

УДК 548.5; 538.9; 544.77.023.55

Связь концентрации кластеров-прекурсоров в насыщенном кристаллизационном растворе с дальним порядком при переходе к твердой фазе

М. А. Марченкова^{1*}, А. С. Бойкова¹, К. Б. Ильина¹, П. В. Конарев¹, Ю. В. Писаревский¹, Ю. А. Дьякова², М. В. Ковальчук^{1,2}

¹ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, 119333 Россия

²НИЦ «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

*E-mail: marchenkova@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 02.10.2022

Принята к печати 11.01.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11815

РЕФЕРАТ Предложена модель перехода от разупорядоченного жидкого состояния к твердой фазе, основанная на установлении корреляции между концентрацией кластеров-прекурсоров в насыщенном растворе и особенностями образования твердой фазы. Справедливость модели проверена экспериментально путем параллельного исследования олигомерной структуры растворов белка лизоцима и особенностей образования твердой фазы из этих растворов. Показано, что в отсутствие в растворе кластеров-прекурсоров (октамеров) твердая фаза не образуется; при небольшой концентрации октамеров образуются совершенные монокристаллы; при увеличении степени пересыщения (и концентрации октамеров) наблюдается массовая кристаллизация; еще большее увеличение концентрации октамеров приводит к образованию аморфной фазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА олигомеры, кластеры-прекурсоры, кристаллизация, пересыщение, рост кристаллов.

ВВЕДЕНИЕ

Переход от жидкого разупорядоченного состояния к твердому является важной областью физики конденсированного состояния, составляющей предмет исследований в течение многих десятилетий [1, 2]. Проведено огромное количество экспериментальных исследований перехода к твердой фазе разнообразных веществ: синтетических, металлических, диэлектрических, полупроводниковых, органических, высокомолекулярных (в том числе белков) и пр. Для растворов известных соединений переход к твердой фазе наблюдается при достижении пересыщения раствора. Также установлено, что степень пересыщения влияет на структуру образующейся твердой фазы. При небольших значениях пересыщения образуются монокристаллы. Дальнейшее увеличение степени пересыщения приводит к массовой кристаллизации, а затем к образованию аморфной фазы. Тем не менее, до настоящего времени не существует общепринятой модели этого перехода.

Классический путь кристаллизации, который когда-то считался применимым ко всем системам, постепенно уступает место неклассическому пути,

который в настоящее время считается доминирующим механизмом кристаллизации из раствора и других систем [2–9]. В соответствии с классической теорией роста кристаллов, рост любого кристалла происходит за счет присоединения к его поверхности новых строительных единиц (атомов, ионов, молекул или их комплексов) из среды – раствора, расплава, пара или твердого тела. В неклассических моделях кристаллизации постулируется возможность роста кристаллов за счет присоединения к растущей поверхности не единичных атомов, ионов или молекул, как в классической теории, а целых блоков твердой фазы. Стоит отметить, что в этих работах описаны образующиеся прекурсоры, частицы, плотные жидкие капли, имеющие аморфную структуру, а также существенные особенности ряда случаев перехода от жидкого к твердому, проявляющиеся в процессах, происходящих в масштабе десятков нанометров и больше. В этих работах отмечается необходимость исследования процессов, происходящих в насыщенных (кристаллизационных) растворах, в масштабе единиц и десятков нанометров.

В последние несколько лет структуры кристаллизационных растворов в масштабах единиц и десятков нанометров изучали с использованием методов малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН), а также методов молекулярной динамики. Такие работы проведены прежде всего для насыщенных кристаллизационных растворов ряда белков [10–15] и дигидрофосфата калия [9]. В этих работах из кристаллической структуры исследуемых соединений выделяли 3D-фрагменты, из которых мог строиться монокристалл. И эти упорядоченные образования обнаружены в насыщенных растворах лизоцима (октамеры [10–15]), термолизина (гексамеры [16]), протеиназы (димеры [17]), аминотрансферазы (двенадцатимеры [18]), а также в растворах дигидрофосфата калия (октамеры [19]), что экспериментально подтвердило гипотезу о существовании и структуре кластера-прекурсора в кристаллизационном растворе. Методом молекулярной динамики установлено, что именно этот кластер стабилен в кристаллизационном растворе [20]. В частности, для лизоцима установлено, что в кристаллизационном растворе существуют только димеры и октамеры белка, а другие олигомеры (тетрамеры, гексамеры, десятимеры и т.п.) нестабильны [21].

Подробно исследована зависимость концентрации димеров и октамеров лизоцима от температуры, концентрации осадителя, растворителя методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей либо нейтронов. В большой области изменения параметров кристаллизационного раствора подтверждено, что структура раствора лизоцима включает мономеры, димеры и октамеры этого белка, соотношение между которыми зависит от степени пересыщения раствора [10–15].

В настоящей работе на примере лизоцима исследована связь между концентрацией кластера-прекурсора и особенностями образования твердой фазы. Для этого были проведены две серии работ. Методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей была измерена олигомерная структура лизоцима (соотношение между концентрацией мономеров, димеров и октамеров) в ~60 растворах лизоцима с различным составом осадителя. В этих же растворах изучен переход к твердой фазе (кристаллизацию проводили методом диффузии в парах в варианте сидячей капли).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Приготовление кристаллизационных растворов белка лизоцима

Для приготовления образцов использовали лизоцим куриного яйца производства Sigma-Aldrich (CAS#

12650-88-3, США). В качестве осадителей использовали растворы из наборов для кристаллизации *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 1*, *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 2* (QIAGEN®) и хлорид натрия (CAS 7647-14-5) производства Helicon (Россия). Для приготовления натрий-ацетатного буфера использовали ацетат натрия (CAS 6131-90-4) производства Sigma-Aldrich и уксусную кислоту (CAS 64-19-7) производства PanReac AppliChem. (Далее растворы осадителей из наборов для кристаллизации будут обозначаться как CS1 № и CS2 № соответственно, где вместо № приведен номер конкретного раствора из набора.) Лизоцим и NaCl растворяли в 0.2 М натрий-ацетатном буфере с pH 4.5, приготовленном с использованием ультрачистой воды Millipore (сопротивление воды 18 Мом × см). Раствор белка перед смешением с осадителем центрифугировали в течение 10 мин с частотой 10 000 об/мин. Начальная концентрация маточного раствора белка – 80 мг/мл, затем этот раствор разбавляли буфером до достижения необходимой концентрации.

Перед проведением измерений МУРР лизоцим и маточные растворы осадителя смешивали в равных объемах.

Измерение структуры кристаллизационных растворов лизоцима методом МУРР

Измерения растворов лизоцима методом МУРР на станции P12 EMBL BioSAXS источника синхротронного излучения PETRA III (DESY, г. Гамбург, Германия). Образцы с различным составом осадителей из наборов CS1 и CS2 были измерены на станции P12 EMBL BioSAXS источника синхротронного излучения PETRA III (DESY, г. Гамбург, Германия) [22]. Энергия рентгеновского излучения составляла 10 кэВ ($\lambda = 0.124$ нм). Сбор данных проводили с использованием пиксельного двухкоординатного детектора PILATUS 6M (Dectris, Швейцария) при расстоянии образец–детектор 3.0 м, охватывающем диапазон вектора рассеяния $0.02 < s < 7.0$ нм⁻¹ ($s = 4\pi\sin\theta/\lambda$, где 2θ – угол рассеяния), что соответствует разрешению 300–0.9 нм в реальном пространстве. Измерения проводили с использованием специализированной ячейки для образцов МУРР, состоящей из горизонтального термостатируемого (в диапазоне температур от 278 до 323 К) кварцевого капилляра с толщиной стенок 50 мкм и диаметром 1.7 мм, размещенного в специализированном корпусе из нержавеющей стали для вакуумных измерений. Исследуемый раствор равномерно продвигался по капилляру, при этом пучок попадал в одну и ту же точку на капилляре, но все время в новую часть образца. Для каждого измерения образца сделано 20 съемок. Время экспо-

зиции составляло 50 мс. Объем образца в каждом измерении составлял 40 мкл. Все измерения проводили при температуре 20°C и концентрации лизоцима 20 мг/мл.

Измерения растворов лизоцима методом МУРР на станции BM29 BioSAXS источника синхротронного излучения ESRF (г. Гренобль, Франция). Образцы с различными концентрациями осадителя NaCl (в диапазоне от 5 до 30 мг/мл) были измерены на станции BM29 BioSAXS источника синхротронного излучения ESRF (г. Гренобль, Франция). Энергия рентгеновского излучения составляла 12.4 кэВ, в качестве детектора сигнала использовали пиксельный двухкоординатный детектор Pilatus 1M (Dectris). Расстояние образец–детектор составляло 2.9 м. Исследуемые образцы помещали в специальную термостатируемую роботизированную систему [23] в кюветы из полистирола объемом 200 мкл, нагрев которых осуществляли одновременно. Образцы нагревали до 20°C и далее поддерживали эту температуру на постоянной основе. Далее раствор из кюветы автоматически поступал в проточный кварцевый капилляр диаметром 1.8 мм, который использовали при измерениях. Исследуемый раствор равномерно продвигался по капилляру, при этом пучок попадал в одну и ту же точку на капилляре, но все время в новую часть образца. За время движения образца по капилляру сделано 10 съемок. Время экспозиции каждого измерения составляло 1 с, сечение пучка на образце – 700 мкм².

Методика обработки экспериментальных данных МУРР

Усреднение сигнала от буферного раствора, вычитание усредненного сигнала от буфера из экспериментальных данных рассеяния раствором белков и нормировку на концентрацию белка выполняли с помощью программы PRIMUS, входящей в пакет программ ATSAS [24, 25]. В результате были получены экспериментальные кривые интенсивности рассеяния $I(s)$ растворов белка в различных условиях. Сравнение последовательных кривых рассеяния не выявило радиационного повреждения на исследуемых образцах. Добавление осадителя к раствору лизоцима в определенных условиях приводит к изменению олигомерного состава раствора, когда наряду с мономерными частицами начинают образовываться мультимеры (олигомеры более высокого порядка: димеры, тетрамеры, гексамеры, октамеры). Вследствие этого анализ данных проводили с учетом присутствия нескольких компонентов в системе. После первичной обработки экспериментальные кривые малоуглового рассеяния обрабатывали с помощью

программы OLIGOMER [25] для определения объемных долей мономеров и олигомеров разного порядка. Расчет теоретических кривых олигомерных компонентов проводили с помощью программы CRY SOL [26]. В качестве мономерного компонента была взята кристаллографическая структура мономера лизоцима (PDB ID: 4WLD), а модели димера, тетрамера, гексамера и октамера получены по методике, описанной в [10]. Качество приближения оценивали с помощью минимизации невязки χ^2 между экспериментальными данными и теоретическими модельными приближениями по формуле, приведенной в [14].

Кристаллизация лизоцима

Маточные растворы, приготовленные для измерений методом МУРР на станции P12 EMBL BioSAXS (DESY, Гамбург, Германия), использовали также для кристаллизации лизоцима. Кристаллизацию осуществляли методом диффузии в парах в варианте сидячей капли с помощью кристаллизационного робота Mosquito-LCP (EMBL, Гамбург, Германия), объем каждой из трех капель составлял 200 нл (100 нл маточного раствора белка + 100 нл маточного раствора осадителя). Кристаллы выращивали в автоматизированной системе визуализации ROCK IMAGER при температуре 19°C. Система позволяет наблюдать рост кристаллов белков и фотографировать капли в течение длительного времени (в «нулевой» день (сразу после загрузки кристаллизационного планшета) и далее в 1, 3, 7, 14, 28, 54 и 84 день). В качестве осадителей использовали те же растворы из наборов *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 1* и *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 2*, как и при исследовании растворов с помощью МУРР. Кристаллизацию лизоцима осуществляли при двух концентрациях белка: 20 и 40 мг/мл. Обратим внимание, что исследование растворов методом МУРР было проведено при одной концентрации (20 мг/мл).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как упомянуто в ввводной части, кристаллизацию можно описать как фазовый процесс перехода вещества из жидкой фазы в твердую. Таким образом, кристаллизация представляет собой трехстадийный процесс (двухступенчатая кристаллизация), при котором раствор первоначально пребывает в жидком состоянии, затем образуется промежуточная фаза, а на завершающей стадии образуется твердая фаза.

Влияние концентрации осадителя на степень пересыщения и его связь с концентрацией октамеров

На степень пересыщения белкового раствора влияют несколько факторов, в число которых входят

Таблица 1. Олигомерный состав кристаллизационного раствора лизоцима (объемные доли мономеров, димеров и октамеров) с использованием NaCl в качестве осадителя, полученный методом МУРР

Концентрация NaCl, мг/мл	R_g , А	Мономер, %	Димер, %	Октамер, %	χ^2
30	21.0	85.6	10.3	4.1	1.46
25	20.7	87.3	8.9	3.8	1.41
20	20.3	88.8	7.7	3.5	1.30
15	19.5	92.0	5.1	2.9	1.43
5	15.5	95.2	4.5	0.3	1.78

Примечание. Измерения проводили при температуре 20°С. R_g – радиус инерции. χ^2 – качество приближения.

как физические параметры (например, температура), так и химические (концентрация осадителя и белка в растворе, химический состав раствора, в том числе природа осадителя). В рамках данной работы изучено влияние концентрации и типа осадителя на состав промежуточной фазы (содержание мономеров, димеров и октамеров, которые ее образуют). Результаты представлены в *табл. 1*.

Согласно уравнению (2) из [27], растворимость лизоцима (C_s) и концентрация NaCl (C_{NaCl}) в натрий-ацетатном буфере (рН 4.6) при температуре 293 К связаны следующим соотношением:

$$C_s = -0.0016C_{NaCl}^3 + 0.2146C_{NaCl}^2 - 9.6437C_{NaCl} + 148.06$$

Пересыщение (σ) связано с растворимостью (C_s) и концентрацией лизоцима в растворе (C) соотношением: $\sigma = C / C_s$ [24].

Расчитанный график зависимости пересыщения раствора лизоцима с зависимостью концентрации октамеров от концентрации NaCl в растворе представлен на *рис. 1*.

С увеличением концентрации NaCl увеличивается как пересыщение, так и объемная доля октамеров, причем пересыщение увеличивается не постепенно, а начиная с какого-то момента, почти экспоненциально. Точка наименьшего пересыщения и наибольшей растворимости при концентрации NaCl 5 мг/мл соответствует наименьшей объемной доли октамеров (0.3%), что делает кристаллизацию маловероятной.

С увеличением концентрации NaCl (от 15 до 30 мг/мл) объемная доля октамеров в растворе увеличивается с 2.9 до 4.1%. В то же время с увеличением концентрации осадителя быстро увеличивается степень пересыщения, что указывает на ее неста-

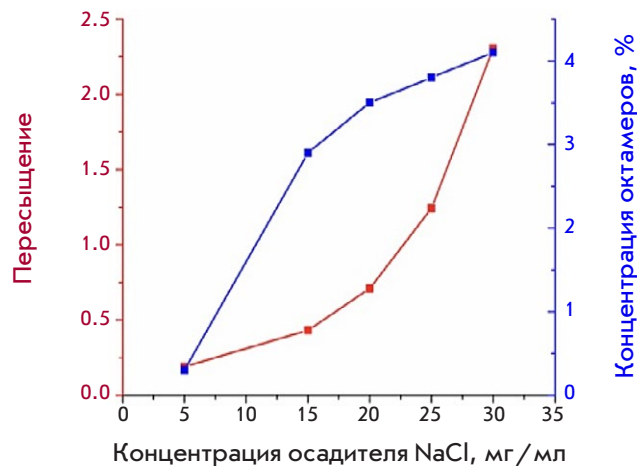


Рис. 1. Пересыщение лизоцима (красная кривая) и объемная доля октамеров (синяя кривая) в растворе лизоцима при разных концентрациях NaCl

бильность, где даже небольшое изменение внешних условий способно сильно повлиять на степень пересыщения раствора. Иными словами, в области, где объемная доля октамеров превышает 4%, вероятность появления монокристаллов должна уменьшаться, а вероятность агрегации или появления аморфного осадка, наоборот, увеличиться.

Сопоставление результатов перехода в твердую фазу с концентрацией октамеров

Обработка полученных данных МУРР (олигомерный состав растворов, радиус инерции (R_g) и значение невязки χ^2) от кристаллизационных растворов с наборами осадителей CS1 и CS2 приведена в *табл. 2–4*. В каждом случае указан химический состав осадителей и результат кристаллизации, который в нашем случае мог быть представлен одним из четырех вариантов:

- пустые капли (нет кристалла, результат «нет»);
- кристалл вырос при исследованной концентрации 20 мг/мл хотя бы в одной капле (результат «кристалл»);
- произошла агрегация (массовая кристаллизация, результат «агрегация»);
- произошла денатурация (образовался аморфный осадок, результат «денатурация»).

Из всех 67 исследованных растворов таких случаев 55.

При использовании остальных 12 осадителей (CS1 13, CS1 55, CS2 16, CS2 14, CS2 15, CS1 36, CS1 26, CS1 54, CS1 38, CS1 40, CS1 12, CS1 52) кристалл не вырос в растворе с концентрацией белка 20 мг/мл, но вырос при концентрации 40 мг/мл в растворе с этим же осадителем. В подавляющем

Таблица 2. Результаты исследования олигомерного состава кристаллизационных растворов лизоцима с осадителями из наборов для кристаллизации CS1 и CS2, полученные методом МУРР

№	Осадитель	$R_g, \text{ \AA}$	Димер, %	Октамер, %	χ^2	Результат кристаллизации	Состав раствора осадителя
1	CS1 1	14.3	0	0	3.26	Нет	0.01 М хлорид кобальта 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 1.0 М 1,6-гександиол
2	CS1 10	15.5	9.3	0	1.37	Нет	0.2 М хлорид магния 0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 30% (v/v) изопропанол
3	CS1 11	15.0	5.4	0	1.25	Нет	0.2 М ацетат аммония 0.1 М Трис-HCl pH 8.5 30% (v/v) изопропанол
4	CS1 14	14.3	0	0	6.97	Нет	25% (v/v) этиленгликоль
5	CS1 15	14.3	0	0	2.24	Нет	0.02 М хлорид кальция 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 30% (v/v) MPD (2-метил-2,4-пентандиол)
6	CS1 16	14.5	1.7	0	1.18	Нет	0.2 М хлорид натрия 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 30% (v/v) MPD
7	CS1 17	16.3	18.4	0	1.2	Нет	0.2 М ацетат аммония 0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6 30% (v/v) MPD
8	CS1 2	16.3	18.4	0	1.69	Нет	0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6 2.5 М 1,6-гександиол
9	CS1 21	15.6	10.9	0	1.43	Нет	0.2 М фосфат аммония 0.1 М Трис pH 8.5 50% (v/v) MPD
10	CS1 23	14.3	0	0	2.17	Нет	0.1 М Трис pH 8.5 25% (v/v) Трет-бутанол
11	CS1 25	16	14.9	0	1.71	Нет	0.4 М фосфат аммония
12	CS1 3	14.3	0	0	1.08	Нет	0.2 М хлорид магния 0.1 М Трис pH 8.5 3.4 М 1,6-гександиол
13	CS1 51	14.3	0	0	7.41	Нет	35% (v/v) диоксан
14	CS1 61	14.5	1.2	0	1.15	Нет	0.2 М формиат магния
15	CS1 18	14.3	0	0	1.17	Нет	0.2 М ацетат магния 0.1 М какодилат натрия pH 6.5 30% (v/v) MPD
16	CS1 20	17.1	25.9	0.1	1.73	Нет	0.5 М сульфат аммония 0.1 М HEPES pH 7.5 30% (v/v) MPD
17	CS1 24	17.6	33.5	0.1	3.06	Нет	0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6 35% (v/v) Трет-бутанол
18	CS1 9	18	39.3	0.1	3.76	Нет	0.2 М тринатрий цитрат 0.1 М какодилат натрия pH 6.5 30% (v/v) изопропанол
19	CS2 13	14.3	0	0.1	1.35	Нет	0.3 М формиат магния 0.1 М Bis-Трис pH 5.5
20	CS1 56	17.5	20.8	0.6	1.14	Нет	0.1 М HEPES pH 7.5 20% (v/v) Джеффамин М-600
21	CS1 35	17.1	14.2	0.6	1.18	Нет	1.0 М имидазол pH 7
22	CS1 6	16	3.9	0.6	1.08	Нет	0.2 М хлорид кальция 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 20% (v/v) изопропанол
23	CS1 8	18.1	29.6	0.7	1.76	Нет	0.2 М тринатрий цитрат 0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 20% (v/v) изопропанол

Примечание. Образцы расположены в порядке увеличения объемной доли октамеров (от 0 до 0.7%).

Таблица 3. Результаты изучения олигомерного состава кристаллизационных растворов лизоцима с осадителями из наборов для кристаллизации CS1 и CS2, полученные методом МУРР

№	Осадитель	$R_g, \text{ \AA}$	Димер, %	Октамер, %	χ^2	Результат кристаллизации	Состав раствора осадителя
24	CS1 39	17.4	14.8	0.9	1.32	Кристалл	0.05 М сульфат кадмия 0.1 М HEPES pH 7.5 1.0 М ацетат натрия
25	CS2 17	18.5	28.9	1	1.08	Агрегация	1.26 М фосфат натрия 0.14 М фосфат калия
26	CS1 62	18.3	25.1	1	1.25	Кристалл	0.1 М MES pH 6.5 1.6 М сульфат магния
27	CS1 46	18.3	24.5	1.1	1.17	Кристалл	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 0.8 М фосфат натрия 0.8 М фосфат калия
28	CS1 50	18.3	20.5	1.2	1.28	Агрегация	1.6 М сульфат аммония 0.1 М MES pH 6.5 10% (v/v) диоксан
29	CS1 27	19.2	29.1	1.6	1.26	Кристалл	0.1 М Трис-HCl pH 8.5 2.0 М фосфат аммония
30	CS1 37	19.1	24.5	1.7	1.28	Кристалл	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 0.8 М К/Na тартрат
31	CS1 58	19.5	28	1.9	1.28	Нет	0.01 М хлорид никеля 0.1 М Трис pH 8.5 1.0 М сульфат лития
32	CS1 28	19.2	19.2	2	1.2	Кристалл	0.1 М HEPES pH 7.5 2.0 М формиат аммония
33	CS1 59	19.6	27.7	2.1	1.34	Агрегация	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 1.5 М сульфат лития
34	CS1 32	19.7	23.6	2.3	1.25	Агрегация	0.1 М хлорид натрия 0.1 М HEPES pH 7.5 1.6 М сульфат аммония
35	CS1 22	21.1	66.8	2.5	12.72	Кристалл	0.1 М HEPES pH 7.5 70% (v/v) MPD
36	CS2 22	19.9	22.8	2.5	1.18	Кристалл	0.8 М янтарная кислота pH 7.0
37	CS1 33	20.1	23.9	2.7	1.26	Агрегация	0.01 М хлорид кобальта 0.1 М MES pH 6.5 1.8 М сульфат аммония
38	CS2 18	20.5	32.6	2.9	1.14	Агрегация	0.49 М фосфат натрия 0.91 М фосфат калия
39	CS1 4	20.7	25.1	3.3	1.22	Агрегация	2.0 М сульфат аммония 5% (v/v) изопропанол
40	CS1 57	20.8	27.6	3.4	1.27	Агрегация	0.5 М сульфат аммония 0.1 М цитрат натрия pH 5.6 1.0 М сульфат лития
41	CS1 30	21.1	24.6	3.8	1.23	Агрегация	0.1 М Трис-HCl pH 8.5 2.0 М сульфат аммония
42	CS2 19	21.4	29.8	4	1.06	Агрегация	0.056 М фосфат натрия 0.91 М фосфат калия
43	CS1 29	21.3	23.7	4	1.09	Агрегация	0.1 М ацетат натрия pH 4.6 2.0 М сульфат аммония
44	CS1 60	21.4	23	4.2	1.18	Нет	0.1 М BICINE pH 9.0 2.0 М хлорид магния
45	CS1 31	21.5	24.6	4.3	1.2	Агрегация	2.0 М сульфат аммония
46	CS1 47	21.6	22.4	4.4	1.13	Кристалл	0.1 М ацетат натрия pH 4.6 2.0 М формиат натрия

Примечание. Образцы расположены в порядке увеличения объемной доли октамеров (от 0.9 до 4.4%).

Таблица 4. Результаты изучения олигомерного состава кристаллизационных растворов лизоцима с осадителями из наборов для кристаллизации CS1 и CS2, полученные методом МУРР

№	Осадитель	$R_g, \text{Å}$	Димер, %	Октамер, %	χ^2	Результат кристаллизации	Состав раствора осадителя
47	CS1 43	18	0	4.9	23.69	Денатурация	0.1 М HEPES pH 7.5 4.3 М хлорид натрия
48	CS2 21	22.3	35.9	5.1	1.27	Денатурация	1.8 М цитрат аммония pH 7.0
49	CS1 42	22.2	24.4	5.2	1.15	Агрегация	0.1 М фосфат натрия 0.1 М фосфат калия 0.1 М MES pH 6.5 2.0 М хлорид натрия
50	CS1 41	22.8	21.3	6.2	1.12	Агрегация	0.1 М ацетат натрия pH 4.62 М хлорид натрия
51	CS2 24	23.4	23.9	7.1	1.13	Денатурация	2.8 М ацетат натрия pH 7.0
52	CS1 34	23.5	25.1	7.4	1.17	Денатурация	0.2 М K/Na тартрат 0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6
53	CS1 44	26.2	15.1	13.5	1.17	Денатурация	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 1.4 М тринатрий цитрат
54	CS1 45	26.8	20.5	16	1.42	Денатурация	1.6 М тринатрий цитрат pH 6.5
55	CS1 48	28.2	0	21.1	18.85	Денатурация	4.0 М формиат натрия

Примечание. Образцы расположены в порядке увеличения объемной доли октамеров (от 4.9 до 21.1%).

большинстве случаев кристалл зафиксирован через очень длительный промежуток времени (по истечении 28–56 дней) либо был зафиксирован всего лишь в одной капле из трех.

Крайне важно отметить, что во всех случаях, когда в растворе отсутствовали октамеры (присутствовали только мономеры и димеры), кристаллы не были обнаружены; также не зафиксированы ни агрегация, ни денатурация (все три капли оставались визуально чистыми в течение всего времени съемки). Наряду с ранее проведенными исследованиями методом малоуглового рассеяния нейтронов [13] и найденной высотой ступеней роста грани (110) кристаллов сингонии тетрагональной сингонии – 6 нм [28, 29], можно утверждать, что именно **образование октамеров является ключевым этапом в процессе кристаллизации лизоцима** [10], а димеры не могут быть ключевым элементом белкового кристалла.

В целом суммарно мы можем выделить три случая, отражающих различный олигомерный состав кристаллизационного раствора и соответствующих разным участкам фазовой диаграммы:

- 1) в растворе присутствуют только мономеры (нижняя точка ненасыщенной области);
- 2) в растворе присутствуют мономеры и димеры (ненасыщенная область – приближение к насыщению);

3) в растворе присутствуют мономеры, димеры и октамеры, причем концентрация октамеров изменяется приблизительно следующим образом в зависимости от степени пересыщения (всего четыре интервала):

1. от 0 до 1% – в растворе отсутствуют кристаллы и другие твердые образования;
2. от 1 до 5% – наблюдается рост монокристаллов и агрегация;
3. от 5 до 7% – наблюдается агрегация или денатурация (аморфное образование);
4. более 7% – наблюдается только денатурация.

На рис. 2 показаны пять экспериментальных кривых МУРР для раствора лизоцима с осадителями CS1 18 (№ 15 в табл. 2), CS1 17 (№ 7 в табл. 2), CS1 28 (№ 32 в табл. 3), CS1 31 (№ 45 в табл. 3) и CS1 45 (№ 54 в табл. 4). Эти кривые представляют разные случаи олигомерного состава раствора лизоцима и результат кристаллизации. В случае CS1 18, где в растворе наблюдались только мономеры, были пустые капли (не образуются кристаллы или другая твердая фаза). В случае CS1 17 (присутствуют мономеры и димеры, тогда как октамеры в растворе не обнаружены) также была пустая капля (результат «нет»). В случае CS1 28 (мономеры, димеры и октамеры обнаружены в растворе), при кристаллизации рос кристалл (результат «кристалл»). В CS1 31 и CS1 45, в кристаллизационных раство-

рах которых наблюдались мономеры, димеры и октамеры, произошли агрегация и денатурация (CS1 31 и CS1 45 соответственно).

Зависимость вероятности роста кристаллов от концентрации кластеров-прекурсоров в кристаллизационном растворе

После приготовления кристаллизационного раствора белка существует несколько путей «эволюции» состояния этого раствора в зависимости от степени пересыщения:

- 1) в белковом растворе после добавления осадителя не образуются кластеры – прекурсоры, т.е. не происходит формирования промежуточной фазы и, следовательно, формирования какой-либо твердой фазы, в том числе и монокристаллов (наряду с мономерами в растворе могут присутствовать димеры (ненасыщенная область – приближение к насыщению));
- 2) в растворе образуются кластеры-прекурсоры, формируется промежуточная фаза, которая затем переходит в рост кристалла;
- 3) степень пересыщения раствора становится настолько высокой и концентрация кластеров-прекурсоров настолько повышается, что в растворе происходит агрегация (состояние, которое может перейти и в кристалл);
- 4) степень пересыщения превышает предельное значение, и белок в растворе переходит в аморфное состояние, в котором может происходить даже частичная денатурация.

Сравнение результатов измерения концентрации октамеров и особенностей перехода лизоцима из раствора в твердую фазу показывает их взаимосвязь. При отсутствии в растворе октамеров (когда в растворе зафиксированы только мономеры и димеры) и при концентрации октамеров ниже 1% не наблюдалось образование ни монокристаллов лизоцима, ни какой-либо другой твердой или аморфной фазы. В интервале концентраций октамеров 1–5% наблюдается кристаллизация и агрегация, причем образование монокристаллов происходит преимущественно в диапазоне концентрации октамеров от 2 до 3%. При концентрации октамеров от 5 до 7% наблюдается агрегация или денатурация (аморфное образование), выше 7% – только денатурация белка (образование аморфных осадков).

Поэтому преобразуем данные к другому виду. Рассмотрим вероятность успешного роста кристаллов при различных долях октамеров в растворе, округлив доли октамеров до целого числа (с помощью стандартной встроенной функции Excel). Рассмотрим следующие случаи, для которых будем рассчитывать вероятность: первый случай – рост

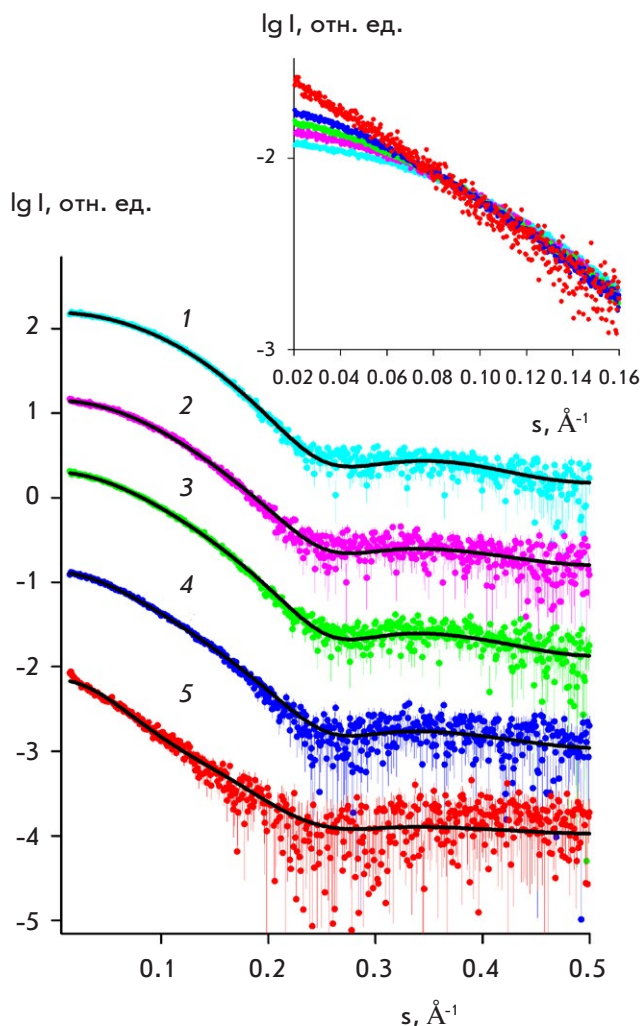


Рис. 2. Экспериментальные кривые МУРП (цветные линии) для кристаллизационных растворов лизоцима и (черные линии) теоретические приближения смесью олигомеров, рассчитанные с использованием программы OLIGOMER для следующих растворов: 1 – лизоцим с осадителем CS1 18 (только мономеры, нет кристалла), 2 – лизоцим с осадителем CS1 17 (димеры и мономеры, без кристалла), 3 – лизоцим с осадителем CS1 28 (мономеры, димеры и октамеры, кристалл), 4 – лизоцим с осадителем CS1 31 (мономеры, димеры и октамеры, агрегация), 5 – лизоцим с осадителем CS1 45 (мономеры, димеры и октамеры, денатурация). Кривые смещены по вертикальной оси для лучшей визуализации

кристалла при 20 мг/мл, второй – появление видимой агрегации (массовая кристаллизация) и третий – выпадение аморфного осадка (денатурация). Тогда вероятность будет рассчитываться как отношение числа успехов (когда в капле наблюдался какой-то из трех случаев, перечисленных выше) к числу всех случаев с данной долей октамеров (табл. 5).

Таблица 5. Вероятности, рассчитанные для роста кристалла при 20 мг/мл, появления видимой агрегации (массовая кристаллизация) и денатурации

Доля октамеров (округленная до целого числа), %	Всего случаев	Кристалл		Агрегация		Денатурация	
		Успех	Вероятность	Успех	Вероятность	Успех	Вероятность
0	24	0	0	0	0	0	0
1	12	3	0.25	2	0.16667	0	0
2	7	3	0.42857	2	0.28571	0	0
3	8	2	0.25	4	0.5	0	0
4	6	1	0.16667	4	0.66667	0	0
5	3	0	0	1	0.33333	2	0.66667
6	2	0	0	1	0.5	0	0
7	2	0	0	0	0	2	1
14	1	0	0	0	0	1	1
16	1	0	0	0	0	1	1
21	1	0	0	0	0	1	1

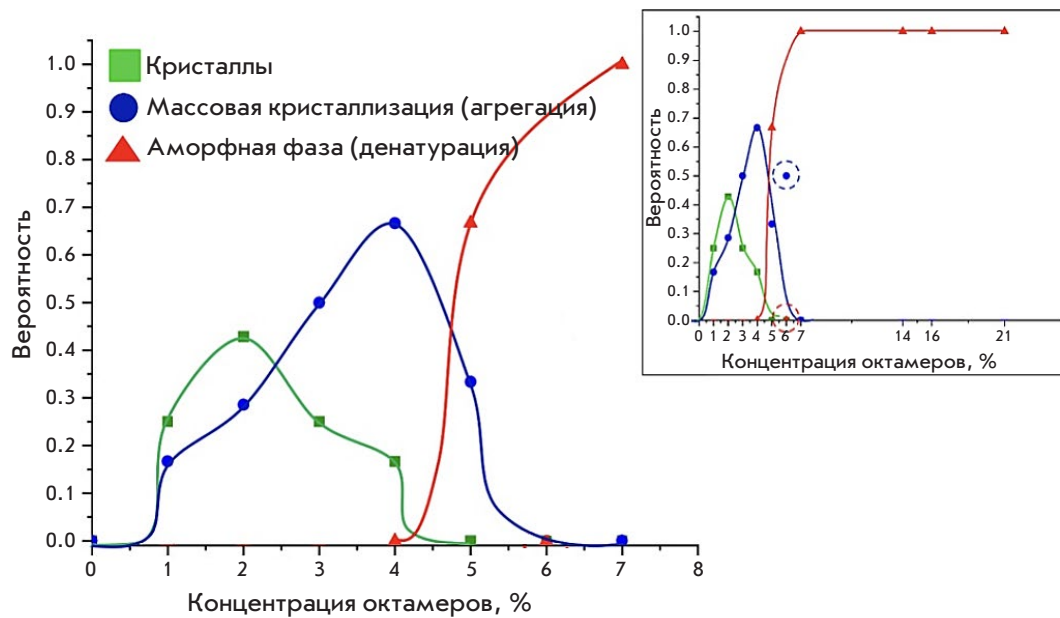


Рис. 3. Общие закономерности, отражающие поведение изменений вероятности роста кристалла, агрегации и денатурации лизоцима, в зависимости от целочисленной доли октамеров (на вставке интервал доли октамеров увеличен до 21%), в разных случаях образования конденсированной фазы: кристаллы (зеленая линия), массовая кристаллизация (синяя линия) и аморфный осадок/денатурация (красная линия)

Максимальная вероятность появления кристалла лизоцима приходится на интервал концентраций октамеров 2–3% (рис. 3). После 7% не наблюдается ни образования кристаллов, ни агрегации, вероятность денатурации в этих случаях равна 1. В целом, общая закономерность между образованием определенной конденсированной фазы в результате кристаллизации и концентрацией октамеров в растворе выглядит следующим образом: при объемной доле октамеров в растворе от 0 до 1% вероятность образования какой-либо твердой фазы равняется 0. При повышении объемной доли октамеров увеличивается вероятность образования кристаллов и агрегации, причем максимальная вероятность появления

кристалла наблюдается при концентрации октамеров 2%, а максимальная вероятность агрегации сдвигается в сторону больших концентраций октамеров и соответствует 4%. Вероятность появления аморфного состояния достигает своего максимума при концентрации октамеров больше 7%.

Отметим, что на данных, представленных на рис. 3, две точки, соответствующие округленной доле октамеров 6%, мы не включили в общие кривые вероятности для агрегации и денатурации. Причина, почему эти точки не вписались в кривые, может быть в маленькой статистике (всего два случая).

В разделе «Влияние концентрации осадителя на степень пересыщения и его связь с концентра-

цией октамеров», где проведено сравнение концентрации октамеров в зависимости от концентрации NaCl со степенью пересыщения и растворимостью, говорилось, что с увеличением концентрации NaCl (от 15 до 30 мг/мл) доля октамеров в растворе увеличивается от 2.9 до 4.1%. Исходя из изменения степени пересыщения с увеличением концентрации NaCl, было показано, что в области, где концентрация октамеров превышает 4%, вероятность появления монокристаллов должна снизиться, а вероятность агрегации или появления аморфного осадка, наоборот, увеличиться. Именно такое поведение вероятности мы и наблюдаем на рис. 3, где при концентрации октамеров больше 4% вероятность роста кристаллов снизилось до 0, а вероятности агрегации и денатурации начали увеличиваться.

Исходя из сопоставления полученных графиков с областями на фазовой диаграмме мы можем сказать, что концентрация октамеров 0% (в растворе присутствуют только мономеры или димеры и мономеры) соответствует ненасыщенной области на фазовой диаграмме. С увеличением объемной доли октамеров увеличивается степень пересыщения, и область концентрации октамеров 1–5% приходится на зону нуклеации. Концентрация октамеров более 5% приходится на зону осаждения.

ВЫВОДЫ

Параллельное измерение концентрации олигомеров и образования твердой фазы в 67 растворах белка лизоцима показывает:

- при малых концентрациях октамеров (меньше 0.8%) кристаллы не образуются;
- при концентрации октамеров в диапазоне от 0.7 до 4% образуются или отдельные кристаллы или происходит массовая кристаллизация (агрегация), причем вероятность агрегации растет с ростом концентрации кластеров-прекурсоров (степени пересыщения раствора);
- начиная с 6% октамеров, резко возрастает вероятность получения аморфной (денатурированной) фазы.

На основании предыдущих результатов о взаимосвязи концентрации октамеров в растворе лизоцима на начальной стадии кристаллизации и результатов кристаллизации, которые могли быть монокристаллами, агрегатами или аморфными образованиями, можно сказать, что концентрация наноразмерных кластеров-прекурсоров (в данном случае октамеров лизоцима) в растворе на начальной стадии кристаллизации связана с тем, в какую форму твердой фазы белковый раствор трансформируется окончательно (рис. 4). Полученные данные позволяют сопоставить процессы, происходящие

в области 3–20 нм, когда образуется промежуточная фаза кластеров-прекурсоров из 3D-кластеров с результатами перехода к твердой фазе (для размеров 1–10 мкм).

Как отмечено выше, концентрация кластеров-прекурсоров определяет вид твердой фазы. За рамками настоящей работы остался собственно переход от кластеров к кристаллам или к аморфной фазе. К настоящему времени это наименее исследованная область. Со времен Фарадея известно, что переохлажденная жидкость может существовать неопределенное время, не переходя в твердое состояние. Обычно этот переход инициируется градиентами температур и концентраций, внесением посторонних объектов, способных играть роль затравки и т.п. В настоящей работе кристаллизация проводилась в условиях градиента концентраций, но при этом образование твердой фазы происходило спустя почти 3 месяца после приготовления раствора.

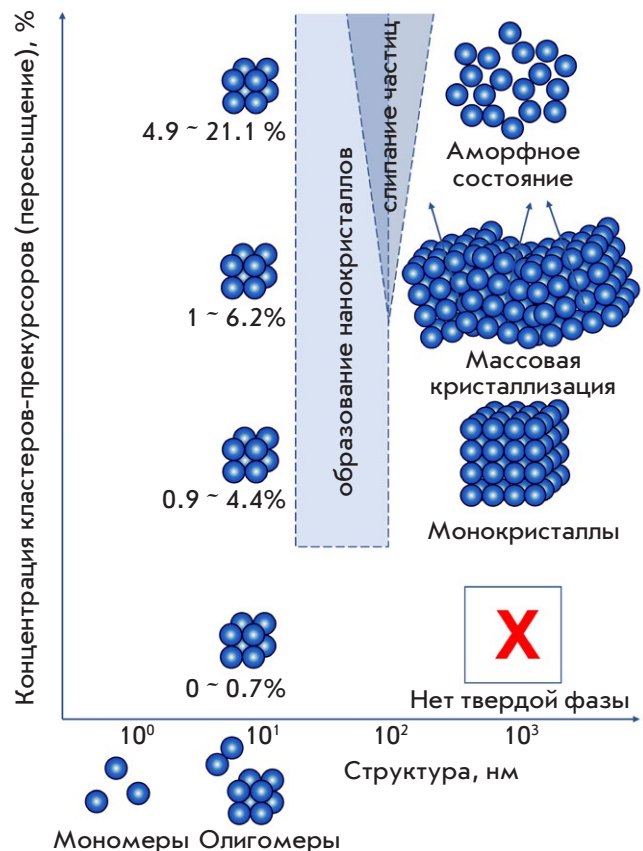


Рис. 4. Полиморфизм структур, формирующихся в процессе кристаллизации, в зависимости от концентрации кластеров-прекурсоров на примере белка лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной сингонии

Тем не менее результат настоящей работы позволяет предсказывать вид твердой фазы на ранней стадии приготовления раствора (расплава) по изменению (или вычислению) концентрации кластеро-прекурсоров.

Также за рамками работы остается процесс зародышеобразования [30], однако полученные результаты могут быть полезными и в понимании этого процесса. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника»

РАН в части исследования начальной стадии кристаллизации лизоцима во внешних условиях (различные условия по составу и концентрации осадителей) на линии ВМ29 в Европейском центре синхротронного излучения и обработки экспериментальных данных МУРР, в рамках выполнения работ по гранту № 075-15-2021-1362 в части обработки экспериментальных данных МУРР и анализа результатов кристаллизации и Консорциума iNEXT [6938] в части «обеспечения финансовой поддержки сбора данных МУРР на линии Р12, управляемой EMBL Hamburg на кольце PETRA III».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gebauer D., Kellermeier M., Gale J.D., Bergström L., Cölfen H. // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43. P. 2348–2371.
- Асхабов А.М. // Записки российского минералогического общества. 2019. Т. 148. № 6. С. 1–13.
- Karthika S., Redhakrishnan T.K., Kalaichelvi P. // Cryst. Growth Des. 2016. V. 16. № 11. P. 6663–6681.
- Ivanov V.K., Fedorov P.P., Baranchikov A.Ye., Osiko V.V. // Rus. Chem. Rev. 2014. V. 83. № 12. P. 1204–1222.
- De Yoreo J.J., Gilbert P.U.P.A., Sommerdijk N.A.J.M., Penn R.L., Whitelam S., Joester D., Zhang H., Rimer J.D., Navrotsky A., Banfield J.F., et al. // Science. 2015. V. 349. № 6247. P. aaa6760-1-aaa6760-9.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28. № 1. P. 235–242.
- Krauss I.R., Merlino A., Vergara A., Sica F. // Int. J. Mol. Sci. 2013. V. 14. № 6. P. 11643–11691.
- McPherson A. // Methods. 2004. V. 34. № 3. P. 254–265.
- Vekilov P.G., Vorontsova M.A. // Acta Cryst. F. 2014. V. F270. P. 271–282.
- Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Yu.A., Gruzinov A.Yu., Marchenkova M.A., Peters G.S., Pisarevsky Yu.V., Timofeev V.I., Volkov V.V. // Cryst. Growth Des. 2016. V. 16. № 4. P. 1792–1797.
- Marchenkova M.A., Volkov V.V., Blagov A.E., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Tereschenko E.Yu., Timofeev V.I., Pisarevsky Yu.V., Kovalchuk M.V. // Cryst. Rep. 2016. V. 61. № 1. P. 5–10.
- Boikova A.S., D'yakova Yu.A., Il'ina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Marchenkova M.A., Blagov A.E., Pisarevskii Yu.V., Koval'chuk M.V. // Cryst. Rep. 2017. V. 62. № 6. P. 837–842.
- Boikova A.S., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Kuklin A.I., Marchenkova M.A., Nabatov B.V., Blagov A.E., Pisarevsky Yu.V., et al. // Acta Cryst. D. 2017. V. 73. № 7. P. 591–599.
- Dyakova Yu.A., Boikova A.S., Ilina K.B., Konarev P.V., Marchenkova M.A., Pisarevsky Yu.V., Timofeev V.I., Kovalchuk M.V. // Cryst. Rep. 2019. V. 64. № 1. P. 11–15.
- Marchenkova M.A., Konarev P.V., Boikova A.S., Ilina K.B., Pisarevsky Yu.V., Kovalchuk M.V. // Cryst. Rep. 2021. V. 66. № 5. P. 751–757.
- Kovalchuk M.V., Boikova A.S., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Marchenkova M.A., Pisarevsky Yu.V., Timofeev V.I. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. V. 37. № 12. P. 3058–3064.
- Boikova A.S., D'yakova Yu.A., Il'ina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Marchenkova M.A., Pisarevskii Yu.V., Koval'chuk M.V. // Cryst. Rep. 2018. V. 63. № 6. P. 865–870.
- Marchenkova M.A., Konarev P.V., Rakitina T.V., Timofeev V.I., Boikova A.S., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Korzhenevskiy D.A., Nikolaeva A.Yu., Pisarevsky Yu.V., et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020. V. 38. № 10. P. 2939–2944.
- Kovalchuk M.V., Alekseeva O.A., Blagov A.E., Ilyushin G.D., Il'ina K.B., Konarev P.V., Lomonov V.A., Pisarevsky Y.V., Peters G.S. // Cryst. Rep. 2019. V. 64. № 1. P. 6–10.
- Kordonskaya Yu.V., Timofeev V.I., Dyakova Yu.A., Marchenkova M.A., Pisarevsky Yu.V., Podshivalov D.D., Kovalchuk M.V. // Cryst. Rep. 2018. V. 63. № 6. P. 947–950.
- Kordonskaya Yu.V., Marchenkova M.A., Timofeev V.I., Dyakova Yu.A., Pisarevsky Y.V., Kovalchuk M.V. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2021. V. 39. № 18. P. 7223–7230.
- Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F., Graewert M.A., Kikhney A., Jeffries C.M., Franke D., Mark D., Zengerle R., Cipriani F. // J. Appl. Crystallogr. 2015. V. 48. P. 431–443.
- Round A., Felisaz F., Fodinger L., Gobbo A., Huet J., Villard C., Blanchet C.E., Pernot P., McSweeney S., Roessle M., et al. // Acta Cryst. D. 2015. V. D71. P. 67–75.
- Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H.D.T., Kikhney A.G., Hajizadeh N.R., Franklin J.M., Jeffries C.M. // J. Appl. Crystallogr. 2017. V. 50. P. 1212–1225.
- Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. // J. Appl. Crystallogr. 2003. V. 36. P. 1277–1282.
- Svergun D., Barberato C., Koch M.H.J. // J. Appl. Crystallogr. 1995. V. 28. P. 768–773.
- Chen R.-Q., Lu Q.-Q., Cheng Q.-D., Ao L.-B., Zhang C.-Y., Hou H., Liu Y.-M., Li D.-W., Yin D.-C. // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 1. P. 1–6.
- Wiechmann M., Enders O., Zeilinger C., Kolb H.-A. // Ultramicroscopy. 2001. V. 86. № 1–2. P. 159–166.
- Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I., Rashkovich L.N. // Cryst. Rep. 2002. V. 47. № S1. P. S149–158.
- Zhou R., Cao H., Zhang C., Yin D. // CrystEngComm. 2017. V. 19. P. 1143–1155.