

На правах рукописи

Ильина Ксения Борисовна

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

Специальность 01.04.07 – «Физика конденсированного
состояния»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2019

Работа выполнена в лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения Института кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН Федерального государственного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук»

Научный

руководитель: **Ковальчук Михаил Валентинович**, доктор физико-математических наук, профессор, член-корреспондент РАН, президент НИЦ «Курчатовский институт»

Официальные

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

Светлана Викторовна Тищенко, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук.

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

Защита диссертации состоится «__» _____ 2020 г. в __ ч. __ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН по адресу 119333, г. Москва, Ленинский пр., 59, конференц-зал.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2019

Ученый секретарь
диссертационного совета

к.ф.-м.н.

К.В. Фролов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

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), 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 образуется предкристаллизационная фаза из олигомеров, состоящих из восьми

молекул белка и соответствующих 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. 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 поставленными целями 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 – D_2O и H_2O – 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 (H_2O и D_2O) 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.

Положения, выносимые на защиту:

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 H_2O и D_2O ;

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 работы:

Основные результаты работы, вошедшие в диссертационную работу, докладывались на международных и национальных конференциях (см. [5–16] в списке основных работ).

Публикации:

В диссертацию включены результаты, опубликованные в 16 публикациях, из которых 3 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК.

Структура и объем диссертации:

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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 методам кристаллизации и исследования растворов белков.

В **главе 2** описаны процедура приготовления образцов и методы малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН), использованные в диссертационной работе. Показана возможность их применения для исследования структуры моно- и полидисперсных растворов белков.

Предварительные измерения растворов лизоцима методом МУРР проводились на станции ДИКСИ Курчатовского источника синхротронного излучения (Москва, Россия) с длиной волны 1.62 Å с использованием двухкоординатного детектора Pilatus 1M.

Измерения рассеяния от растворов лизоцима методом МУРР проводились на станции BM29 BioSAXS Европейского источника синхротронного излучения (Гренобль, Франция) с длиной волны 1.0 Å с использованием двухкоординатного детектора Pilatus 1M. Все измерения проводили с поддержанием определенной температуры (с использованием термостатируемой роботизированной системы).

Исследования растворов лизоцима методом МУРН проводились на станции ЮМО ИБР-2 Объединенного института ядерных исследований (Дубна, Россия) с длиной волны от 0.7 до 4.0 Å.

Обработка данных малоуглового рассеяния проводилась с использованием программ POLY MIX и OLIGOMER [3]. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния, прошедшие

первичную обработку, обрабатывались с помощью программы POLYMIХ, которая является усовершенствованной версией программы MIXTURE [4]. Эта программа выполняет приближение теоретической кривой к экспериментальной с помощью моделирования в приближении простых геометрических тел с учетом межчастичного взаимодействия.

Для более детального определения структуры растворов, кривые МУРР и МУРН обрабатывались с помощью программы OLIGOMER для определения объемных долей мономеров и олигомеров более высокого порядка. Расчет теоретических кривых олигомерных компонентов проводился с помощью программы CRY SOL (МУРР) [5] 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]. Программа OLIGOMER приближает экспериментальные данные путем нахождения наилучшей линейной комбинации теоретических кривых, рассчитанных от известных компонент смеси, олигомеров. Результатом обработки является информация об объемной доле каждого олигомера в растворе.

В **главе 3** показано образование олигомеров в растворе лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии, определенное с помощью обработки данных МУРР. Проводилось исследование структуры растворов лизоцима без и с добавлением осадителя хлорида натрия в зависимости от температуры и концентрации белка.

Для определения структуры растворов лизоцима в условиях кристаллизации было проведено измерение кривых малоуглового рассеяния от растворов лизоцима и лизоцима с осадителем с концентрациями белка 20, 40, 60 мг/мл при температурах 30, 20, 10 °С. В качестве осадителя использовался хлорид натрия с концентрацией 25 мг/мл, а в качестве буфера – натрий-ацетатный буфер рН 4.5. Измерения растворов начинали с температуры 30 °С и последовательно снижали до 20 и 10 °С. Выбор такой схемы измерений, с высокой начальной температурой, был обусловлен тем, что олигомеры, образованные при температуре 10 °С, могли бы не успеть распасться на более мелкие составляющие при повышении температуры. Из-за этого возникла возможность

получить неверный результат о процентном содержании олигомеров в растворе. Поэтому измерения начинали при высокой (30 °С) температуре, при которой растворимость белка выше, чем при 10 °С, но при данной температуре еще не имеет место денатурация белка.

Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от растворов лизоцима без и с осадителем представлены на рис. 1. На кривой рассеяния от раствора лизоцима без осадителя наблюдается влияние межчастичной интерференции (отталкивающее взаимодействие между молекулами), вызванное высокой концентрацией белка. При добавлении к раствору лизоцима осадителя меняется характер кривой рассеяния: увеличивается интенсивность рассеяния при малых углах, меняется взаимодействие между молекулами, они начинают притягиваться. Увеличение интенсивности рассеяния является следствием образования более крупных частиц.

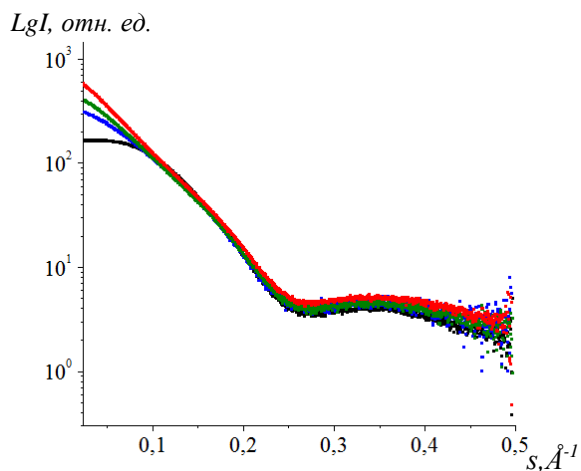


Рис. 1. Экспериментальные кривые интенсивности МУРР при температуре 10 °С от растворов лизоцима с концентрацией белка 40 мг/мл (черная) и лизоцима с осадителем с концентрациями белка и осадителя 20 и 25 (синяя), 40 и 25 (зеленая), 60 и 25 мг/мл (красная) соответственно.

По экспериментальным данным (рис. 2) было рассчитано объемное распределение по размерам в приближении полидисперсных сферических частиц с помощью программы POLYMIX (рис. 3).

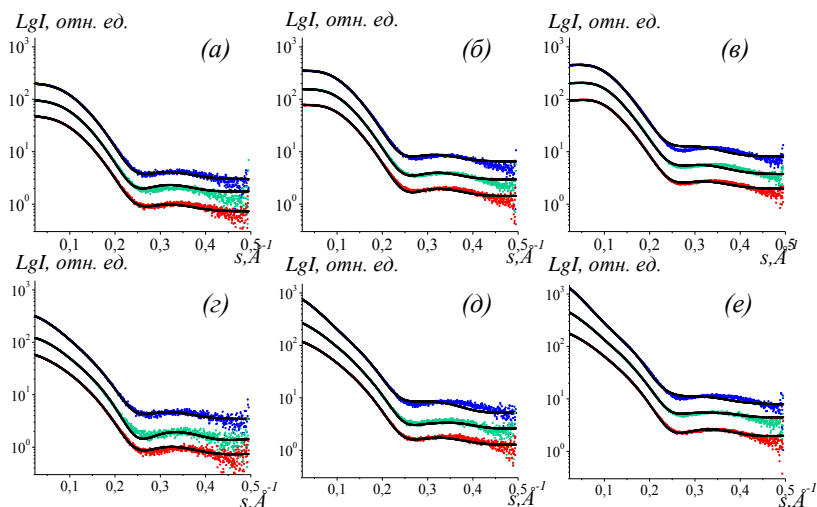


Рис. 2. Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные программой POLYMIX, при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая), 30°C (красная) от растворов лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и лизоцима с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е). Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

Распределения по размерам частиц, полученные от раствора белка без осадителя, содержат один максимум, соответствующий диапазону частиц с радиусом от 15 до 20 Å (рис. 3 а, б, в). Радиус таких частиц близок к радиусу мономера лизоцима. На рис. 3в помимо максимума от мономера присутствуют вклады от частиц малых размеров с радиусом около 8–10 Å, которые можно отнести к флуктуациям плотности в буферном растворе.

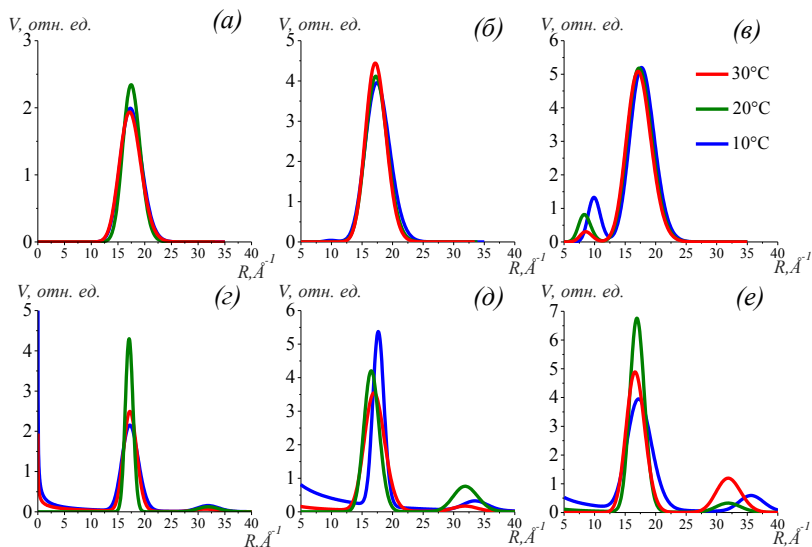


Рис. 3. Распределение по размерам частиц в растворах лизоцима с концентрациями белка 20 (а), 40 (б), 60 мг/мл (в) и лизоцима с осадителем с концентрациями белка и осадителя соответственно 20 и 25 (г), 40 и 25 (д), 60 и 25 мг/мл (е) при температурах 10 (синяя), 20 (зеленая), 30°C (красная).

Распределения по размерам частиц, полученные от растворов белка с осадителем, помимо максимума, соответствующего мономерам лизоцима, имеют второй максимум, соответствующий частицам с радиусом 30–35 Å. Так как программа использует сферическое приближение формы частиц, то данный максимум соответствует агрегатам белка, состоящим примерно из восьми молекул лизоцима.

Для более детального анализа структуры растворов лизоцима без и с осадителем экспериментальные данные были обработаны программой OLIGOMER. При обработке использовались кристаллографические модели олигомеров (рис. 4), выделенные из структуры кристалла лизоцима тетрагональной сингонии (PDB

4WLD). Подробная методика выбора олигомеров описана в работе [1,2]. Результаты обработки представлены в таблице 1.

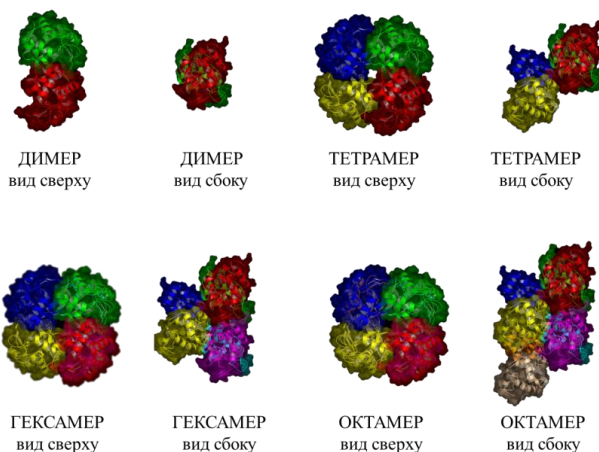


Рис. 4. Структура олигомеров, выделенных из кристаллической структуры лизоцима (PDB 4WLD), для обработки кривых малоуглового рассеяния.

Таблица 1. 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 отсутствии в зависимости от температуры.

C, мг/мл	T, °C	Белок с осадителем						Белок без осадителя *	
		мономер	димер	тетраме	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
40	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
	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.

Установлено, что при добавлении к раствору лизоцима осадителя хлорида натрия, приводящего к росту кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии, в растворе образуются димеры и октамеры. При этом тетрамеров и гексамеров, существование которых в растворе обсуждалось ранее [6–7], не было обнаружено ни при каких условиях. В том случае, когда кристаллизация не происходит, в растворе лизоцима без осадителя не образуется новых олигомеров, раствор состоит только из мономеров.

Температура раствора и концентрация лизоцима оказывают влияние на состав кристаллизационного раствора. При понижении температуры и увеличении концентрации белка растет объемная доля октамеров в растворе лизоцима с осадителем (рис. 5).

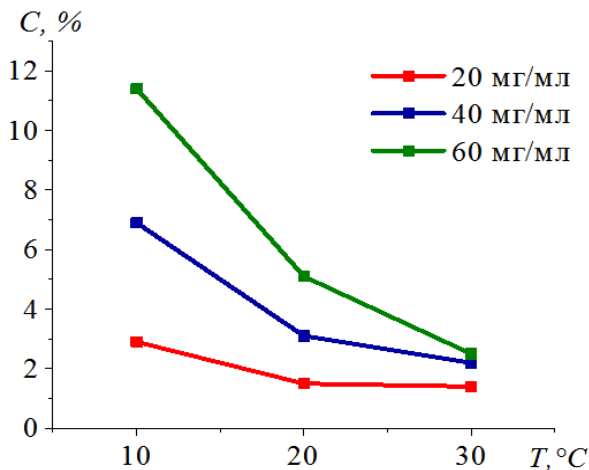


Рис. 5. Зависимость объемной доли октамеров от температуры в растворах лизоцима с хлоридом натрия при концентрациях белка и осадителя 20 и 25 (красная), 40 и 25 (синяя), 60 и 25 мг/мл (зеленая) соответственно.

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

В главе 4 представлены результаты исследования структуры растворов белка лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРН. Использование комплементарного метода МУРН (по отношению к МУРР) обусловлено необходимостью проверки результатов, полученных в главе 3, независимым методом.

Было проведено измерение растворов лизоцима с разной концентрацией белка без и с осадителем при температурах 10, 20, 30 °С. В качестве осадителя использовался хлорид натрия. В качестве буфера – натрий-ацетатный буфер, рD 4.5. Все растворы, белка и осадителя, буферы были приготовлены на основе ультрачистой дейтерированной воды. В выбранных условиях: концентрация и тип осадителя, рD буфера – растут кристаллы лизоцима тетрагональной сингонии. Замена растворителя, с H₂O на D₂O, не меняет сингонию кристалла. В исследовании использовались концентрации белка 10, 20, 40 мг/мл и осадителя 25 мг/мл.

Измерения растворов начинали с температуры 30 °С и затем понижали до 20, 10 °С.

Экспериментальные данные были обработаны программой OLIGOMER с использованием кристаллографических моделей олигомеров (рис. 4). Результат обработки приведен в таблице 2.

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

Образец	C, мг/мл	T, °С	χ^2	R_g (Å)	% мономер	% димер	% октамер
Белок с осадителем	10	10	0.49	18.2±0.2	79.8±3.0	17.3±3.0	2.9±1.0
		20	0.43	15.4±0.2	84.1±3.0	14.9±3.0	1.0±0.5
		30	0.41	13.0±0.2	88.8±3.0	11.2±3.0	0.0±0.0
	20	10	0.88	21.7±0.2	83.3±3.0	9.6±3.0	7.0±1.0
		20	1.03	21.0±0.2	90.7±3.0	3.0±1.5	6.2±1.0
		30	0.64	18.1±0.2	90.5±3.0	6.2±2.0	3.2±1.0

	40	10	1.06	20.5±0.2	87.8±3.0	5.2±2.0	7.0±1.0
		20	0.61	23.2±0.2	88.8±3.0	1.4±0.5	9.6±1.0
		30	0.60	21.5±0.2	92.9±3.0	0.0±0.0	7.0±1.0
Белок без осадителя	10	10	0.39	13.1±0.2	90.1±3.0	9.8±3.0	0.0±0.0
		20	0.48	12.9±0.2	89.0±3.0	10.9±3.0	0.0±0.0
		30	0.48	12.3±0.2	93.4±3.0	6.6±2.0	0.0±0.0
	20	10	0.56	13.1±0.2	91.1±3.0	8.6±3.0	0.0±0.0
		20	0.60	12.2±0.2	93.6±3.0	6.3±2.0	0.0±0.0
		30	0.64	11.9±0.2	95.6±3.0	4.3±2.0	0.0±0.0
	40	20	0.80	13.6±0.2	99.0±3.0	0.0±0.0	0.9±0.5
		30	0.64	12.8±0.2	99.3±3.0	0.0±0.0	0.6±0.3

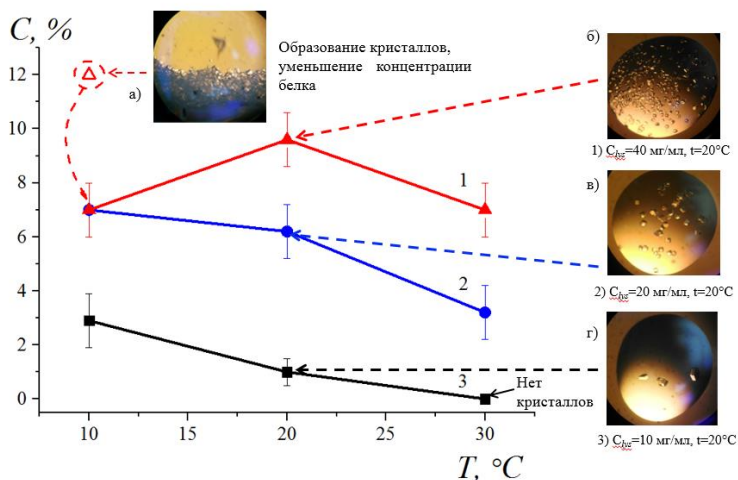


Рис. 6. Зависимость объемной доли октамеров от температуры в растворах лизоцима с хлоридом натрия при концентрациях белка и осадителя соответственно 20 и 25 (1), 40 и 25 (2), 60 и 25 мг/мл (3)

На основании полученных данных было обнаружено, что при росте кристаллов лизоцима тетрагональной сингонии образуются димеры и октамеры. Объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима увеличивается с

понижением температуры и увеличением концентрации белка (рис. 6).

Исключением является только точка, соответствующая максимальной концентрации белка (40 мг/мл), максимальному времени измерения и минимальной температуре (10 °С). При данных условиях в измерительной кювете образовались кристаллы, которые и могли повлиять на процентное содержание октамеров в растворе. Результаты этой главы хорошо согласуются с результатами, полученными в главе 3.

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

В главе 5 показано влияние типа растворителя (H_2O и D_2O) на образование олигомеров в растворах лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии методом МУРР. Условия эксперимента методами МУРР и МУРН не были идентичными из-за использования в качестве растворителя D_2O , а также длительного времени накопления сигнала и использования большого объема образца в экспериментах методом МУРН. Для того чтобы определить влияние типа растворителя необходимо было реализовать одинаковые условия экспериментов. Так как проведение эксперимента методом МУРН не позволяет использовать H_2O , а в эксперименте методом МУРР используется маленький объем образца (50 мкл) и минимальное время экспозиции (1 с), то были проведены измерения растворов лизоцима в D_2O методом МУРР в зависимости от концентрации белка и температуры.

Было проведено измерение растворов лизоцима с разной концентрацией белка без и с осадителем при температурах 10, 20, 30 °С. В исследовании использовались концентрации белка 10, 20, 30, 40 мг/мл и осадителя 25 мг/мл. Измерения растворов начинали с температуры 30 °С и затем понижали до 20, 10 °С.

Результат обработки экспериментальных данных с помощью программы OLIGOMER на основе кристаллографических моделей, полученных в главе 3, приведен в таблице 3.

Таблица 3. 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 отсутствии 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	14.35
	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	14.35
	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	14.36
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	14.34
	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	14.34
	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	14.34
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	14.33
	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	14.33
	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	14.34
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	14.32
	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	14.32
	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	14.33

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

На основании полученных результатов показано, что в кристаллизационных растворах лизоцима в условиях роста кристаллов тетрагональной сингонии присутствуют мономеры, димеры и октамеры как в растворах H_2O , так и с D_2O . Объемная доля октамеров в кристаллизационных растворах лизоцима увеличивается с ростом концентрации белка и понижением температуры. При одинаковых условиях содержание октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима в D_2O значительно превышает, по сравнению с H_2O .

Для более детального определения разницы в содержании олигомеров в растворах лизоцима в условиях кристаллизации в H_2O и D_2O были проведены исследования растворов методом

МУРР в зависимости от температуры. При этом исследовалась концентрация белка и осадителя 20 и 25 мг/мл соответственно, а измерения проводились, начиная с температуры 30 °С (D₂O) и 27 °С (H₂O) до 4 °С (D₂O) и 5 °С (H₂O) с шагом 1 °С. Результаты обработки программой OLIGOMER представлены на рис. 7.

Во всем диапазоне температур в кристаллизационном растворе лизоцима присутствуют помимо мономеров димеры и октамеры при использовании в качестве растворителя H₂O и D₂O.

Объемная доля октамеров в кристаллизационном растворе лизоцима в D₂O значительно выше, чем в H₂O, при этом сохраняется общая тенденция нелинейного увеличения концентрации октамеров с понижением температуры (рис. 7а).

Также с понижением температуры увеличивается процентное содержание всех олигомеров (октамеры + димеры). При этом разница между объемной долей всех олигомеров остается постоянной при любой температуре и составляет примерно 8 % (рис.7. б).

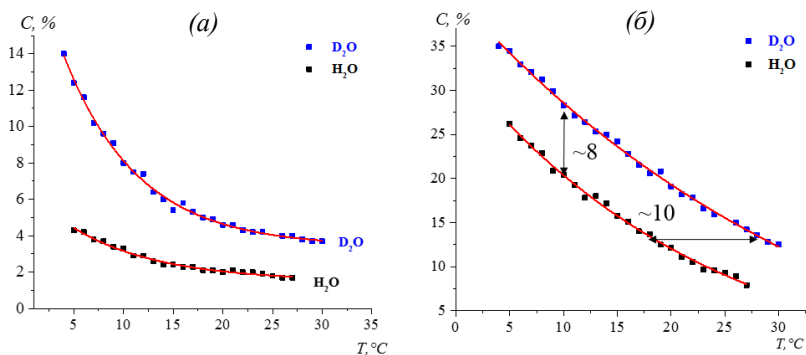


Рис. 7. Зависимость объемной доли октамеров (а) и олигомеров (б) лизоцима от температуры при в растворах H₂O (черная) и D₂O (синяя).

Одинаковое содержание олигомеров в кристаллизационных растворах лизоцима в H₂O и D₂O достигается, когда температура раствора в H₂O ниже на ~ 10°C, чем в D₂O (рис. 7б). Полученный результат согласуется с результатами исследования изменения растворимости лизоцима при замене H₂O на D₂O [8].

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. 4). Показано, что димеры и октамеры стабильны в кристаллизационном растворе в присутствии хлорида натрия (с концентрацией 25 мг/мл) и нестабильны в его отсутствие, а тетрамеры и гексамеры нестабильны как в присутствии, так и в отсутствие осадителя [9].

Таблица 4. Времена жизни олигомеров лизоцима в водном растворе с ацетатным буфером при температуре 10 °С 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 [10]

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 ЦИТИРУЕМЫХ РАБОТ

1. Marchenkova M.A., Volkov V.V., Blagov A.E., Dyakova Y.A., Pina K.B., Tereschenko E.Y., Timofeev V.I., Pisarevsky Y.V., Kovalchuk M.V. // 2016. *Crystallogr. Rep.* V. 61. P. 5–10.
2. Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Y.A., Gruzinov A.Y., Marchenkova M.A., Peters G.S., Pisarevsky Y.V., Timofeev V.I., Volkov V.V. // 2016. *Cryst. Growth Des.* V. 16. P. 1792–1797.
3. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. // 2003. *J. Appl. Cryst.* V. 36. P. 1277–1282.
4. Svergun D.I., Konarev P.V., Volkov V.V., Koch M. H. J., Sager W. F. C., Smeets J., Blokhuis E. M. // *J. Chem.Phys.* 2000. V. 113. P. 1651-1665.
5. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. // *J. Appl. Crystallogr.* 1995. V. 28. № 6. P. 768–773.
6. Nadarajaha A., Li H., Pusey M.L. // *Acta Cryst.* 1997. D.53. P. 524–534.
7. Li H., Nadarajaha A. Pusey M.L. // *Acta Cryst.* 1999. D. 55.P. 1036–1045.
8. Gripon C., Legrand L., Rosenman I., Vidal O., Robert M. C. & Boue' F. // 1997. *J. Cryst. Growth.* V.177. P. 238–247.
9. Кордонская Ю.В., Тимофеев В.И., Ильина К.Б., Марченкова М.А., Подшивалов Д.Д., Бойкова А.С., Дьякова Ю.А., Писаревский Ю.В., Ковальчук М.В. // Сборник научных трудов. Современные проблемы физики и технологий. VIII-я Международная молодежная научная школа-конференция. 2019. P. 120–121.
10. Кордонская Ю.В. Тимофеев В.И., Дьякова Ю.А., Марченкова М.А., Писаревский Ю.В., Подшивалов Д.Д., Ковальчук М.В. // *Кристаллография.* 2018. V. 6. № 63. P. 902–905.

Список основных авторских публикаций по теме диссертации:

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.

5. **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.

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

7. **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.

8. 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

9. **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

10. **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.

11. **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

12. **К.В. Пина**, А.С. Boikova, Y.A. Dyakova, P.V. Konarev, А.Е. Kryukova, М.А. Marchenkova, А.Е. 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

13. А.Е. Blagov, A.S. Boikova, Yu.A. D'yakova, **К.В. Пина**, P.V. Konarev, A.G. Kulikov, А.Е. Kryukova, М.А. 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

14. **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

15. **К.В. Пина**, A.S. Boikova, Y.A. Dyakova, P.V. Konarev, M.A. Marchenkova, А.Е. 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

16. **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.