

УДК 535.4; 537.531; 539.26

на правах рукописи

Дьякова Юлия Алексеевна

**САМООРГАНИЗАЦИЯ БЕЛКОВЫХ МОЛЕКУЛ ПРИ  
ФОРМИРОВАНИИ КРИСТАЛЛОВ И ПЛЕНОК**

Специальность 01.04.18 – «Кристаллография, физика кристаллов»

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Москва 2021

**Работа выполнена в НИЦ «Курчатовский институт» и ФНИЦ  
«Кристаллография и фотоника» РАН.**

**Научный консультант:**

**Ковальчук Михаил Валентинович**, член-корреспондент РАН, доктор физико-математических наук, профессор, президент НИЦ «Курчатовский институт», руководитель научного направления ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН.

**Официальные оппоненты:**

**Авдеев Михаил Васильевич**, доктор физико-математических наук, начальник сектора нейтронной оптики Лаборатории нейтронной физики им. И.М. Франка Объединенного института ядерных исследований;

**Макаров Александр Александрович**, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, директор Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН;

**Суворов Эрнест Витальевич**, доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории структурных исследований Института физики твердого тела РАН.

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии „Вектор“» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г. в \_\_\_ ч. \_\_\_ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по адресу 119333, г. Москва, Ленинский пр. 59, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ([www.kif.ras.ru](http://www.kif.ras.ru)) ИК РАН.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета Д 002.114.01  
кандидат физико-математических наук

К.В. Фролов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

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

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

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

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

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

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

Основным «узким» *местом определения структуры белков* методом РСА остается *поиск условий кристаллизации*, необходимый даже для получения нанокристаллов, который сегодня производится методом проб и ошибок. При этом для оценки результата – образования кристалла – может потребоваться от нескольких часов до нескольких месяцев.

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

Такие подходы и методы должны обеспечить *определение с высоким пространственным разрешением структуры* не только кристаллов, но и *слабоупорядоченных систем, включая растворы.*

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

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

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

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

1. Экспериментальная верификация **гипотезы о том, что в процессе кристаллизации формируется промежуточная фаза** из специфических 3D-фрагментов структуры кристалла белка в кристаллизационном растворе;

2. Разработка подходов, **выбор и адаптация экспериментальных и вычислительных методов** для изучения самоорганизации белковых молекул в упорядоченные системы, включая разработку методик и измерительных ячеек для обеспечения исследования структуры и динамики растворов, пленок и кристаллов с применением синхротронных и нейтронных методов, а также вычислительного эксперимента по моделированию взаимодействия белковых молекул;

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

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

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

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

#### **Научная новизна работы:**

В работе впервые:

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

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

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

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

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

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

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

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

- **новый подход к анализу данных** по исследованию промежуточной фазы кристаллизации методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения (МУРР) и нейтронов (МУРН), основанный на использовании

моделей олигомеров – элементов кристалла для обработки экспериментальных кривых рассеяния;

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

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

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

### **Практическая значимость работы**

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

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



*Предложенный в работе метод ускоренного подбора условий кристаллизации и полученные результаты, составляют основу для формирования технологических процессов дизайна и создания новых лекарственных средств, а также ферментов и других макромолекул для сельского хозяйства, промышленной биотехнологии, создания новых материалов.*

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

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

#### **Личный вклад диссертанта**

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

Автор непосредственно принимала участие в разработке и изготовлении всех элементов измерительного комплекса, включая создание специальных измерительных ячеек и разработку экспериментальных методик, изготовлении всех изученных образцов – растворов, кристаллов, пленок, а также при их исследовании оптическими методами и методом атомно-силовой микроскопии; в проведении рентгеновских экспериментов в лабораторных условиях и на источниках нейтронов и синхротронного излучения методами малоуглового рассеяния, рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн, рентгеноструктурного анализа, в обработке полученных данных; в работах по моделированию

молекул, их комплексов, а также проведении численных экспериментов методом молекулярной динамики.

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

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

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

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

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

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

олигомеров в кристаллизационном растворе с учетом образования их связи с ионами указанных осадителей;

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

**6. Образование в кристаллизационном растворе лизоцима новой фазы, состоящей из мономеров, димеров и октамеров лизоцима, включающих ионы осадителя, связанные с молекулами белка определенным образом, подтвержденное результатами исследования структуры растворов лизоцима методами МУРР и МУРН, определения структуры кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии (включая позиции ионов осадителя в кристалле), а также численного моделирования и исследования структуры ленгмюровских пленок, сформированных из кристаллизационных растворов, методом СРВ в ПВО.**

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены в виде приглашенных, устных и стендовых докладов на международных и российских научных конференциях. Основные мероприятия, на которых представлялись результаты работы: Совещание пользователей Курчатовского комплекса синхротронно-нейтронных исследований (20 – 23 ноября 2017, Москва, Россия); 24th Congress & General Assembly of the International Union of Crystallography (21 – 27 августа 2017, Хайдарабад, Индия); 30th Meeting of the European Crystallographic Association (28 августа – 1 сентября 2016, Базель, Швейцария); Первый Российский кристаллографический конгресс (21 – 26 ноября 2016, Москва, Россия); VIII Международная конференция «Фотоника и информационная оптика» (23 – 25 января 2019, Москва,

Россия); International conference and satellite school «Biomembranes 2018» (1 – 5 октября 2018, Долгопрудный, Россия); 14th Biennial Conference of High-Resolution X-ray Diffraction and Imaging (ХТОР-2018) (3 – 7 сентября 2018, Бари, Италия); VII Международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий» (16 – 21 апреля 2018, Москва, Россия); V международная молодёжная летняя школа RACIRI-2017 (19 – 26 августа 2017, Роннебю, Швеция); ECS4 - 4th European Crystallography School (2 – 7 июля 2017, Варшава, Польша); International Conference on Electron, Positron, Neutron and X-Ray Scattering under the External Influences (16 – 22 октября 2017, Ереван, Армения); Семинар BioSoft: The future of biology and soft matter research on reactor PIK (14 – 16 мая 2017, Петергоф, Россия); IV международная молодёжная летняя школа RACIRI-2016 (21 – 28 августа 2016, Репино, Санкт-Петербург, Россия); Восьмой международный научный семинар и шестая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики» (22 июня – 2 июля 2016, Великий Новгород, Россия); XIII Курчатовская молодежная научная школа (27 – 30 октября 2015, Москва, Россия); Седьмой международный научный семинар и пятая международная молодежная научная школа-семинар «Современные методы анализа дифракционных данных и актуальные проблемы рентгеновской оптики» (24 – 30 августа 2015, Великий Новгород, Россия); Международная летняя школа для молодых ученых «Исследования материалов с высоким разрешением: основы и приложения» (RACIRI-2015) (22 – 28 августа 2015, Зеллин, Германия); V Международная конференция «Фотоника и информационная оптика» (3 – 5 февраля 2015, Москва, Россия); Совещание российских пользователей источников синхротронного и нейтронного излучений (2 – 3 июля 2015, Москва, Россия); Совещание по использованию рассеяния нейтронов и

синхротронного излучения в конденсированных средах (27 – 31 октября 2014, Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Россия); 12th Biennial Conference on High-Resolution X-Ray Diffraction and Imaging (ХТОР 2014) (14 – 19 сентября, 2014, Гренобль и Виллар-де-Ланс, Франция); VIII международная научная конференция «Кинетика и механизм кристаллизации. Кристаллизация как форма самоорганизации вещества» (24 – 27 июня 2014, Иваново, Россия).

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

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

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

Разработка и создание методов контроля и управления механизмами самоорганизации белков в упорядоченные системы позволит уже сегодня создавать эффективные технологические процессы дизайна и ускоренной разработки терапевтических препаратов и диагностических систем, технологий для сельского хозяйства и промышленной биотехнологии, а «завтра» создать технологии использования белков как функциональных элементов природоподобных технических систем.

Работа посвящена изучению фундаментальных закономерностей взаимодействия белковых молекул, механизмов их самоорганизации при

формировании упорядоченных систем. Для изучения таких закономерностей в работе был разработан и апробирован новый подход к исследованию механизмов организации и структуры белковых систем, включая адаптацию и применение ряда синхротронных и нейтронных методов, молекулярное моделирование и создание специализированного инструментального комплекса – измерительных ячеек и оригинальных методик.

В главе 1 представлен обзор методов и подходов к исследованию структуры макромолекул с атомарным разрешением, а также работ, посвященных исследованию взаимодействия белковых молекул в растворах на начальной стадии кристаллизации.

Начало исследованиям структуры биомолекул с атомарным разрешением было положено в тридцатые годы прошлого века. Так в 1934 году была получена первая рентгенограмма белкового кристалла, пепсина (одного из протеолитических ферментов), закристаллизованного в 1929 г., а в 1958 г. были расшифрованы первые структуры глобулярных белков – миоглобина и гемоглобина.

В настоящее время наибольшее число структур белков и белковых комплексов (более 85%) решено с помощью метода рентгеноструктурного анализа (РСА). Для применения этого метода исследования структуры необходимо предварительно получить кристалл белка, причем чем более совершенным будет кристалл, тем с лучшим разрешением удастся определить структуру белковой молекулы. Белковые кристаллы получают из растворов, как правило, добавляя к раствору белка раствор осадителя, что приводит к изменению растворимости белка. Для того, чтобы получить кристалл белка, необходимо, чтобы все параметры раствора (температура, концентрация белка и осадителя, рН, состав буферного раствора) попали в достаточно узкую область значений, при которых белковые молекулы выстраиваются в упорядоченную структуру.

В Советском Союзе огромный вклад в кристаллографию вообще и разработку метода рентгеноструктурного анализа в частности внес академик Борис Константинович Вайнштейн, многие годы возглавлявший Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова АН СССР.

Школа Вайнштейна заложила прочный фундамент развития структурной биологии и оказала решающее влияние на становление рентгеноструктурного анализа биомакромолекул в нашей стране [2].

Механизмы взаимодействия и самоорганизация белковых молекул в растворах, в том числе при образовании белковых кристаллов изучались разными авторами [3]. Было показано, что добавление осадителя к раствору белка приводит к увеличению среднего радиуса частиц, сформированных из молекул белка в растворе [4, 5]. Были сделаны различные предположения о природе и возможной структуре комплексов белков, образующихся при кристаллизации, однако они не нашли однозначного экспериментального подтверждения. В большинстве представленных ранее гипотез о механизмах кристаллизации белков, основанных на предположении об образовании промежуточных белковых комплексов, допускалось, что такие комплексы формируются произвольным образом и могут содержать любое количество молекул.

Таким образом, дальнейшее продвижение в исследовании механизмов самоорганизации белков в упорядоченные системы требовало применения экспериментальных методов исследования структуры биологических молекул в нативном состоянии и в пленках с высоким разрешением.

Основа создания и развития таких методов и экспериментальной техники для исследования процессов самоорганизации биологических молекул и систем была заложена Михаилом Валентиновичем Ковальчуком. Им был выполнен цикл пионерских работ по развитию метода стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения, позволившего с субангстремной точностью исследовать тонкие

слои и пленки [6 – 8], развит подход по применению данного и других высокоразрешающих рентгеновских методов для исследования биологических пленок [9 –11]; создана уникальная экспериментальная техника, включая не имеющие аналогов экспериментальные станции на источнике синхротронного излучения [12]. Под руководством Михаила Валентиновича был введен в эксплуатацию и модернизирован единственный действующий сегодня на постсоветском пространстве специализированный источник синхротронного излучения «КИСИ-Курчатов», инфраструктура которого позволяет проводить комплексные исследования биомолекул и биосистем на современном уровне [12, 13]; а также был создан комплекс «Белковая фабрика», позволяющий наработать, выделить и очистить любой белок, провести скрининг условий его кристаллизации в автоматическом режиме [14, 15], создан суперкомпьютерный центр для анализа и обработки экспериментальных данных и молекулярного моделирования и пр.

В **главе 2** описаны методы и подходы, развитые в настоящей работе, к исследованию взаимодействия белковых молекул в растворе и в монослое, использованные в работе. Для решения поставленных в работе задач был подобран комплекс взаимодополняющих методов, позволяющий проследить переход от монодисперсного раствора белка к образованию прекурсоров будущего кристалла, а затем исследовать структуру кристалла в процессе его роста. В силу специфики работы с биологическими (природными) макромолекулами для каждого метода необходимо было подобрать такую методику и особенности техники проведения эксперимента, которые позволяли бы предотвратить денатурацию белка.

В качестве исследуемого объекта был выбран лизоцим из куриного яйца (HEWL). Его относительно небольшая молекула имеет только 129 аминокислотных остатков, при этом содержит четыре дисульфидных мостика, что делает молекулу белка довольно жесткой и удобной для



использования в качестве модели [16]. В качестве дополнительных объектов для исследования процесса кристаллизации были выбраны протеиназа К и термолизин.

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

Для уточнения механизмов взаимодействия белковых молекул в растворе проводилось моделирование возможных элементов кристалла и оценка взаимодействий молекул в кристалле на основе анализа структуры кристалла, полученного с разрешением менее 1,5 Å. Также динамика взаимодействия белковых молекул в растворе, содержащем олигомеры, исследовалась методом молекулярной динамики.

*Исследования растворов белков методами малоуглового рассеяния рентгеновского, синхротронного излучений и нейтронов* проводили с использованием разных источников: лабораторного источника АМУР-К (ИК РАН, Москва), синхротронных станций ДИКСИ и БиоМУР (НИЦ «Курчатовский институт», Москва), синхротронной станции ВМ29 BioSAXS (ESRF, Гренобль, Франция), нейтронной станции ЮМО, ИБР-2 (ОИЯИ, Дубна). Проводилось исследование изменения структуры растворов белка с осадителем для разных условий. При этом для каждого эксперимента проводили регистрацию малоуглового рассеяния от раствора белка с осадителем, раствора осадителя в буфере (вычитали как фон для обработки данных), а также в качестве контроля регистрировали малоугловое рассеяние от раствора белка без осадителя. Для каждого эксперимента (за исключением исследований растворов термолизина, где процедура подготовки образца несколько отличалась) готовили базовый

раствор белка с концентрацией, в два раза превышающей концентрацию в исследуемом растворе, после чего к базовому раствору белка добавляли раствор осадителя в пропорции 1:1 (исследуемый образец) и раствор буфера также в пропорции 1:1 (контрольный образец). Для всех экспериментов базовый раствор белка центрифугировали (10 000 об./мин, 10 минут), фильтровали с помощью мембранных шприцевых фильтров Millex с размером пор 0,22 мкм. Концентрацию белка в растворах определяли спектрофотометрически по поглощению при  $\lambda = 280$  нм. Для экспериментов на каждом источнике излучения использовались свои измерительные ячейки. Для дифрактометра АМУР-К использовали тонкостенный капилляр, который с двух сторон герметично закрывался. На станциях ДИКСИ и БиоМУР растворы после смешивания загружались непосредственно в измерительные тонкостенные капилляры, которые помещались в термостатируемую ячейку.

На станции VM29 Biosaxs растворы помещались в ячейки роботизированной системы, из которых в процессе эксперимента растворы автоматически подавались в измерительный капилляр. Температура в ячейках роботизированной системы и измерительном капилляре поддерживалась постоянной, в соответствии с заданным значением. После каждого образца измерительный капилляр промывался детергентом и буферным раствором.

Для проведения исследований на источнике нейтронов – станции ЮМО, образцы помещались в тонкие кюветы объемом около 0,5 мл, температура которых поддерживалась постоянной, а сам эксперимент продолжался 30 часов.

Для оптимизации расхода белка была разработана микрофлюидная ячейка, измерения в которой были проведены на станции БиоМУР.

Обработка данных малоуглового рассеяния проводилась программами POLYMIX и OLIGOMER. Программа POLYMIX, являющаяся

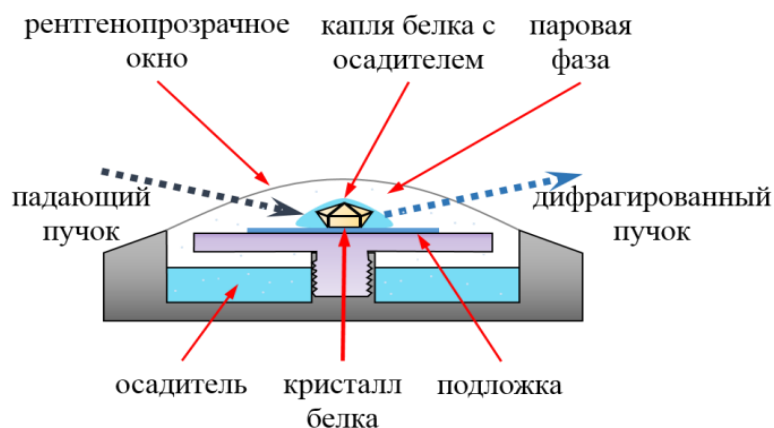
усовершенствованной версией программы MIXTURE, позволяет оценить средний размер частиц, присутствующих в растворе. Более детальный анализ состава кристаллизационных растворов проводился программой OLIGOMER, которая позволила определить олигомерный состав раствора белка (как порядок, так и их количество). [17]

Анализ структуры белковых кристаллов проводился рентгенодифракционными методами: расшифровка структуры методом рентгеноструктурного анализа; оценка степени совершенства белкового кристалла в процессе его роста методом *in situ* высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии. Образование кристаллов и кристаллографическую ориентацию граней наблюдали под микроскопом.

*Анализ упорядоченной структуры белковых молекул в кристалле и в монослое.* Структура полученных кристаллов определялась с помощью метода рентгеноструктурного анализа. Дифракционный набор от кристалла собирали при температуре 100 К на станции "Белок" (НИЦ «Курчатовский институт», Москва. В качестве детектора использовалось ПЗС-устройство Rayonix SX156. Дифракционные данные были получены с использованием монокристалла путем вращения. Длина волны составляла 0,8 Å, диапазон колебаний составлял 1°, а угол поворота составлял 180°. Обработка наборов экспериментальных интенсивностей проводилась с использованием программного обеспечения iMosflm [18]. Структуры были определены методом молекулярного замещения с использованием программного обеспечения PHASER [19] и структуры HEWL (PDB ID 4WLD) в качестве исходной модели. Атомные модели были уточнены с использованием программы REFMAC [20].

Так как на воздухе из-за потери воды, содержание которой в кристалле белка может достигать 70 %, белковые кристаллы быстро разрушаются, то для проведения исследований степени их совершенства *in situ* в процессе роста с помощью рентгеновских методов, в том числе с

помощью высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии, была разработана и создана специальная кристаллизационная измерительная ячейка (рис. 1).



*Рисунок 1. Специальная кристаллизационная измерительная ячейка.*

В данной ячейке проводили рост кристаллов методом "сидячей капли", контролировали процесс образования кристаллов с помощью оптической микроскопии. Ячейка была закрыта рентгенопрозрачной пленкой (майлар), что позволило проводить рентгенодифракционный анализ качества, степени структурного совершенства кристаллов в процессе роста и в зависимости от внешних условий.

В разработанной ячейке проводились исследования белковых пленок методом рентгеновской рефлектометрии, что позволило контролировать параметры (в том числе толщины и плотности) белковых пленок в процессе их высыхания, изменения структуры во времени.

Формирование планарных белковых систем из кристаллизационных растворов с добавлением осадителя осуществлялось с использованием ленгмюровской технологии. Для переноса белковых пленок на твердые подложки (монокристалл Si, предметные стекла с различными покрытиями) применялся метод Ленгмюра-Шеффера. Структура полученных монослоев контролировалась посредством измерения поверхностного давления пленки (монослоя) в зависимости от площади,

приходящейся на одну молекулу (изотерма сжатия). Полученные монослои переносили на кремниевые и стеклянные подложки, после чего сформированные пленки исследовали методами атомно-силовой микроскопии, рентгеновской рефлектометрии, стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения (СРВ в ПВО). Исследования монослоев лизоцима проводились методом СРВ в ПВО как на поверхности жидкости, в процессе их формирования, так и после переноса на твердую подложку.

*Метод рентгеновской рефлектометрии* наиболее широко используется для исследования качества поверхности и определения параметров планарных периодических и аperiodических наносистем (шероховатостей, толщин, плотностей), в том числе органических пленок [21, 22], многослойных систем на их основе и монослоев на поверхности жидкости [23]. Рефлектометрический эксперимент основан на регистрации зависимости интенсивности зеркальной компоненты рентгеновского отражения от угла скользющего падения ( $\theta$ ) излучения на поверхность пленки. Форма угловой зависимости рентгеновского отражения дает информацию о распределении электронной плотности по глубине, определяющей картину волнового поля [24, 25].

По полученным экспериментальным угловым зависимостям отражения рентгеновского пучка от поверхности образцов (слоев белковых молекул, перенесенных на кремниевые подложки) можно восстановить профиль распределения электронной плотности. Алгоритм восстановления заключался в представлении системы пленка-подложка в виде слоистой модели, характеризующейся ступенчатым профилем электронной плотности. Параметры слоев исходной модели уточнялись путем минимизации расхождения между расчетными и экспериментальными данными.

Для исследования взаимодействия полученных белковых пленок с ионами осадителя использовался метод СРВ в ПВО [26, 27]. В основе метода лежит одновременная регистрация рентгеновской рефлектометрии и выхода рентгеновской флуоресценции от различных атомов, входящих в состав образца. При этом угловая зависимость выхода рентгеновской флуоресценции от атомов определенного сорта определяется как профилем распределения данного элемента по глубине, так и распределением интенсивности СРВ [28]. Анализ получаемых угловых зависимостей выхода флуоресценции в области ПВО позволяет определять местоположение атомов – источников вторичного излучения относительно границы раздела. Применение данного метода в работе позволило определить распределение атомов химических элементов по толщине пленки – анализ распределения ионов (К, Cl, Cu, Ni и т.д.) и молекул белка (S). Исследования проводились как на лабораторном источнике, так и на синхротронной станции РКФМ (НИЦ «Курчатовский институт», Москва).

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

Для повышения точности исследований была разработана и создана специализированная измерительная ячейка проточного типа, позволяющая реализовать исследования систем, содержащих белки (кристаллы, ленгмюровские пленки) в условиях гелиевой атмосферы методами СРВ в ПВО, рентгенофлуоресцентного анализа и др. (рис. 2). Применение данной ячейки обеспечило уменьшение фона флуоресцентного излучения от воздуха, позволило исключить из флуоресцентного спектра линию Ar, перекрывающую сигналы от ряда элементов – К, Cl, S и т.д.

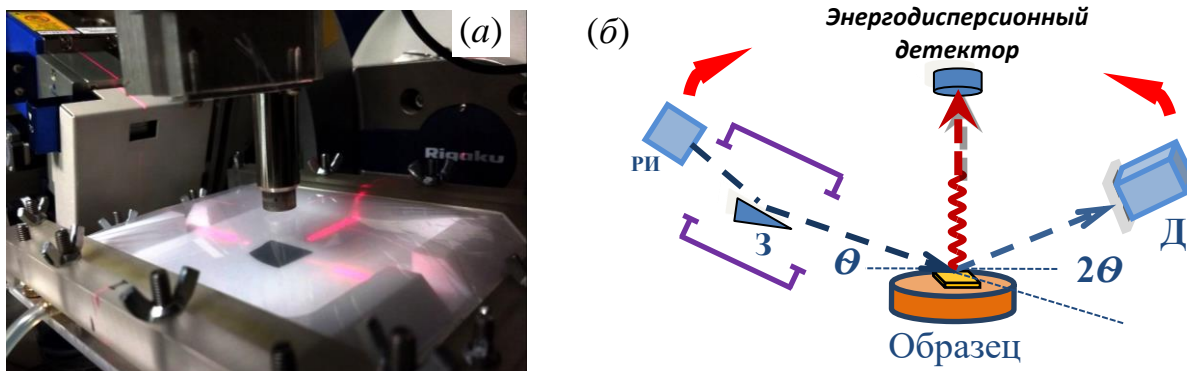


Рисунок 2. а) Специализированная ячейка для исследований белковых структур методом СРВ в ПВО, б) Рентгенооптическая схема проведения эксперимента по исследованию белковых пленок методом СРВ в ПВО.

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

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

В **главе 3** описаны результаты определения структуры растворов в условиях кристаллизации на примере белка лизоцима и механизмы влияния термодинамических параметров на процесс кристаллизации. Исследовано влияние температуры, концентрации белка, концентрации осадителя и растворителя на количество октамеров и димеров, образующихся в растворе перед началом кристаллизации. Установление взаимосвязи между олигомерным составом кристаллизационного раствора

и образованием кристалла позволило разработать технологический процесс ускоренного подбора условий кристаллизации.

Было сделано предположение, что еще до начала образования зародышей кристалла в растворе белка при создании условий кристаллизации образуются олигомеры, являющиеся составными элементами кристаллической структуры, из которых впоследствии образуется кристалл. Эмпирическая проверка данного предположения проведена на примере изучения процесса образования кристалла лизоцима тетрагональной сингонии.

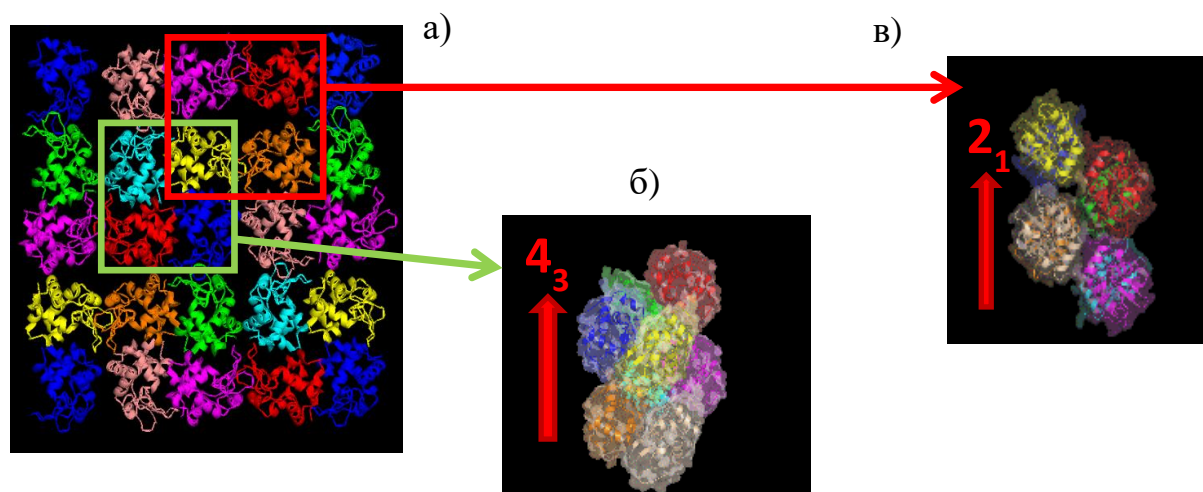
Были выбраны условия (концентрация белка 40 мг/мл, осадитель – NaCl с концентрацией 25 мг/мл, температура 20 °C), при которых стабильно получали достаточно крупные и совершенные кристаллы лизоцима тетрагональной сингонии ( $P4_32_12$   $a = b = 79,20 \text{ \AA}$ ,  $c = 37,90 \text{ \AA}$ ,  $\alpha = \beta = \gamma = 90,00^\circ$ ). Предварительный анализ данных МУРР от растворов лизоцима с добавлением осадителя, показал, что в условиях кристаллизации в растворе помимо мономеров образуются также частицы, объем которых приблизительно в 8 раз превышает объем одной молекулы.

На основе анализа структуры кристалла были предложены модели различных олигомеров, являющихся элементарными мотивами кристаллической решетки (рис. 3).

Использование таких моделей для обработки экспериментальных данных МУРР позволило качественно и количественно определить состав полидисперсного раствора. Результаты показали, что при добавлении осадителя в растворе белка перед началом кристаллизации образуются димеры и октамеры, при этом других олигомеров не образуется. Аналогичные исследования были проведены с применением комплементарного метода МУРН, а также на различных синхротронных станциях МУРР. Результаты всех проведенных экспериментов оказались



сходны – в растворе белка с осадителем помимо мономеров наблюдалось образование димеров и около 3 – 4 % октамеров (Табл. 1).



*Рисунок 3. Построение двух типов октамеров на основе структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии. а) проекция кристаллической решётки перпендикулярно оси четвертого порядка б) октамер типа А (обладающий минимальным объемом) – стабильный, в) октамер типа Б (имеет больший объем) – нестабильный.*


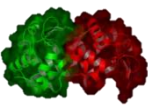
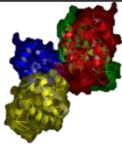
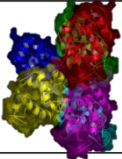
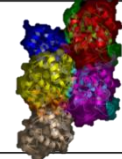
Несколько отличаются результаты исследований растворов лизоцима методом МУРН (количество октамеров, обнаруженных в растворе, превышает 9 %), что связано с тем, что при проведении данных исследований белок растворяли в тяжелой (дейтерированной, D<sub>2</sub>O) воде, которая оказывает существенное влияние на процесс и условия кристаллизации.

Показано, что количество октамеров растет при понижении температуры и повышении концентрации белка. При этом октамеры в растворе сохраняются после образования кристаллов, непосредственно в процессе их роста, но их количество уменьшается по мере уменьшения концентрации лизоцима, находящегося в растворенном состоянии. Исследовано изменение состава раствора лизоцима в D<sub>2</sub>O в условиях кристаллизации методом МУРР. Методом МУРР показано, что при замене растворителя – обычной воды (H<sub>2</sub>O) на D<sub>2</sub>O – на начальной стадии

кристаллизации лизоцима в условиях роста кристалла так же, как и в случае растворителя  $H_2O$ , образуются димеры и октамеры, причем количество октамеров растет при повышении концентрации белка и понижении температуры (рис. 4). Замена растворителя приводит к увеличению процентного содержания октамеров в растворе при прочих равных условиях.

Проведено исследование термодинамических параметров раствора белка лизоцима в условиях кристаллизации как в обычной, так и в тяжелой воде (рис. 4).

*Таблица 1. Олигомерный состав растворов лизоцима с добавлением осадителя, определенный методами МУРР, МУРН на различных экспериментальных установках.*

	<b>мономер</b>	<b>димер</b>	<b>тетрамер</b>	<b>гексамер</b>	<b>октамер</b>
					
ИК РАН (АМУР-К)	96,2	<b>1,9</b>	0,0	0,0	<b>2,9</b>
ККСНИ (ДИКСИ)	95,2	<b>1,0</b>	0,0	0,0	<b>3,8</b>
ESRF (BIOSAXS)	90,6	<b>6,3</b>	0,0	0,0	<b>3,1</b>
ИБР-2* (YuMO)	88,8	<b>1,4</b>	0,0	0,0	<b>9,6*</b>

Из кристаллической решетки лизоцима тетрагональной сингонии выделить октамеры можно различными способами. Использование разных моделей октамеров для обработки данных малоуглового рассеяния приводило к результатам, которые совпадали в пределах ошибки.

Для определения типа октамера, который образуется в растворе, а также объяснения того факта, что в растворе не наблюдается других олигомеров, были проведены исследования устойчивости различных олигомеров в использованных условиях методом молекулярной динамики.

На траектории 100 нс в присутствии и в отсутствие осадителя промоделировано поведение октамеров двух типов (рис. 3), которые путем трансляции образуют кристаллическую решетку кристалла лизоцима тетрагональной сингонии.

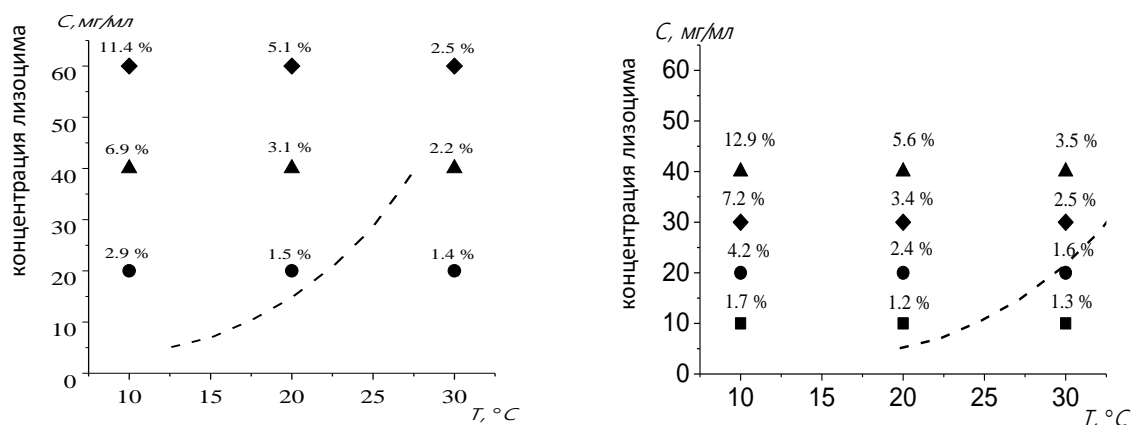


Рисунок 4. а) Количество октамеров, образующихся при разной температуре и концентрации белка в H<sub>2</sub>O, б) Количество октамеров, образующихся при разной температуре и концентрации белка в D<sub>2</sub>O.

Показано, что в присутствии осадителя стабилен октамер типа А (рис. 3б), в то время как октамер типа Б (рис. 3в) диссоциирует как в присутствии, так и в отсутствие осадителя. Также промоделировано поведение тетрамеров, гексамеров и димеров различного типа. Показано, что даже в присутствии осадителя тетрамеры и гексамеры различных типов диссоциируют на составляющие, а димеры устойчивы.

В **главе 4** представлены результаты исследования роли ионов осадителя в механизме кристаллизации белка по результатам исследований структуры растворов, кристаллов лизоцима и моделирования молекулярной динамики.

Исследовано влияние ионного состава осадителя на образование олигомеров разного типа. Показано, что замена аниона приводит к изменению сингонии кристалла лизоцима. Исследовано влияние типа катиона и концентрации осадителя в ряду хлоридов (NaCl, KCl, LiCl, NiCl<sub>2</sub>,

$\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ) на объемную долю олигомеров (димеров, октамеров), образующихся перед началом кристаллизации белка. Объемные доли димеров и октамеров возрастают с увеличением концентрации осадителя и понижением температуры (рис. 5). В ряду одновалентных ионов объемная доля октамеров увеличивается в порядке:  $\text{K}^+ - \text{Na}^+ - \text{Li}^+$ , а для двухвалентных:  $\text{Cu}^{2+} - \text{Ni}^{2+} - \text{Co}^{2+}$ , что соответствует ряду Гофмейстера увеличения энергии гидратации.

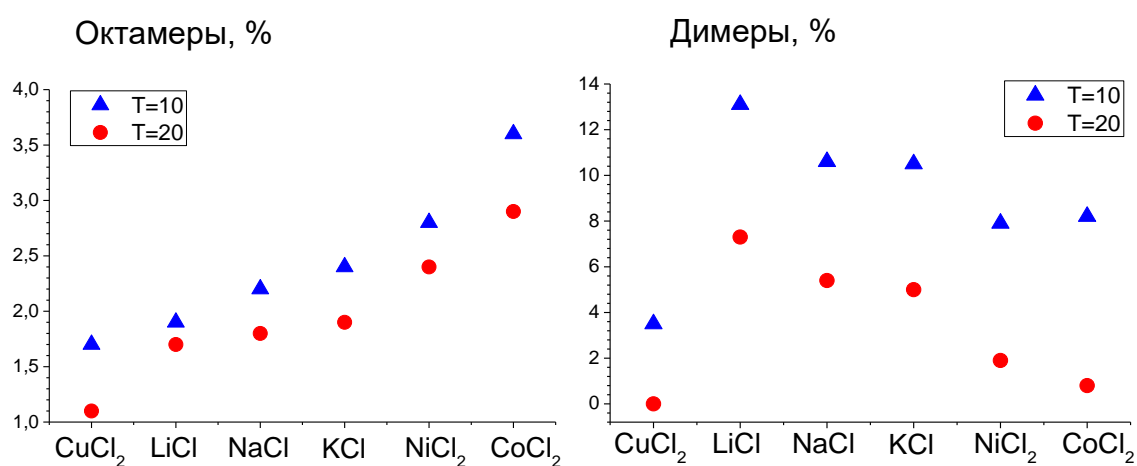
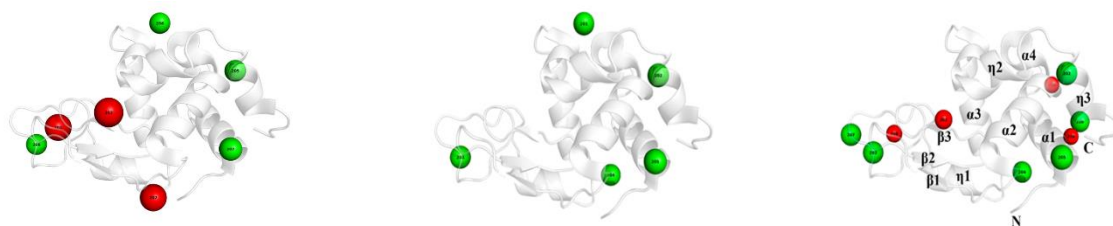


Рисунок 5. Количество октамеров (а) и димеров (б), образующихся в растворе при добавлении к раствору лизоцима в качестве осадителя хлоридов различных металлов.

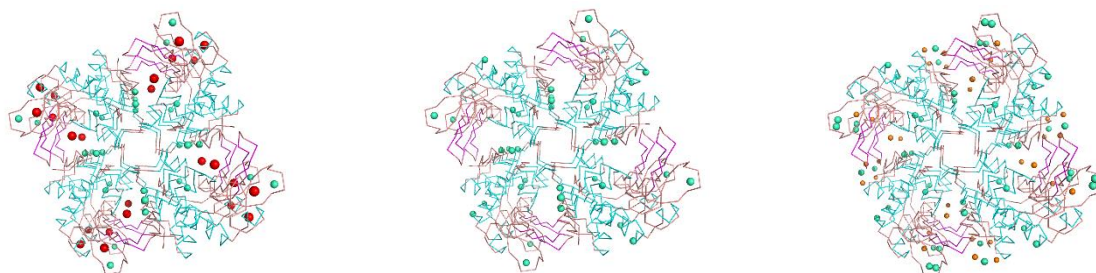
На основе структурных данных, полученных с высоким разрешением, были проанализированы связи между молекулами лизоцима в кристалле и ионами хлоридов – осадителей ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ). Ионы металлов и хлора можно разделить на три группы: 1 – связанные непосредственно с молекулой белка; 2 – связанные с молекулами белка в прекурсоре кристалла (димере и октамере); 3 – расположенные на границе октамеров в кристалле.

Было показано, что кристаллы, выращенные с различными осадителями, различаются по количеству связанных ионов металла и хлора (рис. 6, табл. 2).

## МОНОМЕРЫ:



## ОКТАМЕРЫ



## Осадитель: NaCl

## KCl

## CuCl<sub>2</sub>

Рисунок 6. Локализация ионов осадителя в кристалле лизоцима (верхний ряд – молекулы, нижний – октамеры): зеленый – ион хлора, красный – ион металла. С осадителем KCl – ион калия в структуре не обнаружен.

Таблица 2 Количество ионов хлора и металла в мономере в кристаллах лизоцима, полученных с разными осадителями.

Осадитель	CuCl <sub>2</sub>	NiCl <sub>2</sub>	NaCl	KCl	LiCl
PDB ID	6QWW	6QWX	6QWY	6QWZ	6QX0
Количество анионов (ионов Cl <sup>-</sup> )	6	4	4	5	3
Количество катионов (ионов металла)	4	2	3	-	-

Для всех осадителей было показано, что:

- ионы группы 1 обеспечивают распределение поверхностного заряда, приводящее к упорядоченной ассоциации молекул и образованию прекурсоров кристалла – октамеров, влияют на равновесную концентрацию октамеров в кристаллизационных растворах и обеспечивают дальнейший рост кристаллов;

- ионы хлора и металла группы 2 вносят вклад в конформационную стабильность октамера, посредством взаимодействия с аминокислотными остатками, принадлежащими удаленным сегментам полипептидной цепи;

- ионы группы 3 способны различным образом влиять на связывание октамеров между собой. Так для ионов Cu, расположенных на границе октамера, обнаружены особенности, которые оказывают влияние на равновесную концентрацию октамеров. Ионы Cu образуют регулярную пространственную сетку в кристалле белка и потенциально способны влиять на физические свойства кристалла белка.

С целью уточнения влияния ионов осадителя, связанных с молекулами белка в кристалле было проведено моделирование динамики различных олигомеров – элементов кристалла при условиях, для которых механизм кристаллизации изучался методами МУРР и МУРН (Глава 3).

Из кристаллической структуры лизоцима тетрагональной сингонии (PDB ID: 6QWY) были выделены молекулярные модели возможных единиц роста кристаллов лизоцима. В структуре олигомеров были оставлены ионы осадителя, связанные с лизоцимом (на одну молекулу белка приходится 3 иона натрия и 4 иона хлора), и удалена кристаллическая вода.

Из сравнения результатов, полученных для моделей олигомеров с ионами натрия и хлора, связанными с белком в кристалле, только с ионами натрия, связанными с белком, а также без связанных с белком ионов, следует, что модели олигомеров, учитывающие связанные с белковым кристаллом ионы натрия и хлора, намного лучше согласуются с экспериментальными результатами исследования раствора методом МУРР. Показано, что ионы натрия и хлора, связанные с белком в кристалле, играют важную роль в формировании кристалла лизоцима тетрагональной сингонии, а также вносят вклад в обеспечение стабильности основной «единицы роста» - октамера типа А.

В **главе 5** приведены результаты исследования процесса формирования ленгмюровских пленок на основе растворов лизоцима в условиях кристаллизации. Исследование такой модельной системы позволило

уточнить степень стабильности промежуточной фазы кристаллизации и роль ионов осадителя в образовании такой фазы. Было сделано предположение, что если для формирования ленгмюровских монослоев на поверхности жидкости использовать растворы белка с добавлением осадителя, то в процессе формирования монослоя будут принимать участие октамеры, что окажет влияние на структуру полученных пленок. Данное предположение было экспериментально подтверждено – методами АСМ и рентгеновской рефлектометрии показано, что при формировании ленгмюровского монослоя из раствора белка лизоцима с добавлением осадителя на подложке образуется сплошная однородная пленка, толщиной около 6 нм, что соответствует диаметру октамера.

Методом СРВ в ПВО исследовали расположение ионов осадителя в полученных пленках (рис. 7).

Было показано, что при использовании для формирования ленгмюровского монослоя раствора лизоцима с добавлением КСl, при переносе монослоя на подложку также образуется пленка, толщина которой соответствует диаметру октамера, при этом на поверхности раздела пленка/воздух формируется тонкий слой ионов калия и хлора (рис. 7а).

Исследования процесса формирования ленгмюровского монослоя на поверхности субфазы непосредственно в ленгмюровской ванне методом СРВ в области ПВО показало, что уже на поверхности субфазы формируется монослой толщиной в две молекулы, что соответствует тому, что в формировании монослоя принимают участие октамеры лизоцима. Показано, что под монослоем образуется тонкий слой ионов хлора и калия (рис. 7б).

Для пленок, сформированных из растворов лизоцима с добавлением КI (условия образования кристаллов моноклинной сингонии) показано, что толщина полученной пленки белка составляет около 3 нм, а электронная

плотность в 4 раза превышает плотность, рассчитанную для пленки, сформированной из раствора чистого белка, при этом ионы осадителя формируют над поверхностью пленки тонкие слои, образуя многослойную структуру.

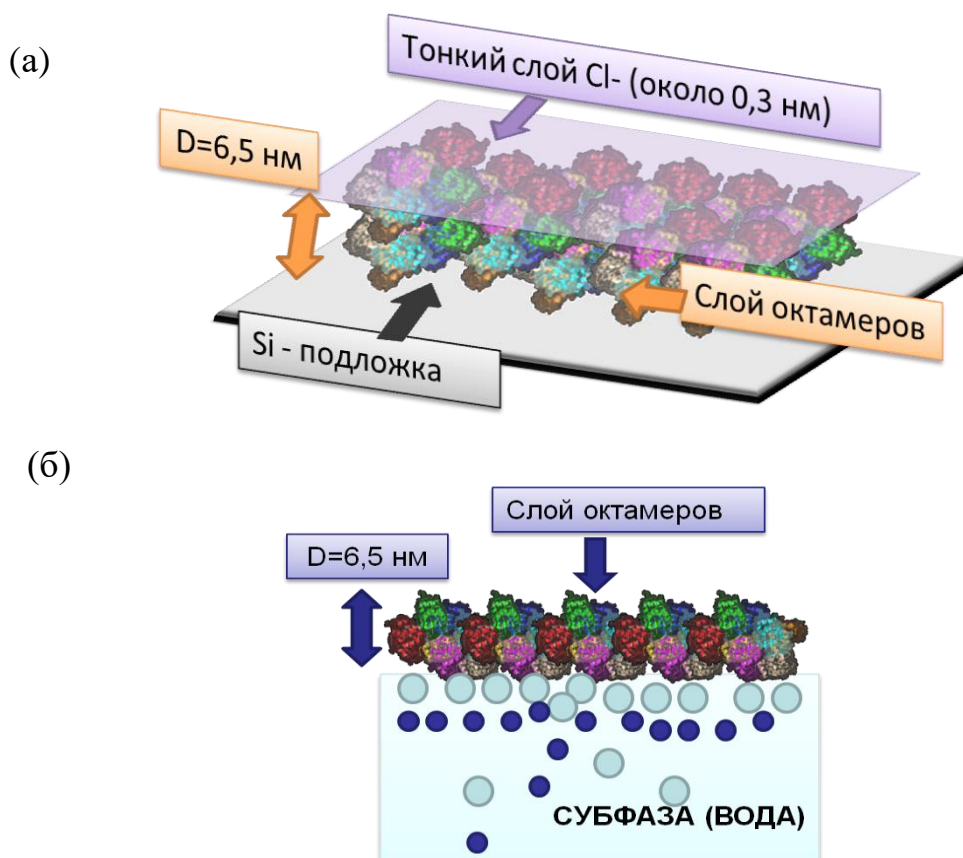
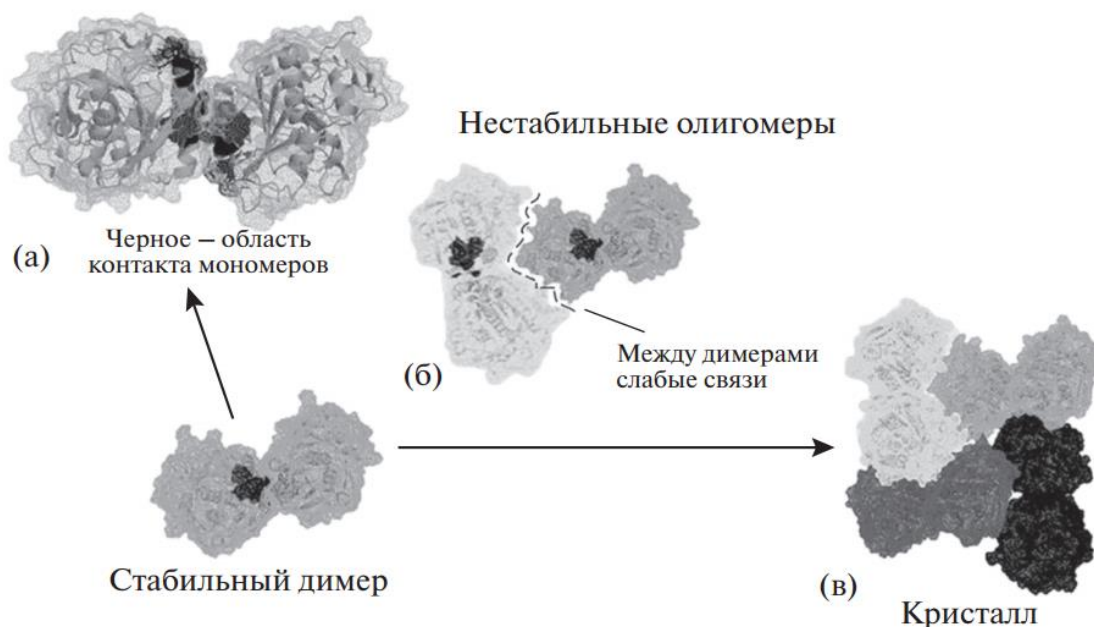


Рисунок 7. Модели пленок, сформированных из растворов лизоцима с добавлением осадителя KCl, структура которых подтверждена методами СРВ в ПВО и рентгеновской рефлектометрии. а) пленка на подложке, б) монослой на поверхности водной субфазы.

В **главе 6** представлены результаты верификации предположения о том, что механизм кристаллизации водорастворимых белков включает формирование промежуточной фазы – образование олигомеров – «единиц роста» будущего кристалла посредством изучения начальной стадии кристаллизации белков протеиназы К и термолизина. Показано, что при добавлении к раствору протеиназы К сульфата аммония или нитрата натрия в качестве осадителей в растворе образуется существенная доля

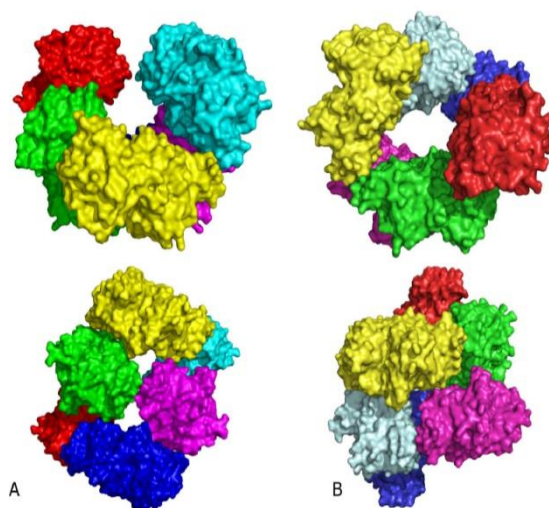


димеров белка, причем содержание димеров в растворе слабо возрастает с уменьшением температуры. Образование димеров обусловлено тем, что в кристалле именно между димерами наблюдаются наиболее сильные связи, а сами димеры связаны друг с другом слабее (рис. 8).



*Рисунок 8. Структура димера (а) и относительное положение димеров в кристаллической решетке протеиназы К (в). Черным цветом выделена область с наибольшим количеством водородных связей между двумя молекулами белка. Связи между димерами в нестабильных олигомерах (тетрамер, гексамер, октамер) существенно слабее, чем между молекулами в самом димере (б).*

В растворе термолизина при добавлении осадителя  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  на начальной стадии кристаллизации в растворе обнаружено формирование димеров и гексамеров. При этом количество гексамеров растет при понижении температуры и повышении концентрации осадителя. Кристалл термолизина имеет гексагональную сингонию. Анализ связей между отдельными молекулами в кристалле показал, что наиболее вероятным прекурсором для образования кристалла могут являться димеры и один из двух гексамеров, представленных на рис. 9.



*Рисунок 9. Возможные типы гексамеров, смоделированные на основе анализа кристаллической решетки термолизина.*

Таким образом, результаты исследования механизмов кристаллизации протеиназы К и термолизина еще раз подтвердили, что образование олигомеров в растворе на начальной стадии кристаллизации, обусловлено определенным для каждого белка и осадителя взаимодействием между молекулами белка и ионами, обеспечивающим формирование прекурсоров определенного типа и дальнейшую «сборку» из них кристалла.

Образование в растворе белка прекурсоров – олигомеров определенного типа, являющихся элементами будущего кристалла, представляет собой дополнительную промежуточную фазу между беспорядком молекул белка в растворе и упорядоченным кристаллом. Взаимодействия между отдельными молекулами белка, которые возникают при добавлении осадителя приводят к образованию таких прекурсоров, процентное содержание которых в свою очередь зависит от условий и взаимосвязано с условиями, способствующими росту кристалла.

### **Выводы и основные результаты работы.**

**1. Разработан и апробирован подход к многомасштабному исследованию механизмов организации и структуры белковых систем,**

основанный на применении синхротронных и нейтронных методов и молекулярного моделирования. **Разработаны и изготовлены специализированные измерительные ячейки**, позволяющие проводить *in situ* исследования процессов формирования белковых кристаллов и пленок методами рентгеновской рефлектометрии, дифрактометрии, а также методом стоячих рентгеновских волн в области полного внешнего отражения в условиях гелиевой атмосферы, специальная микрофлюидная ячейка для проведения исследований методами малоуглового рассеяния. **Создан измерительный комплекс для исследования белковых систем в нативном состоянии, включающий четыре измерительные ячейки.**

2. **Взаимодополняющими методами малоуглового рассеяния рентгеновских лучей и нейтронов и дифракционными методами в серии экспериментов, выполненных на различных установках (дифрактометр АМУР-К, источники синхротронного излучения КИСИ-Курчатов (ДИКСИ, БиоМУР, РСА, «Белок») и ESRF (BM29 BioSAXS, ID23-1), источник нейтронов ИБР 2 (ЮМО)), установлено, что растворы лизоцима в условиях образования кристаллов тетрагональной сингонии содержат только три компонента – мономеры (от 90 до 96 %), димеры (от 1 до 6 %) и октамеры (от 3 до 9 %).**

3. **Предложен подход к моделированию механизмов формирования кристаллов, основанный на проведении вычислительного эксперимента методом молекулярной динамики по определению стабильности белковых комплексов с определенной структурой, представляющих собой элемент белкового кристалла, при различных условиях. Рассчитана динамика олигомеров в растворе с осадителем и без. Показано, что в присутствии осадителя стабилен только один из исследуемых типов октамеров (содержащий ось 4-ого порядка), при этом другие типы октамеров, а также тетрамеры и гексамеры диссоциируют. В растворе без осадителя все олигомеры нестабильны.**

4. Установлено, что **концентрация октамеров в растворе лизоцима, содержащего осадитель, растет с увеличением концентрации белка и осадителя, а также с уменьшением температуры** и при замене обычной воды на тяжелую. Показано, что при добавлении хлоридов металлов к раствору лизоцима степень увеличения концентрации октамеров в растворе коррелирует с положением иона металла в лиотропном ряду.

5. На основе **анализа структуры кристаллов лизоцима, полученных при использовании в качестве осадителя хлоридов различных металлов, установлено взаимодействие ионов осадителя с молекулами белка.** Показано, что **ионы осадителя обеспечивают оптимальное распределение поверхностного заряда молекулы лизоцима, приводящее к образованию прекурсоров кристалла – октамеров; определено влияние различных ионов осадителя на равновесную концентрацию и конформационную стабильность октамеров, а также связывание прекурсоров между собой при дальнейшем росте кристаллов.**

6. **Апробирован подход к исследованию взаимодействия белковых молекул с ионами осадителя в модельной системе – ленгмюровском монослое, сформированном на поверхности водной субфазы из кристаллизационного раствора.** Показано, что **такие монослои и пленки лизоцима имеют толщину, равную диаметру октамера, высокую плотность и однородность.** Установлено, что **при формировании монослоя ионы осадителя формируют тонкий слой на границе раздела белок/субфаза, при этом структура «слой белка/слой осадителя/субфаза» остается стабильной не менее 12 часов, а также сохраняется при переносе монослоя на твердую подложку.**

7. На основе **анализа взаимодействий между молекулами протеиназы К в кристалле было предсказано, что наиболее вероятными**

**единицами роста кристалла**, которые могут устойчиво существовать в кристаллизационных растворах, **являются димеры**. **Методом МУРР подтверждено**, что растворы протеиназы К в условиях кристаллизации включают только две компоненты – мономеры и димеры.

8. На основе **анализа взаимодействий между молекулами белка в кристалле термолизина** сделано предположение, что наиболее вероятными **единицами роста кристалла**, которые могут устойчиво существовать в кристаллизационных растворах, **являются димеры и гексамеры**. **Методом МУРР подтверждено**, что растворы термолизина в условиях кристаллизации включают только три компоненты – мономеры, димеры и гексамеры.

#### Список цитируемых работ

- 
- [1] Финкельштейн А.В. и Птицын О.Б. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами (3-е изд., испр. и доп.). М.: КДУ, 2012. — 456 с.
- [2] Ковальчук М.В., Попов В.О. // Наука в России. 2013. №3. С.4—12.
- [3] Dauter, Z., Dauter, M., de La Fortelle, E., Bricogne, G., & Sheldrick, G. M. (1999), Journal of Molecular Biology, 289(1), 83–92.
- [4] Boue, F., Lefaucheur, F., Robert, M. C., & Rosenman, I. (1993). Journal of Crystal Growth, 133(3–4), 246–254.
- [5] Ducruix, A. F., Guilloteau, J.-P., Ries-Kautt, M. M., & Tardieu, A. (1996). Journal of Crystal Growth, 168(1–4), 28–39.
- [6] Kovalchuk M.V., Kazimirov A.Yu., Zheludeva S.I. // Nuclear Instrum. and Methods in Phys. Research. 1995. V.101.
- [7] Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., Novikova N.N. // Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy. 2001. V.56.
- [8] Ковальчук М.В., Кон В.Г. // Успехи физ. наук. 1986. Т. 149. Вып. 5. С. 69–103.

- 
- [9] M.V. Kovalchuk, S.I. Zheludeva, N.N. Novikova et. al., X-ray Standing Waves in X-ray Specular Reflection and Fluorescence Study of Nano-Films // J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography, 1997. Vol. 30, № 5. P. 833–838.
- [10] Kovalchuk M.V. Zheludeva S.I., Novikova N.N., Konovalov O.V. et al. Langmuir monolayers on water surface investigated by X-ray total reflection fluorescence // Mater. Sci. Eng. C. 2003. Vol. 23, № 5. P. 567– 570.
- [11] Kovalchuk M.V. Novikova N.N., Stepina N.D., Konovalov O.V. et al. Spectral-selective X-ray methods for structure diagnostics of ordered bioorganic nanosystems on a liquid surface // J. Surf. Investig. X-ray, Synchrotron Neutron Tech. 2011. Vol. 5, № 5. P. 816–821.
- [12] Ковальчук М.В., Квардаков В.В., Корчуганов В.Н КИСИ вчера, сегодня, завтра // Природа 2013 №12(1180) с.25-36.
- [13] Ковальчук М.В., Квардаков В.В. Подготовка к работам по физическому материаловедению на Курчатовском источнике синхротронного излучения // ВАНТ: Материаловедение и новые материалы 2004 №2(63) с.392-397.
- [14] Ковальчук М.В., Попов В.О. // Наука в России. 2013. №3. С.4—12.
- [15] Куранова И.П., Ковальчук М.В., Кристаллы для изучения белковых структур. // Природа. 2014. № 3. С. 12.
- [16] Li, M., Nadarajah, A., & Pusey, M. L. (1999). Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography, 55(5),1012–1022.
- [17] Konarev, P. V., & Svergun, D. I. (2018). IUCrJ, 5(4), 402–409
- [18] Battye, T.G.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R. & Leslie, A.G.W. (2011), Acta Cryst. D67, 271-281
- [19] McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). J. Appl. Crystallogr. 40, 658–674

- 
- [20] Vagin, A. A., Steiner, R. A., Lebedev, A. A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., & Murshudov, G. N. (2004), *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60(12), 2184–2195
- [21] Emanuel Schneck, Erzsebet Papp-Szabo, Bonnie E. Quinn et al.// *Journal of the Royal Society Interface*. -2009.-Vol.6.-P.671-678.
- [22] Le-Thu T. Nguyen, Andrew J. Musser, Eltjo J. Vorenkamp et al.//*Langmuir*. -2010.-Vol. 17.-P.14073–14080.
- [23] Luigi Cristofolini, Tatiana Berzina, Victor Erokhin et al.// *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. -2008.-Vol. 321.-P.158–162.
- [24] Pedersen J., Hamley I. // *J. Appl. Crystallography*.1994. V.27.P.36.
- [25] Ghose S. K., Dev B. N. // *Physical Review B*, 2001. V.63. P. 245409.
- [26] Zheludeva S.I., Novikova N.N., Konovalov O.V. et al. // *J. Appl. Cryst.*2003. V.36.P.727
- [27] Zheludeva S.I., Novikova N.N., Stepina N.D. et al. // *Spectrochimica Acta Part B*. 2008.V.63.P.1399.
- [28] Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., et al. // *Thin Solid Films*. 1991. V.193. P.395.

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

1. А.С. Бойкова, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование влияния на начальную стадию кристаллизации лизоцима тетрагональной сингонии замены растворителя с обычной воды на тяжелую методом малоуглового рентгеновского рассеяния» // Кристаллография, 2017, том 62, № 6, с. 876–881.

2. **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, В.В. Волков, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Исследование условий образования единиц роста белкового кристалла в растворах лизоцима методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей» // Кристаллография, 2017, том 62, № 3, с. 364–369

3. М.В. Ковальчук, А.С. Бойкова, **Ю.А. Дьякова**, М.А. Марченкова, А.М. Ополченцев, Ю.В. Писаревский, П.А. Просеков, А.Ю. Серегин «Модификация метода Ленгмюра–Шеффера для получения упорядоченных белковых пленок» // Кристаллография, 2017, том 62, № 4, с. 650–656

4. A.S. Boikova, **Y.A. Dyakova**, K.B. Ilina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, A.I. Kuklin, M.A. Marchenkova, B.V. Nabatov, A.E. Blagov, Yu.V. Pisarevskaya, M.V. Kovalchuk «Octamer formation in lysozyme solutions at the initial crystallization stage detected by small-angle neutron scattering» // Acta Cryst., D73, 2017, P. 591-599.

5. М.А. Марченкова, В.В. Волков, А.Е. Благов, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, Е.Ю. Терещенко, В.И. Тимофеев, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук, «In situ - исследования состояния молекул лизоцима на стадии начала процесса кристаллизации методом малоуглового рентгеновского рассеяния», Кристаллография, 2016, Том 61, № 1, С. 14 – 19.



6. M.V. Kovalchuk, A.E. Blagov, **Yu.A. Dyakova**, A.Yu. Gruzinov, M.A. Marchenkova, G.S. Peters, Yu.V. Pisarevskiy, V.I. Timofeev and V.V. Volkov, «Investigation of the initial crystallization stage in lysozyme solutions by small-angle X-ray scattering». *Crystal Growth & Design*. 2016. 16 (4). P. 1792.

7. **Ю.А. Дьякова**, М.А. Марченкова, «Создание частично упорядоченных органических планарных систем на основе *in situ* контроля их структурной организации», *Кристаллография*, 2016, Т. 61, № 5, С. 718–735.

8. Marchenkova M.A., **Dyakova Y.A.**, Tereschenko E.Y., Kovalchuk M.V., Vladimirov Y.A. «Cytochrome c complexes with cardiolipin monolayer formed under different surface pressure» // *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2015. Т. 31. № 45. С. 12426-12436.

9. М.В. Ковальчук, П.А. Просеков, М.А. Марченкова, А.Е. Благов, **Ю.А. Дьякова**, Е.Ю. Терещенко, Ю.В. Писаревский, О. А. Кондратьев, «Исследование *in-situ* процессов роста и деградации кристаллов тетрагонального лизоцима на подложке кремния методом высокоразрешающей рентгеновской дифрактометрии», *Кристаллография*, 2014, Т. 59, №5, С. 749-754.

10. M.V. Kovalchuk, A.S. Boikova, **Y.A. Dyakova**, K.B. Plina, P.V. Konarev, A.E. Kryukova, M.A. Marchenkova, Y.V. Pisarevsky, V.I. Timofeev «Pre-crystallization phase formation of thermolysin hexamers in solution close to crystallization conditions» *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2019, V. 37(12), P. 3058-3064.

11. А.С. Бойкова, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, М.А. Марченкова, А.Ю. Серегин, П.А. Просеков, Ю.А. Волковский, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Получение многослойных пленок на основе белка лизоцима и ионов осадителя (йода и калия) на кремниевой подложке модифицированным методом Ленгмюра–Шеффера» // *Кристаллография*, 2018, том 63, № 5, с. 703–707.

12. М.В. Ковальчук, А.С. Бойкова, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П. В. Конарев, А.Е. Крюкова, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский «Исследование предкристаллизационной стадии раствора (влияния температуры и типа осадителя) протеиназы к методом малоуглового рассеяния рентгеновского излучения» Кристаллография 2018т.63 № 6, с. 857-862

13. Ю.В. Кордонская, В.И. Тимофеев, **Ю.А. Дьякова**, М.А. Марченкова, Ю. В. Писаревский, Д. Подшивалов, М.В. Ковальчук «Исследование поведения олигомеров белка лизоцима, образующихся в растворах на ранней стадии кристаллизации методом молекулярной динамики.» Кристаллография 2018 Т 63 №6, с. 902-905.

14. **Ю.А. Дьякова**, А.С. Бойкова, К.Б. Ильина, П.В. Конарев, М.А. Марченкова, Ю.В. Писаревский, В.И. Тимофеев, М.В. Ковальчук «Исследование влияния иона осадителя на образование олигомеров в кристаллизационных растворах белка лизоцима», Кристаллография 2019 64 №1, с. 15-19

15. А.М. Попов, А.С. Бойкова, В.В. Волков, **Ю.А. Дьякова**, К.Б. Ильина, П. В. Конарев, М.А. Марченкова, Г.С. Петерс, Ю.В. Писаревский, М.В. Ковальчук «Микрофлюидная ячейка для изучения структуры предкристаллизационной стадии растворов белков методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей», Кристаллография, 2018. том 63 № 5, с. 697-702.

16. Kovalchuk M.V., Boikova A.S., **Dyakova Y.A.**, Ilina K.B., Konarev P.V., Marchenkova M.A., Pisarevskiy Y.V., Prosekov P.A., Rogachev A.V., Seregin A.Y. “Structural characteristics of lysozyme Langmuir layers grown on a liquid surface from an oligomeric mixture formed during the stages of lysozyme crystallization”, Thin Solid Films 2019. V. 677. P. 13–21

17. М.А. Marchenkova, I.P. Kuranova, V.I. Timofeev, A.S. Boikova, P.V. Dorovatovskii, **Y.A. Dyakova**, К.В. Ilina, Y.V. Pisarevskiy, M.V. Kovalchuk,

«The binding of precipitant ions in the tetragonal crystals of hen egg white lysozyme» // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2020, Vol. 38, № 17, 5159 – 5172. DOI: 10.1080/07391102.2019.1696706.

18. M.A. Marchenkova, P.V. Konarev, T.V. Rakitina, V.I. Timofeev, A.S. Boikova, **Yu.A. Dyakova**, K.B. Ilina, Yu.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk. «Dodecamers derived from the crystal structure were found in the pre-crystallization solution of the transaminase from the thermophilic bacterium *Thermobaculum terrenum* by small-angle X-ray scattering», Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 2020, V. 38(10), P. 2939-2944.

19. Y.V. Kordonskaya, M.A. Marchenkova, V.I. Timofeev, **Y.A. Dyakova**, Y.V. Pisarevsky, M.V. Kovalchuk, «Precipitant ions influence on lysozyme oligomers stability investigated by molecular dynamics simulation at different temperatures» Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, Published online: 08 Aug 2020. DOI: 10.1080/07391102.2020.1803138.

20. 30th European Crystallographic Meeting, 28th August - 1st September 2016, Congress Center Basel, Switzerland. **Y.A. Dyakova**, A.E. Blagov, M.A. Marchenkova, Y.V. Pisarevskiy, P.A. Prosekov, V.V. Volkov, M.V. Kovalchuk, «New approach to protein crystallization. Investigation of various crystallization stages of lysozyme» // Acta.Cryst. A: Foundations and Advances. (2016). A72. s238.

21. M. Marchenkova, A. Boikova, Y. Dyakova, A. Opolchentsev, P. Prosekov, Y. Pisarevsky, A. Seregin, M. Kovalchuk, «A new approach to ordered protein films formation» // Acta Cryst. (2017), A70, C1182.

22. Y. Dyakova, M. Marchenkova, Y. Pisarevsky, M. Kovalchuk, «A new approach to finding the protein crystal growth conditions» // Acta Cryst. (2017), A70, C1184.

### **Патенты:**

1. Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Дьякова Ю.А., Марченкова М.А., Просеков П.А., Серегин А.Ю., Бойкова А.С. Заявка на патент

«Способ получения упорядоченных белковых пленок на твердых подложках в ленгмюровской ванне» Патент № RU 2672410 С1;

2. Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Благоев А.Е., Дьякова Ю.А., Марченкова М.А. «Способ определения условий кристаллизации белков» Патент № 2626576;

3. Ковальчук М.В., Писаревский Ю.В., Волков В.В., Дьякова Ю.А., Конарев П.В., Марченкова М.А., Попов А.М., «Микрофлюидная ячейка для определения условий кристаллизации белков методом малоуглового рассеяния.» Патент на полезную модель № 182997.