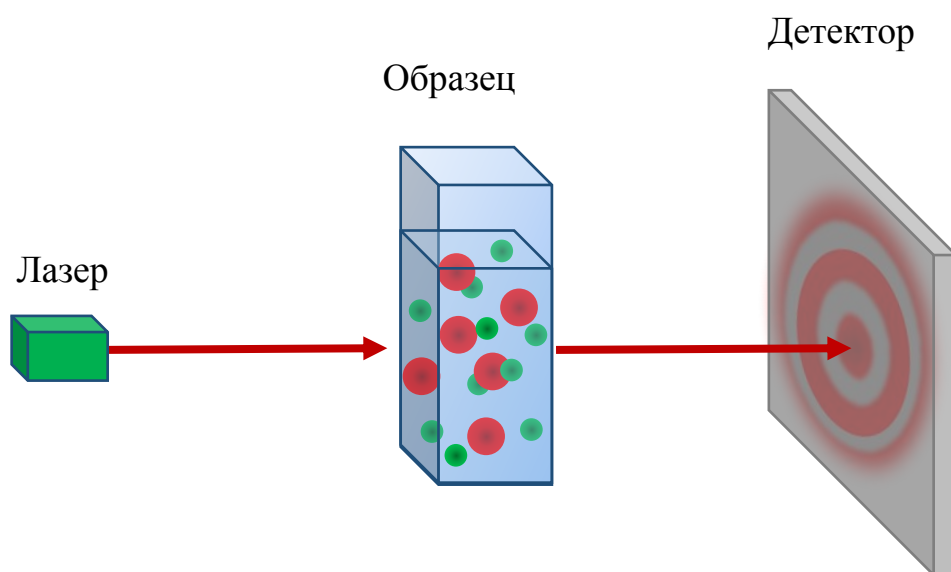


Рис. 1.7. Схематическое изображение метода СРС

Из уравнения Рэлея можно определить массу частиц:

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M} + 2A_2c\right) P(\theta) \quad (1.4)$$

где R_θ – соотношение Рэлея рассеянного света к падающему, c – концентрация (мг/мл), M – молекулярная масса (Да), A_2 – второй вириальный коэффициент, описывающий взаимодействие между частицами, $P(\theta)$ – угловая зависимость рассеяния образца, K – оптическая постоянная, определяемая

$$K = \frac{2\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{n_0 dn}{dc}\right)^2 \quad (1.5)$$

где N_A – число Авогадро, λ_0 – длина волны лазерного излучения, n – показатель преломления, n_0 – показатель преломления растворителя [16].

Метод позволяет получить информацию о средней молекулярной массе частиц в растворе, радиусе инерции R_g и форме. Измеряя интенсивность СРС для образцов с различной концентрацией, можно рассчитать второй вириальный

коэффициент [17]. Второй вириальный коэффициент является мерой неидеальности раствора, возникающей в результате взаимодействия двух тел. Положительные значения второго вириального коэффициента указывают на наличие суммарных сил отталкивания между молекулами растворенного вещества, в то время как отрицательные значения показывают, что молекулы растворенного вещества притягиваются [18]. Определяя второй вириальный коэффициент, также можно изучать кристаллизацию белков [19,20].

Современные приборы, использующие метод ДРС и СРС, позволяют исследовать частицы размером от 0.3 нм до 10 мкм. С помощью этих методов часто изучают поведение макромолекул, полимеров, наночастиц в растворе и эмульсий. Так как методы являются неразрушающими и позволяют производить быстрые измерения образцов, с помощью этих методов можно проводить различные *in-situ* исследования [21]. Они часто используются при исследовании гомогенности растворов белков, полимеров, наночастиц и для определения их размеров. Методы ДРС и СРС являются удобными для изучения агрегации, кластеризации молекул белков и исследования их кристаллизации.

1.2.2. Малоугловое рассеяние рентгеновских лучей и нейтронов

Малоугловое рассеяние основано на эффектах упругого рассеяния монохроматических рентгеновских лучей и нейтронов вблизи первичного луча на флуктуациях электронной плотности и ядер в материалах. Методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН) являются универсальными методами исследования структуры растворов как упорядоченных, частично упорядоченных, так и неупорядоченных объектов. Основной принцип работы методов заключается в измерении рассеянного излучения от молекул в растворе и регистрации интенсивности рассеяния как функции угла рассеяния. На рис. 1.8. показана схема измерения методом МУРР и картина рассеяния. МУРР и

МУРН позволяют изучать частицы размеры, которых лежат в диапазоне от 1 нм до 100 нм.

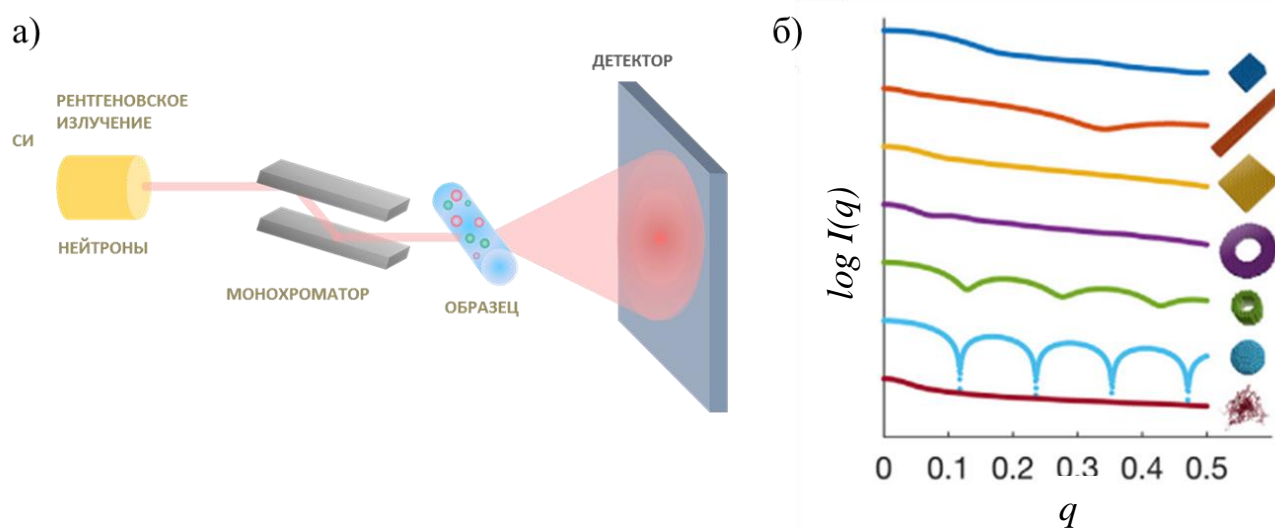


Рис. 1.8. Схематическое изображение метода МУРР и МУРН (а) и картина рассеяния геометрических объектов (б) [22]

Малоугловое рассеяние может использоваться для исследования белков, нуклеиновых кислот и их комплексов в различных условиях от почти физиологических до высоко денатурированных. Преимуществом метода является то, что нет необходимости кристаллизовать образец, и нет ограничений по молекулярной массе молекул, присущих другим методам, таким как ЯМР- спектроскопия. Используя методы малоуглового рассеяния, можно получать информацию о размерах и формах молекул полимеров, наночастиц, белков, а также сложных белковых комплексов. Обычно методы МУРР и МУРН используются для получения нескольких ключевых параметров, таких как молекулярная масса MW , радиус инерции R_g и максимальный размер частицы D_{max} [23].

В экспериментах по малоугловому рассеянию измеряется не амплитуда, а интенсивность рассеяния, при этом амплитуда рассеяния зависит от электронной плотности частицы $\rho(r)$ [24]:

$$A(s) = \int_V \rho(r) e^{-isr} dr \quad (1.6.),$$

где

$$s = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad (1.7)$$

Интенсивность выражается как функция вектора рассеяния s (1.7), возникающего в результате рассеяния фотона или нейтрона с длиной волны λ на образце под углом 2θ .

$$I_s = A(s)A^*(s) \quad (1.8.)$$

Рассеяние частиц может быть записано в виде:

$$I_p = (\Delta\rho)^2 V_p^2 P(s) \quad (1.9)$$

где $\Delta\rho$ - контраст для данной частицы, V_p - ее объем, $P(s)$ - форм-фактор частицы, т.е. нормированная интенсивность рассеяния частицей ($P(0)=1$)

Полная интенсивность представляет собой сумму интенсивности каждой частицы (1.10.)

$$I_p = \sum I_p(s) \quad (1.10)$$

Картина малоуглового рассеяния имеет три различных участка рис. 1.9.: Гинье, Фурье и Порода.

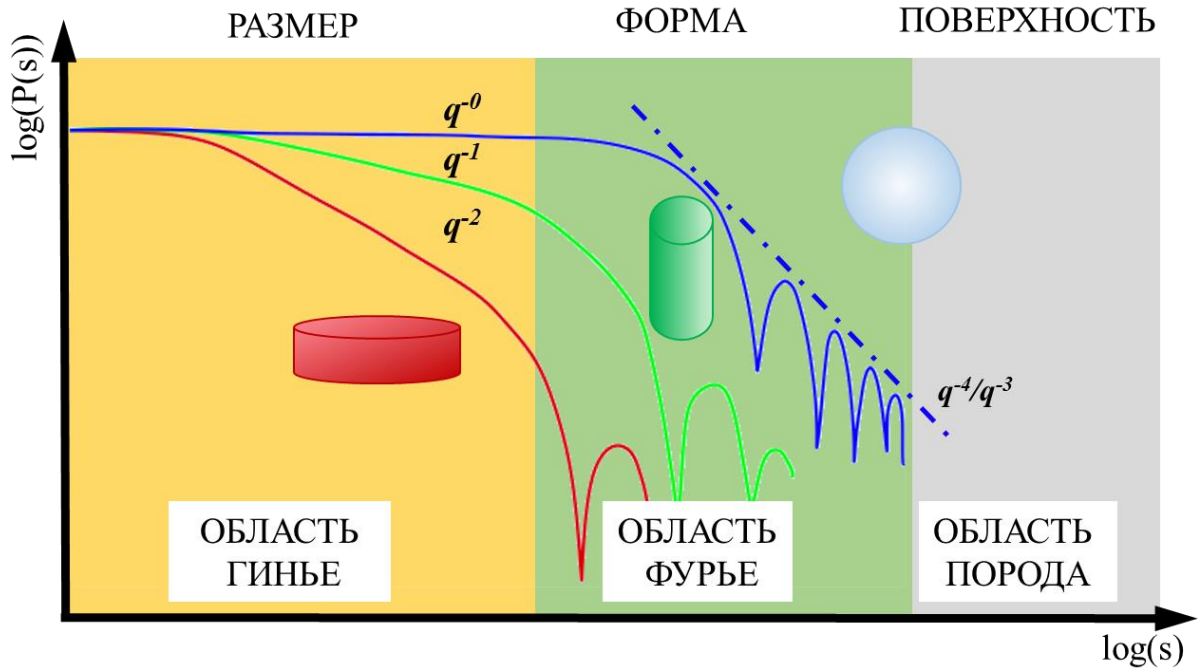


Рис. 1.9. Области кривых малоуглового рассеяния и картина рассеяния объектов разных форм [24]

В области Гинье экспериментальный радиус инерции R_g может быть получен путем приближения линейной функции к экспериментальным данным, используя график натурального логарифма интенсивности от квадрата вектора рассеяния s^2 (график Гинье, рис. 1.10.).

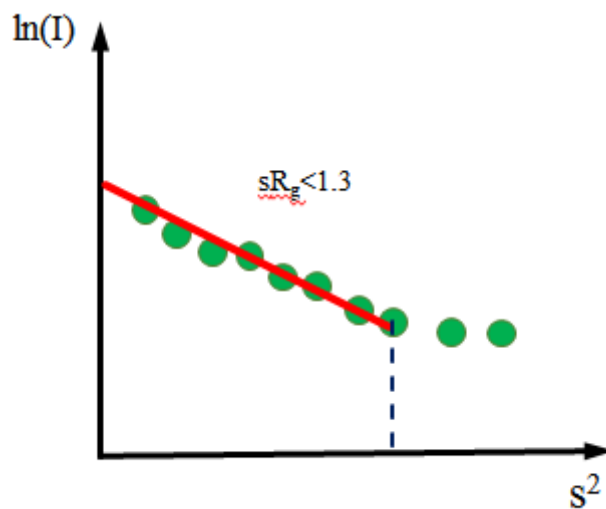


Рис. 1.10. График Гинье

В области Гинье/Фурье может быть определена функция распределения по расстояниям $p(r)$ (1.11) путем косвенного Фурье преобразования экспериментального форм-фактора [25], обеспечивающего значительную информацию о форме частиц $P(s)$. Функции $p(r)$ используются для определения формы частиц при условии, что все частицы в образце имеют одинаковую форму и размер. Функция распределения по расстояниям (рис. 1.11.) позволяет определить максимальный размер D_{max} при условии $p(r)=0$ при $r > D_{max}$

$$p(r) = \frac{1}{4\pi^2 r} \int_0^\infty s P(s) \sin(sr) dr \quad (1.11) [26]$$

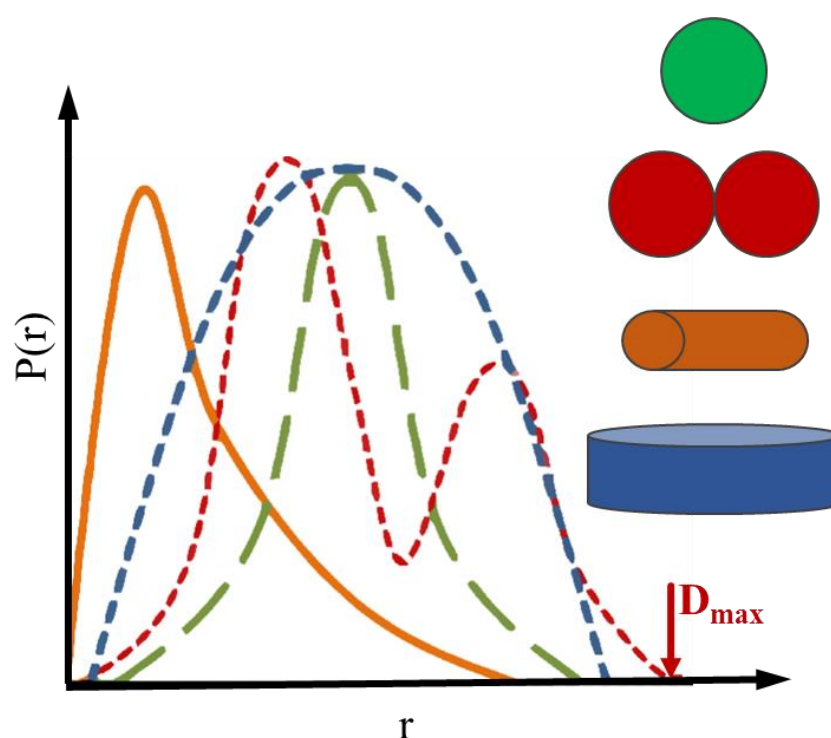


Рис. 1.11. Функция распределения по расстояниям и ее соответствие разной форме частиц (цветом) [27]

Радиус инерции может быть также оценен с помощью функции $p(r)$:

$$R_g^2 = \frac{\int_0^{D_{max}} r^2 p(r) dr}{2 \int_0^{D_{max}} p(r) dr} \quad (1.12.)$$

В области Порода может быть определен инвариант Порода Q (1.13), из которого можно получить информацию о поверхности, отношение поверхности к

объему (1.14), и оценку удельной поверхности для компактных частиц. Логарифм форм-фактора пропорционален $\sim q^{-4}$ для частиц с однородной плотностью.

$$Q = \int_0^{\infty} s^2 I(s) ds \quad (1.13)$$

$$\frac{S}{V} = \frac{\log_{s \rightarrow \infty} \pi(I(s)s^4)}{Q} \quad (1.14)$$

МУРР и МУРН являются одними из немногих методов, которые позволяют количественно охарактеризовать сложные полидисперсные системы и определить доли компонентов полидисперсной системы [28].

Важнейшей особенностью методов является возможность анализа внутреннего строения разупорядоченных систем. Зачастую их применение – единственный способ получения прямой структурной информации о системах с хаотическим распределением неоднородностей плотности [29,30].

Рентгеновские лучи и нейтроны принципиально по-разному взаимодействуют с веществом. Рентгеновские лучи взаимодействуют с электронами атомов, приводящих к известному монотонному увеличению амплитуды рассеяния с увеличением атомного номера. Рентгеновское излучение гораздо более чувствительно к тяжелым металлам, чем к углероду и азоту, положение водорода в белке трудно определить из рентгеновских данных. Однако, нейтроны взаимодействуют с ядрами атомов таким образом, что не проявляют четкой зависимости по отношению к атомному номеру. Легкие элементы так же видимы для нейтронов, как тяжелые элементы, углерод, азот и кислород. Поскольку нейтроны взаимодействуют с ядрами, они могут быть чувствительны к изотопному замещению [31]. Низкое радиационное повреждение биологических образцов при использовании метода МУРН позволяет проводить длительные *in-situ* исследования [32–34].

Увеличивающаяся доступность источников синхротронного излучения третьего поколения, усовершенствование детекторов и разработки алгоритмов

анализа данных позволили методу МУРР быть лидирующим методом исследования для целого ряда биологических применений [35].

1.3. Исследования процессов агрегации и кристаллизации лизоцима

Изучение закономерностей роста кристаллов белков остается актуальной проблемой современной науки. На сегодняшний день не существует точного ответа, как растут белковые кристаллы. Кристаллизация белков очень сложный физико-химический процесс, который зависит от огромного количества различных факторов. Первым этапом процесса кристаллизации является зарождение новой кристаллической фазы, нуклеация. Нуклеация играет ключевую роль в определении результатов любого процесса кристаллизации в отношении размера, формы и симметрии кристалла.

Одним из основных предположений классической теории нуклеации [36] является то, что кластеры имеют ту же структуру и свойства, что и новая фаза, которая формируется. Если зарождающаяся фаза имеет определенный уровень внутреннего порядка – как это действительно имеет место при кристаллизации – тогда молекулы должны быть пространственно организованы в соответствии с правилами симметрии конечного состояния. Зародыш определяется как критический кластер, который имеет тот же локальный порядок, который обнаруживается в конце процесса образования кристалла [37]. Как только такое кристаллическое ядро сформировано, оно будет являться структурным шаблоном, который направляет молекулы для формирования связей, копирующих уже существующие молекулярные структуры. Из предположений классической теории нуклеации относительно структуры кластеров следует, что даже самые маленькие группы молекул должны объединиться в кластеры, которые структурно эквивалентны внутреннему порядку макроскопических кристаллов. Этот путь зарождения, где все кластеры проявляют одинаковую степень кристалличности независимо от их размера, называется классическим путем нуклеации при кристаллизации. Поскольку этот путь нуклеации влечет за собой только

прохождение одного барьера нуклеации, он может быть классифицирован как одностадийный механизм нуклеации [38].

Образование кластеров обусловлено исключительно случайными молекулярными столкновениями, когда молекулы постоянно прибывают и удаляются из данного кластера. Следовательно, нуклеация – это случайный процесс, делающий невозможным прогнозирование, где и когда будет образовано новое ядро. Эта непредсказуемая природа и наноразмерные масштабы размеров агрегатов делают прямые наблюдения довольно сложными. Чтобы обойти эту проблему, большинство экспериментальных подходов к нуклеации белка основаны на методах статического и динамического рассеяния света, где относительно большой объем жидкости освещается лазерным источником, обеспечивающим усредненную структурную или динамическую информацию о процессе агрегации. Методы рассеяния света начали набирать популярность в начале 90-х годов, но первые работы, в которых использовалось динамическое рассеяние света для изучения конденсации белка, датируются концом 70-х – серединой 80-х годов [39,40]. Самые ранние работы демонстрируют наличие белковых кластеров, состоящих всего из пары мономеров [41–43], которые, как предполагалось, являются либо небольшими олигомерами, либо агрегатами элементарной ячейки. Эти олигомеры были признаны в качестве кластеров, предсказанными классической теорией нуклеации. Но этот вывод был преждевременным, потому что существует важный недостаток при анализе данных ДРС. При извлечении абсолютных гидродинамических радиусов рассеивающих частиц необходимо соблюдать большую осторожность. Как указывалось Бишопом и др. [44], а затем Мушхолом и Розенбергером [45], измеренные диффузионные способности ДРС представляют коллективные константы диффузии и зависят от межмолекулярных взаимодействий между рассеивающими частицами. Эффекты неидеальности раствора, обусловленные наличием потенциалов притяжения или отталкивания между растворенными молекулами, приводят к концентрационным зависимостям коллективной константы диффузии. При интерпретации с использованием

соотношения Стокса-Эйнштейна для определения размера частиц они будут давать видимые радиусы, которые не соответствуют гидродинамическому радиусу рассеивающих частиц, что ставит под сомнение существование зарегистрированных кластеров и их размеры.

В работе Шанднер и др. [46] использовалось малоугловое рентгеновское и нейтронное рассеяние для изучения структуры концентрированных растворов лизоцима с низкой ионной силой. Было показано существование малых равновесных кластеров, состоящих менее, чем из десяти молекул. Обнаружение таких кластеров было неожиданным, потому что эти растворы были ненасыщенными, и молекулы лизоцима в растворе были отрицательно заряжены при выбранных условиях, добавляя компонент электростатического отталкивания на больших расстояниях к потенциалу парного взаимодействия между молекулами лизоцима. Существование таких кластеров было позже опровергнуто Шуклой и соавторами [47], им удалось зафиксировать четкое изменение в положениях пиков МУРР и МУРН с изменением концентрации белка, которое опровергло существование кластерной фазы и согласовывалось с отталкивающим взаимодействием между отдельными молекулами лизоцима.

Вольде и Френкель провели численное моделирование нуклеации для глобулярных белков [48], в результате которого был предложен другой механизм нуклеации, в котором коллоидные и белковоподобные вещества могут пройти через микроскопические метастабильные состояния, прежде чем перейти в стабильное кристаллическое состояние. Они показали, что предпочтительный путь нуклеации повлечет за собой начальное образование жидкого кластера, который впоследствии трансформируется в кристаллическое ядро. Такой путь нуклеации называется двухступенчатым механизмом нуклеации.

Первая стадия двухступенчатого механизма нуклеации кристаллов включает в себя формирование неупорядоченной богатой белком плотной капли. На втором этапе происходит повторная сборка неупорядоченных белков и образование упорядоченных кристаллических ядер внутри капли [49]. Эти богатые белком

капли наблюдались при кристаллизации нескольких белков, включая лизоцим, [50,51], глюкозоизомеразу [52], гемоглобин [53], при этом была доказана ключевая роль богатых белком капель в зародышеобразовании кристаллов [54,55]. Кроме того, зародышеобразование кристаллов непосредственно наблюдалось внутри подобных мезоскопических кластеров в коллоидных растворах [56].

Большое количество работ по исследованию роста кристаллов белков было сделано на примере модельного белка лизоцима. Наиболее часто исследования посвящены агрегации молекул и образованию белковых кластеров в растворах перед кристаллизацией, происходящей на начальных этапах роста белковых кристаллов.

При исследовании растворов белков часто используются методы МУРР и МУРН. Они позволяют определить, в каком состоянии находится белковый раствор, монодисперсном или агрегированном. Также с помощью этих методов можно определить размеры, форму молекул белка и агрегатов.

В одном из ранних исследований процесса кристаллизации [57] методом МУРН показано, что при добавлении даже малейшего количества осадителя хлорида натрия к раствору лизоцима молекулы начинают агрегировать. Также показано, что интенсивность рассеяния от ненасыщенного раствора белка не изменяется во времени, а от пересыщенного – меняется. Этот эксперимент является демонстрацией того, что ненасыщенный раствор лизоцима находится в равновесном состоянии, а пересыщенный – в неравновесном. В пересыщенном растворе впоследствии образовались кристаллы белка.

Нимура и др. [58] продолжили работу над исследованием пересыщенных растворов лизоцима с добавлением хлорида натрия. Были проведены временные измерения растворов лизоцима с хлоридом натрия методом МУРН. Показано, что в пересыщенном растворе лизоцима присутствуют агрегаты двух типов. Размеры агрегатов первого типа составляют примерно от 200 до 600 Å или более, а второго – 30 Å. Со временем размеры агрегатов второго типа меняются незначительно. А

агрегаты первого типа немного увеличиваются в размере на протяжении 14 часов, затем они начинают уменьшаться. При этом концентрация агрегатов второго типа больше, чем первого в 10^5 раз. Также в работе сделано предположение, что агрегаты обоих типов не могут быть зародышами будущего кристалла.

В работе [59] методом МУРН исследовали процесс агрегации молекул белка лизоцима в растворе для определения закономерностей зародышеобразования при кристаллизации. При проведении эксперимента использовали в качестве растворителя дейтерированную воду. В работе исследовались растворы с разной степенью пересыщения, которая контролировалась с помощью изменения концентрации белка и осадителя хлорида натрия, а также температуры. Размеры агрегатов лизоцима оценивались по радиусу инерции. Показано, что в ненасыщенных растворах лизоцима присутствуют мономеры и димеры, в насыщенных только димеры, а в пересыщенных тетрамеры и октамеры. При этом было сделано предположение о том, что тетрамеры являются минимальными единицами роста кристалла лизоцима, а октамеры максимальными. Также было сделано предположение, что октамеры являются необходимыми строительными единицами для образования критических зародышей.

Дюкруа и др. [60] исследовали влияние различных солей на белок-белковое взаимодействие в растворах лизоцима с помощью метода МУРР. Показано, что в растворах лизоцима с низкой ионной силой молекулы белка отталкиваются. При увеличении ионной силы раствора взаимодействие между молекулами белка меняется, молекулы начинают притягиваться. Также проводилось сравнение влияния катионов и анионов на взаимодействие между молекулами лизоцима при одинаковой ионной силе растворов. В работе не было обнаружено существенного различия во влиянии различных типов катионов на белок-белковое взаимодействие. Анионы же показали заметную разницу во влиянии на взаимодействие между молекулами белка. При этом показано, что эффективность влияния анионов на белок-белковое взаимодействие укладывается в обратный ряд

Гофмейстера. Подобное поведение наблюдалось в исследованиях растворимости белка лизоцима [61].

Часто при исследовании растворов белков используется метод ДРС, который является неразрушающим и позволяет проводить *in-situ* исследования. Поэтому метод ДРС используют при исследовании процесса кристаллизации белков.

В работе Куи и др. [62] исследовали раствор лизоцима в условиях кристаллизации при добавлении осадителя, хлорида натрия, методом ДРС. Было показано, появление агрегатов лизоцима до образования кристаллов. Размеры агрегатов составляли 5.62 и 7.50 нм. На основании данных о размерах одиночной молекулы лизоцима 3.79 нм × 2.8 нм × 2.8 нм, было сделано предположение, что агрегаты с размерами 5.62 нм соответствует тетрамерам лизоцима, а агрегаты с размером 7.50 нм соответствуют октамерам. Также проводилось исследование скорости роста граней кристалла с помощью метода оптической микроскопии. При увеличении концентрации хлорида натрия увеличивалась скорость роста грани (110). На основании разницы в скоростях роста граней кристалла лизоцима был сделан вывод о том, что в росте грани (110) участвуют октамеры, а в росте грани (101) – тетрамеры.

В работе [63] Танака и др. наблюдали агрегацию молекул лизоцима в пересыщенных растворах методом ДРС. Растворы лизоцима исследовались при двух условиях, соответствующих условиям роста кристаллов тетрагональной и орторомбической сингонии. Размер агрегатов лизоцима оценивался по гидродинамическому радиусу. Авторы сделали предположение о модели кристаллизации лизоцима, в котором процесс кристаллизации делится на несколько этапов. Сначала в растворе присутствуют только мономеры белка. На первом этапе образуются белковые «единицы», состоящие из нескольких молекул, радиус которых составляет от 2.0 до 3.5 нм. На втором этапе эти единицы начинают формировать кластеры, размер которых от 0.1 до 1 мкм. На третьем этапе единицы перестают агрегировать и начинают агрегировать сами кластеры. На третьей стадии начинают образовываться первые кристаллы. Показано, что динамика

образования белковых единиц или кластеров одинакова как для роста кристаллов лизоцима орторомбической сингонии, так и для роста кристаллов тетрагональной сингонии. Авторы делают вывод о том, что образование белковых единиц и кластеров является условием для роста кристаллов.

В работе [63] определяли размер и плотность предкристаллизационных агрегатов с помощью метода ДРС. Исследовались пересыщенные водные растворы лизоцима с добавлением хлорида натрия в качестве осадителя. Измерения растворов проводили при двух температурах: 35 °С для условий, соответствующих росту кристаллов лизоцима орторомбической сингонии, и 20 °С для условий роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Показано, что в растворе образуются агрегаты двух типов: более мелкие – «единицы» и более крупные – «кластеры». Единицы состоят из нескольких молекул, в то время как кластеры могут достигать размеров от 100 нм до 1 мкм. В начале агрегации плотность единиц уменьшилась, тогда как плотность кластеров увеличилась. На этом этапе агрегирование единиц с кластерами продолжалось. На следующем этапе плотность единиц стала постоянной, в то время как плотность кластеров начала уменьшаться, что означало прекращение агрегации единиц и начало агрегации кластеров друг с другом. Механизм агрегации для кластеров хорошо согласуется с моделью агрегации кластеров с ограниченной диффузией, но эта модель сама по себе не может объяснить то, что агрегаты разделены на две группы, соответствующие единицам и кластерам, и что единицы прекратили агрегирование в процессе агрегации. Авторами было сделано предположение, что образование белковых кластеров перед кристаллизацией имеет сходство с разделением фаз жидкость-жидкость, и что кластеры являются важным промежуточным состоянием для кристаллизации.

Георгалис [64] и др. проводили исследования поведения растворов лизоцима в присутствии солей NaCl и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при изменении их концентрации. Показано, на начальных этапах агрегации образуются массовые фрактальные кластеры, которые сосуществуют с мономерами или небольшими олигомерами лизоцима. С

помощью метода СРС удалось выявить прогрессивную перестройку фракталов в компактные структуры на последних этапах агрегации.

В работе Шкоури и др. [65] исследовались кристаллизационные растворы лизоцима с разной степенью пересыщения при добавлении хлорида натрия. С помощью метода ДРС показано, что в пересыщенном растворе лизоцима присутствуют частицы двух типов. Были получены гидродинамические радиусы каждого из типов частиц. Радиус частиц первого типа составил 25 \AA , а частиц второго типа – 2700 \AA . Гидродинамический радиус мономера лизоцима, рассчитанный из кристаллической структуры, составил 17 \AA , поэтому было сделано предположение, что частицы первого типа соответствуют мономерам лизоцима в пределах погрешности. Частица второго типа соответствует агрегату, состоящему из тысячи молекул белка.

Прайс и др. [66] изучали поведение растворов лизоцима в зависимости от концентрации белка, концентрации хлорида натрия, рН и температуры с использованием импульсно-градиентных ЯМР измерений. При рН 7.0 молекула лизоцима имеет положительный заряд, так как ее изоэлектрическая точка при рН 11. Поскольку молекула лизоцима заряжена, изменения в коэффициентах диффузии интерпретировались с учетом конкурирующих эффектов в белковых взаимодействиях (например, электростатического отталкивания) и агрегации. Поведение молекул в растворе согласовывалось с моделью Дерягин-Ландау-Вервей-Овербек (DLVO), учитывающую силы притяжения и отталкивания. Экспериментальные данные диффузии сравнивались с различными моделями самоорганизации. Коэффициенты диффузии высших олигомеров были получены из предположения, что мономеры агрегируют, как твердые сферы. Используя модель изодесмической ассоциации, константа равновесия для самоорганизации лизоцима при рН 4.6 и 298 К в присутствии 0.5 М NaCl оценивалась как $118 \pm 12 \text{ M}^{-1}$. Результаты работы демонстрируют агрегацию лизоцима при высоких концентрациях солей.

Методы ДРС и СРС, продемонстрированные Георгалисом и др., показали, что лизоцим перед кристаллизацией образует фрактальные кластерные агрегаты [67,68]. Аналогичные результаты агрегации молекул лизоцима в растворе изучались методом ДРС Танакой и др. [63,69]. Однако связь между кристаллизацией белка и фрактальной агрегацией не была определена. Необходимо различать агрегаты и кластеры, которые могут являться кристаллическими ядрами от тех, которые не могут образовывать впоследствии кристалл.

Вакаматсу и др. [70] исследовали агрегацию лизоцима в растворах на ранних стадиях кристаллизации с использованием анализа профилей прямого статического рассеяния и обсуждения связи между фрактальной агрегацией и условиями кристаллизации. Проводились измерения интенсивности рассеяния растворов лизоцима с концентрацией белка от 10 – 30 мг/мл при добавлении хлорида натрия разной концентрации. Основываясь на том, что фрактальные агрегаты демонстрируют степенной закон рассеяния волнового вектора, и экспериментальная интенсивность рассеяния соответствует линейной функции, было получено значение степени α ($I_q \sim q^{-\alpha}$, $\alpha > 0$), которое равно фрактальной размерности D , что, в свою очередь, дает информацию о внутренней фрактальной структуре. При концентрации белка и NaCl 20 мг/мл и 4.0 % (w/v) соответственно значение α составляло 1.59 ± 0.06 . А для раствора с концентрациями белка и NaCl 30 мг/мл и 3.5% (w/v) соответственно α составляло 1.66 ± 0.05 . В отличие от более высоких концентраций NaCl рассеяние от растворов с концентрацией 1.5 % (w/v) не имеет степенного закона. Это указывает на то, что агрегаты лизоцима, образующиеся в растворах с концентрацией NaCl 1.5 % (w/v), не являются фрактальными кластерами. При этом никакие кристаллы не образовались в растворах лизоцима с концентрацией NaCl 1.5 % (w/v). В растворах лизоцима, приводящих к кристаллизации, появляются плотные фрактальные кластеры с фрактальной размерностью D больше 1.5.

Методом аналитического ультрацентрифугирования изучалось образование в растворе лизоцима единицы роста при кристаллизации [71]. Исследовались

растворы, содержащие различные концентрации лизоцима и хлорида натрия. Кристаллизационные растворы подвергались ультрацентрифугированию с использованием режима, в котором осаждение и диффузия находились в равновесии. Градиент концентрации белка при центрифугировании в ячейке измерялся спектрофотометрически, а молекулярный вес рассчитывался по данным градиента концентрации. При анализе результатов учитывалось, что молекулы не взаимодействуют друг с другом. Во всех растворах, кроме условий, при которых выросли кристаллы, было показано, что молекулярный вес частиц находится в диапазоне 12 000 – 16 500 кДа. Из данных о молекулярной массе мономера лизоцима 14 400 кДа был сделан вывод, что молекулы лизоцима в ненасыщенных и в пересыщенных растворах существуют в виде мономеров.

Кристаллизация макромолекул представляет собой сложный процесс. Небольшие молекулы имеют только несколько контактов в кристаллической решетке, а макромолекулы обычно имеют 10 или даже 100 контактов между молекулами. Формирование упорядоченной трехмерной структуры может быть затруднено или невозможно при отсутствии или при наличии слишком большого количества сильных взаимодействий. Процесс зарождения и роста кристаллов включает упорядоченную сборку единиц роста в заданную трехмерную решетку. Пьюзи и Надарадж [72] предположили, что зародыши и кристаллизационные растворы лизоцима при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии являются высокоассоциированными, а ассоциированные частицы, имеющие симметрию 4_3 спирали, являются строительными блоками кристалла. Самоассоциированная фаза раствора переходит в фазу роста кристаллов, где агрегированные частицы являются единицами роста. Симметрия, приобретенная в растворе при фазе самоассоциации, облегчает как зарождение, так и рост кристаллов. Эта модель была разработана на основе экспериментальных данных, основанных на скорости роста граней, атомно-силовой микроскопии (АСМ) и данных переноса энергии флуоресценции для зарождения и роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии.

В работе [73] исследовалась скорость роста грани (110) кристалла лизоцима тетрагональной сингонии в зависимости от температуры, концентрации белка и рН буферного раствора. Было обнаружено, что при высокой степени пересыщения скорости роста достигают максимума, а затем начинают уменьшаться. При очень низкой степени пересыщения скорость роста асимптотически приближалась к нулю. Данные о скорости роста также показали зависимость от рН и концентрации осадителя, которые не могли быть охарактеризованы исключительно пересыщением. Был предложен механизм роста кристаллов лизоцима, включающий образование агрегатов, представляющих собой единицы роста, массовый перенос единицы роста к поверхности кристалла и рост граней кристалла с помощью добавления единиц роста. Предполагалось, что такой механизм может обеспечить более последовательное объяснение наблюдаемых тенденций скоростей роста.

В работе [74] авторы продолжили исследовать механизмы роста и морфологию тетрагонального кристалла лизоцима. Проводился анализ упаковки молекул и молекулярных связей в кристалле. Относительные силы пяти различных взаимодействий между молекулами в кристаллах тетрагонального лизоцима оценивались по числу межатомных связей, включая водородные связи и солевые мостики. Было выбрано два типа тетрамеров с осью 2_1 и 4_3 . Анализ связей показал, что тетрамер 4_3 обладает более сильными связями, по сравнению с тетрамером 2_1 . Поэтому в качестве строительного блока был выбран тетрамер с винтовой осью 4_3 . Было сделано предположение, что тетрамер 4_3 является строительным элементом для грани (101), тогда как октамер, состоящий из двух таких тетрамеров, является строительным элементом для (110) грани. Предполагалось что, тетрамеры играют центральную роль в определении механизма роста кристалла.

В работе [75] исследовалась скорость роста грани (110) тетрагонального лизоцима в зависимости от степени пересыщения. В более ранних исследованиях показано, что такие закономерности роста можно объяснить образованием единиц роста кристалла в виде агрегата с винтовой осью 4_3 . Из анализа структуры

тетрагонального лизоцима показано, что рост поверхности грани (110) является двухступенчатым процессом: более сильные межмолекулярные связи вызывают быстрое образование и накопление в объемном растворе агрегатов с винтовой осью 4_3 , тогда как более слабые связи в значительной степени ответственны за медленное присоединение единиц роста к поверхности кристалла.

Использовались различные модели роста кристаллов лизоцима, где в качестве единиц роста были мономеры в монодисперсном растворе лизоцима, а также тетрамеры – в полидисперсном в растворе. Ни одна из стандартных моделей роста не смогла объяснить наблюдаемые скорости роста в зависимости от температуры и концентрации белка. Две дислокационные и одна двумерная модель зарождения с единицами роста октамерами хорошо согласуется с измерениями скорости роста. Эти результаты согласуются с анализом молекулярной упаковки кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии и с исследованиями микроскопического роста кристаллов [76]. Даже с октамерами в качестве единиц роста дислокационная модель дает более точные результаты при низкой степени пересыщения, а при высокой – модель двумерного зарождения.

Работа [77] посвящена исследованию механизмов роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии с помощью метода атомно-силовой микроскопии. Проводилось сканирование рельефа поверхности грани (110) в направлениях [110] и [001]. В направлении [110] размер ступеней роста составил 5.6, 11.2 и 16.8 нм. Размер ступени роста 5.6 нм соответствует ширине агрегата с винтовой осью 4_3 , остальные кратны этому значению. В результате сканирования направления [001] размеры ступеней роста имели значения около 3.8, 7.6 и 11.4 нм, что соответствовало высоте агрегатов с одним, двумя и тремя виткам спирали 4_3 . Таким образом, был сделан вывод, что минимальной единицей, участвующей в росте грани (110) кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, является тетрамер с осью 4_3 . Эти результаты дают хорошее согласие с теоретическими работами [74,75] и более ранними экспериментальными наблюдениями [78–80]. Используемая методика АСМ не может решить вопрос о том, образуются ли эти единицы роста

из мономеров в растворе до присоединения к поверхности кристалла или непосредственно зарождаются на поверхности из мономеров.

Изучение скоростей роста поверхности грани (101) кристаллов тетрагонального лизоцима показало, что их необычная зависимость от пересыщения имеет сильное сходство с поведением роста грани (110) [76,81]. С увеличением степени пересыщения скорость роста увеличивается, достигает пикового значения и затем начинает уменьшаться. По мере снижения степени пересыщения скорость роста быстро снижается и асимптотически приближается к нулю. Такое сходство в поведении скоростей роста для обеих граней предполагает, что их механизмы роста также могут быть схожими.

Механизм роста поверхности грани (110) определялся двумя разными, но взаимодополняющими способами. Один из подходов состоял в том, чтобы проанализировать молекулярную упаковку в кристалле тетрагонального лизоцима и связать их с механизмом роста поверхности кристалла [74,75,82]. Результаты, полученные с помощью АСМ, дополнили предыдущие результаты и позволили вывести механизм молекулярного роста поверхности кристалла. Было показано, что рост кристаллов тетрагонального лизоцима осуществляется с помощью агрегатов с винтовой осью 4_3 , состоящих из четырех молекул [80,83]. С помощью АСМ сканирования было обнаружено, что к грани (110) присоединяются агрегаты разного размера с винтовой осью 4_3 [77].

Второй подход включал в себя связь условий роста кристаллов со скоростью роста граней и определение всех процессов, происходящих в растворе и на поверхности кристалла [73,75]. Предполагалось, что формирование мультимерных единиц роста происходит посредством процесса самоорганизации. А механизм роста либо – дислокационный, либо двумерный рост зародышей. Была разработана математическая модель всего процесса, основанная на сравнении теоретических скоростей роста с экспериментальными. В результате этого сравнения была получена единица роста, которая дала наилучшее согласие между теоретическими моделями и экспериментальными данными.

Применение двойного подхода к исследованию роста поверхности грани (110) показало, что рост происходит за счет образования кластеров лизоцима с осью 4_3 в растворе, после чего происходит их присоединение к поверхности кристалла. Такой же подход был применен и для исследования роста грани (101) [84]. Анализ кристаллической упаковки, произведенный в [74], показал, что для грани (101) минимальной единицей роста является тетрамер с винтовой осью 4_3 .

Грань (101) кристалла тетрагонального лизоцима является довольно нерегулярной, что делает ее более сложной для определения молекулярной упаковки и механизмов роста. Предсказываемый механизм молекулярного роста для этой грани включает в себя образование мономолекулярных слоев, путем добавления единиц роста в виде тетрамеров с осью 4_3 . Однако рельеф поверхности (101) подразумевает, что рост осуществляется не только присоединением тетрамеров, но и присоединением других видов агрегатов и примесей, что приводит к формированию многослойных ступеней роста. Таким образом, рост, вероятно, будет включать несколько единиц роста, аналогичных тем, которые наблюдаются для грани (110). Усредненная единица роста для грани (101) меньше, чем октамер и больше, чем тетрамер, что объясняет относительные скорости роста (101) и (110) граней при более высокой и более низкой степени пересыщения. Макроскопическая модель, которая использовалась в этом исследовании, включающая добавление различных единиц роста к поверхности грани (101) дислокационным и механизмом двумерного зародышеобразования, указывает на то, что средний размер единицы роста действительно находится между тетрамером и октамером.

В работе Вичмана и др. [85] проводился анализ ступеней роста грани (110) поверхности кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. Анализ АСМ изображений поверхности грани (110) показал, что наиболее часто встречаемая высота ступеней составляла 5.5 ± 0.3 нм, хотя также наблюдались и ступени высотой 2.8 нм. При этом ступени меньшего размера наблюдались только попарно. Также была рассчитана нормальная скорость роста, которая составляла 0.28 ± 0.03 нм/с. На некоторых изображениях наблюдается рост посредством двумерного

зародышеобразования. Сравнение изображений показало, что поверхность грани (110) относительно гладкая с шероховатостью менее 0.2 нм, по сравнению с поверхностью (101), у которой шероховатость около 1.5 нм. АСМ изображения грани 110 демонстрируют, что к поверхности кристалла присоединяются агрегаты лизоцима, а не мономеры.

Димитров и др. [86] также изучали рост кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии на ранней стадии кристаллизации. В своей работе авторы использовали условия кристаллизации с семью различными концентрациями белка от 25 до 55 мг/мл. В качестве осадителя и буфера использовали 5 %-ный раствор NaCl (w/v) и 0.1 М натрий-ацетатный буфер с pH 4.0 соответственно. Измерения проводились при постоянной температуре (22.0 °C). Скорость роста кристаллов лизоцима определялась путем анализа микроскопических изображений кристаллов, полученных при относительно высоком увеличении (600x). Данные о скорости роста кристаллов анализировались в соответствии с равновесным распределением агрегатов лизоцима, основанном на модели роста, как двухчастичном процессе (мономер ↔ димер ↔ тетрамер ↔ октамер ↔ гексадекамер), описанном в работе Ли и др. [76]. Было обнаружено, что и октамеры, и тетрамеры являются возможными единицами роста кристаллов и представляют собой наиболее объемную агрегатную фракцию, оказывающую влияние на процесс роста кристаллов. Результаты показывают, что тетрамер, по-видимому, является минимальным критическим зародышем во всем диапазоне концентраций белка, где наблюдается классическое зарождение.

Высокие уровни перенасыщения являются необходимым, но недостаточным условием для кристаллизации очищенных белков. В отличие от большинства малых молекул, агрегация белков может идти различными путями, что делает результаты кристаллизации совершенно непредсказуемыми. Феррера и др. [87] исследовали растворы лизоцима, содержащие 3 % хлорида натрия. Исследования растворов проводили в диапазоне концентраций лизоцима от 25 до 50 мг/мл с шагом 5 мг/мл. В данной работе с помощью методов динамического рассеяния

света и оптической микроскопии было показано, что зарождению кристаллов лизоцима предшествует начальная стадия олигомеризации белка и прогрессирующее образование метастабильных кластеров. Так, было показано, что в растворе лизоцима присутствуют две группы рассеивающих частиц: олигомеры малого порядка с растворенными молекулами белка, средний гидродинамический радиус которых составил $R \approx 3$ нм, и метастабильные кластеры со средним гидродинамическим радиусом $R > 100$ нм. По данным ДРС в растворе лизоцима без NaCl содержатся частицы с гидродинамическим радиусом $R = 2.15$ нм, соответствующие молекулам растворенного белка. Значение радиуса частиц хорошо согласуется с рассчитанным гидродинамическим радиусом мономера лизоцима [63,88]. В растворах лизоцима без хлорида натрия не было выявлено признаков агрегации белка при выдерживании раствора при температуре 289.2 К. Было показано, что присутствие осадителя не только снижает растворимость белка, но и способствует быстрому образованию олигомеров малого порядка.

Образование метастабильных кластеров происходило менее, чем за 6 минут после смешивания растворов белка и осадителя при концентрациях белка и NaCl от 25 до 50 мг/мл и 1.3 % соответственно при температуре 289.2 К. Гораздо более длительное время образования метастабильных кластеров, 4.5 часов, наблюдалось в экспериментах, проводимых при более высокой температуре 298 К. Постепенное снижение относительной интенсивности рассеяния являлось результатом образования и роста метастабильных кластеров за счет присоединения мономеров белка, а также является следствием образования кристаллов лизоцима. При увеличении общей концентрации белка наблюдалось заметное увеличение радиуса олигомеров размером более 3 нм.

Метод ДРС сам по себе не может различить совокупность различных олигомеров малого порядка, присутствующих в растворе, поэтому в работе использовались модели, включающие мономеры \leftrightarrow димеры \leftrightarrow тетрамеры \leftrightarrow октамеры \leftrightarrow 16-меры [76], для оценки содержания различных олигомеров малого порядка в растворе лизоцима с хлоридом натрия. На основании данных о

гидродинамическом радиусе мономера (2.15 нм), предполагалось в приближении сферической формы частиц, что гидродинамические радиусы димеров, тетрамеров, октамеров, 16-меров составляют 2.71 нм, 3.41 нм, 4.30 нм и 5.42 нм соответственно. Значения интенсивности использовались для оценки количественной доли каждого олигомера. Возрастающие значения гидродинамического радиуса со временем предположительно являлись следствием постепенного образования олигомеров, таких как тетрамеры, октамеры или 16-меры, которые, по-видимому, необходимы для образования метастабильных кластеров.

Время формирования мезоскопических кластеров варьируется от нескольких минут до более, чем 4 ч в зависимости от степени пересыщения раствора. Последующая фаза роста кластеров происходит за счет включения белковых мономеров и олигомеров низкого порядка, а не за счет слияния более мелких агрегатов. При гидродинамических радиусах, быстро превышающих диапазон субмикрометров, метастабильные кластеры постоянно конкурируют за растворенный белок. Они также выступают в качестве гетерогенных центров зародышеобразования для образования кристаллических ядер. Рост кристаллов происходит параллельно с ростом кластеров.

В работе Ке и др [89] исследовался процесс роста кристалла лизоцима и кинетика роста поверхности кристалла методом компьютерного моделирования на основе случайного процесса Монте-Карло. При моделировании процесса авторы учитывали число связей на поверхности кристалла, тип агрегата и энергию миграции. В качестве единиц роста рассматривались мономеры, димеры и тетрамеры. Полученные модели сравнивались с экспериментальными результатами скорости роста граней кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии [73]. Результаты показали, что, если в процесс присоединения к поверхности кристалла включены только мономеры, то моделирование не воспроизводит экспериментально наблюдаемую скорость роста кристаллов лизоцима при высоком пересыщении. Включение агрегатов в качестве одного из

типов единиц роста дает хорошее согласие с экспериментально наблюдаемыми тенденциями скорости роста как при низкой, так и при высокой степени пересыщения.

Исследования начальной стадии кристаллизации различных систем выявили особенности, которые нельзя объяснить с помощью классической теории нуклеации [90]. Большое количество экспериментальных результатов, подтвержденных теорией и экспериментом, предполагают, что на первой стадии до формирования кристаллической структуры образуется метастабильная промежуточная фаза в виде небольшого кластера или макроскопической плотной жидкой фазы [52,91,92]. На втором этапе происходит зародышеобразование внутри метастабильной промежуточной фазы. Образование и динамику метастабильной промежуточной фазы изучали Шаутер и др. [93] на примере кристаллизации бычьего бета-лактоглобулина в присутствии многовалентных солей. Авторы изучали временные характеристики с использованием методов МУРР и оптической микроскопии, уделяя особое внимание механизму зародышеобразования, а также роли метастабильной промежуточной фазы в кристаллизации. Показано, что белковые агрегаты образуют метастабильную фазу, которая приводит к росту кристалла. Экспериментальные результаты вместе с моделированием скорости роста подтвердили двухступенчатый механизм нуклеации на начальной стадии кристаллизации.

В работе Векилова и др. [94] исследовалась нуклеация белков, происходящая при кристаллизации. В этой работе методами ДРС, АСМ и броуновской микроскопии показано, что предшественником нуклеации является образование в растворе мезоскопических кластеров. Кластеры имеют размер в несколько сотен нанометров, а их свойства в пересыщенных растворах аналогичны свойствам в гомогенных ненасыщенных растворах. Кластеры существуют благодаря конформационной гибкости белковых молекул, что приводит к обнажению гидрофобных поверхностей и усилению межмолекулярного связывания. Результаты работы демонстрируют, что конформационная гибкость белка может

быть механизмом образования метастабильных мезоскопических кластеров и зародышей кристалла.

Недавно был предложен двухступенчатый механизм зарождения кристаллов в растворе [55,95–97]. Предполагалось, что первым этапом зарождения кристаллов является образование беспорядочных белковых кластеров мезоскопического размера. Вторым этапом было образование кристаллических зародышей внутри кластеров [95,98,99]. Этот механизм объяснил большую часть расхождений между теорией и экспериментом по росту кристаллов из раствора, включая скорость зарождения, которая на десять или более порядков медленнее предсказанной классической теорией нуклеации [55,99,100].

Выводы о свойствах кластера демонстрируют две необычные особенности. Во-первых, кластеры существуют в гомогенной области фазовой диаграммы там, где должны присутствовать только одиночные молекулы белка в стабильном состоянии. Во-вторых, они обладают значительным избытком свободной энергии, что должно привести к их быстрому распаду.

Кластеры размером до нескольких сотен нанометров представляют собой вторую фазу. В действительности раствор является негомогенным, а двухфазным. С другой стороны, раствор сохраняет три степени свободы: температуру, давление и концентрацию. В соответствии с фазовым правилом Гиббса, $f=2+c-\pi$, где f – число степеней свободы, c – число компонент и π – число фаз. Если $f=3$ и $\pi=2$, то получается, что $c=3$. Первые две компоненты тривиальные: белок и растворитель. Наличие третьей компоненты вызвано присутствием кластерной фазы, можно предположить, что этот новый компонент лежит в основе кластерного механизма. Таким образом, новая компонента должна быть новым состоянием белков. Широкий спектр белков, для которых были обнаружены кластеры, исключает специфические для белка модификации: окисление, протеолиз, ковалентную димеризацию и другие. Новый компонент должен образовываться в области высокой концентрации белка и распадаться при низких концентрациях, и это говорит о том, что этот компонент представляет собой слабосвязанный димер белка

или другой олигомер. Следуя этим соображениям, было сделано предположение, что кластеры представляет собой смесь белковых мономеров и переходных олигомеров [92]. Олигомеры стабильны при высоких концентрациях, типичных для ядер кластеров. Так как они диффундируют из центра кластера к периферии кластера, то они распадаются обратно на мономеры. В растворе, состоящем из мономеров белка, флуктуации концентрации приводят к областям с высокой концентрацией белка. Простые термодинамические оценки показывают, что области, в которых концентрация сопоставима с плотной жидкой фазой, малы и содержат несколько молекул и не выживают в течение времени, превышающего время диффузии [92]. Однако в некоторых из этих колебаний образуются белковые олигомеры.

Мезоскопические кластеры были продемонстрированы в растворах различных белков. Обычно диаметр таких кластеров порядка 100 нм, а каждый содержит примерно 10^4 – 10^5 белковых молекул [52,101,102].

1.4. Заключение

Большинство работ по исследованию процессов кристаллизации было сделано на примере модельного белка лизоцима. Методы МУРР, МУРН, ДРС и СРС позволили показать, что на начальном этапе кристаллизации происходит агрегация, кластеризация молекул лизоцима. С помощью анализа скоростей роста были выдвинуты предположения о характере агрегатов и кластеров, образующихся перед кристаллизацией. С помощью метода АСМ были сделаны выводы о характере агрегатов и кластеров, участвующих в росте граней лизоцима тетрагональной сингонии.

При исследовании растворов белков не удалось точно определить характер агрегатов и кластеров. Также не удалось точно определить их структуру. Для определения структуры агрегатов, образующихся на начальном этапе кристаллизации и участвующих в росте кристаллов лизоцима, требуется провести дополнительные исследования.

ГЛАВА 2. АППАРАТУРНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ КРИСТАЛЛИЗАЦИИ БЕЛКОВ

2.1. Получение кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Поиск условий кристаллизации

2.1.1. Подготовка растворов для кристаллизации и проведения малоугловых экспериментов

Для приготовления образцов использовали очищенный яичный лизоцим (HEWL) фирмы Sigma (CAS # 12650-88-3) без дополнительной очистки и хлорид натрия с высоким классом чистоты фирмы Helicon (CAS # 7647-14-5) в качестве осадителя. В качестве растворителя была использована протонированная (везде, где не указано иное) ультрачистая вода Millipore (18 МОм* см) или дейтерированная вода (D₂O) производства Line Chemical (сопротивление воды 15 МОм·см). Лизоцим и хлорид натрия растворяли в 0.2 М натрий-ацетатном буфере (далее буфер) с pH = 4.5 и pD = 4.55 фирмы Helicon (CAS # 6131-90-4), приготовленном с использованием D₂O и H₂O. Растворы белка и осадителя фильтровали с помощью мембранных шприцевых фильтров Millex с размером пор 0.22 мкм, раствор белка центрифугировали в течение 10 мин с частотой 10 000 об./мин. Изначально растворы лизоцима и хлорида натрия готовили высокой концентрации, 140, 120 и 70, 50 мг/мл соответственно. Затем раствор белка разбавляли буфером до концентрации: 120, 100, 80, 60, 40, 20 мг/мл, а раствор осадителя: 50, 30, 10 мг/мл. Концентрацию растворов белка проверяли с помощью спектров поглощения при длине волны 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Белок с осадителем смешивали за час до начала измерения.

2.1.2. Кристаллизация лизоцима при добавлении в качестве осадителя хлорида натрия методом диффузии паров растворителя

Для определения типа симметрии кристалла лизоцима при использовании осадителя, хлорида натрия, была проведена кристаллизация методом диффузии паров растворителя. Кристаллизация проводилась в кристаллизационной ячейке на стеклянной силанизированной подложке. В ячейку помещали раствор осадителя с концентрацией 50 мг/мл объемом 500 мкл. На подложку наносили сначала раствор объемом 3 мкл с концентрацией 80 мг/мл, затем добавляли раствор осадителя такого же объема с концентрацией 50 мг/мл. Концентрация лизоцима и хлорида натрия в капле составляла 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно. В процессе роста поддерживалась постоянная температура 20 °С.

2.1.3. Поиск условий роста кристаллов лизоцима

Для определения условий, в которых необходимо проводить исследования структуры растворов в условиях кристаллизации, был проведен скрининг условий роста кристаллов лизоцима с осадителем, хлоридом натрия. Кристаллизацию проводили методом кристаллизации в объеме с использованием специализированных планшетов Hampton Research. Метод кристаллизации в объеме был выбран, исходя из того, что при проведении исследований растворов методом МУРР и МУРН измерения проводятся на заранее смешанных растворах белка с осадителем, как и при проведении кристаллизации в объеме.

Лизоцим с осадителем смешивали в равных пропорциях объемом по 20 мкл. Затем в кристаллизационную ячейку загружалась смесь лизоцима с осадителем объемом 2 мкл. Каждая ячейка с кристаллизационным раствором покрывалась специальным силиконовым маслом (Hampton Research) для герметизации.

Для проведения скрининга были выбраны концентрации лизоцима 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 мг/мл и хлорида натрия 5, 15, 25, 35 мг/мл. Кристаллизация проводилась при температуре 10 и 20 °С. Результат кристаллизации фиксировался через 14 дней после начала кристаллизации.

2.1.4. Исследование структуры кристалла лизоцима

Для подтверждения образования кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии при добавлении хлорида натрия был произведен рентгеноструктурный анализ (РСА). Для проведения эксперимента был выбран кристалл, полученный при концентрации белка и осадителя 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно. Сбор дифракционных данных проводился на станции ID23-1 Европейского источника синхротронного излучения ESRF (Гренобль, Франция). При проведении сбора данных использовалась низкая температура для снижения радиационного распада кристаллов при взаимодействии с рентгеновским излучением. Для предотвращения разрушения кристалла при заморозке кристалл был предварительно заморожен в криорастворе, содержащем 15 % глицерина и 25 мг/мл хлорида натрия. Набор собран методом вращения при длине волны 1 Å, угол вращения 155.1°, угол качания 0.15°. Расстояние образец-детектор составляло 315.64 мм. Экспериментальные интенсивности обработаны с использованием программного пакета iMosflm [103]. Полученный набор использовался для решения пространственной структуры лизоцима методом молекулярного замещения с помощью программы PHASER [104].

2.2. Исследования растворов белков методом МУРР и МУРН

2.2.1. Исследование растворов белков методом МУРР с использованием синхротронного излучения на станции ДИКСИ

Предварительные измерения растворов лизоцима в условиях кристаллизации методом МУРР проводились на станции ДИКСИ (рис. 2.1.) Курчатовского источника синхротронного излучения КИСИ (Москва, Россия) на длине волны 1.62 \AA с использованием двухкоординатного детектора Pilatus3 1М. Расстояние образец-детектор составляло 300 мм.

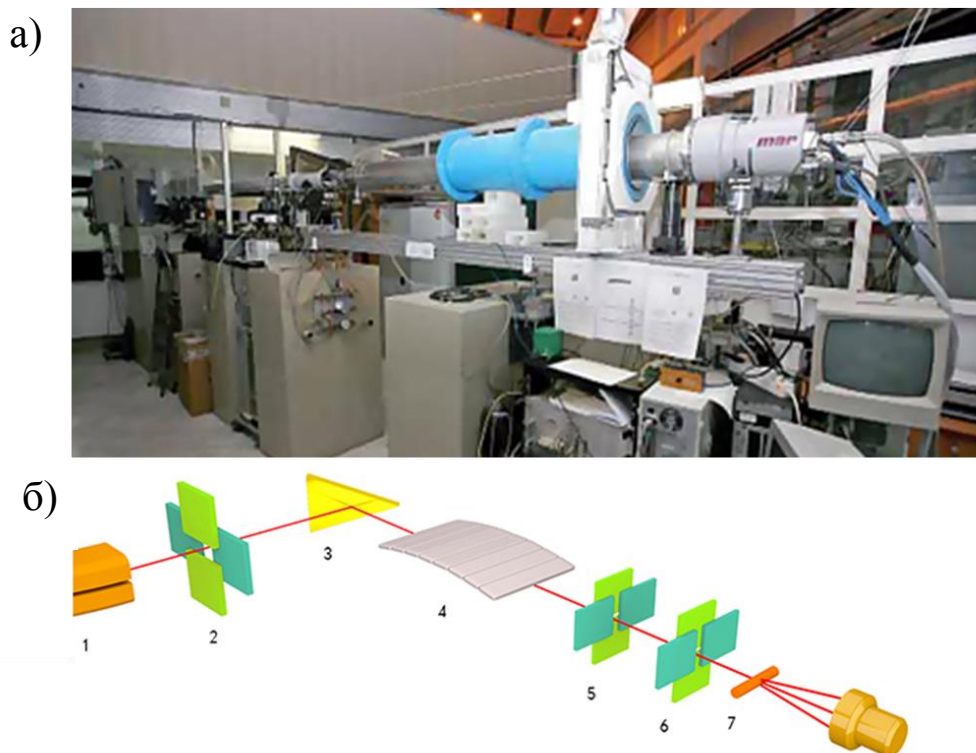


Рис. 2.1. Фотография (а) и схематическое изображение (б) станции «ДИКСИ» Курчатовского источника синхротронного излучения, где: 1 – поворотный магнит, 2, 5, 6 – коллимирующие щели, 3 – кристалл-монокроматор, 4 – фокусирующее зеркало, 7 – образец, 8 – двумерный детектор

Исследуемые образцы загружались в кварцевые капилляры с диаметром 2.0 мм и толщиной стенок 0.01 мм. Объем образца в капилляре составлял от 50 до 200 мкл. Капилляр погружался в специальную термостатируемую ячейку (рис. 2.2.). Время экспозиции составляло 5 минут, а сечение пучка на образце – $0.4 \times 0.6 \text{ мм}^2$.

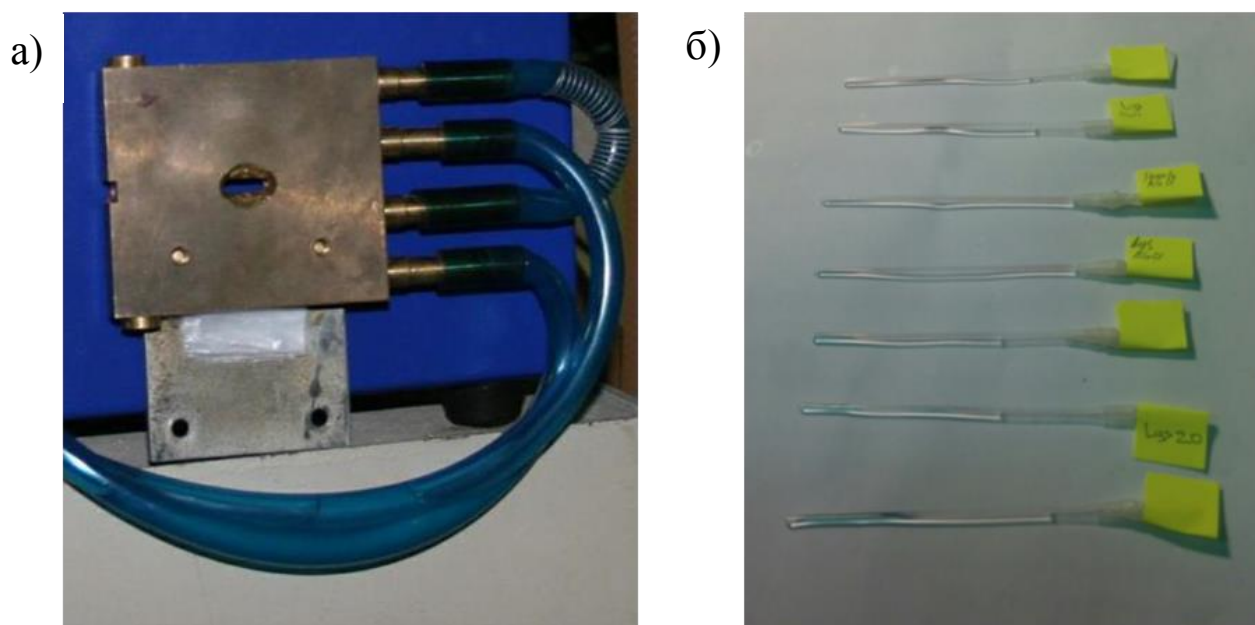


Рис. 2.2. Термостатируемая ячейка (а) и кварцевые капилляры с образцами (б)

Измерения растворов начинали с температуры $30 \text{ }^\circ\text{C}$ и последовательно снижали ее до 20 и $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Выбор такой схемы измерений, с высокой начальной температурой, был обусловлен тем, что олигомеры или микрокристаллы, образованные при температуре $10 \text{ }^\circ\text{C}$, могли бы не успеть распасться при повышении температуры. Из-за этого можно было получить неверный результат о процентном содержании олигомеров в растворе. Поэтому измерения начинали при высокой ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) температуре, при которой растворимость белка выше, чем при $10 \text{ }^\circ\text{C}$, но при данной температуре еще не имеет место денатурация белка.

2.2.2. Исследование растворов белков методом МУРР с использованием синхротронного излучения на станции BioSAXS

Измерения растворов лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРР проводились на станции BM29 BioSAXS (рис. 2.3.) [105]. Европейского источника синхротронного излучения (Гренобль, Франция) с энергией 12.4 кэВ с использованием двухкоординатного детектора Pilatus 1M. Расстояние образец-детектор составляло 2.9 м.

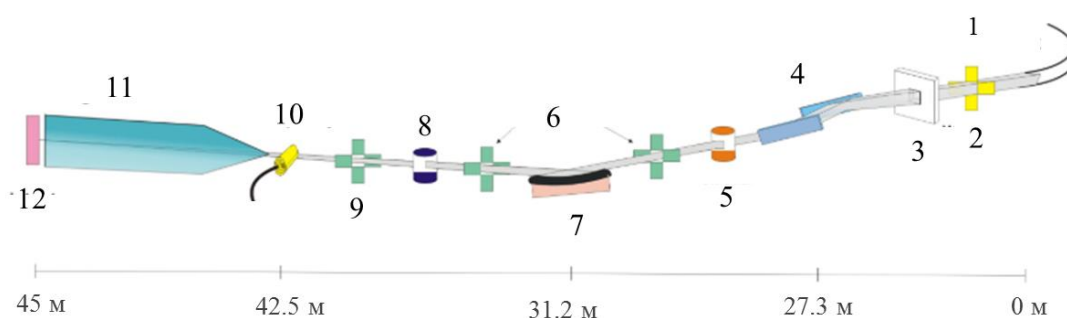


Рис. 2.3. Схематическое изображение станции BM29 ESRF, где: 1 – поворотный магнит; 2 – щели белого пучка; 3 – маска; 4 – монохроматор; 5 – калибратор энергии, 6 – монохроматические щели; 7 – тороидальное зеркало; 8 – быстрый затвор; 9 – щель; 10 – образец в капилляре; 11 – вакуумная трубка; 12 – детектор [105]

Исследуемые образцы помещались в специальную термостатируемую роботизированную систему [106] в кюветы из полистирола объемом 200 мкл, нагрев которых осуществлялся одновременно. Первоначально образцы нагревались до температуры 30 °С, а затем температуру последовательно снижали до 20 и 10 °С. Далее, 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 – 700 мкм².

2.2.3. Исследование растворов белков методом МУРН с использованием нейтронов на станции ЮМО ИБР-2

Данные МУРН были получены на модернизированном двухдетекторном спектрометре ЮМО на ИБР-2 ОИЯИ (Дубна, Россия) [107]. Расстояние от образца до детектора составляло 12.96 и 5.3 м для детекторов «NEW» и «OLD» соответственно. Диапазон длин волн варьировался от 0.7 до 4.0 Å. Схема спектрометра представлена на рис. 2.4.

Исследуемые образцы помещались в специальные кварцевые кюветы, объем каждого образца составлял 1.5 мл. Кюветы помещались в термостат. Первоначально образцы нагревались до температуры 30 °С, затем температуру понижали до 20, 10 °С. Время экспозиции каждого измерения составляло 1 ч.

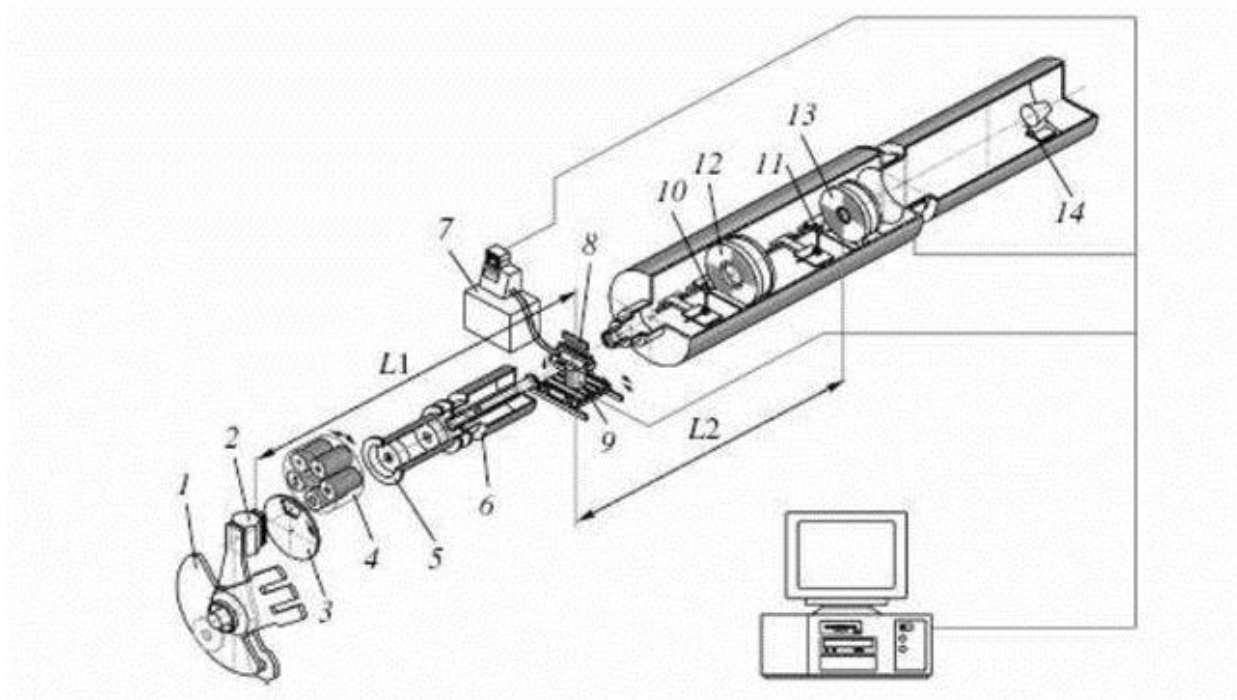


Рис. 2.4. Схема функционального спектрометра ЮМО на реакторе ИБР-2: 1 – система с двумя отражателями; 2 – реактор с модератором; 3 – чоппер; 4 – первый коллиматор; 5 – вакуумная трубка; 6 – второй коллиматор; 7 – термостат; 8 – держатель образца; 9 – место для электромагнита во время экспериментов на магнитных образцах; 10, 11 – стандарты ванадия; 12 – первый детектор «OLD»; 13 – второй детектор «NEW»; 14 – детектор прямого пучка.

2.2.4. Методика обработки экспериментальных данных

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» станции BM29 [108]. Следующие этапы обработки (усреднение сигнала от буфера раствора, вычитание усредненного сигнала от буфера из данных рассеяния белками и нормировка на концентрацию белков) выполнялись с

помощью программы PRIMUS [28], входящей в программный пакет ATSAS [109–111]. В результате 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 лизоцима при различных условиях. Угловой диапазон составлял $0.03 < s < 5.0 \text{ нм}^{-1}$. Радиационного повреждения на исследуемых образцах обнаружено не было.

При изменении условий (концентрации, температуры, состава буфера) меняются формы кривых рассеяния (в частности, наклон начальной части кривых). Это соответствует изменению олигомерного состава раствора: при определенных условиях наряду с мономерными частицами начинают образовываться мультимеры (олигомеры более высокого порядка, например, димеры, тетрамеры и т.д.). Поэтому анализ данных проводился с учетом наличия нескольких компонент в системе.

Интенсивность рассеяния многокомпонентной системы (в случае разбавленного раствора) может быть представлена в виде линейной комбинации рассеяния от ее компонент в следующем виде:

$$I(s) = \sum_{k=1}^N v_k I_k(s), \quad (2.1)$$

где N – количество компонент системы, v_k , $I_k(s)$ – относительная объемная доля и интенсивность k -й компоненты соответственно.

Для полидисперсной системы взаимодействующих частиц интенсивность каждой компоненты определяются следующим образом:

$$I_k(s) = S_k(s) \int_0^\infty D_k(R) V_k(R) [\Delta\rho_k(R)]^2 i_{0k}(s, R) dR, \quad (2.2)$$

где R – размер частицы, $D_k(R)$ – нормированное объемное распределение частиц по размеру для k -й компоненты, $V_k(R)$ – эффективный объем k -й компоненты, $\Delta\rho_k(R)$ – рассеивающий контраст k -й компоненты, $i_{0k}(s, R)$ – нормированный формфактор k -й компоненты, $S_k(s)$ – структурный фактор k -й компоненты, ответственный за межчастичное взаимодействие.

Экспериментальные кривые, прошедшие первичную обработку, обрабатывались с помощью программы POLYMIX, которая является усовершенствованной версией программы MIXTURE [112]. Эта программа выполняет приближение теоретической кривой к экспериментальной с помощью моделирования в приближении простых геометрических тел с учетом межчастичного взаимодействия согласно (1, 2). В рамках данной работы моделирование выполняли тремя компонентами полидисперсных сфер. Первая компонента соответствовала размерам мономерных и димерных частиц, вторая – олигомерам более высокого порядка (тетрамерам, гексамерам, октамерам и т.д.), третья – малоразмерным частицам, соответствующим флуктуациям плотности в растворителе, выяснение природы которых требует дополнительного исследования. Для растворов без добавления осадителя учет отталкивающего взаимодействия между молекулами лизоцима (приводящий к изменению наклона кривой в области малых углов) проводили с помощью структурного фактора, рассчитанного для потенциала жестких сфер в приближении Перкуса–Йовика [113].

Чтобы получить более детальное структурное описание системы, кривые МУРР и МУРН обрабатывались с помощью программы OLIGOMER [28] для определения объемных долей мономеров и олигомеров более высокого порядка. Расчет теоретических кривых олигомерных компонентов проводился с помощью программы CRY SOL (МУРР) [114] и CRYSON (МУРН). В качестве мономерной компоненты взяли известную структуру мономера лизоцима (PDBID: 4WLD), а модели димера, тетрамера, гексамера и октамера были получены по методике, описанной в [1,2].

Структура молекулы лизоцима (PDBID: 4WLD), определенная с разрешением 1.54 Å, была выбрана для построения молекулярных моделей возможных единиц роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии. Кристалл относится к пространственной группе $P4_32_12$ с параметрами элементарной ячейки $a = b = 79.2 \text{ \AA}$, $c = 37.9 \text{ \AA}$ и $\alpha = \beta = \gamma = 90.0^\circ$. Используя программу Coot [115], было проведено распространение мономера в пространстве

для воссоздания кристаллической упаковки, используя операторы симметрии, в соответствии с пространственной группой кристалла $P4_32_12$ ($-X, -Y, 1/2 + Z; 1/2 - Y, 1/2 + X, 3/4 + Z; 1/2 + Y, 1/2 - X, 1/4 + Z; 1/2 - X, 1/2 + Y, 3/4 - Z; 1/2 + X, 1/2 - Y, 1/4 - Z; Y, X, -Z, -Y, -X, 1/2 - Z$). Из анализа молекулярной упаковки кристалла лизоцима был выделен повторяющийся мотив, октамер с винтовой осью 4_3 , которым можно путем трансляции заполнить кристалл (рис. 2.5.). Далее были получены координаты каждого мономера, входящего в октамер. На основании координат мономеров в программе PyMOL [116] был построен октамер лизоцима с винтовой осью 4_3 , и затем на основании структуры октамера были построены другие олигомеры: димер, тетрамер, гексамер.

Средний радиус инерции для смеси олигомеров рассчитывался по формуле:

$$R_g = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w_i (M_{w_i} * R_{g_i})^2}{\sum_{i=1}^N w_i M_{w_i}^2}} \quad (2.3)$$

где M_{w_i} – молекулярная масса каждого олигомера, N – количество олигомеров, R_{g_i} – радиус инерции каждого олигомера, w_i – объемная доля олигомера каждого олигомера.

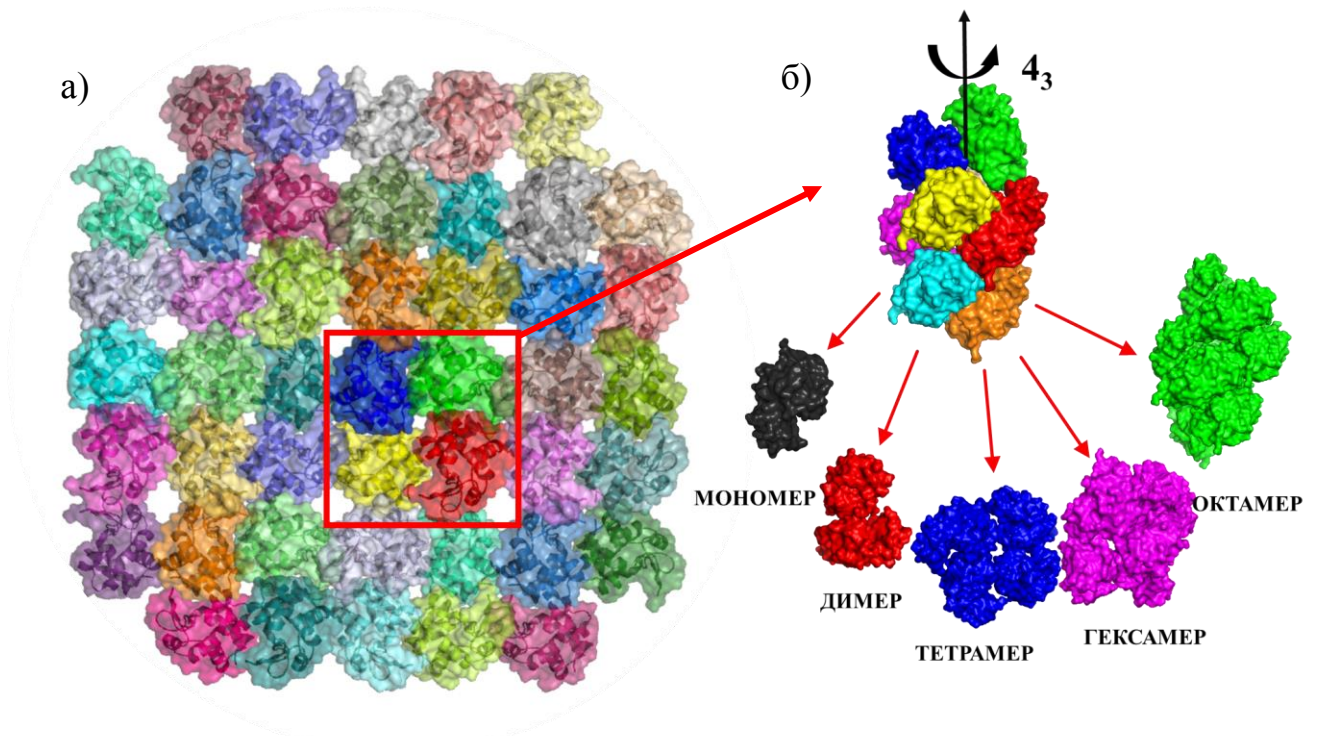


Рис. 2.5. Проекция структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии (PDB 4WLD) (а), олигомеры, выделенные из его структуры (б)

Качество приближения оценивалось с помощью минимизации невязки χ^2 между экспериментальными данными и рассчитанными модельными приближениями по формуле:

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I(s_j) - c I_{calc}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (2.4)$$

где N – число экспериментальных точек, c – шкалирующий коэффициент, $I_{calc}(s)$ и $\sigma(s_j)$ – рассчитанная интенсивность и ошибка экспериментальной интенсивности в соответствующих угловых узлах s_j .

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ ЛИЗОЦИМА ПРИ РОСТЕ КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ МЕТОДОМ МУРР

3.1. Кристаллизация лизоцима при использовании в качестве осадителя хлорида натрия

Для определения типа симметрии кристалла лизоцима, образующегося при добавлении в качестве осадителя хлорида натрия, был выращен кристалл лизоцима методом диффузии паров на стеклянной силанизированной подложке при температуре 20 °С в условиях с концентрациями лизоцима и NaCl 40 мг/мл и 25 мг/мл соответственно.

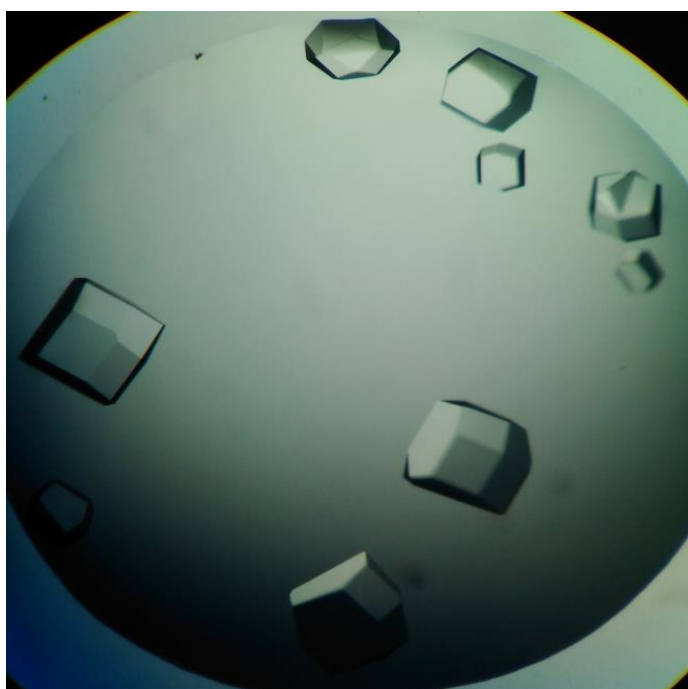


Рис. 3.1. Кристаллы лизоцима, выращенные методом диффузии паров при температуре 20 °С в условиях с концентрациями лизоцима и NaCl 40 мг/мл и 25 мг/мл

Через несколько дней с помощью оптического микроскопа было оценено качество кристаллов. На рис. 3.1. представлен результат кристаллизации, изображение кристаллов лизоцима. Для проведения рентгенодифракционного анализа были выбраны наиболее крупные монокристаллы.

3.2. Структура кристалла лизоцима

Набор дифракционных данных до разрешения 1.89 Å собран с одного кристалла с использованием источника синхротронного излучения. Экспериментальные интенсивности обработаны до разрешения 1.89 Å с использованием программного пакета iMosflm [103]. На рис. 3.2. представлены две рентгенограммы из набора.

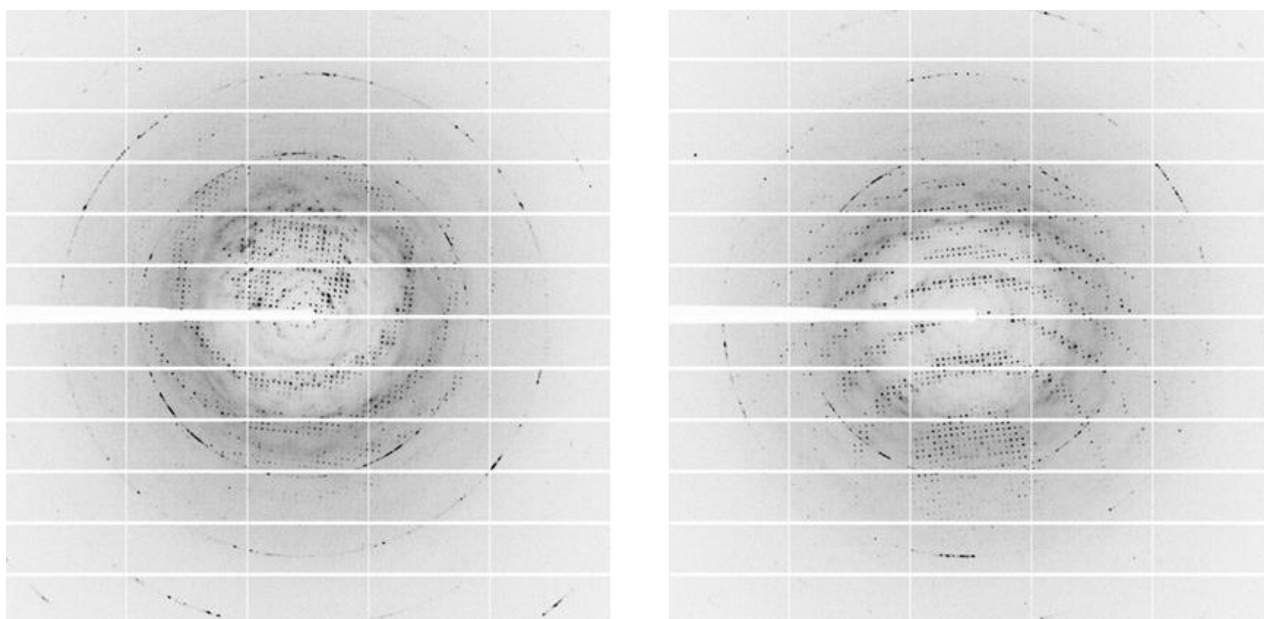


Рис. 3.2. Рентгенограммы от кристалла лизоцима, выращенного при концентрации белка и осадителя 40 и 25 мг/мл соответственно

Полученный набор использовался для решения пространственной структуры фермента методом молекулярного замещения с помощью программы PHASER [104]. Статистические характеристики набора приведены в табл. 3.1.

Таблица 3.1. Статистические характеристики рентгенодифракционного набора, полученного от кристалла лизоцима

Пространственная группа	$P4_32_12$
$a, b, c, \text{Å}; \alpha, \beta, \gamma, \text{град}$	36.1, 77.0, 77.0; 90, 90, 90
Разрешение, Å	100.0-1.89 (1.96–189)
Кол-во независимых рефлексов	26264 (2248)
Полнота, %	97.3 (93.1)
$I/\sigma(I)$	6.33 (2.1)
Rmrgd-F, %	10.6

*В скобках приведены значения для последней оболочки

Структура фермента была решена методом молекулярного замещения. Исходной моделью послужили координаты атомов нелигандированной молекулы фермента, полученные при более низком разрешении. Кристалл лизоцима принадлежит пространственной группе $P4_32_12$, в независимой части кристаллической ячейки находится одна субъединица молекулы фермента. Уточнение полученной модели было проведено по программе REFMAC [117]. Статистические характеристики набора и параметры уточнения пространственной структуры приведены в табл. 3.2.

Таблица 3.2. Статистические характеристики уточнения структуры лизоцима

Разрешение, Å	1.89
Кол-во рефлексов	26264
Rcryst, %	21.3
Rfree, %	24.7
Кол-во уточненных атомов белка	2205

Средний В-фактор, \AA^2	23.8
Стандартные отклонения (RMS)	
Длины связей, \AA	0.009
Углы, град	1.345
Карта Рамачандрана	
Наиболее благоприятные области,	90.3
Допустимые области, %	9.7
Запрещенные области, %	0.0

3.3. Результат поиска условий роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии

Наличие кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии в капле фиксировалось с помощью оптического микроскопа Nikon Eclipse LV 150. Результат скрининга условий роста тетрагонального лизоцима методом кристаллизации в объеме при температуре 10 °С представлен на рис. 3.3. и рис. 3.4. Фотографии кристаллов получены при увеличении $\times 5$.

Кристаллы выросли в течение 14 дней при концентрации лизоцима 70, 60, 50, 30, 20, 10 мг/мл и хлорида натрия 35 мг/мл. При концентрации белка и осадителя 70 и 35 мг/мл соответственно (рис. 3.3. - 1) выросло много кристаллов с размерами от 200 до 500 мкм. Встречаются преимущественно поликристаллы. При понижении концентрации белка до 60 мг/мл ($C_{\text{NaCl}}=35$ мг/мл) также выросло много кристаллов (рис. 3.3. - 5). Встречаются преимущественно монокристаллы размером от 100 до 400 мкм. При концентрации белка и осадителя 50 и 35 мг/мл соответственно количество кристаллов уменьшается, а их размеры увеличиваются по сравнению с кристаллами с концентрациями белка 70 и 60 мг/мл. В результате кристаллизации образовались монокристаллы размерами 200 – 500 мкм (рис. 3.3. - 9).

При концентрации белка и осадителя 40, 30, 20 и 35 мг/мл соответственно (рис. 3.4. - 1, 5, 9) выросло несколько монокристаллов с размерами от 300 до 600 мкм. Один кристалл размера ~ 50 мкм образовался при концентрации белка и осадителя 10 и 35 мг/мл.

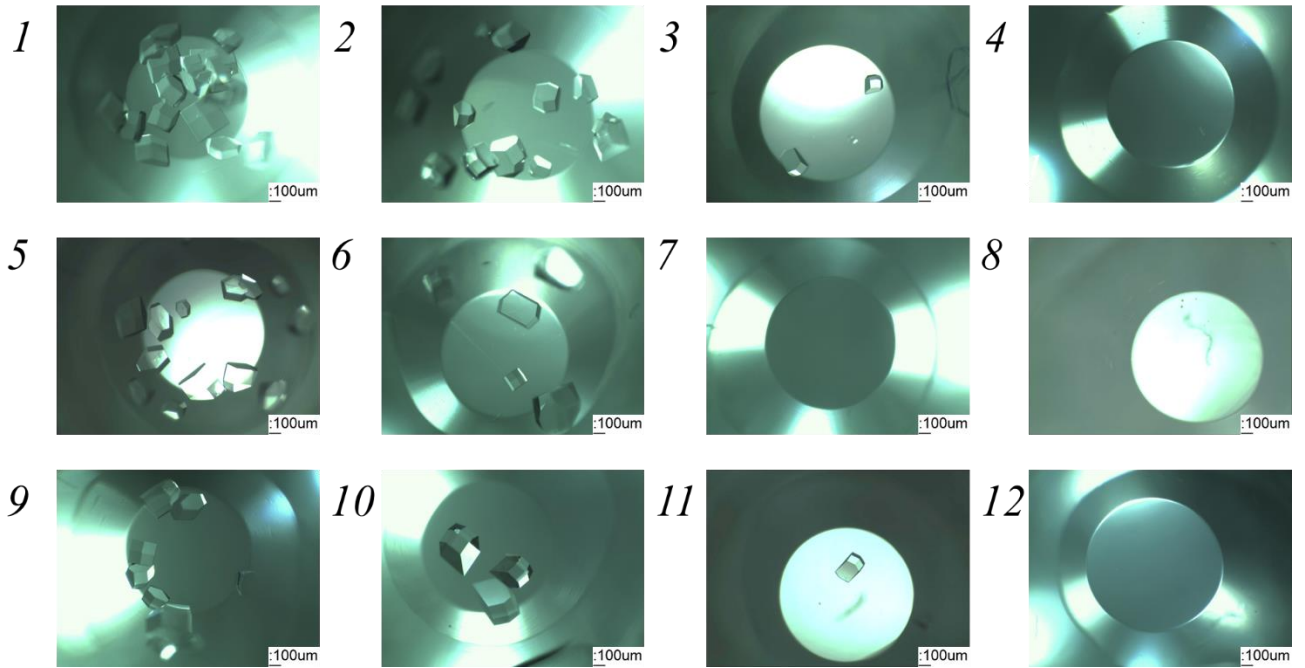


Рис. 3.3. Кристаллы лизоцима, выращенные методом объемной кристаллизации при температуре 10 °С в условиях с концентрациями лизоцима и NaCl: 1) 70 мг/мл и 35 мг/мл; 2) 70 мг/мл и 25 мг/мл; 3) 70 мг/мл и 15 мг/мл; 4) 70 мг/мл и 5 мг/мл; 5) 60 мг/мл и 35 мг/мл; 6) 60 мг/мл и 25 мг/мл; 7) 60 мг/мл и 15 мг/мл; 8) 60 мг/мл и 5 мг/мл; 9) 50 мг/мл и 35 мг/мл; 10) 50 мг/мл и 25 мг/мл; 11) 50 мг/мл и 15 мг/мл; 12) 50 мг/мл и 5 мг/мл

При кристаллизации с использованием концентрации осадителя 25 мг/мл количество образовавшихся кристаллов уменьшается (рис. 3.3. - 2, 6, 10 и рис. 3.4. - 2, 6) по сравнению с концентрацией 35 мг/мл.

При концентрации белка и осадителя 70 и 25 мг/мл соответственно в результате кристаллизации образовалось большое количество монокристаллов размером от 200 до 300 мкм (рис. 3.3. - 2). При понижении концентрации белка до 60 мг/мл количество кристаллов уменьшается, а их размер увеличивается до 200 – 400 мкм (рис. 3.3. - 6). Несколько монокристаллов размером от 300 до 600 мкм образовалось при кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 50 и 25 мг/мл соответственно (рис. 3.3. - 10).

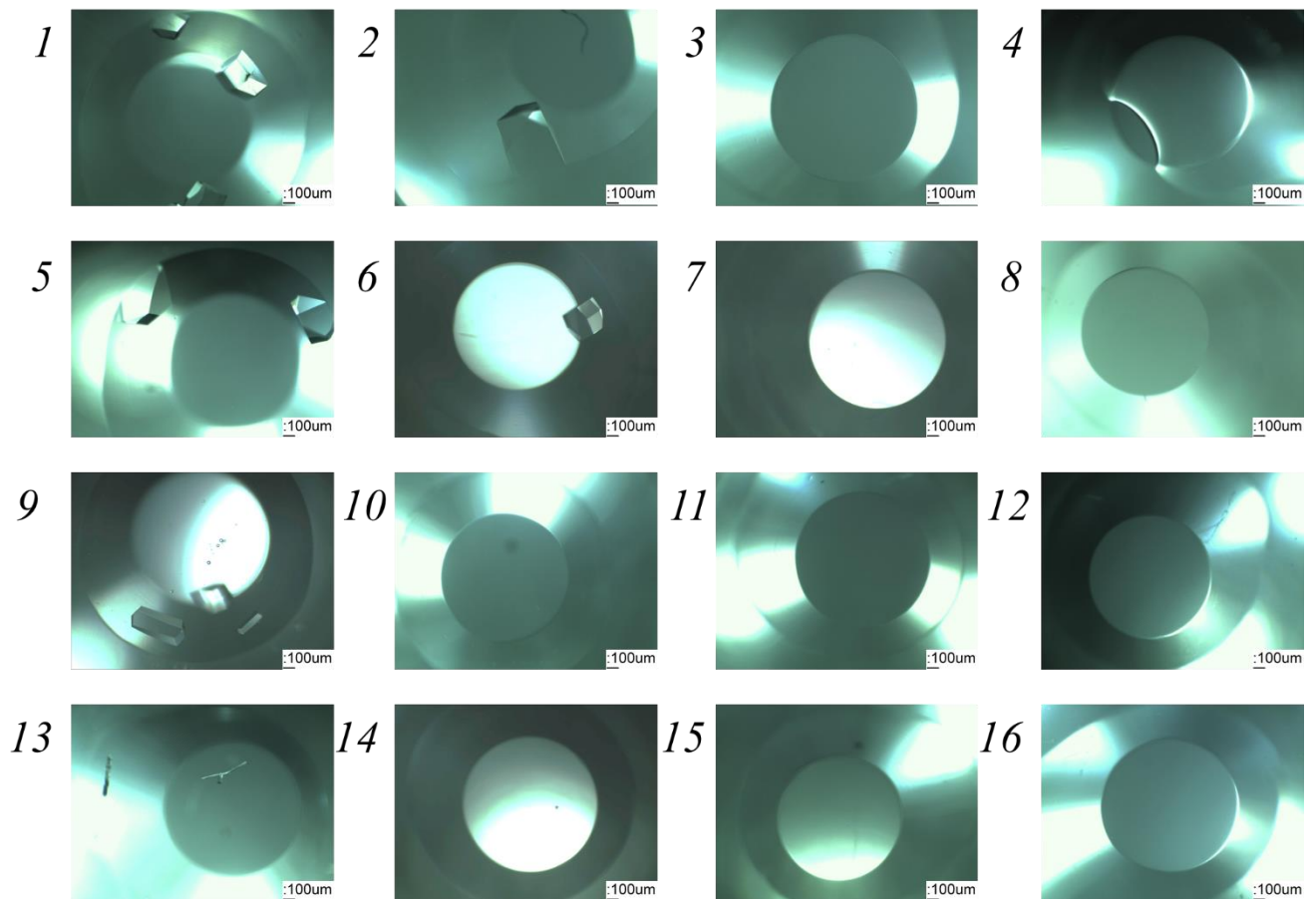


Рис. 3.4. Кристаллы лизоцима, выращенные методом объемной кристаллизации при температуре 10 °С в условиях с концентрациями лизоцима и NaCl: 1) 40 мг/мл и 35 мг/мл; 2) 40 мг/мл и 25 мг/мл; 3) 40 мг/мл и 15 мг/мл; 4) 40 мг/мл и 5 мг/мл; 5) 30 мг/мл и 35 мг/мл; 6) 30 мг/мл и 25 мг/мл; 7) 30 мг/мл и 15 мг/мл; 8) 30 мг/мл и 5 мг/мл; 9) 20 мг/мл и 35 мг/мл; 10) 20 мг/мл и 25 мг/мл; 11) 20 мг/мл и 15 мг/мл; 12) 20 мг/мл и 5 мг/мл; 13) 10 мг/мл и 35 мг/мл; 14) 10 мг/мл и 25 мг/мл; 15) 10 мг/мл и 15 мг/мл; 16) 10 мг/мл и 5 мг/мл

Один монокристалл размером ~ 600 мкм образовался при кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 40 и 25 мг/мл соответственно (рис. 3.4. - 2). При кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 30 и 25 мг/мл соответственно также образовался один монокристалл размером ~ 400 мкм.

При кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 70, 50 и 25 мг/мл соответственно образовался монокристаллы размером ~ 200 мкм (рис. 3.3. - 3, 11).

В течение 14 дней не образовались кристаллы при концентрации белка и осадителя 60, 40, 30, 20, 10 и 15 мг/мл, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 и 5 мг/мл соответственно.

Результат скрининга условий роста лизоцима тетрагонального сингонии методом объемной кристаллизации при температуре 20 °С представлен на рис. 3.5. и рис. 3.6., Фотографии кристаллов получены при увеличении х5.

При кристаллизации с концентрациями белка и осадителя 70 и 35 мг/мл соответственно образовалось много поликристаллов размером от 200 до 400 мкм (рис. 3.5. - 1). При понижении только концентрации белка до 50, 60 мг/мл количество кристаллов увеличилось, образовались как монокристаллы, так и поликристаллы размером 200 – 500 мкм (рис. 3.5. - 5, 9). Монокристаллы, размер которых составил 400 – 500 мкм, образовались при концентрации белка и осадителя 40 и 35 мг/мл соответственно (рис. 3.6. - 1). В кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 30 и 35 мг/мл соответственно вырос один монокристалл, размер которого составил ~ 600 мкм (рис. 3.6. - 5). При понижении только концентрации белка до 20 мг/мл образовалось несколько кристаллов размером от 100 до 400 мкм (рис. 3.6. - 9). В течение 14 дней не было обнаружено никаких кристаллов в кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 10 и 35 мг/мл (рис. 3.6. - 13).

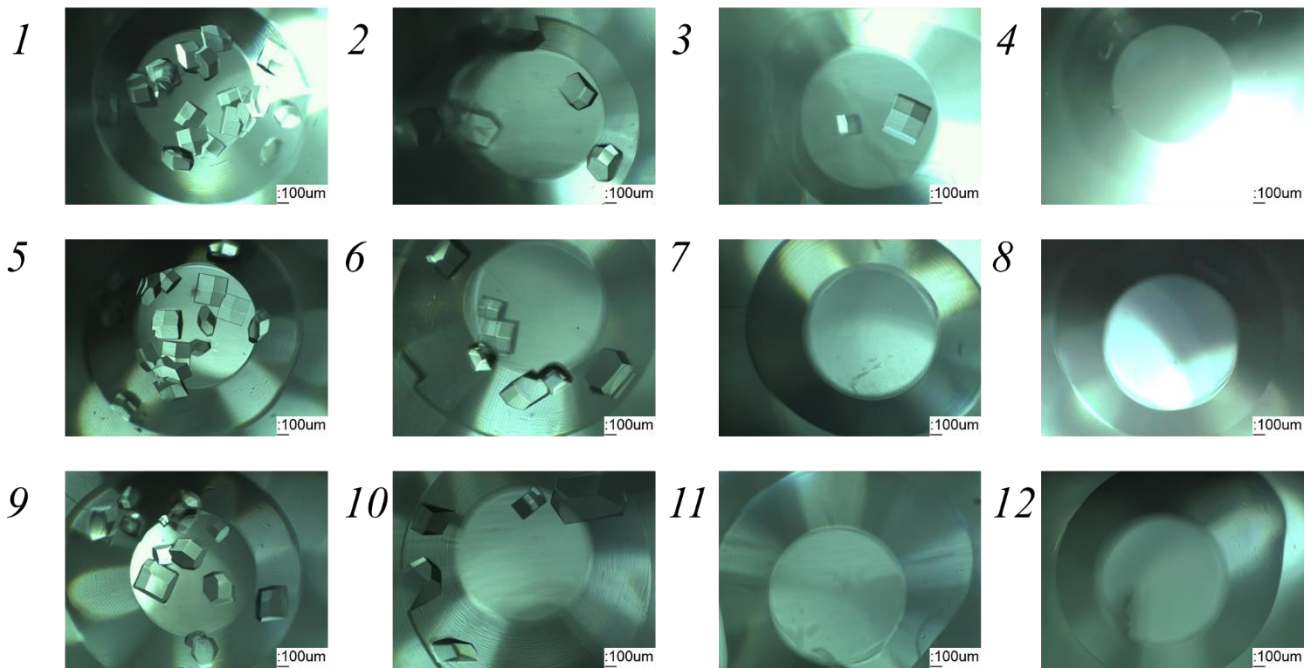


Рис. 3.5. Кристаллы лизоцима, выращенные методом объемной кристаллизации при температуре 20 °С в условиях с концентрациями лизоцима и NaCl: 1) 70 мг/мл и 35 мг/мл; 2) 70 мг/мл и 25 мг/мл; 3) 70 мг/мл и 15 мг/мл; 4) 70 мг/мл и 5 мг/мл; 5) 60 мг/мл и 35 мг/мл; 6) 60 мг/мл и 25 мг/мл; 7) 60 мг/мл и 15 мг/мл; 8) 60 мг/мл и 5 мг/мл; 9) 50 мг/мл и 35 мг/мл; 10) 50 мг/мл и 25 мг/мл; 11) 50 мг/мл и 15 мг/мл; 12) 50 мг/мл и 5 мг/мл;

При кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 70, 60 и 25 мг/мл соответственно образовались монокристаллы лизоцима размером от 200 до 400 мкм (рис. 3.5. - 2, 6). При понижении концентрации белка до 50 мг/мл количество кристаллов уменьшилось, а их размер увеличился до 300–700 мкм (рис. 3.5. - 10). По одному монокристаллу образовалось при кристаллизации с концентрацией белка и осадителя 40, 30 и 25 мг/мл соответственно. При этом при концентрации белка 40 мг/мл образовался кристалл (рис. 3.6. - 2). большего размера (~ 600 мкм), по сравнению с условиями с концентрацией белка 30 мг/мл, где образовался кристалл размера ~ 500 мкм (рис. 3.6. - 6). При концентрации белка и осадителя 20, 10 и 25 мг/мл соответственно в течение 14 дней не образовалось ни одного кристалла (рис. 3.6. – 10, 14).

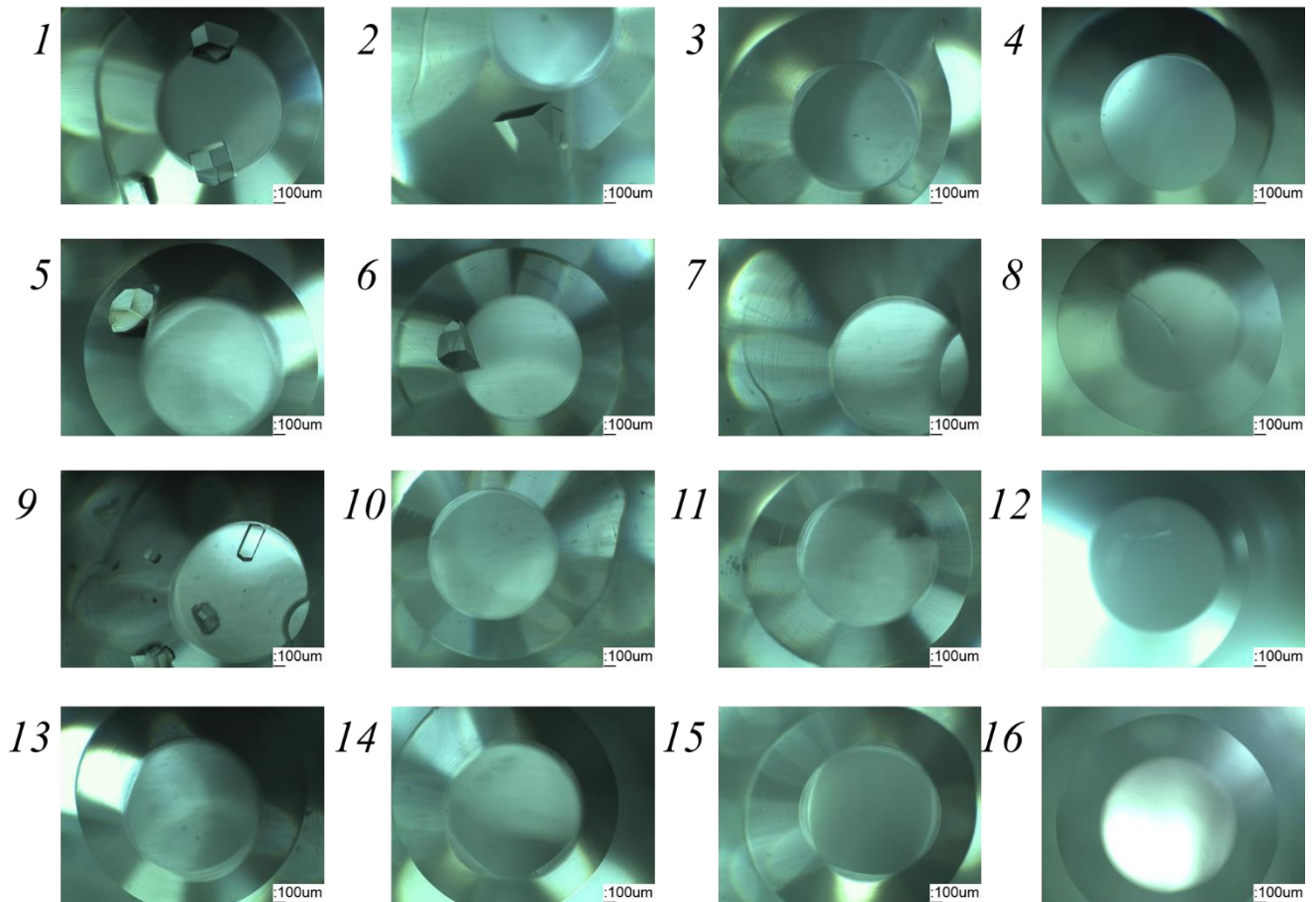


Рис. 3.6. Кристаллы лизоцима, выращенные методом объемной кристаллизации при температуре 20 °С в условиях с концентрациями лизоцима и NaCl: 1) 40 мг/мл и 35 мг/мл; 2) 40 мг/мл и 25 мг/мл; 3) 40 мг/мл и 15 мг/мл; 4) 40 мг/мл и 5 мг/мл; 5) 30 мг/мл и 35 мг/мл; 6) 30 мг/мл и 25 мг/мл; 7) 30 мг/мл и 15 мг/мл; 8) 30 мг/мл и 5 мг/мл; 9) 20 мг/мл и 35 мг/мл; 10) 20 мг/мл и 25 мг/мл; 11) 20 мг/мл и 15 мг/мл; 12) 20 мг/мл и 5 мг/мл; 13) 10 мг/мл и 35 мг/мл; 14) 10 мг/мл и 25 мг/мл; 15) 10 мг/мл и 15 мг/мл; 16) 10 мг/мл и 5 мг/мл;

В кристаллизациях с концентрацией осадителя 15 мг/мл образовались монокристаллы размером 300 – 500 мкм только при концентрации белка 70 мг/мл (рис. 3.6 - 3). При концентрации белка и осадителя 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 и 5 мг/мл соответственно не образовалось ни одного кристалла лизоцима в течение 14 дней.

Результаты кристаллизации при температуре 10 и 20 °С при одинаковой концентрации белка и осадителя отличаются, что может быть вызвано разницей в

растворимости лизоцима при данных значениях температур. Так при температуре 10 °С степень пересыщения будет выше, чем при температуре 20 °С при одинаковых концентрациях компонентов.

3.4. Исследования структуры растворов лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРР на станции ДИКСИ

Предварительные исследования структуры растворов лизоцима в условиях кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии проводились на станции ДИКСИ Курчатовского источника синхротронного излучения (см. п. 2.2.1).

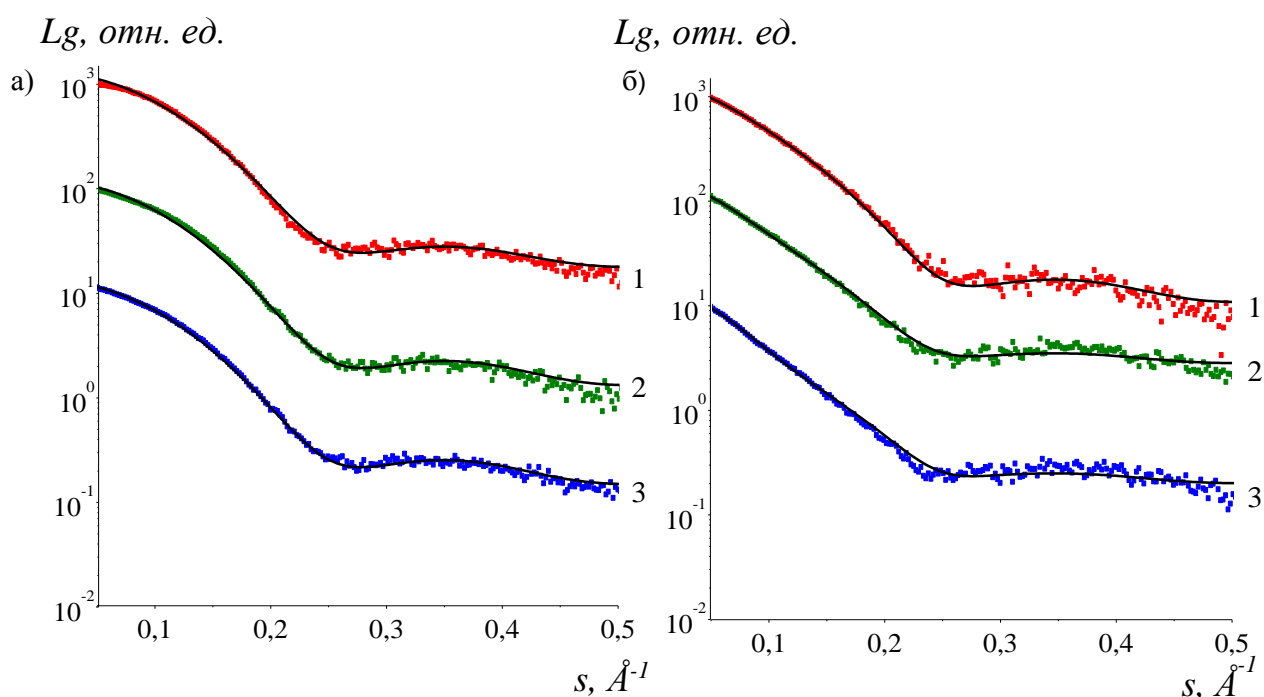


Рис. 3.7. Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой OLIGOMER, при температурах 30 (1), 20 (2), 10 °С (3) от растворов лизоцима без осадителя (а) с концентрацией белка 40 мг/мл и лизоцима с осадителем (б) с концентрацией белка и осадителя соответственно 40 и 25 мг/мл. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Методом МУРР проводились измерения растворов белка без добавления осадителя и растворов белка с осадителем хлоридом натрия при трех температурах 30, 20 и 10 °С. Экспериментальные данные были обработаны программой OLIGOMER (рис. 3.7.) с использованием кристаллографических моделей октамера, гексамера, тетрамера, димера, мономера, результат обработки представлен в табл. 3.3.

Показано, что в растворе белка без осадителя присутствует 100 % мономеров, радиусы инерции R_g не превышают радиуса одиночных молекул лизоцима.

Таблица 3.3. Объемные доли олигомеров, качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 и радиусы инерции R_g , рассчитанные по начальному участку кривых, при концентрациях белка и осадителя 40 и 25 мг/мл соответственно и в его отсутствие в зависимости от температуры.

образец	Т, °С	мономер, %	димер, %	тетрамер, %	гексамер, %	октамер, %	χ^2	R_g Å
Лизоцим без осадителя	30	100.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.82	15.4±0.2
	20	100.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.77	15.4±0.2
	10	100.0±0.1	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.75	15.4±0.2
Лизоцим с осадителем	30	98.1±0.2	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.8±0.0	1.43	20.4±0.2
	20	95.7±0.3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	4.3±0.1	1.37	23.8±0.2
	10	91.4±0.4	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	5.2±1.2	1.31	26.0±0.2

В растворе лизоцима с осадителем обнаружены октамеры. При этом с понижением температуры наблюдается рост объемной доли октамеров, а также радиуса инерции R_g .

3.5. Структура растворов лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии

Для определения структуры растворов белка лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной сингонии проводились измерения растворов лизоцима методом МУРР на станции малоуглового рассеяния BM29 BioSAXS ESRF (см. п. 2.2.2). Проводилось измерение растворов лизоцима без осадителя и с осадителем с концентрациями белка от 20 до 60 мг/мл при температурах от 30 до 10 °С, концентрация осадителя оставалась постоянной 25 мг/мл во всех экспериментах.

Графики Гинье от растворов белка и белка с осадителем при температурах 10, 20, 30 °С представлены на рис. 3.8. Линейный характер графиков Гинье (что характерно для монодисперсных систем) удобно оценить с помощью графиков отклонений (невязки) между экспериментальными данными МУРР и аппроксимацией Гинье (рис. 3.9.).

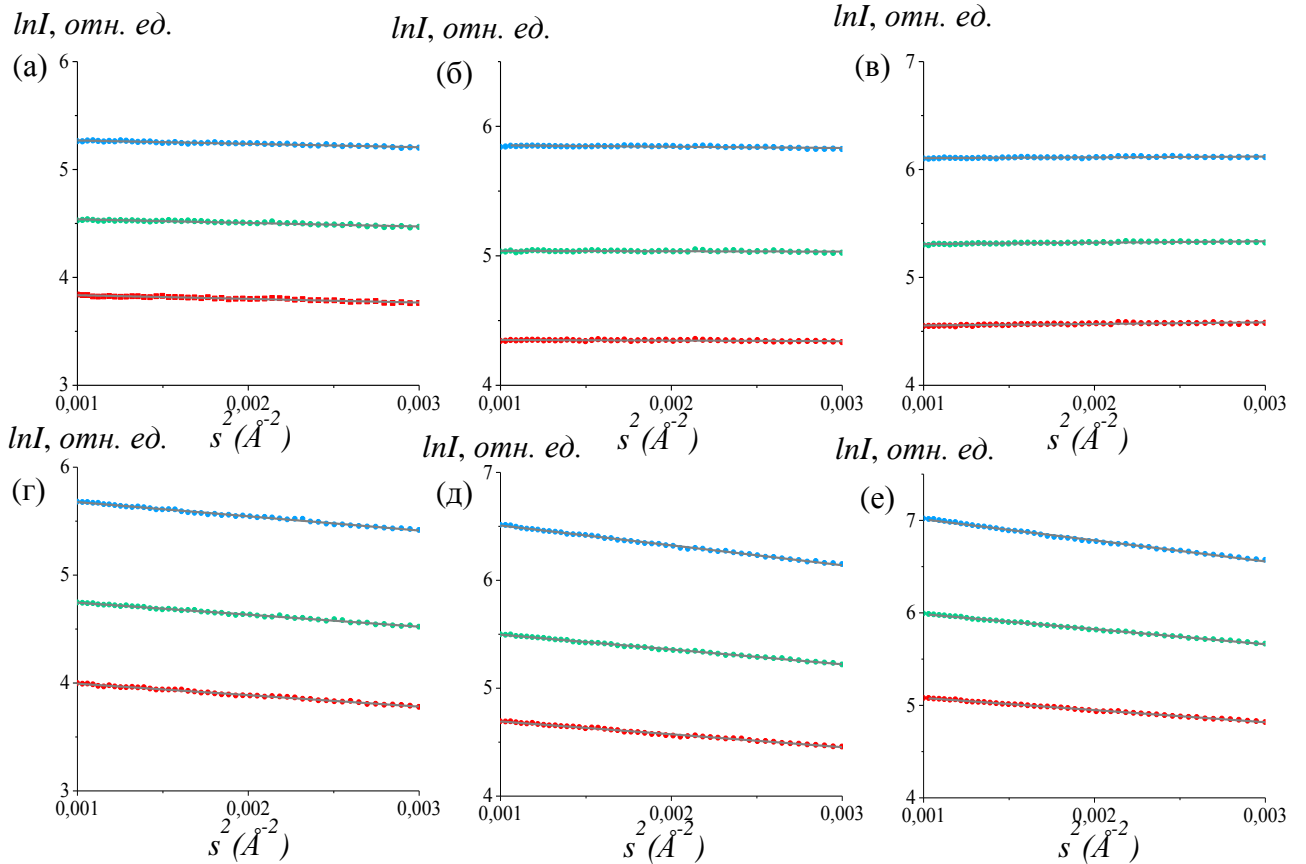


Рис. 3.8. Экспериментальные данные МУРР (точки) и аппроксимация Гинье (линии) от растворов лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и лизоцима с NaCl с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е) при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая), 30 °С (красная).

Систематические отклонения между экспериментальными данными и аппроксимацией Гинье свидетельствует о наличии гетерогенных агрегатов в кристаллизационных растворах лизоцима. Характер систематических отклонений в случае растворов белка без осадителя указывает на то, что молекулы белка отталкиваются (рис. 3.9. а, б, в), а в случае раствора белка с осадителем притягиваются или образуют ассоциаты (олигомеры) (рис. 3.9. г, д, е).

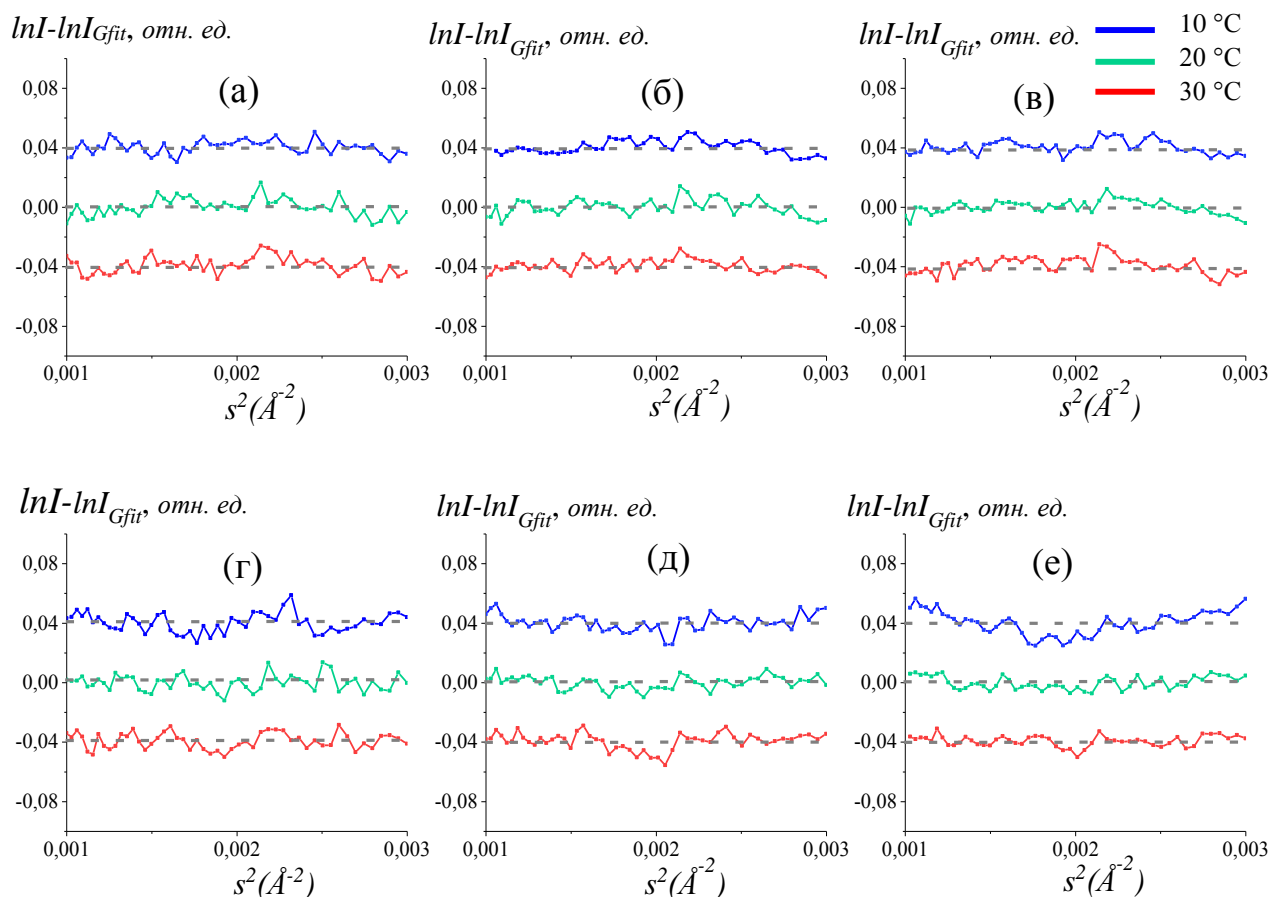


Рис. 3.9. Невязка между экспериментальными данными МУРР и аппроксимацией Гинье от растворов лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и лизоцима с NaCl с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е) при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая), 30 °C (красная).

Экспериментальные кривые МУРР и модельные кривые, рассчитанные программой POLYMIX, от раствора белка и белка с осадителем при температурах 10, 20, 30 °C представлены на рис. 3.10. На кривых рассеяния от раствора белка без осадителя (рис. 3.10. а – в) наблюдается влияние межчастичной интерференции (отталкивающее взаимодействие между молекулами), вызванной высокими концентрациями белка (20, 40, 60 мг/мл). При добавлении к раствору белка осадителя меняется характер кривой рассеяния (рис. 3.10. г – е): увеличивается интенсивность рассеяния при малых углах, меняется взаимодействие между

молекулами, они начинают притягиваться. Увеличение интенсивности рассеяния является следствием образования более крупных частиц. Можно сделать вывод, что происходит ассоциация (олигомеризация) отдельных молекул.

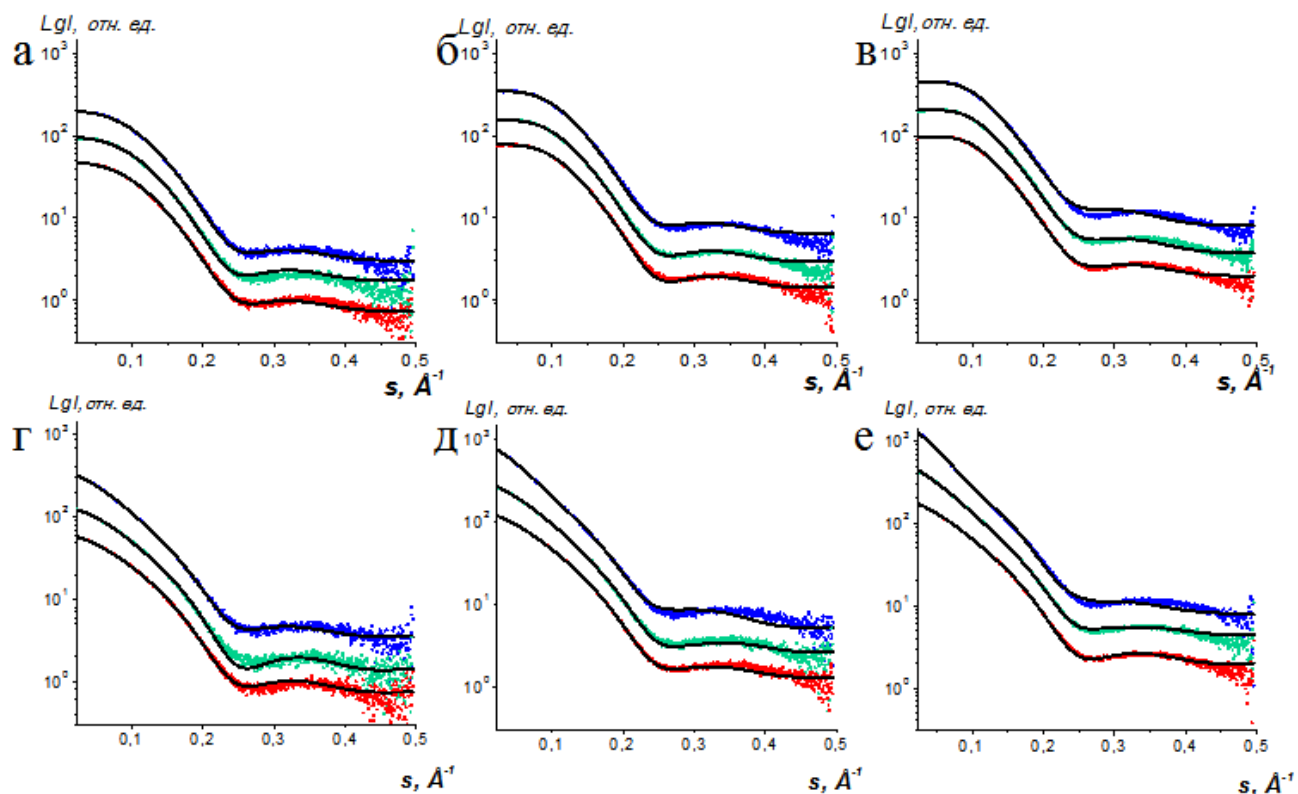


Рис. 3.10. Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой POLYMIX, при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая), 30 °С (красная) от растворов лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и лизоцима с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

По экспериментальным данным было рассчитано объемное распределение по размерам в приближении полидисперсных сферических частиц с помощью программы POLYMIX (рис. 3.11., табл. 3.4.). Экспериментальные данные хорошо приближаются модельными расчетами во всем угловом диапазоне и имеют невязку χ^2 в диапазоне 0.9 – 1.7.

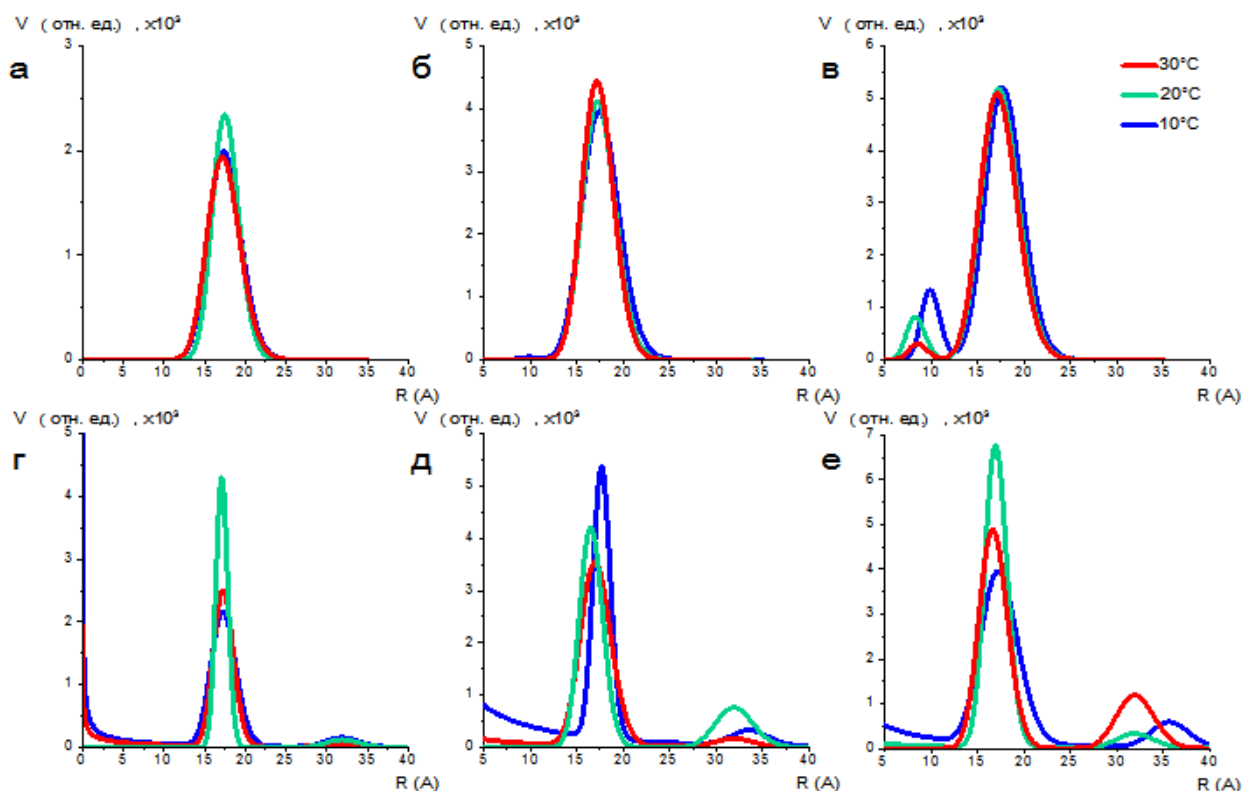


Рис. 3.11. Распределение по размерам частиц в растворах лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и лизоцима с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е) при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая), 30 °С (красная).

Таблица 3.4. Распределение по размерам частиц в растворах лизоцима при разных концентрациях белка с осадителем и в его отсутствие в зависимости от температуры

		Белок без осадителя		Белок с осадителем	
$C_{\text{лиз}}$, мг/мл	T , °С	Радиус частиц, Å	χ^2	Радиус частиц*, Å	χ^2
20	30	17.4 ± 2.0	1.2	17.3 ± 1.2 31.5 ± 2.0	0.9
	20	17.6 ± 1.6	1.4	17.1 ± 0.7 32.0 ± 2.0	1.4
	10	17.5 ± 2.0	1.4	17.4 ± 1.5 32.0 ± 2.0	1.3
40	30	17.3 ± 1.7	1.3	17.1 ± 1.6 32.0 ± 2.0	1.2

	20	17.4 ± 1.8	1.5	16.6 ± 1.2 32.0 ± 2.0	1.4
	10	17.6 ± 2.0	1.7	17.7 ± 0.9 33.7 ± 2.0	1.6
60	30	17.4 ± 2.0	1.4	17.0 ± 1.2 32.0 ± 2.0	1.3
	20	17.5 ± 2.0	1.7	16.8 ± 1.5 32.0 ± 2.0	1.6
	10	17.9 ± 2.0	1.7	17.5 ± 2.0 35.8 ± 2.0	1.5

Все распределения по размерам частиц, полученные от раствора белка без осадителя, содержат пик в районе $15 - 20 \text{ \AA}$, соответствующий мономеру лизоцима. Но на рис. 3.11. в помимо пика от мономера присутствуют вклады от частиц малых размеров с радиусом около $8 - 10 \text{ \AA}$. Эти пики можно отнести к флуктуациям плотности в буферном растворе. При добавлении к раствору белка осадителя появляются большие частицы с радиусом в диапазоне $30 - 35 \text{ \AA}$, соответствующие олигомерным частицам белка лизоцима.

Для получения более детальной структурной информации экспериментальные данные обработаны программой OLIGOMER с использованием кристаллографических моделей олигомеров высокого разрешения [1,2] рис. 3.12.

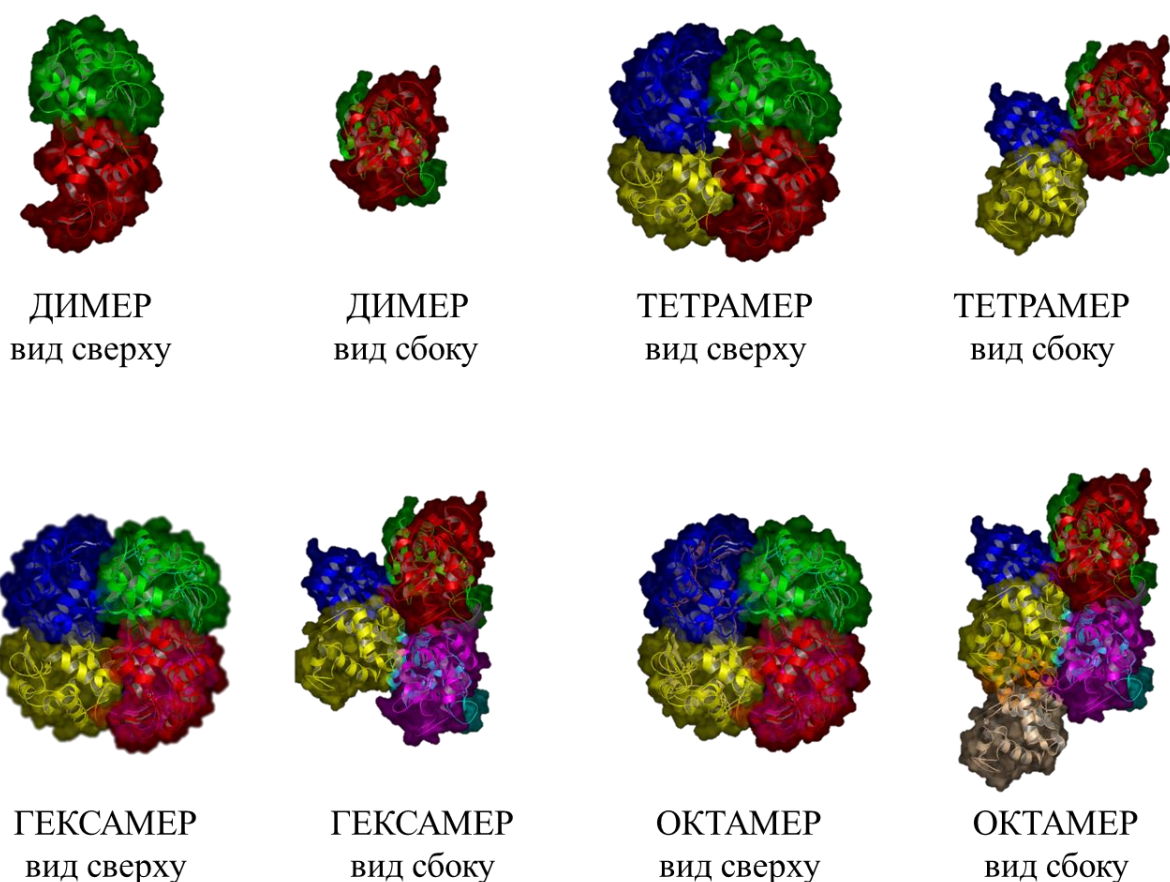


Рис. 3.12. Структура олигомеров, выделенных из кристаллической структуры лизоцима (PDB 4WLD), для обработки кривых малоуглового рассеяния.

Результаты обработки представлены на рис. 3.13. и в табл. 3.5. для разных концентраций белка. Показано, что при всех значениях температур и концентраций в кристаллизационном растворе присутствуют мономеры, димеры и октамеры. Тетрамеры, гексамеры и олигомеры порядка выше октамера не были обнаружены ни при каких условиях. Результаты хорошо согласуются с данными [1]. При этом наблюдается рост объемной доли октамеров при понижении температуры до оптимальной для кристаллизации при всех концентрациях белка (рис. 3.14.). В то же время объемная доля октамеров растет при увеличении концентрации белка.

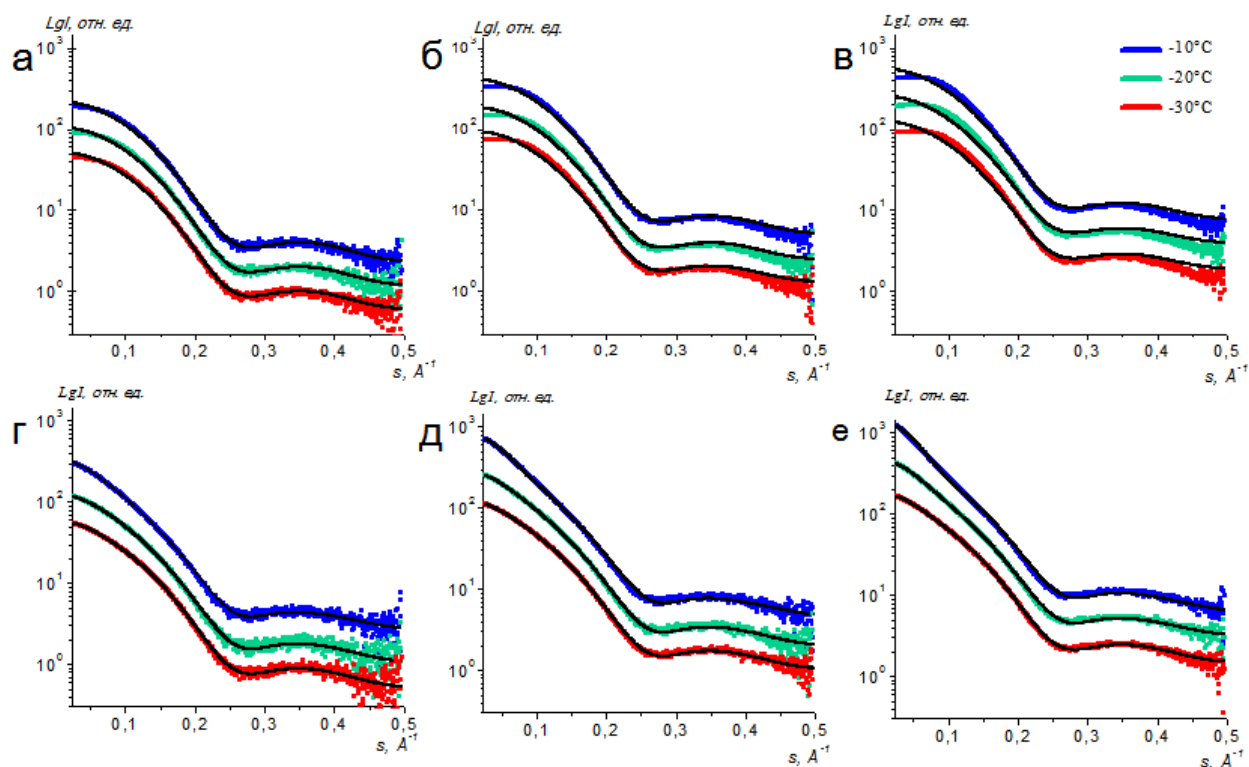


Рис. 3.13. Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой OLIGOMER, при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая), 30 °С (красная) от растворов лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и белка с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е).

Таблица 3.5. Объемные доли олигомеров, качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 и радиусы инерции R_g , Å, рассчитанные по начальному участку кривых, при разных концентрациях белка с осадителем и в его отсутствие в зависимости от температуры.

C, мг/мл	T, °C	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	1.05	19.2 ± 0.2	3.47	14.3 ± 0.2
	20	92.7 ± 0.4	5.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.1	1.21	19.7 ± 0.2	3.53	14.3 ± 0.2
	10	87.3 ± 0.4	9.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.9 ± 0.1	1.13	22.0 ± 0.2	3.59	14.3 ± 0.2
	30	94.7 ± 0.3	3.0 ± 0.4	0.0 ± 0.0	2.2 ± 0.1	1.03	22.0 ± 0.2	4.08	14.3 ± 0.2

40	20	90.6 ± 0.2	6.3 ± 0.1	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.1	1.17	22.3 ± 0.2	4.85	14.3 ± 0.2
	10	83.5 ± 0.3	9.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	6.9 ± 0.1	1.24	25.6 ± 0.2	3.92	14.3 ± 0.2
60	30	95.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3	2.5 ± 0.1	1.18	21.9 ± 0.2	5.04	14.3 ± 0.2
	20	88.8 ± 0.2	6.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	5.1 ± 0.1	1.09	24.4 ± 0.2	4.89	14.3 ± 0.2
	10	84.9 ± 0.2	3.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	11.4 ± 0.1	1.25	28.0 ± 0.2	6.58	14.3 ± 0.2

Примечание. * Доля мономеров 100%, остальные олигомеры отсутствуют.

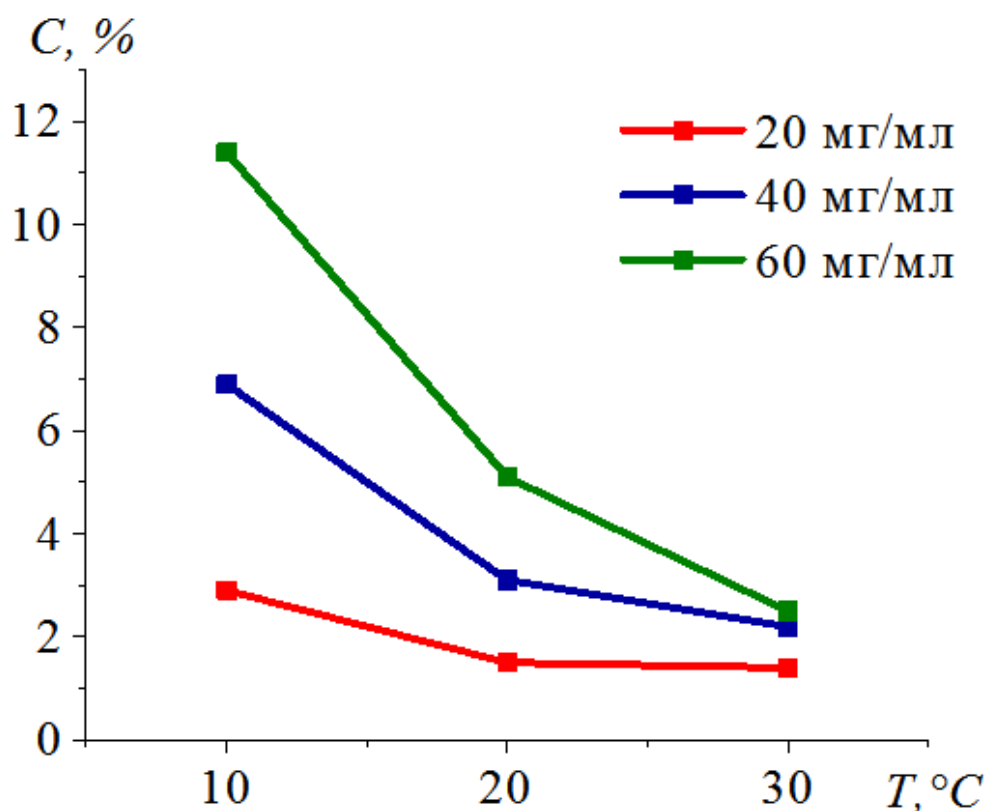


Рис. 3.14. Зависимость объемной доли октамеров от температуры в растворах лизоцима с хлоридом натрия при концентрациях белка и осадителя соответственно 20 и 25 (красная), 40 и 25 (синяя), 60 и 25 мг/мл (зеленая).

Рассчитанные кривые распределений для растворов с осадителем совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне, значения невязки χ^2 не превышают 1.25 (табл. 3.5.). В случае растворов без добавления осадителя модельные приближения программой OLIGOMER не позволяли приблизить начальные части кривых из-за сильного эффекта межчастичного отталкивания, однако его учет (с помощью программы POLYMIX) позволяет приблизить данные

во всем угловом диапазоне (рис. 3.10.) и указывает, что в данных условиях в растворе присутствуют только мономерные частицы.

3.6. Заключение

Методом МУРР показано, что при добавлении к раствору лизоцима осадителя, хлорида натрия, приводящего к росту кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, в растворе образуются димеры и октамеры. В том случае, когда кристаллизация не происходит, в растворе лизоцима без осадителя не образуются новых олигомеров, раствор состоит только мономеров.

Температура раствора и концентрация лизоцима оказывает влияние на состав кристаллизационного раствора. При понижении температуры и увеличении концентрации белка растет объемная доля октамеров в растворе лизоцима с осадителем.

Результаты, представленные в Главе 3, опубликованы в работе [A1].

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ РАСТВОРОВ ЛИЗОЦИМА ПРИ РОСТЕ КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ МЕТОДОМ МУРН

1.1. Структура растворов лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии

Для подтверждения образования олигомеров в растворе лизоцима при кристаллизации были проведены измерения растворов методом МУРН (см. п. 2.2.3). При исследовании растворов лизоцима методом МУРН использовали в качестве растворителя D₂O для минимизации фона некогерентного рассеяния. Были проведены измерения растворов лизоцима с осадителем, хлоридом натрия, при разной температуре и концентрации белка.

На рис. 4.1. и рис. 4.2. представлены экспериментальные и модельные кривые, рассчитанные программой *OLIGOMER* при температуре 10, 20, 30 °С для разных концентраций белка.

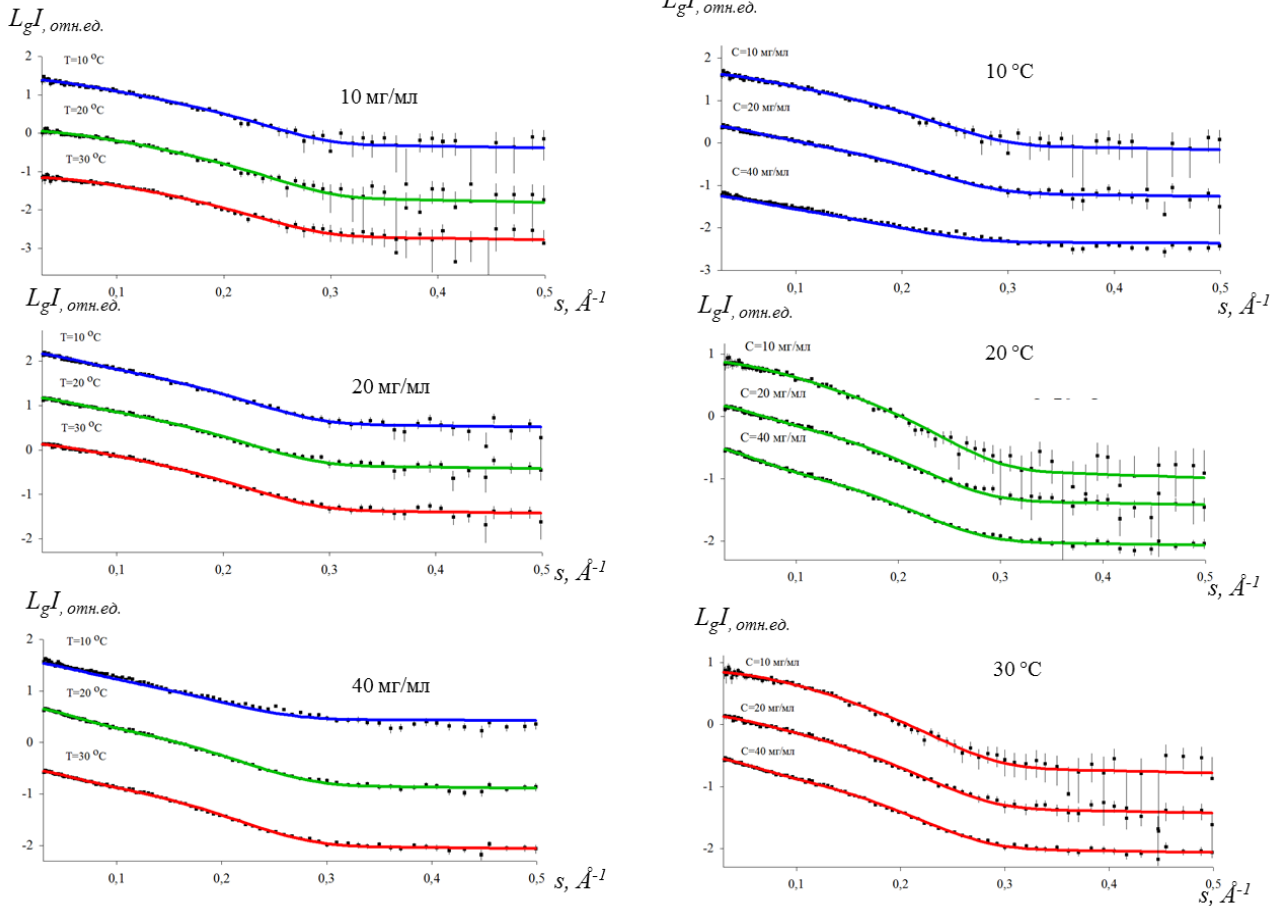


Рис. 4.1. Экспериментальные кривые интенсивности МУРН (точки с погрешностью) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой OLIGOMER, при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая) 30 (красная) $^\circ\text{C}$ от растворов лизоцима с осадителем с концентрациями белка 10 до 40 мг/мл и осадителя соответственно 25 мг/мл. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

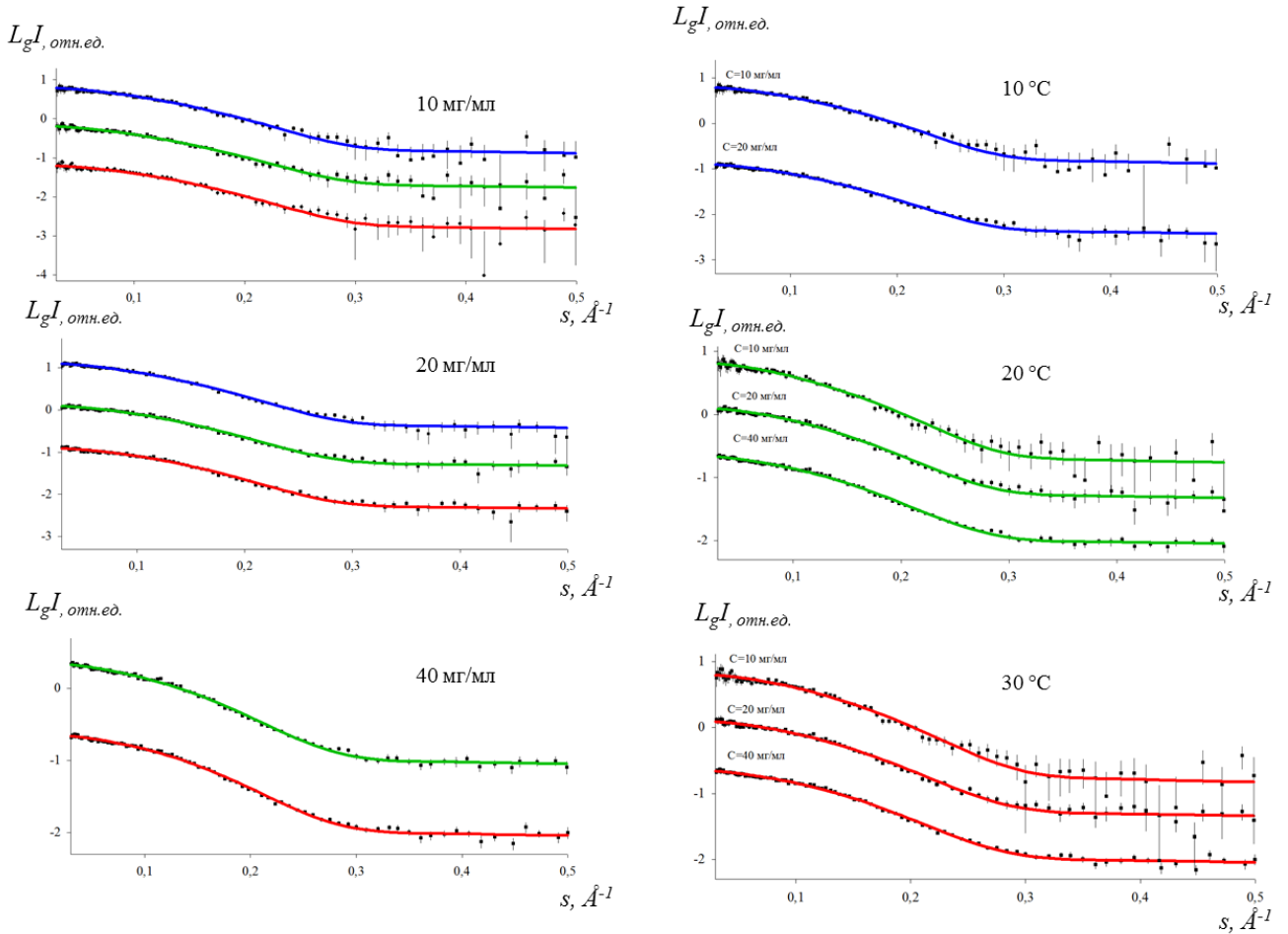


Рис. 4.2. Экспериментальные кривые интенсивности МУРН (точки с погрешностью) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой OLIGOMER, при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая) 30 (красная) °C от растворов лизоцима без осадителя с концентрациями белка 10 до 40 мг/мл. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации

В таблице 4.1. представлены общие параметры, рассчитанные по данным МУРН: молекулярная масса (MW) и радиус инерции (R_g). Экспериментальные значения R_g находятся между теоретическими значениями для структуры мономера и октамера лизоцима (11.6 и 31.3 Å соответственно), указывая на образование смеси олигомеров в растворе лизоцима при добавлении хлорида натрия.

Таблица. 4.1. Общие структурные параметры растворов лизоцима, определенные по данным МУРН

Концентрация белка (мг/мл)	Температура, °С	Буфер	R_g (Å)	MW (кДа)
10	10	D ₂ O, NaCl25	18.2±0.2	20±3
	20		15.4±0.2	16±3
	30		13.0±0.2	15±3
20	10		21.7±0.2	19±3
	20		21.0±0.2	21±3
	30		18.1±0.2	18±3
40	10		20.5±0.2	26±3
	20		23.2±0.2	27±3
	30		21.5±0.2	23±3
10	10	D ₂ O	13.1±0.2	15±3
	20		12.9±0.2	15±3
	30		12.3±0.2	16±3
20	10		13.1±0.2	15±3
	20		12.2±0.2	15±3
	30		11.9±0.2	15±3
40	20		13.6±0.2	14±3
	30		12.8±0.2	14±3

Систематические отклонения от линейного характера графика Гинье (рис. 4.3.) свидетельствуют о наличии гетерогенных объектов в растворе.

Для характеристики неоднородного состава растворов лизоцима был проведен сингулярный анализ кривых рассеяния (SVD) с использованием модуля SVDPLOT, который входит в состав пакета обработки экспериментальных данных PRIMUS [28]. Из SVD были определены три значимых сингулярных значения, соответствующих трем неслучайно осциллирующим сингулярным векторам (рис. 4.4.). Предполагается, что система может быть описана тремя независимыми

компонентами, что подтверждает выбор трех олигомеров (мономеров, димеров и октамеров) для моделирования данных МУРН.

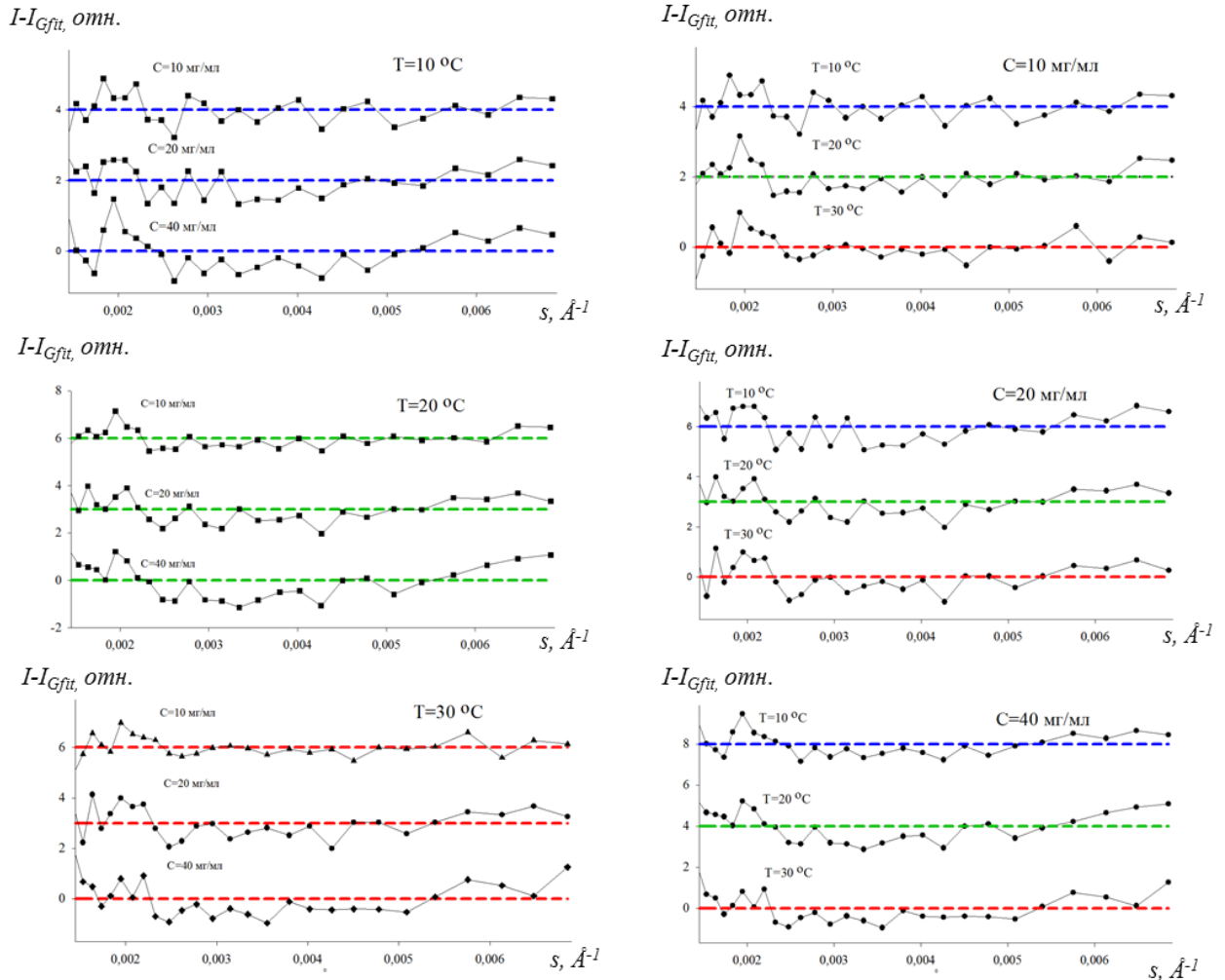


Рис. 4.3. Невязка между экспериментальными данными МУРН и аппроксимацией Гинье от растворов лизоцима с NaCl при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая) 30 (красная) $^\circ\text{C}$ и концентрациях белка от 10 до 40 мг/мл.

По результатам SVD-разложения экспериментальные данные, полученные в диапазоне концентраций белка от 10 до 40 мг/мл и в диапазоне температур от 10 до 30 $^\circ\text{C}$, были приближены с использованием программы OLIGOMER [28]. Программа OLIGOMER использует линейную комбинацию теоретических кривых рассеяния от нескольких компонентов (то есть мономеров, димеров, тетрамеров, гексамеров и октамеров) для наилучшего соответствия с экспериментальными

данным. Результаты обработки экспериментальных данных программой OLIGOMER представлены в табл. 4.2., а также на рис. 4.1. и 4.2. (наилучшие совпадения с OLIGOMER показаны сплошными линиями).

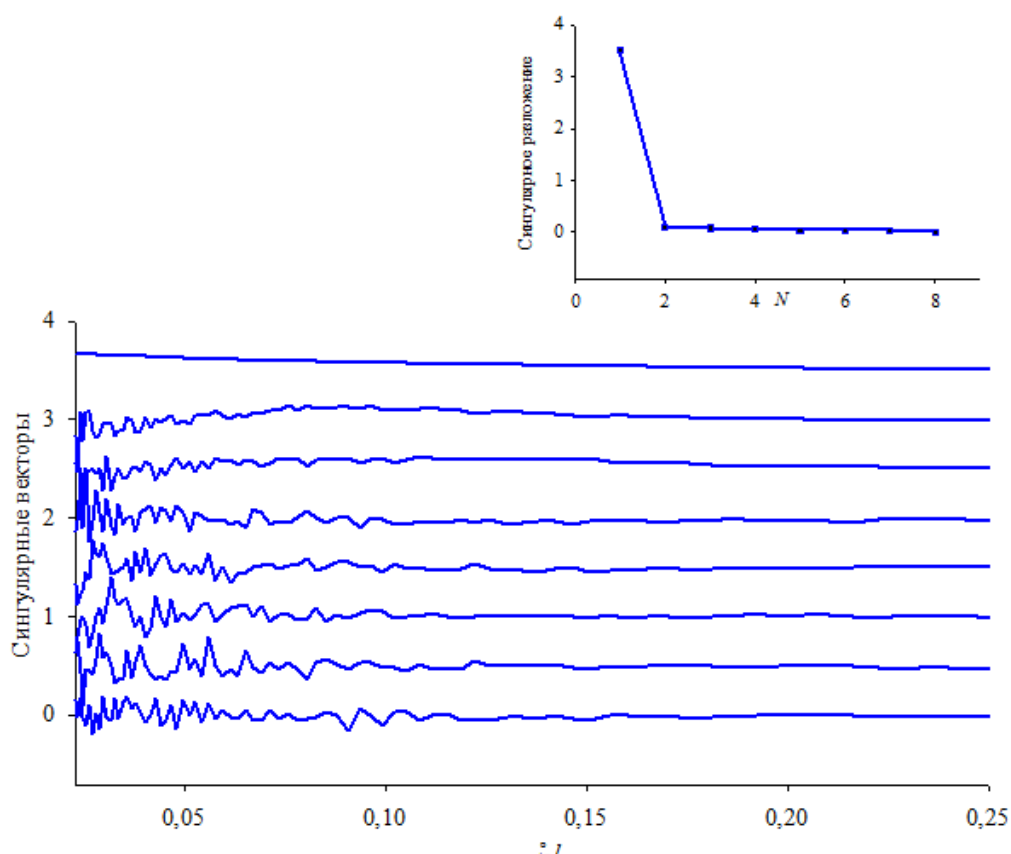


Рис. 4.4. Сингулярное разложение данных МУРН при различных температурах и концентрациях с NaCl. Верхняя панель отображает значения в единственном числе, отсортированные в порядке убывания, нижняя панель отображает соответствующие векторы.

Наилучшие качества приближения χ^2 было достигнуто при использовании смеси мономеров, димеров и октамеров. Для сравнения также приведены значения качества приближения $\chi^2(\text{MDT})$, соответствующее смеси мономеров, димеров и тетрамеров. Объемные доли мономеров, димеров и октамеров приведены в процентах.

Таблица 4.2. Объемные доли олигомеров в растворах лизоцима и лизоцима с осадителем, полученные с помощью программы OLIGOMER, и качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 .

Образец	C, мг/мл	T, °C	χ^2	$\chi^2(\text{MDT})$	% мономер	% димер	% октамер
Белок с осадителем	10	10	0.49	0.51	79.8±3.0	17.3±3.0	2.9±1.0
		20	0.43	0.43	84.1±3.0	14.9±3.0	1.0±0.5
		30	0.41	0.41	88.8±3.0	11.2±3.0	0.0±0.0
	20	10	0.88	1.02	83.3±3.0	9.6±3.0	7.0±1.0
		20	1.03	1.18	90.7±3.0	3.0±1.5	6.2±1.0
		30	0.64	0.69	90.5±3.0	6.2±2.0	3.2±1.0
	40	10	1.06	1.07	87.8±3.0	5.2±2.0	7.0±1.0
		20	0.61	1.00	88.8±3.0	1.4±0.5	9.6±1.0
		30	0.60	0.87	92.9±3.0	0.0±0.0	7.0±1.0
Белок без осадителя	10	10	0.39	0.39	90.1±3.0	9.8±3.0	0.0±0.0
		20	0.48	0.48	89.0±3.0	10.9±3.0	0.0±0.0
		30	0.48	0.48	93.4±3.0	6.6±2.0	0.0±0.0
	20	10	0.56	0.56	91.1±3.0	8.6±3.0	0.0±0.0
		20	0.60	0.60	93.6±3.0	6.3±2.0	0.0±0.0
		30	0.64	0.64	95.6±3.0	4.3±2.0	0.0±0.0
	40	20	0.80	0.83	99.0±3.0	0.0±0.0	0.9±0.5
		30	0.64	0.65	99.3±3.0	0.0±0.0	0.6±0.3

Было обнаружено, что растворы лизоцима без осадителя состоят преимущественно из мономеров с незначительной долей димеров, тогда как добавление осадителя на основе хлорида натрия приводит к появлению олигомеров более высокого порядка. Моделирование показало, что наилучшее качество обработки соответствует случаю, когда в кристаллизационном растворе лизоцима присутствуют мономеры, димеры и октамеры. В случае добавления тетрамеров в модель качество обработки ухудшается, увеличивается значение χ^2 . Это четко

наблюдается при малых углах рассеяния для образцов при температуре 20 °С и концентрации белка 40 мг/мл (рис.4.5.).

Lg, отн. ед.

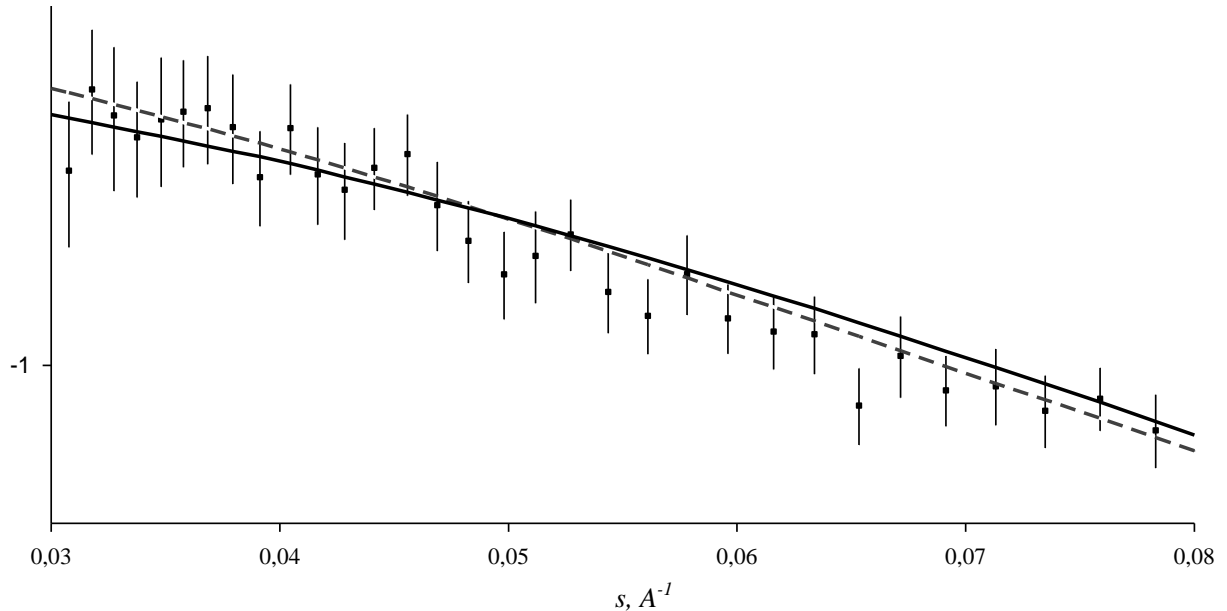


Рис. 4.5. Экспериментальные данные МУРН (точки) и рассчитанные программой OLIGOMER модельные (линии) от растворов лизоцима с осадителем с концентрациями 40 и 25 мг/мл соответственно при температуре 20 °С. Показана малоугловая часть кривой ($s < 0.08, \text{Å}^{-1}$). Сплошная кривая соответствует модельному приближению из смеси мономеров-димеров-тетрамеров ($\chi^2 = 1.00$), пунктирная кривая – для смеси мономеров-димеров-октамеров ($\chi^2 = 0.61$)

Объемная доля октамеров возрастает при увеличении концентрации белка (с 1 – 3 % при 10 мг/мл до 7 – 8 % при 40 мг/мл). В то же время для каждой концентрации белка объемная доля октамеров достигает максимума при понижении температуры до 10 °С. Для образцов с низкой концентрацией белка при повышении температуры до 30 °С октамеры полностью исчезают.

Сравнение полученных данных с кривой растворимости лизоцима [118] рис. 4.6., показывает, что в условиях ниже кривой растворимости ($C_{\text{лиз}} = 10 \text{ мг/мл}$, 30 °С) октамеры не были обнаружены.

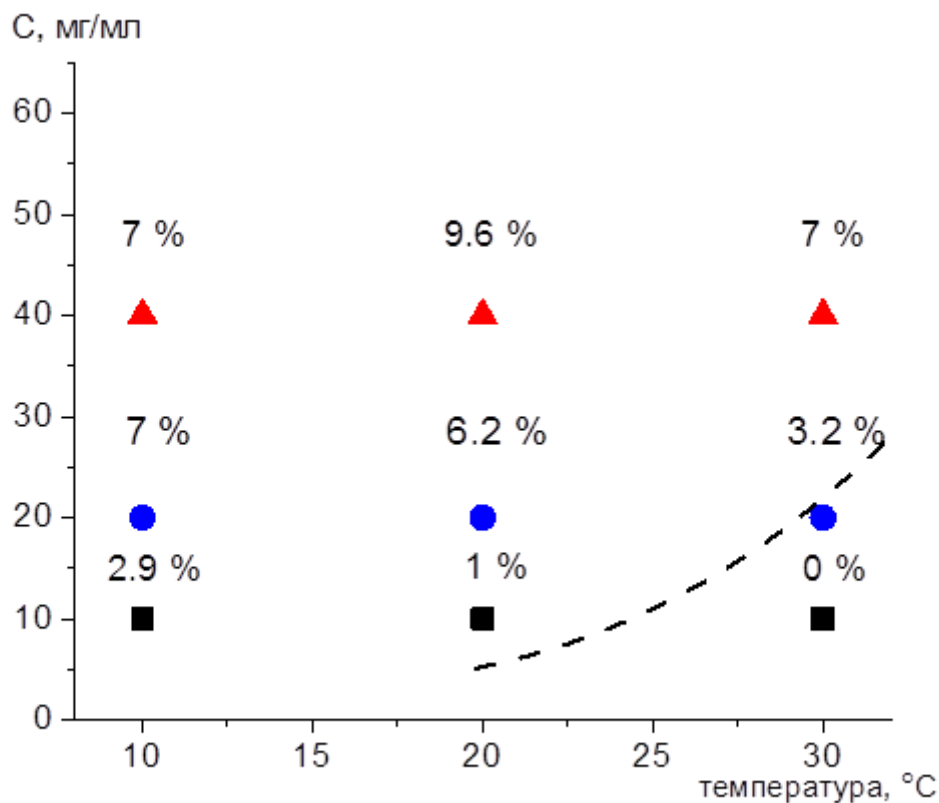


Рис. 4.6. Температурные зависимости объемной доли октамеров, образовавшихся в растворе, для разных концентраций лизоцима в присутствии NaCl (25 мг/мл), определенные методом МУРН в случае растворителя D₂O. Кривая растворимости (пунктирная линия) лизоцима в D₂O (pD 4.75) в присутствии 25 мг/мл NaCl построена на основании данных [118]

В условиях, близких к кривой растворимости ($C_{\text{лиз}} = 10$ мг/мл, 10 °C, $C_{\text{лиз}} = 10$ мг/мл, 20 °C и $C_{\text{лиз}} = 20$ мг / мл, 30 °C), образуется небольшая, но значительная доля октамеров (0.5 – 3.0 %), однако, рост кристаллов происходит не всегда. В условиях, выше кривой растворимости ($C_{\text{лиз}} = 20$ мг/мл, 20 °C, $C_{\text{лиз}} = 20$ мг/мл, 10 °C, $C_{\text{лиз}} = 40$ мг/мл, 30 °C, $C_{\text{лиз}} = 40$ мг/мл, 20 °C и $C_{\text{лиз}} = 40$ мг/мл, 10 °C), объемная доля октамеров, образующихся в растворах, превышает 5 %.

Зависимость объемной доли октамеров от температуры для различных концентраций белка в присутствии осадителя представлена на рис. 4.7.

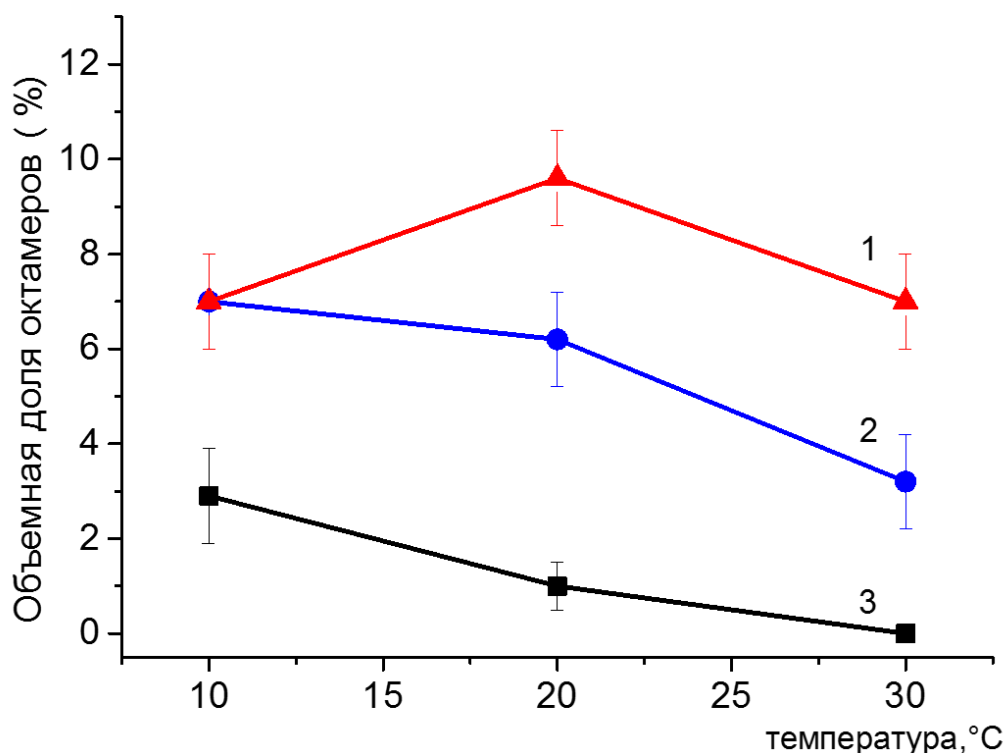


Рис. 4.7. Зависимость объемной доли октамеров от температуры в растворах лизоцима с хлоридом натрия при концентрациях белка и осадителя соответственно 10 и 25 (1), 20 и 25 (2), 40 и 25 мг/мл (3)

Для каждой концентрации белка объемная доля октамеров увеличивается с понижением температуры. Исключение является точка, соответствующая концентрации белка 40 мг/мл и температуре 10 °C. Это противоречие объясняется тем фактом, что при высокой концентрации белка кристаллы уже сформировались до окончания измерений (рис. 4.8. а). Это привело к снижению концентрации белка в растворе.

Из кристаллизационных растворов, которые загружались в измерительные ячейки (кюветы) перед началом МУРН измерений, была проведена кристаллизация для определения условий, в которых образуются кристаллы в D₂O. Рост кристаллов осуществлялся методом диффузии паров при температуре 20 °C, время роста составляло 36 ч.

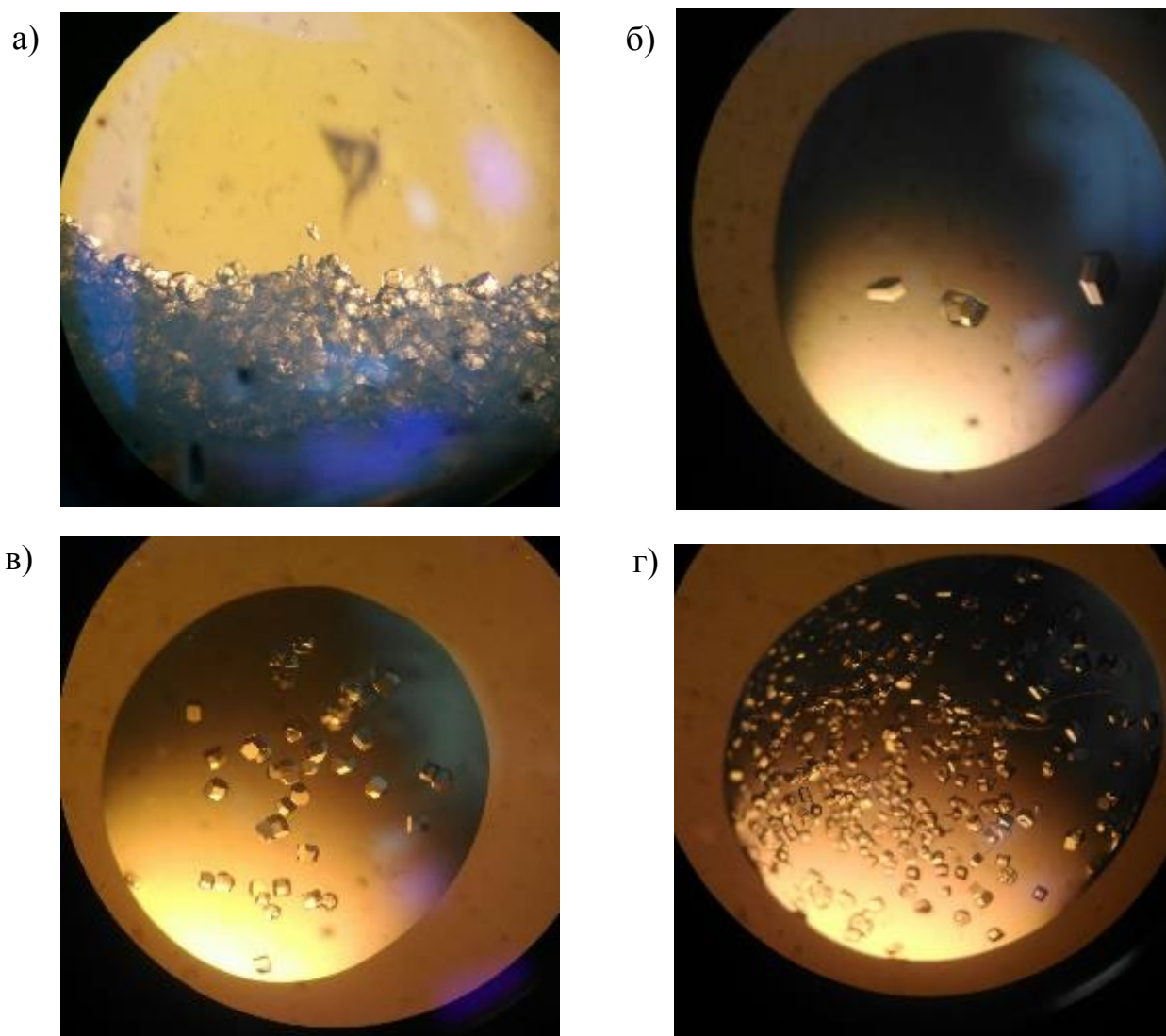


Рис. 4.8. Кристаллы лизоцима (а), образовавшиеся в измерительной кювете в конце эксперимента в условиях с концентрациями белка и осадителя 40 и 25 мг/мл соответственно. Кристаллы лизоцима (а-в), полученные из растворов, находящихся в измерительных ячейках (кюветах). Рост проводился при температуре 20 °С в течение 36 ч. Концентрация белка и осадителя при кристаллизации составляла 10 и 25 мг/мл (а), 20 и 25 мг/мл (б), 40 и 25 мг/мл (в)

На рис. 4.8. а–в изображены фотографии кристаллов лизоцима, полученные в условиях соответствующие условиям эксперимента МУРН. Увеличение концентрации белка приводит к увеличению количества образовавшихся кристаллов и уменьшению их размеров. Результаты кристаллизации хорошо

согласуются с изменением объемной доли образовавшихся октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима при изменении концентрации белка.

1.2. Заключение

Растворы лизоцима в D_2O были изучены методом МУРН. Было обнаружено, что при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии образуются димеры октамеры. Объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима увеличивается с понижением температуры и увеличением концентрации белка. Полученные в этой главе результаты хорошо согласуются с результатами предыдущих работ, в которых исследовались растворы лизоцима в H_2O методом МУРР [1,2]. Олигомеры присутствуют в растворе при кристаллизации, даже когда изменяется тип растворителя с H_2O на D_2O . Показано, что октамеры присутствуют на начальной стадии кристаллизации и также остаются в растворе во время образования кристаллов. Формирование октамеров лизоцима происходит в течение десятков минут, тогда как образование видимых кристаллов белка может занимать недели. Обнаружение олигомеров белка в растворе может дать возможность предсказать наилучшие условия для роста кристаллов белка. Образование олигомеров, наблюдаемое для лизоцима, происходит в условиях, благоприятных для роста кристаллов. Октамеры могут быть единицами роста кристаллов лизоцима или формировать эти единицы. Участие октамеров в качестве единицы роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии было косвенно подтверждено экспериментами по росту кристаллов лизоцима с помощью АСМ [84]. Было показано, что измеренные размеры ступеней роста грани (110) в направлении [001] составили 3.8, 7.6 и 11.4 нм, что соответствует одному, двум и трем виткам 4_3 спирали.

Результаты, представленные в Главе 4, опубликованы в работе [A2].

ГЛАВА 5. ВЛИЯНИЕ ТИПА РАСТВОРИТЕЛЯ (H_2O НА D_2O) НА ОБРАЗОВАНИЕ ОЛИГОМЕРОВ В РАСТВОРАХ ЛИЗОЦИМА В УСЛОВИЯХ РОСТА КРИСТАЛЛОВ ТЕТРАГОНАЛЬНОЙ СИНГОНИИ

5.1. Структура растворов лизоцима в D_2O при росте кристаллов тетрагональной сингонии

Для того чтобы сравнить влияние типа растворителя H_2O и D_2O на образование олигомеров в растворах лизоцима при росте кристаллов тетрагональной сингонии необходимо было воссоздать условия одного из экспериментов, описанных в главе 3 и 4. При исследовании методом МУРН необходимо использовать в качестве растворителя D_2O и большие объемы образца около 1 мл. При исследовании методом МУРР требуются значительно меньшие объемы образца ~ 100 мкл. Поэтому для сравнения влияния типа растворителя было проведено исследование кристаллизационных растворов лизоцима в D_2O методом МУРР на станции малоуглового рассеяния BM29 BioSAXS ESRF (см. п. 2.2.2).

На рис. 5.1. приведены систематические отклонения между экспериментальными данными и аппроксимацией Гинье для растворов лизоцима и лизоцима с осадителем при температурах 10, 20, 30 °C. Нелинейная зависимость графика Гинье свидетельствует о наличии гетерогенных агрегатов в кристаллизационных растворах лизоцима. Характер невязки от растворов белка без осадителя указывает на то, что молекулы белка отталкиваются (рис. 5.1. а, в, д, ж), а в растворе белка с осадителем притягиваются и образуют олигомеры (рис. 5.1. б, г, е, з).

Экспериментальные и рассчитанные программой OLIGOMER модельные кривые МУРР от растворов белка и белка с осадителем в D_2O при температуре 10, 20, 30 °C представлены на рис. 5.2. На кривых рассеяния в растворе белка без осадителя в D_2O (рис. 5.2. а, в, д, ж) наблюдается влияние межчастичной интерференции (вследствие отталкивающего потенциала взаимодействия). При

добавлении к раствору белка осадителя характер межчастичного взаимодействия меняется с отталкивания на притягивание.

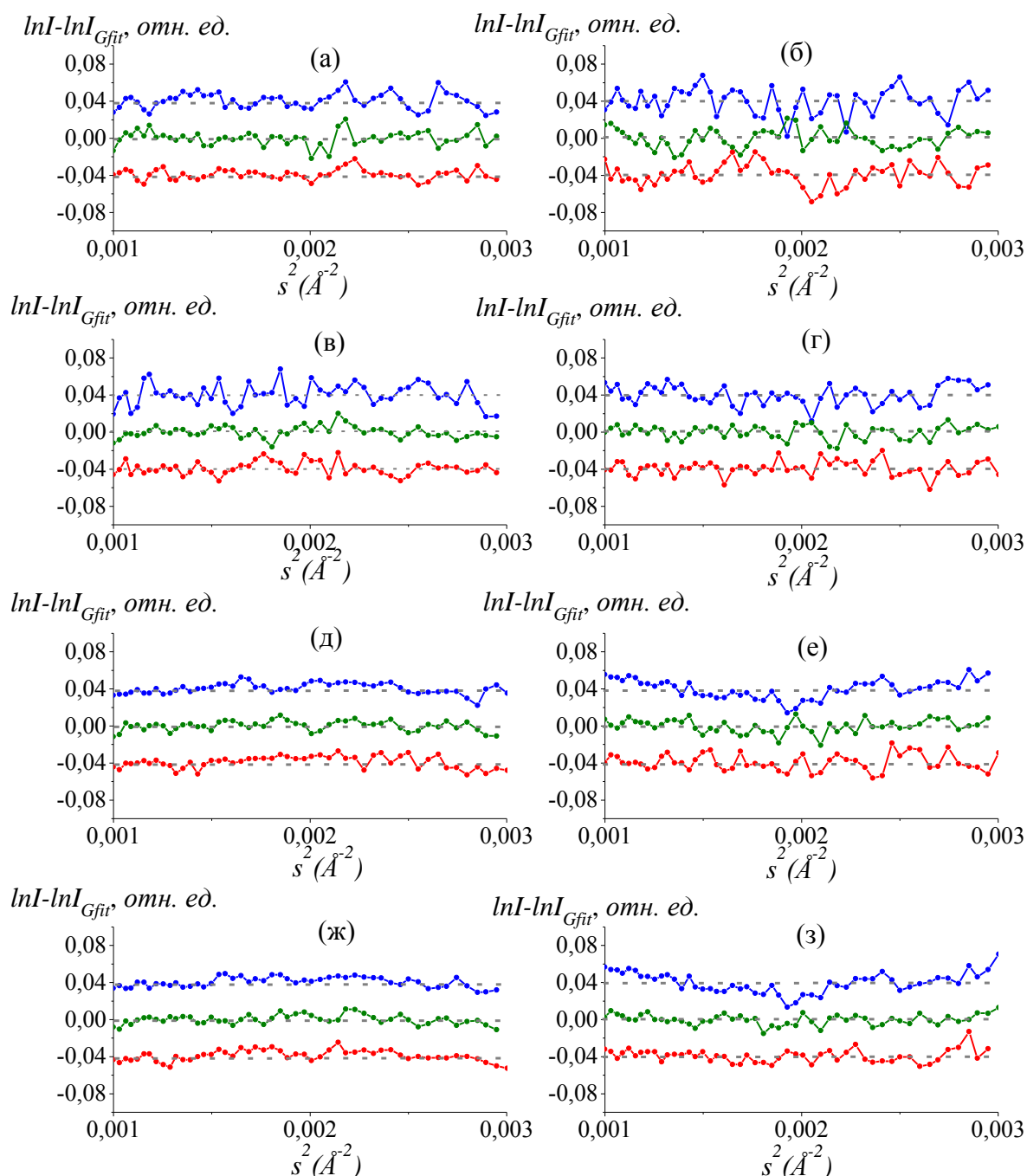


Рис. 5.1. Невязка между экспериментальными данными МУРР и аппроксимацией Гинье от растворов лизоцима и лизоцима с NaCl с концентрацией белка 10 (а), 20 (б), 30 (в), 40 мг/мл (г) и белка с осадителем 10 и 25 (д), 20 и 25 (е), 30 и 25 (ж), 40 и 25 мг/мл (з) соответственно при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая) и 30 °C (красная). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Увеличение интенсивности рассеяния при малых углах (рис. 5.2. б, г, е, з) свидетельствует об образовании более крупных частиц. Такое же изменение кривых рассеяния после добавления осадителя к раствору белка наблюдалось при использовании в качестве растворителя H_2O .

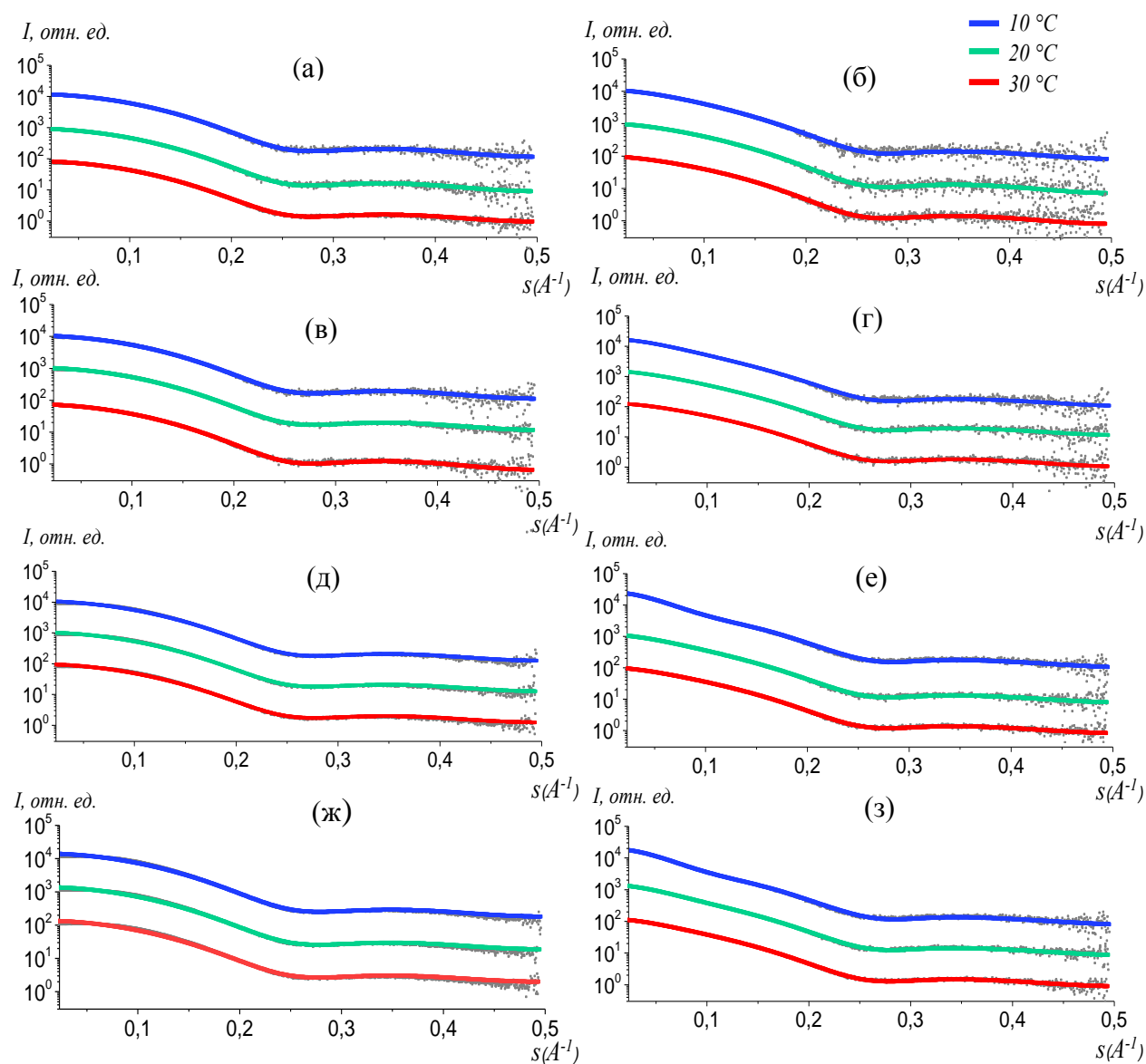


Рис. 5.2. Экспериментальные (точки) и рассчитанные программой OLIGOMER модельные (линии) кривые МУРР: раствор лизоцима без осадителя с концентрацией белка 10 (а), 20 (в), 30 (д), 40 мг/мл (ж); раствор белка с осадителем с концентрациями белка и осадителя 10 и 25 (б), 20 и 25 (г), 30 и 25 (е), 40 и 25 мг/мл (з) соответственно при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая) и 30 °С (красная). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Результат обработки экспериментальных данных с использованием кристаллографических моделей олигомеров с помощью программы OLIGOMER и качество приближения представлены в табл. 5.1. и на рис. 5.2. для разных температур и концентраций белка.

Рассчитанные кривые распределений для растворов белка с осадителем совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне, значения невязки χ^2 не превышают 1.25 (табл. 5.1).

Таблица 5.1. 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

C, мг/мл	T, °C	Белок с осадителем						Белок без осадителя *	
		Мономер	Димер	Тетрамер	Октамер	χ^2	$R_g, \text{Å}$	χ^2	$R_g, \text{Å}$
10	30	96.0 ± 0.8	2.6 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.08	19.1 ± 0.2	2.54	14.4 ± 0.2
	20	93.1 ± 0.9	5.8 ± 0.4	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.11	19.0 ± 0.2	2.60	14.4 ± 0.2
	10	89.2 ± 1.1	9.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.19	20.2 ± 0.2	2.65	14.4 ± 0.2
20	30	93.2 ± 0.5	5.2 ± 0.3	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.1	1.13	19.9 ± 0.2	2.82	14.3 ± 0.2
	20	88.9 ± 0.5	8.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.1	1.24	21.3 ± 0.2	3.05	14.3 ± 0.2
	10	83.5 ± 0.7	12.3 ± 0.4	0.0 ± 0.0	4.2 ± 0.1	1.73	23.6 ± 0.2	3.35	14.3 ± 0.2
30	30	92.0 ± 0.4	5.5 ± 0.2	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.1	1.58	21.4 ± 0.2	2.93	14.3 ± 0.2
	20	87.9 ± 0.5	8.7 ± 0.3	0.0 ± 0.0	3.4 ± 0.1	1.74	22.7 ± 0.2	3.13	14.3 ± 0.2
	10	81.7 ± 0.6	11.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	7.2 ± 0.1	2.02	25.8 ± 0.2	3.72	14.3 ± 0.2
40	30	91.2 ± 0.3	5.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	3.5 ± 0.1	2.07	22.8 ± 0.2	3.32	14.3 ± 0.2
	20	85.7 ± 0.4	8.7 ± 0.2	0.0 ± 0.0	5.6 ± 0.1	2.36	24.8 ± 0.2	4.11	14.3 ± 0.2
	10	82.8 ± 0.5	4.3 ± 0.3	0.0 ± 0.0	12.9 ± 0.1	2.49	28.5 ± 0.2	4.48	14.3 ± 0.2

* 100% мономеров; остальные олигомеры отсутствуют.

На рис. 5.3. а представлены зависимости объемной доли октамеров лизоцима в растворах H_2O и D_2O от концентрации белка для трех температур: 10, 20 и 30 °С. Для наглядности на рис. 5.3. б также представлены зависимости объемной доли октамеров лизоцима в растворах H_2O и D_2O от температуры для разных концентраций белка.

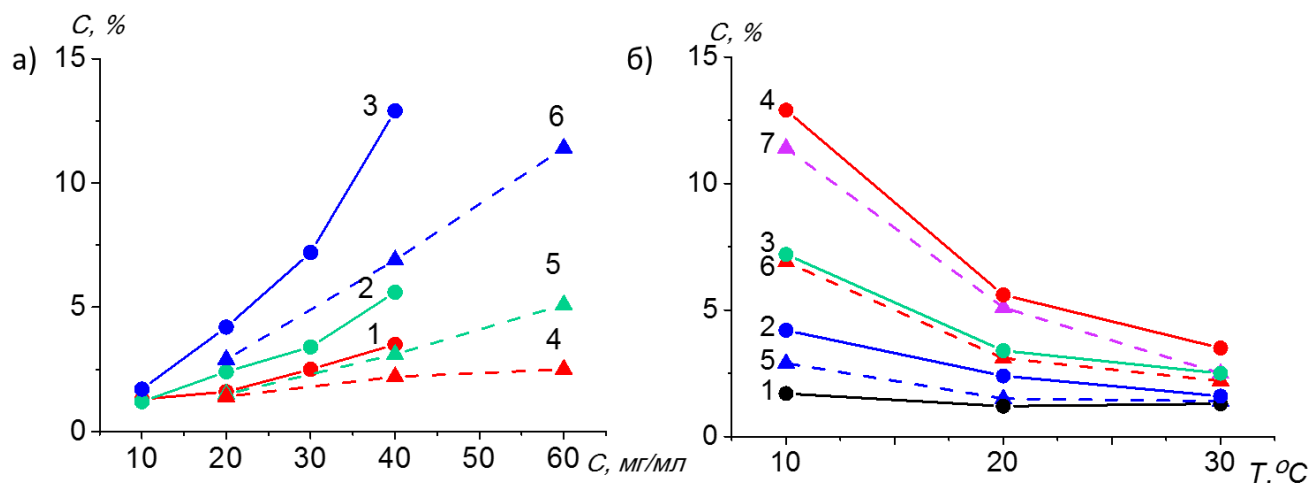


Рис. 5.3. Зависимость объемной доли октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима: а – от концентрации белка при температуре 30 (1, 4), 20 (2, 5) и 10 °С (3, 6) в растворах лизоцима с осадителем в D_2O (1–3) и H_2O (4–6); б – от температуры при концентрациях белка 10 (1), 20 (2, 5), 30 (3), 40 (4, 6), 60 мг/мл (7) в растворах D_2O (1–4) и H_2O (5–7)

Для двух типов растворителя (H_2O и D_2O) показано, что при всех значениях концентраций белка в кристаллизационных растворах помимо мономеров образуются димеры и октамеры. Объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе увеличивается с ростом концентрации белка и понижением температуры. Однако замена растворителя – H_2O на D_2O – приводит к увеличению объемной доли октамеров в растворе при прочих равных условиях. Полученные данные согласуются с результатами исследования начальной стадии кристаллизации лизоцима методом МУРН (глава 4), 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. При исследованиях методом МУРН от момента смешивания растворов и установления температуры до начала измерений проходило 5 – 7 ч, каждое измерение длилось 1 ч, а при исследованиях методом МУРР до начала измерений проходило ~1 ч.

Сравнение полученных данных для растворов лизоцима с осадителем в D_2O и H_2O с кривой растворимости лизоцима [118] представлено на рис. 5.4. Содержание октамеров в условиях ниже кривой растворимости составляет 1.3 и 1.4 % для растворов в D_2O и H_2O соответственно, при таких условиях ($C_{\text{лиз}} = 20$ мг / мл, 30 °C - для H_2O и $C_{\text{лиз}} = 10$ мг / мл, 30 °C – для D_2O) кристаллы не образуются. В условиях, близких к кривой растворимости ($C_{\text{лиз}} = 20$ мг/мл, 20 °C – для H_2O и $C_{\text{лиз}} = 10$ мг/мл, 20 °C – для D_2O) рост кристаллов происходит не всегда. В условиях выше кривой растворимости объемная доля октамеров, образующихся в растворах, превышает 2.5 % для обоих типов растворителей, при данных условия в большинстве случаев образуются кристаллы.

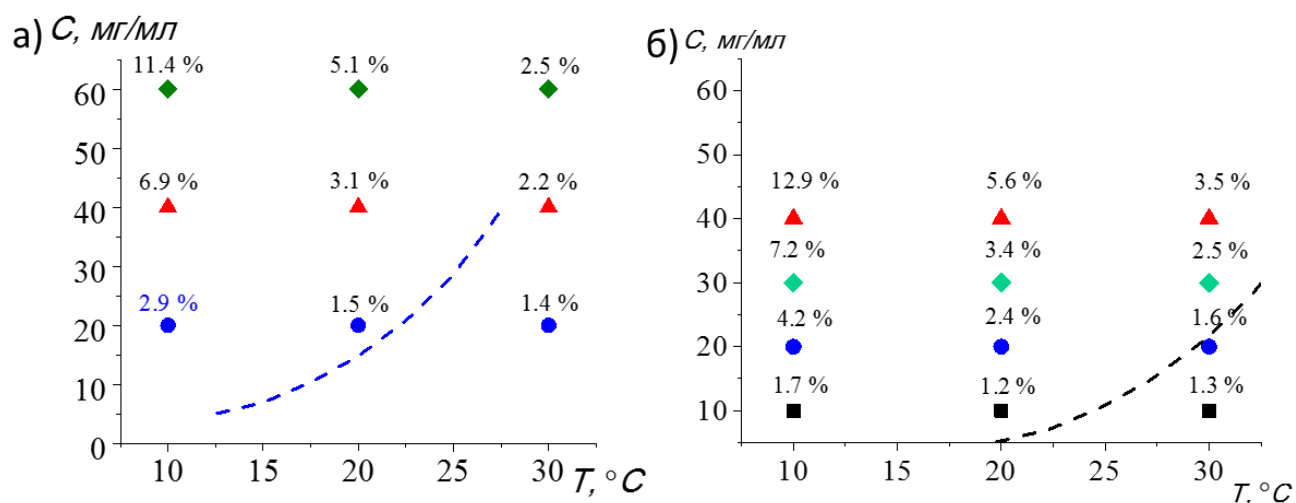


Рис. 5.4. Температурные зависимости объемной доли октамеров, образовавшихся в растворе, для разных концентраций лизоцима в присутствии $NaCl$ (25 мг/мл), определенные методом: а – МУРР в случае растворителя H_2O ; б – МУРР в случае растворителя D_2O . Кривые растворимости лизоцима в детерированной (рD 4.75) и протонированной (рН 4.6) воде в присутствии 25 мг/мл $NaCl$ построены на основании данных [118]

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 также оказывает существенное влияние на начальную стадию кристаллизации, приводя к увеличению процентного содержания октамеров. Для различных концентраций белка изменение объемной доли октамеров в растворе при замене H_2O на D_2O аналогично изменению температуры на $\sim 10^\circ\text{C}$. Полученный результат согласуется с результатами [118] исследования изменения растворимости лизоцима при замене H_2O на D_2O , в котором показано, что одинаковое значение растворимости лизоцима в H_2O на D_2O достигается, когда температура раствора в D_2O ниже на $\sim 7^\circ\text{C}$.

Несмотря на то, что методы МУРР и МУРН являются независимыми 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 является одним из параметров, влияющих на образование олигомеров и рост кристаллов белков. Варьируя его, можно управлять процессом кристаллизации.

5.2. Влияние типа растворителя на структуру кристаллизационных растворов лизоцима

Для того, чтобы более точно оценить, насколько сильно отличается объемная доля олигомеров в растворах лизоцима при кристаллизации в H_2O и D_2O были проведены исследования растворов методом МУРР при изменении температуры с шагом 1°C . Концентрация белка и осадителя составляла 20 и 25 мг/мл соответственно.

Измерения данных МУРР проводили в диапазоне температур от 27 и до 5 °С для растворов лизоцима с осадителем в H₂O, а для D₂O от 30 и до 4 °С. Экспериментальные данные МУРР обрабатывались программой OLIGOMER с использованием кристаллографических моделей олигомеров (рис. 5.5.).

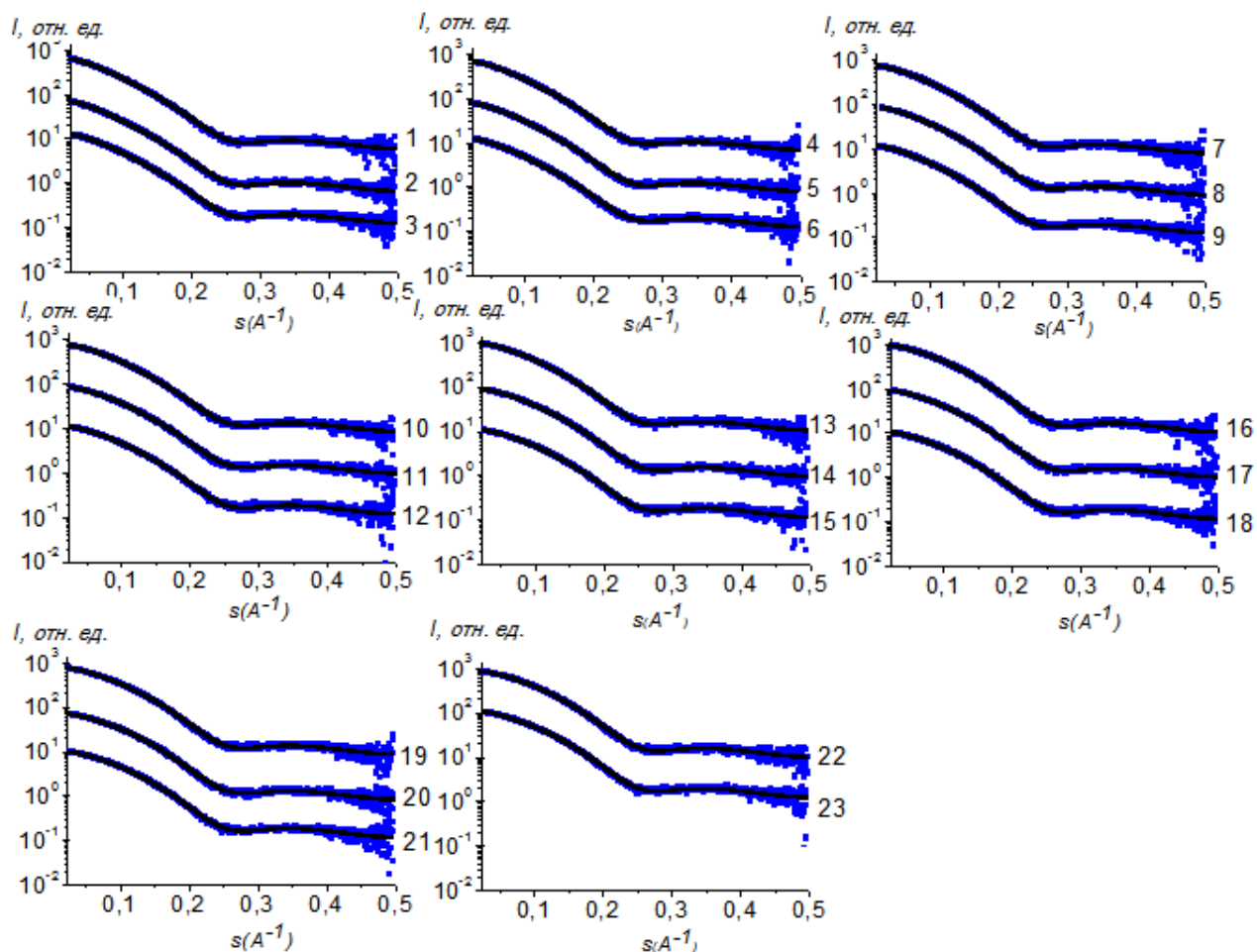


Рис. 5.5. Экспериментальные (точки) и рассчитанные программой OLIGOMER модельные (линии) кривые МУРР от раствора лизоцима с осадителем с концентрациями белка и осадителя 20 и 25 мг/мл соответственно в H₂O при температурах: 5 (1), 6 (2), 7 (3), 8 (4), 9 (5), 10 (6), 11 (7), 12 (8), 13 (9), 14 (10), 15 (11), 16 (12), 17 (13), 18 (14), 19 (15), 20 (16), 21 (17), 22 (18), 23 (19), 24 (20), 25 (21), 26(22), 27 (23) °С. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Результат обработки представлен в табл. 5.2. и на рис. 5.5. Во всем диапазоне температур в кристаллизационном растворе лизоцима присутствуют помимо

мономеров димеры и октамеры при использовании в качестве растворителя H_2O . При этом тенденция увеличения объемной доли октамеров при понижении температуры хорошо согласуется с предыдущими экспериментами.

Таблица 5.2. Объемные доли олигомеров, качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 и радиусы инерции R_g , Å, рассчитанные по начальному участку кривых, для растворов лизоцима с осадителем в H_2O в зависимости от температуры.

Т, °С	R_g , Å	Мономер, %	Димер, %	Тетрамер %	Гексамер, %	Октамер, %	χ^2
27	18.1± 0.2	92.1±0.3	6.2±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.7±0.1	0.90
26	18.2± 0.2	91.1±0.3	7.1±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.7±0.1	0.93
25	18.3± 0.2	90.7±0.3	7.5±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.8±0.1	0.89
24	18.5± 0.2	90.4±0.3	7.6±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.9±0.1	0.94
23	18.5± 0.2	90.3±0.3	7.7±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.0±0.1	0.91
22	18.6± 0.2	89.5±0.3	8.5±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.0±0.1	0.98
21	18.8± 0.2	88.9±0.3	8.9±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.1±0.1	0.94
20	18.7± 0.2	87.9±0.3	10.0±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.0±0.1	0.94
19	18.9± 0.2	87.5±0.3	10.3±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.1±0.1	0.98
18	18.9± 0.2	86.3±0.3	11.5±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.1±0.1	0.99
17	19.1± 0.2	86.0±0.3	11.7±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.3±0.1	1.00
16	19.2± 0.2	84.9±0.3	12.8±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.3±0.1	1.04
15	19.4± 0.2	84.3±0.3	13.3±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.4±0.1	1.01
14	19.5± 0.2	82.8±0.3	14.7±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.4±0.1	1.02
13	19.6± 0.2	82.0±0.3	15.4±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.6±0.1	1.06
12	20.0± 0.2	82.2±0.3	14.9±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.9±0.1	1.18
11	20.0± 0.2	80.7±0.3	16.4±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	2.9±0.1	1.09
10	20.4± 0.2	79.6±0.3	17.1±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.3±0.1	1.28
9	20.5± 0.2	79.1±0.3	17.5±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.4±0.1	1.27

8	20.8± 0.2	77.1±0.3	19.2±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.7±0.1	1.31
7	21.0± 0.2	76.3±0.3	19.9±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.8±0.1	1.27
6	21.3± 0.2	75.4±0.3	20.5±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.2±0.1	1.28
5	21.4± 0.2	73.8±0.3	21.9±0.3	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.3±0.1	1.23

Измерения данных МУРР для растворов лизоцима с осадителем с использованием в качестве растворителя D₂O проводили в диапазоне температур от 30 и до 4 °С. Экспериментальные данные МУРР обрабатывались программой OLIGOMER с использованием кристаллографических моделей олигомеров. Экспериментальные кривые МУРР и качество приближения смесью олигомеров представлено на рис. 5.6.

Результат обработки программой OLIGOMER представлен в табл. 5.3. Так же, как и в случае с растворителем H₂O, в растворе лизоцима с осадителем в D₂O присутствуют димеры и октамеры во всем температурном диапазоне. При этом наблюдается тенденция увеличения объемной доли октамеров при понижении температуры, которая хорошо согласуется с предыдущими экспериментами.

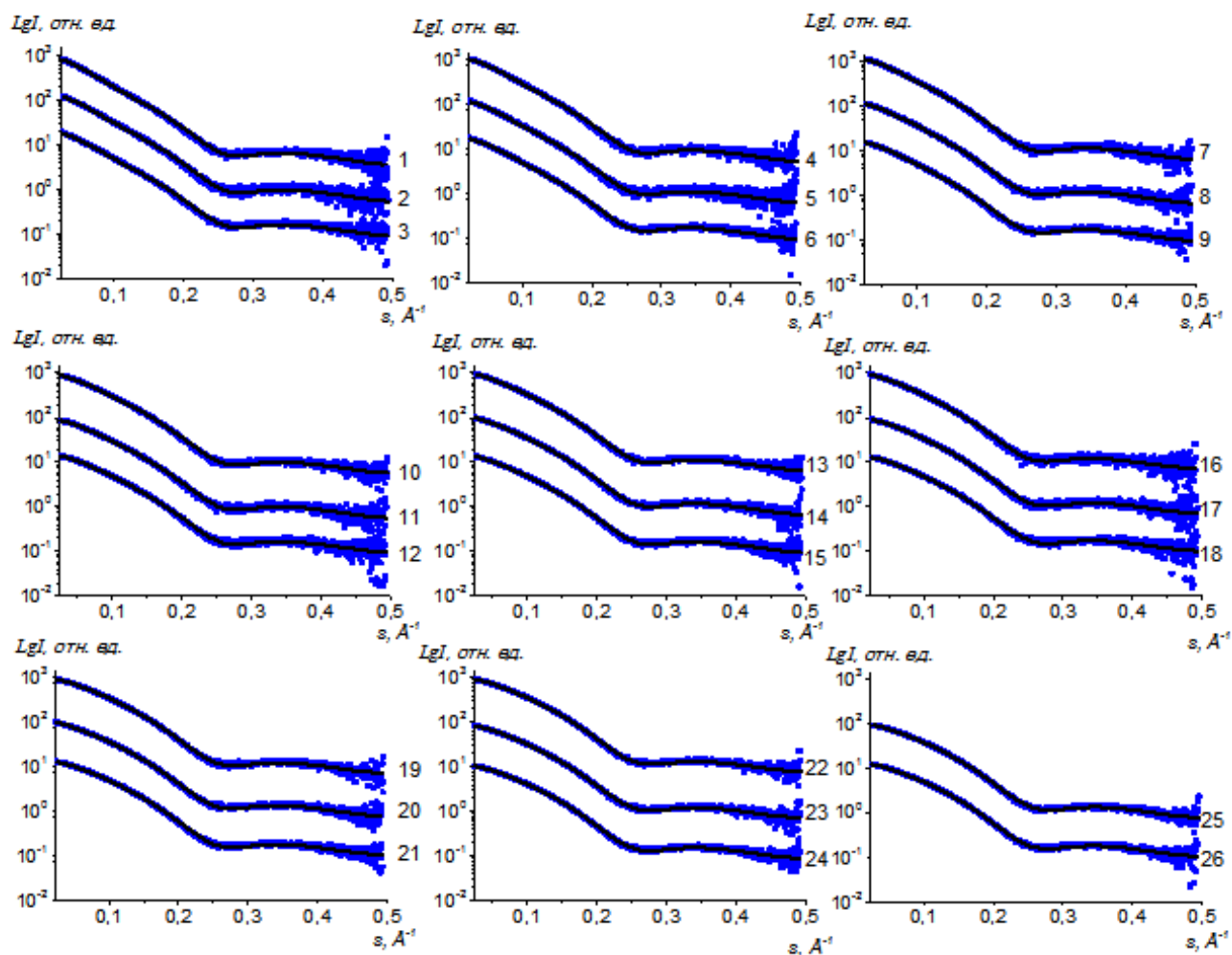


Рис. 5.6. Экспериментальные (точки) и рассчитанные программой OLIGOMER модельные (линии) кривые МУРР от раствора лизоцима с осадителем с концентрациями белка и осадителя 20 и 25 мг/мл соответственно в D_2O при температурах: 4 (1), 5 (2), 6 (3), 7 (4), 8 (5), 9 (6), 10 (7), 11 (8), 12 (9), 13 (10), 14 (11), 15 (12), 16 (13), 17 (14), 18 (15), 19 (16), 20 (17), 21 (18), 22 (19), 23 (20), 24 (21), 26 (22), 27 (23), 28 (24), 29 (25), 30 (26) °С. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Таблица 5.3. Объемные доли олигомеров, качество приближения экспериментальных данных смесью олигомеров χ^2 и радиусы инерции R_g , Å, рассчитанные по начальному участку кривых, для растворов лизоцима с осадителем в D_2O в зависимости от температуры.

Т, °С	R_g , Å	Мономер, %	Димер, %	Тетрамер, %	Гексамер, %	Октамер, %	χ^2
-------	-----------	------------	----------	-------------	-------------	------------	----------

30	20.6± 0.2	87.5±0.3	8.8±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.7±0.1	0.83
29	20.6± 0.2	87.2±0.3	9.1±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.7±0.1	0.97
28	20.7± 0.2	86.4±0.3	9.8±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.8±0.1	0.82
27	20.9± 0.2	85.8±0.3	10.2±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.0±0.1	0.99
26	20.9± 0.2	85.0±0.3	11.0±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.0±0.1	1.05
24	21.1± 0.2	84.1±0.3	11.7±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.2±0.1	1.13
23	21.2± 0.2	83.4±0.3	12.4±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.2±0.1	1.41
22	21.3± 0.2	82.2±0.3	13.4±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.3±0.1	1.54
21	21.5± 0.2	81.8±0.3	13.6±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.6±0.1	1.45
20	21.6± 0.2	80.9±0.3	14.5±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.6±0.1	1.20
19	21.8± 0.2	79.2±0.3	15.9±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	4.9±0.1	1.23
18	21.9± 0.2	79.4±0.3	15.6±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	5.0±0.1	1.68
17	22.1± 0.2	78.5±0.3	16.3±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	5.3±0.1	1.63
16	22.5± 0.2	77.2±0.3	17.0±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	5.8±0.1	1.77
15	22.3± 0.2	75.8±0.3	18.8±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	5.4±0.1	1.29
14	22.7± 0.2	75.0±0.3	19.0±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	6.0±0.1	1.64
13	22.9± 0.2	74.7±0.3	18.9±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	6.4±0.1	1.41
12	23.5± 0.2	73.6±0.3	19.1±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	7.4±0.1	1.95
11	23.6± 0.2	72.9±0.3	19.6±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	7.5±0.1	1.70
10	23.9± 0.2	71.7±0.3	20.4±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	8.0±0.1	1.99
9	24.5± 0.2	70.1±0.3	20.7±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	9.1±0.1	2.17
8	24.7± 0.2	68.8±0.3	21.7±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	9.6±0.1	2.19
7	25.0± 0.2	67.9±0.3	21.9±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	10.2±0.1	2.02
6	25.5± 0.2	67.1±0.3	21.4±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	11.6±0.1	2.25
5	25.8± 0.2	65.5±0.3	22.1±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	12.4±0.1	2.50
4	26.4± 0.2	65.0±0.3	20.9±0.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	14.0±0.1	2.53

Наблюдается нелинейная зависимость роста объемной доли октамеров при понижении температуры для обоих типов растворителей. Объемная доля октамеров лизоцима выше в D_2O , чем H_2O , разница между ними также растет с понижением температуры (рис. 5.7. а). При этом разница между объемной долей всех олигомеров (димеры + октамеры) в D_2O и H_2O остается постоянной при любой температуре и составляет $\sim 8\%$ (рис.5.7. б).

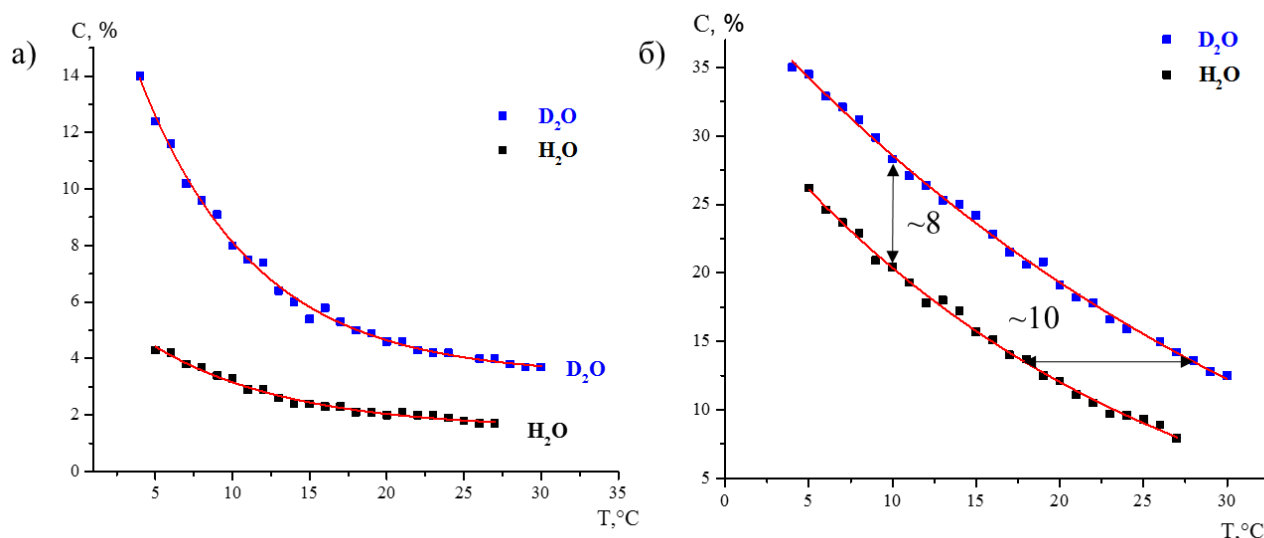


Рис. 5.7. Зависимость объемной доли октамеров (а) и олигомеров (б) от температуры в растворах лизоцима с осадителем в H_2O (черная) и D_2O (синяя).

При этом, когда достигается одинаковое содержание олигомеров в растворе, разница в температуре составляет $\sim 10\text{ }^\circ\text{C}$. Такая разница в содержании олигомеров в растворе лизоцима при использовании растворителей H_2O и D_2O может быть вызвана тем, что растворимость D_2O ниже, чем в H_2O . Одинаковая растворимость достигается при разнице в температуре примерно в $7\text{ }^\circ\text{C}$ [118].

Также разница в структурах кристаллизационных растворов в H_2O и D_2O может быть связана с тем, что при добавлении к раствору белков D_2O уменьшается гидратация белковых молекул из-за усиления межмолекулярного взаимодействия. Что приводит к сдвигу равновесия между мономерами и агрегатами в сторону образования агрегатов белков. Гидратация может снижаться на 10 – 40 %. [119].

Гидрофобные связи также могут оказывать влияние на разное содержание олигомеров в кристаллизационных растворах в H_2O и D_2O , так в работе [120] показано, что гидрофобные связи между аминокислотами сильнее в D_2O , чем в H_2O .

Дополнительное подтверждение того, что в кристаллизационном растворе лизоцима образуются только октамеры и димеры было показано при моделировании методом молекулярной динамики. Было рассчитано время жизни олигомеров (табл. 5.4). Показано, что димеры и октамеры стабильны в кристаллизационном растворе в присутствии осадителя NaCl (с концентрацией 25 мг/мл) и нестабильны в его отсутствие, а тетрамеры и гексамеры нестабильны как в присутствии, так и в отсутствие осадителя [121].

Таблица 5.4. Времена жизни олигомеров лизоцима в водном растворе с ацетатным буфером при температуре 10 °C по расчетам молекулярного моделирования в силовом поле Amber ff99SB-ILDN с моделью воды TIP3P

Тип олигомера	Время жизни, нс	
	С осадителем	Без осадителя
Димер	>100	81.5
Тетрамер	65.5	72.5
Гексамер	30	35
Октамер	>100	58

Также методом молекулярной динамики подтверждена стабильность октамера лизоцима при добавлении хлорида натрия, модель которого использовалась при обработке данных малоуглового рассеяния, и нестабильность другого типа октамера [122].

5.3. Заключение

Показано, что как в случае с использованием растворителя H_2O , так и D_2O , в растворе при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии образуются димеры и октамеры. При этом сохраняется общая закономерность увеличения объемной доли октамеров при понижении температуры и увеличении концентрации белка.

Также показано, что процентное содержание олигомеров в кристаллизационном растворе лизоцима выше при использовании в качестве растворителя D_2O по сравнению с H_2O . Что, вероятнее всего, вызвано, разницей в растворимости лизоцима в H_2O и D_2O . Объемная доля олигомеров в D_2O выше, чем в H_2O , на $\sim 8\%$. Одинаковое содержание олигомеров в кристаллизационных растворах лизоцима в H_2O и D_2O достигается, когда температура раствора в H_2O ниже на $\sim 10^\circ C$, чем в D_2O .

Результаты, представленные в Главе 5, опубликованы в работах [A3, A4].

ВЫВОДЫ И ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Показано, что изменение взаимодействия между молекулами лизоцима при добавлении осадителя приводит к формированию стабильной фазы из октамеров

2. Установлено, что при всех исследуемых в данной работе значениях температур, концентраций белка для H_2O и для D_2O в растворе в условиях роста кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии присутствуют мономеры, димеры и октамеры. При этом в кристаллизационных растворах не обнаружены тетрамеры, гексамеры, а также олигомеры крупнее октамеров.

3. С помощью методов МУРР и МУРН показано, что как для H_2O , так и для D_2O при изменении концентрации белка от 10 до 60 мг/мл при добавлении осадителя, приводящего к образованию кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, в растворе образуется от 1 до 15 % димеров и от 1 до 13 % октамеров при изменении температуры раствора от 30 до 10 °С. Показано, что при повышении концентрации белка и понижении температуры растет объемная доля октамеров

4. Методом МУРР показано, что объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима выше в D_2O , чем в H_2O . Одинаковое содержание олигомеров в кристаллизационных растворах лизоцима в H_2O и D_2O достигается, когда температура раствора в H_2O ниже на ~ 10 °С, чем в D_2O .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kovalchuk M. V. et al. Investigation of the Initial Crystallization Stage in Lysozyme Solutions by Small-Angle X-ray Scattering // *Cryst. Growth Des.* 2016. Vol. 16, № 4. P. 1792–1797.
2. Marchenkova M.A. et al. In situ study of the state of lysozyme molecules at the very early stage of the crystallization process by small-angle X-ray scattering // *Crystallogr. Reports.* 2016. Vol. 61, № 1. P. 5–10.
3. McPherson A., Cudney B. Optimization of crystallization conditions for biological macromolecules // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun. International Union of Crystallography,* 2014. Vol. 70, № 11. P. 1445–1467.
4. Luft J.R., Newman J., Snell E.H. Crystallization screening: The influence of history on current practice // *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.* 2014. Vol. 70, № 7. P. 835–853.
5. Zhang C.Y. et al. A strategy for selecting the pH of protein solutions to enhance crystallization // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 2013. Vol. 69, № 7. P. 821–826.
6. Veessler J.-P.A., Ste'phane. Using Temperature To Crystallize Proteins: A Mini-Review // *Cryst. Growth Des.* 2008. Vol. 8, № 12. P. 4215–4219.
7. Matsumura H., Sugiyama S., Hirose M. Approach for growth of high-quality and large protein crystals. *International Union of Crystallography,* 2011. P. 16–19.
8. Givargizov E., Kliya M.O., Grebenko A. Artificial epitaxy (graphoepitaxy) of proteins. 1991. Vol. 112. P. 758–772.
9. Pechkova E., Nicolini C. Accelerated protein crystal growth by protein thin film template // *J. Cryst. Growth.* 2001. Vol. 231. P. 599–602.
10. 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.
11. Chayen N.E., Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal // *Nat. Methods*. 2008. Vol. 5, № 2. P. 147–153.
 12. D’Arcy A. et al. A novel approach to crystallising proteins under oil // *J. Cryst. Growth*. 1996. Vol. 168, № 1–4. P. 175–180.
 13. D’Arcy A. et al. The advantages of using a modified microbatch method for rapid screening of protein crystallization conditions // *Acta Crystallogr. - Sect. D Biol. Crystallogr.* 2003. Vol. 59, № 2. P. 396–399.
 14. McPherson A., Delucas L.J. Microgravity protein crystallization. 2015. № July. P. 1–20.
 15. Куранова И.П. Кристаллизация белков на Земле и в невесомости // *Поверхность*. 2004. №6. С.4—12. 2004. P. 4–12.
 16. Lorber B. et al. Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students // *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2012. Vol. 40, № 6. P. 372–382.
 17. Minton A.P. Static Light Scattering from Concentrated Protein Solutions , I : General Theory for Protein Mixtures and Application to Self-Associating Proteins // *Biophys. J. Elsevier*, 2007. Vol. 93, № 4. P. 1321–1328.
 18. Alford J.R. et al. Measurement of the second osmotic virial coefficient for protein solutions exhibiting monomer-dimer equilibrium // *Anal. Biochem.* 2008. Vol. 377, № 2. P. 128–133.
 19. George A., Wilson W.W. Predicting Protein Crystallization from a Dilute Solution Property // *Acta Cryst. International Union of Crystallography*, 1994. Vol. 50, № 4. P. 361–365.
 20. Tessier P.M., Lenhoff A.M. Measurements of protein self-association as a guide to crystallization // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2003. Vol. 14, № 5. P. 512–516.

21. Baitan D. et al. Growing Protein Crystals with Distinct Dimensions Using Automated Crystallization Coupled with In Situ Dynamic Light Scattering // *JoVE*. 2018. № 138. P. e57070.
22. Franke D., Jeffries C.M., Svergun D.I. Machine Learning Methods for X-Ray Scattering Data Analysis from Biomacromolecular Solutions // *Biophysj. Biophysical Society*, 2018. Vol. 114, № 11. P. 2485–2492.
23. Lipfert J., Doniach S. Small-Angle X-Ray Scattering from RNA, Proteins, and Protein Complexes // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2007. Vol. 36, № 1. P. 307–327.
24. Boldon L., Laliberte F., Liu L. Relevant Integrated Application // *Nano Rev.* 2015. Vol. 6. P. 1–22.
25. Svergun D.I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria // *J. Appl. Crystallogr.* 1992. Vol. 25, № pt 4. P. 495–503.
26. Kikhney A.G., Svergun D.I. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins // *FEBS Lett.* 2015. Vol. 589, № 19. P. 2570–2577.
27. Trends in Polyoxometalates Research / ed. Ruhlmann L., Schaming D. Nova Science Publishers, 2015.
28. Konarev P.V. et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr.* 2003. Vol. 36, № 5. P. 1277–1282.
29. Feigin L.A., Svergun D.I. Structure Analysis by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering. New York: Plenum Press, 1987. 176 p.
30. Petoukhov M.V, Svergun D.I. Analysis of X-ray and neutron scattering from biomacromolecular solutions. 2007. № Figure 1. P. 562–571.
31. Neylon C. Small angle neutron and X-ray scattering in structural biology : recent

- examples from the literature. 2008. № May 2007. P. 531–541.
32. Heigl R.J. et al. Crossover from a Linear to a Branched Growth Regime in the Crystallization of Lysozyme // *Cryst. Growth Des.* 2018. Vol. 18, № 3. P. 1483–1494.
 33. Su T.J. et al. Application of Small Angle Neutron Scattering to the in Situ Study of Protein Fouling on Ceramic Membranes // *Langmuir.* 2002. Vol. 14, № 19. P. 5517–5520.
 34. Hayward D.W. et al. A small-angle neutron scattering environment for in-situ observation of chemical processes // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–11.
 35. Grossmann J.G. Biological solution scattering: Recent achievements and future challenges // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2007. Vol. 40, № SUPPL. 1. P. 217–222.
 36. Kashchiev D. *Nucleation - Basic Theory with Applications.* Butterworth-Heinemann, 2000.
 37. Lutsko J.F. A dynamical theory of nucleation for colloids and macromolecules // *J. Chem. Phys.* 2012. Vol. 136, № 3.
 38. Sleutel M., Van Driessche A.E.S. Nucleation of protein crystals-a nanoscopic perspective // *Nanoscale.* 2018. Vol. 10, № 26. P. 12256–12267.
 39. Kam Z., Shore H.B., Feher G. On the crystallization of proteins. // *J. Mol. Biol.* 1978. Vol. 123, № 4. P. 539–555.
 40. Feder J., Jossang T. Scaling Behavior and Cluster Fractal Dimension Determined by. 1925. Vol. 3, № October. P. 1403–1406.
 41. Kadima W. et al. Precrystallization aggregation of insulin by dynamic light scattering and comparison with canavalin // *J. Cryst. Growth.* 1991. Vol. 110, № 1–2. P. 188–194.
 42. Kadima W. et al. Characterization of precrystallization aggregation of canavalin by

- dynamic light scattering // *Biophys. J.* Elsevier, 1990. Vol. 57, № 1. P. 125–132.
43. Azuma T. Clustering Phenomenon and Growth Units in Lysozyme Aqueous Solution. 1989. Vol. 98. P. 371–376.
 44. Bishop J.B. et al. Dynamic light scattering analysis of solutions from which lysozyme crystals grow // *J. Cryst. Growth.* 1992. Vol. 122, № 1–4. P. 41–49.
 45. Muschol M., Rosenberger F. Interactions in Undersaturated and Supersaturated Lysozyme Solutions: Static and Dynamic Light Scattering Results // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 103, № December. P. 10424–10432.
 46. Stradner A. et al. Equilibrium cluster formation in concentrated protein solutions and colloids // *Nature.* 2004. Vol. 432, № 7016. P. 492–495.
 47. Shukla A. et al. Absence of equilibrium cluster phase in concentrated lysozyme solutions. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 13. P. 5075–5080.
 48. Ten Wolde P.R., Frenkel D. Enhancement of protein crystal nucleation by critical density fluctuations // *Science.* 1997. Vol. 277, № 5334. P. 1975–1978.
 49. Zhou R.-B. et al. A review on recent advances for nucleants and nucleation in protein crystallization // *CrystEngComm.* 2017. Vol. 19, № 8. P. 1143–1155.
 50. Li Y. et al. Ostwald-like ripening of the anomalous mesoscopic clusters in protein solutions // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116, № 35. P. 10657–10664.
 51. Li Y., Lubchenko V., Vekilov P.G. The use of dynamic light scattering and Brownian microscopy to characterize protein aggregation // *Rev. Sci. Instrum.* 2011. Vol. 82, № 5. P. 053106–053108.
 52. Sleutel M., Van Driessche A.E.S. Role of clusters in nonclassical nucleation and growth of protein crystals // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Vol. 111, № 5. P. E546–E553.
 53. Pan W. et al. Metastable mesoscopic clusters in solutions of sickle-cell hemoglobin. // *Biophys. J.* 2007. Vol. 92, № 1. P. 267–277.

54. Uzunova V. et al. Control of the nucleation of sickle cell hemoglobin polymers by free hematin // *Faraday Discuss.* 2012. Vol. 159. P. 87–104.
55. 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.
56. Savage J.R., Dinsmore A.D. Experimental evidence for two-step nucleation in colloidal crystallization // *Phys. Rev. Lett.* 2009. Vol. 102, № 19. P. 198302–198304.
57. 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.
58. Niimura N. et al. Aggregation in supersaturated lysozyme solution studied by time-resolved small angle neutron scattering // *J. Cryst. Growth.* 1995. Vol. 154, № 1/2. P. 136–144.
59. Boué F. et al. Small angle neutron scattering study of lysozyme solutions // *J. Cryst. Growth.* 1993. Vol. 133, № 3–4. P. 246–254.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.

64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Georgalis Y. et al. Formation dynamics of protein precrystallization fractal clusters // *J. Cryst. Growth.* 1993. Vol. 126, № 2–3. P. 245–260.
68. Georgalis Y. et al. Ordering of fractal clusters in crystallizing lysozyme solutions // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. Vol. 121, № 8. P. 1627–1635.
69. 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.
70. 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.
71. Yoshizaki I. et al. Investigation of the protein pre-crystallization solution using analytical ultracentrifugation // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2005. Vol. 61. P. 755–758.
72. Pusey M.L., Nadarajah A. A Model for Tetragonal Lysozyme Crystal Nucleation and Growth // *Cryst. Growth Des.* 2002. Vol. 2, № 6. P. 475–483.
73. 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.

74. 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.
75. Nadarajah A., Li M., Pusey M.L. Growth mechanism of the (110) face of tetragonal lysozyme crystals // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 1997. Vol. 53, № 5. P. 524–534.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.* International Union of Crystallography, 1999. Vol. 55, № 5. P. 1012–1022.
85. 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.
86. 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.
87. Ferreira C. et al. The nucleation of protein crystals as a race against time with on- and off-pathways // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2017. Vol. 50, № 4. P. 1056–1065.
88. Georgalis Y. et al. Protein crystallization screening through scattering techniques // *Adv. Colloid Interface Sci.* 1995. Vol. 58, № 1. P. 57–86.
89. 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.
90. Gebauer D. et al. Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. Vol. 43, № 7. P. 2348–2371.
91. Gliko O. et al. A metastable prerequisite for the growth of lumazine synthase crystals // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 10. P. 3433–3438.
92. 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.
93. Sauter A. et al. On the question of two-step nucleation in protein crystallization //

- Faraday Discuss. Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 179. P. 41–58.
94. 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.
 95. 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.
 96. Vekilov P.G. The two-step mechanism of nucleation of crystals in solution // *Nanoscale.* 2010. Vol. 2, № 11. P. 2346–2357.
 97. Filobelo L.F. et al. Spinodal for the solution-to-crystal phase transformation Spinodal for the solution-to-crystal phase transformation. 2009. Vol. 014904, № 2005.
 98. Galkin O., Vekilov P.G. Control of protein crystal nucleation around the metastable liquid – liquid phase boundary. 2000. Vol. 97, № 12. P. 6277–6281.
 99. 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.
 100. Vekilov P.G. Nucleation // *Cryst. Growth Des.* 2010. Vol. 10, № 12. P. 5007–5019.
 101. Schubert R. et al. Real-Time Observation of Protein Dense Liquid Cluster Evolution during Nucleation in Protein Crystallization // *Cryst. Growth Des.* 2017. Vol. 17, № 3. P. 954–958.
 102. Gliko O. et al. Metastable liquid clusters in super- and undersaturated protein solutions // *J. Phys. Chem. B.* 2007. Vol. 111, № 12. P. 3106–3114.
 103. Battye T.G.G. et al. iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2011. Vol. 67, № 4. P. 271–281.
 104. McCoy A.J. et al. Phaser crystallographic software // *J. Appl. Crystallogr.* International Union of Crystallography, 2007. Vol. 40, № 4. P. 658–674.

105. Pernot P. et al. Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution // *J. Synchrotron Radiat. International Union of Crystallography*, 2013. Vol. 20, № 4. P. 660–664.
106. Martel A. et al. An integrated high-throughput data acquisition system for biological solution X-ray scattering studies // *J. Synchrotron Radiat. International Union of Crystallography*, 2012. Vol. 19, № 3. P. 431–434.
107. Kuklin A.I., Islamov A.K., Gordeliy V.I. Scientific Reviews: Two-Detector System for Small-Angle Neutron Scattering Instrument // *Neutron News*. 2005. Vol. 16, № 3. P. 16–18.
108. Brennich M.E. et al. Online data analysis at the ESRF bioSAXS beamline, BM29 // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2016. Vol. 49, № 1. P. 203–212.
109. Konarev P.V. et al. ATSAS 2.1, a program package for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr.* 2006. Vol. 39, № 2. P. 277–286.
110. Petoukhov M.V. et al. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2012. Vol. 45, № 2. P. 342–350.
111. Franke D. et al. ATSAS 2.8 : a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, 2017. Vol. 50, № 4. P. 1212–1225.
112. Svergun D.I. et al. 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. Vol. 113, № 4. P. 1651–1665.
113. Percus J.K., Yevick G.J. Analysis of Classical Statistical Mechanics by Means of Collective Coordinates // *Phys. Rev.* 1958. Vol. 110, № 1. P. 1–13.
114. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL - A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates // *J. Appl.*

- Crystallogr. 1995. Vol. 28, № 6. P. 768–773.
115. Emsley P. et al. Features and development of Coot // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography, 2010. Vol. 66, № 4. P. 486–501.
116. Schrodinger L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. 2015.
117. Murshudov G.N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2011. Vol. 67, № Pt 4. P. 355–367.
118. Gripon C. et al. Lysozyme solubility in H₂O and D₂O solutions: a simple relationship // J. Cryst. Growth. 1997. Vol. 177, № 3–4. P. 238–247.
119. Goryunov A.S. H/D isotope effects on protein hydration and interaction in solution // Gen. Physiol. Biophys. 2006. Vol. 25, № 3. P. 303–311.
120. Kresheck G.C., Schneider H., Scheraga H.A. The Effect of D₂O on the Thermal Stability of Proteins. Thermodynamic Parameters for the Transfer of Model Compounds from H₂O to D₂O // J. Phys. Chem. 2006. Vol. 69, № 9. P. 3132–3144.
121. Кордонская Ю.В. и др. Исследование начальной стадии процесса кристаллизации белка лизоцима методом молекулярной динамики // Сборник научных трудов. Современные проблемы физики и технологий. VIII-я Международная молодежная научная школа-конференция. 2019. P. 120–121.
122. Кордонская Ю.В. et al. Исследование поведения олигомеров белка лизоцима в растворах методом молекулярной динамики // Кристаллография. 2018. Vol. 6, № 63. P. 902–905.