

ДИФРАКЦИЯ И РАССЕЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

УДК 538.911

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КАТИОНА ОСАДИТЕЛЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ ОЛИГОМЕРОВ В КРИСТАЛЛИЗАЦИОННЫХ РАСТВОРАХ БЕЛКА ЛИЗОЦИМА

© 2019 г. Ю. А. Дьякова^{1,2}, А. С. Бойкова^{1,2}, К. Б. Ильина^{1,2,*}, П. В. Конарев^{1,2},
М. А. Марченкова^{1,2}, Ю. В. Писаревский^{1,2}, В. И. Тимофеев^{1,2}, М. В. Ковальчук^{2,1,3}

¹ Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ilina-ks@mail.ru

Поступила в редакцию 05.09.2018 г.

После доработки 05.09.2018 г.

Принята к публикации 13.09.2018 г.

Методом малоуглового рентгеновского рассеяния исследовано влияние типа катиона осадителя в ряду хлоридов (NaCl, KCl, LiCl, NiCl₂, CuCl₂, CoCl₂) на структуру растворов лизоцима в условиях, благоприятных для роста кристаллов тетрагональной сингонии. Изучено влияние концентрации осадителей на объемную долю олигомеров (димеров, октамеров), образующихся перед началом кристаллизации белка. В растворах лизоцима при добавлении осадителей обнаружено помимо мономеров заметное содержание димеров (3.5–13.1%) и октамеров (1.7–3.6%). Объемные доли всех олигомеров возрастают с увеличением концентрации осадителя и понижением температуры. В ряду одновалентных ионов объемная доля октамеров увеличивается в следующем порядке: K⁺ – Na⁺ – Li⁺, а для двухвалентных: Cu²⁺ – Ni²⁺ – Co²⁺.

DOI: 10.1134/S0023476119010065

ВВЕДЕНИЕ

Использование трехмерной структуры биологических макромолекул при исследовании механизма их функционирования является одной из важнейших областей современной биологии. Наличие структур макромолекул, определенных при высоком разрешении, обеспечивает глубокое понимание их функций и помогает понять процессы, происходящие в живой клетке. На сегодняшний день около 90% пространственных структур макромолекул, депонированных в белковый банк данных (Protein Data Bank), определено с использованием рентгеноструктурного анализа (РСА).

Для получения кристаллов, пригодных для исследования методом РСА, раствор макромолекул приводят к пересыщенному состоянию с помощью добавления осадителей (соли, полимеры), изменяя параметры раствора (концентрацию компонентов раствора, pH, температуру) [1].

В последнее время появился ряд работ, в которых методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) было исследовано влияние концентрации белка, температуры раствора, типа растворителя на начальную стадию кристаллизации белков. Предположение, что образуется предкри-

сталлизационная фаза из олигомеров белка, представляющая элемент его кристаллической структуры, было подтверждено для различных белков (лизоцим, протеиназа, термоллизин) [2–5].

До настоящего времени влияние катионов и анионов осадителя исследовалось для растворов лизоцима только с точки зрения изменения взаимодействия между молекулами белка. Было выявлено, что при одинаковой ионной силе раствора изменение взаимодействия молекул лизоцима не сильно зависит от природы катиона, а зависит от типа аниона. Растворимость лизоцима в присутствии разных типов анионов увеличивается в соответствии с лиотропным рядом Гофмейстера [6].

Однако остался вопрос о влиянии ионов металлов на процесс перехода монодисперсной системы в полидисперсную и собственно структуру полидисперсной системы. В настоящей работе проведено исследование влияния типа катиона осадителя из ряда хлоридов (NaCl, KCl, LiCl, NiCl₂, CuCl₂, CoCl₂) на концентрацию олигомеров (димеров, октамеров), образующихся перед началом появления тетрагональных кристаллов лизоцима.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы и подготовка образцов. Для приготовления образцов использовали белок лизоцим из куриного яйца производства Sigma-Aldrich (CAS# 12650-88-3). Для приготовления исследуемых растворов использовали следующие неорганические соли: NaCl (CAS# 7647-14-5, Helicon), KCl (CAS# 7447-40-7, abcr GmbH), LiCl (ТУ 6-09-3751-83, Лаверна Стройинжиниринг), CoCl₂ (CAS# 7791-13-1, Alta Aesar), NiCl₂ (CAS# 7791-20-0, Alta Aesar) и CuCl₂ (CAS# 7447-39-4, Acros Organics). Все растворы были приготовлены с использованием ультрачистой воды Millipore (сопротивление воды 18 Мом · см). Белок и соли растворяли в 0.2 М натрий-ацетатном буфере с pH 4.5. Растворы солей фильтровали с помощью мембранных шприцевых фильтров Millex с размером пор 0.22 мкм, раствор белка центрифугировали в течение 10 мин с частотой 10 000 об./мин.

Начальная концентрация в растворе белка — 40 мг/мл, начальные концентрации всех солей в растворах — 0.4, 0.2 и 0.1 М. Перед проведением измерений методом МУРР растворы лизоцима и солей смешивали друг с другом в равных объемах. Таким образом, концентрация лизоцима во всех растворах была 20 мг/мл, а осадителя — 0.2, 0.1 и 0.05 М.

Методика МУРР-измерений. Измерения проводились на станции BM29 BioSAXS [7] Европейского источника синхротронного излучения (Гренобль, Франция) с энергией 12.4 кэВ с использованием двухкоординатного детектора Pilatus 1М. Расстояние образец–детектор составляло 2.9 м.

Исследуемые образцы помещались в специальную термостатируемую роботизированную систему [8] в кюветы из полистирола объемом 200 мкл, нагрев которых осуществлялся одновременно. Первоначально образцы нагревались до 20°C, затем температура понижалась до 10°C. Далее раствор из кюветы с помощью робота помещали в проточный кварцевый капилляр диаметром 1.8 мм, который использовался 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 было сделано 10 съемок. Время экспозиции каждого измерения составляло 1 с, сечение пучка на образце — 700 мкм².

Методика обработки экспериментальных данных. Первичная обработка экспериментальных малоугловых данных (радиальное усреднение, нормировка на интенсивность прошедшего пучка, проверка на наличие радиационного повреждения, поправка на чувствительность детектора) проводилась с помощью автоматической системы обработки данных “SaxsAnalysis” станции

BM29 [9]. Следующие этапы обработки (усреднение сигнала от буфера раствора, вычитание усредненного сигнала от буфера из данных рассеяния белками и нормировка на концентрацию белков) выполнялись с помощью программы PRIMUS [10], входящей в программный пакет ATSAS [11–13]. В результате получены обработанные экспериментальные зависимости интенсивности I МУРР от модуля вектора рассеяния s ($s = 4\pi \sin\theta/\lambda$, 2θ — угол рассеяния, λ — длина волны) для растворов белка лизоцима при различных условиях. Угловой диапазон составлял $0.03 < s < 5.0 \text{ нм}^{-1}$. Радиационного повреждения на исследуемых образцах обнаружено не было.

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

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

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

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

Чтобы получить более детальное структурное описание системы, кривые МУРР обрабатывались с помощью программы OLIGOMER [10] с целью определения объемных долей мономеров и олигомеров более высокого порядка для тетрагонального лизоцима. Расчет теоретических кривых олигомерных компонент проводился с помощью программы CRY SOL [14]. В качестве мономерной компоненты взяли известную структуру мономера лизоцима (PDB_ID: 4WLD), а модели димера, тетрамера, гексамера и октамера изготовили по методике, описанной в [2].

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

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

где N — число экспериментальных точек, c — шкалирующий коэффициент, $I_{\text{calc}}(s)$ и $\sigma(s_j)$ — расчи-

танная интенсивность и ошибка экспериментальной интенсивности в соответствующих угловых узлах s_j .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Радиусы инерции и распределение фракций в растворе при добавлении различных осадителей, определенные по экспериментальным данным МУРР с использованием программы OLIGOMER, приведены в таблице. Рассчитанные кривые МУРР от олигомерных смесей для растворов белка с осадителем хорошо совпадают с экспериментальными данными во всем угловом диапазоне, значения невязки χ^2 не превышают 1.5 (рис. 1).

Из приведенных в таблице экспериментальных данных видно, что для всех исследованных случаев из возможных конфигураций олигомеров (димеров, тетрамеров, гексамеров, октамеров и других более крупных образований) в растворе присутствуют только димеры и октамеры. Это хорошо согласуется с предыдущими измерениями растворов лизоцима с осадителем NaCl [2–4] и недавно проведенными расчетами стабильности октамера в растворе лизоцима с осадителем NaCl методом молекулярной динамики [15].

Зависимости радиуса инерции частиц и объемных долей димеров и октамеров лизоцима в предкристаллизационных растворах от типа осадителя и температуры показаны на рис. 2. Как видно на рис. 2а, 2б, характер зависимости радиуса инерции частиц от типа осадителя хорошо коррелирует с объемной долей октамеров в растворе, что подтверждает чувствительность вклада крупных частиц в среднее экспериментальное значение радиуса инерции частиц в смеси даже при наличии только небольшой их доли в растворе. Отметим, что доля октамеров возрастает в одновалентном ряду щелочных ионов (Li^+ , Na^+ , K^+) с увеличением ионного радиуса, что согласуется с увеличением адсорбционной активности ионов в лиотропном ряду Гофмейстера [16].

Общей чертой проведенных измерений является рост концентрации олигомеров по мере повышения концентрации осадителей и понижения температуры, что является следствием увеличения степени пересыщения раствора.

Сравнение влияния исследованных осадителей на концентрацию димеров показывает четкое различие между хлоридами щелочных металлов и хлоридами металлов переходной группы. Концентрации димеров в первой группе заметно больше, чем во второй (рис. 2в).

Различие этих групп связано, во-первых, с существенной разницей концентрации хлора, так как при одинаковой молярной концентрации соли концентрация ионов хлора в 2 раза выше для двухвалентных металлов, чем для одновалентных.

Олигомерный состав растворов лизоцима с осадителями из ряда хлоридов для концентрации осадителей 0.05 (курсив), 0.1 (обычный шрифт) и 0.2 М (жирный шрифт) при температурах 20 и 10 °С

Осадитель	T , °С	KCl	NaCl	LiCl	CoCl ₂	NiCl ₂	CuCl ₂
R_g , Å	20	14.4	14.4	14.5	14.7	14.3	14.3
		15.6	15.9	15.3	16.8	16.4	14.3
		18.4	18.2	18.2	19.3	18.7	16.6
	10	14.7	14.8	14.8	15.0	14.7	14.3
		15.9	15.8	15.9	18.0	17.4	14.4
		19.3	19.0	18.8	20.4	19.5	17.9
Димеры, %	20	0.6	1.1	1.2	0.3	0.0	0.0
		4.5	4.9	6.2	0.0	0.0	0.0
		5.0	5.4	7.3	0.8	1.9	0.0
	10	3.3	3.8	3.4	4.3	3.3	0.0
		9.3	10.1	10.5	4.4	3.7	0.1
		10.5	10.6	13.1	8.2	7.9	3.5
Октамеры, %	20	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
		0.3	0.1	0.1	1.2	1.0	0.0
		1.9	1.8	1.7	2.9	2.4	1.1
	10	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
		0.3	0.1	0.2	1.7	1.4	0.0
		2.4	2.2	1.9	3.6	2.8	1.7
χ^2	20	1.40	1.47	1.44	1.32	1.41	1.39
		1.44	1.23	1.45	1.25	1.03	1.38
		1.15	1.23	1.44	0.91	1.03	1.28
	10	1.36	1.46	1.05	1.35	1.39	1.31
		1.50	1.48	1.47	1.35	1.30	1.45
		1.47	1.48	1.49	1.31	1.01	1.15

Примечание. Концентрация белка лизоцима составляла 20 мг/мл. R_g — средний экспериментальный радиус частиц, χ^2 — качество приближения экспериментальных данных с помощью модели от смеси мономеров, димеров и октамеров лизоцима. Объемная доля мономеров, присутствующих в растворе лизоцима, равна доле, остающейся после вычитания суммарной доли димеров и октамеров.

Во-вторых, с возможным влиянием металлов второй группы на взаимодействие между молекулами белка.

В отличие от ситуации с димерами концентрации октамеров для двух групп катионов различаются незначительно и находятся в пределах 2–3% (таблица), за исключением CuCl_2 , где концентрация октамеров заметно ниже и составляет 1.1–1.7%.

Для солей двухвалентных металлов концентрация октамеров приблизительно в 1.5 раза выше по сравнению с растворами солей одновалентных металлов. При одинаковой молярной концентрации осадителя содержание ионов хлора в случае двухвалентных металлов в 2 раза выше,

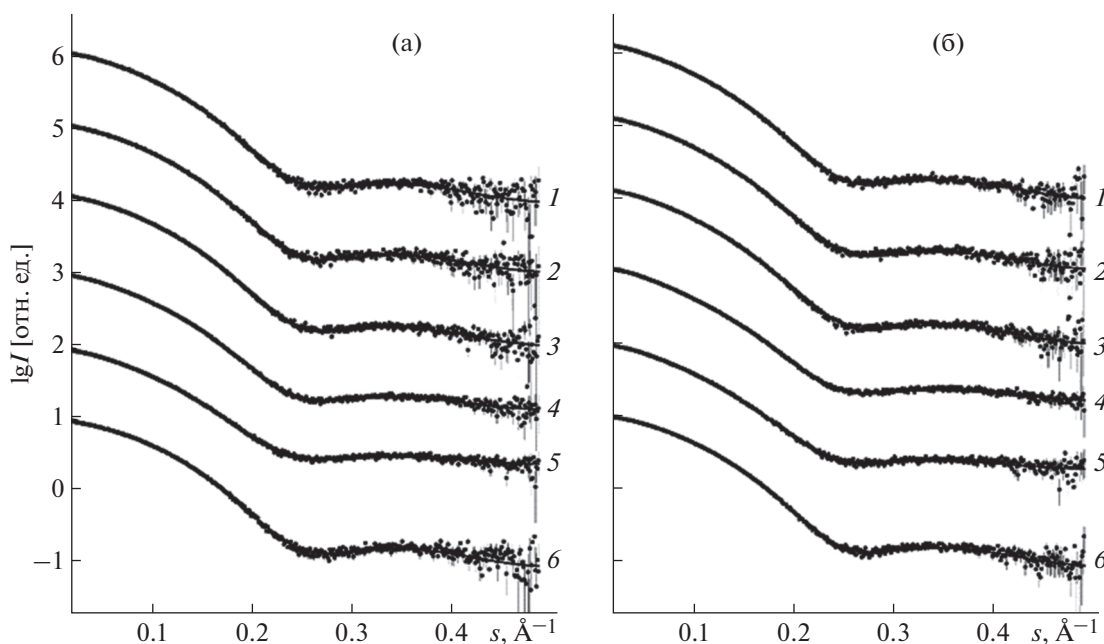


Рис. 1. Экспериментальные кривые интенсивности МУРР (точки) и модельные кривые (линии), рассчитанные с помощью программы OLIGOMER, при температурах 20 (а) и 10°C (б) от растворов тетрагонального лизоцима с различными осадителями: NaCl (1), KCl (2), LiCl (3), CoCl₂ (4), NiCl₂ (5), CuCl₂ (6). Концентрация белка составляла 20 мг/мл, концентрация осадителей – 0.2 М. Кривые смещены по вертикали для лучшей визуализации.

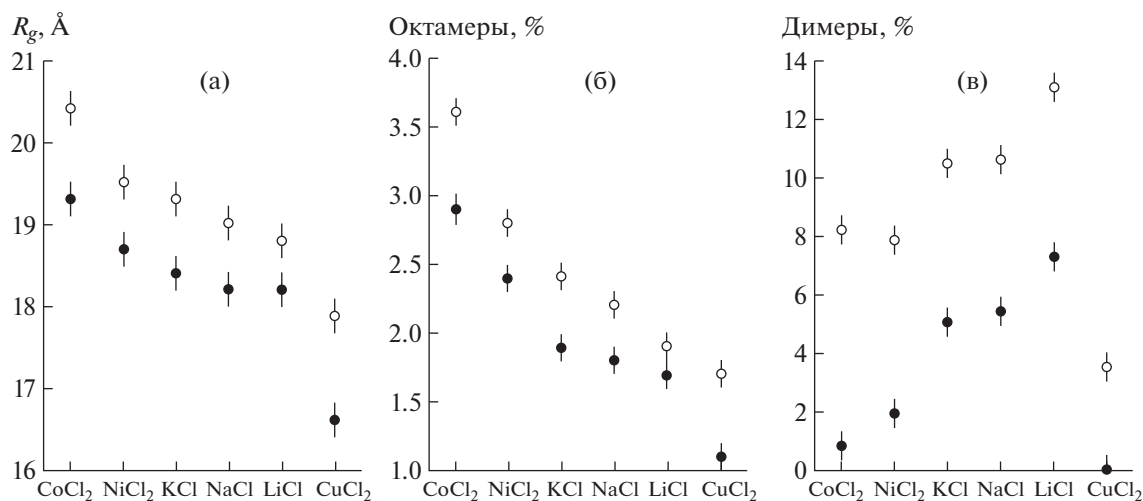


Рис. 2. Зависимости радиуса инерции частиц тетрагонального лизоцима (а), объемных долей димеров (б) и октамеров (в) лизоцима в предкристаллизационном растворе от типа растворителя. Темные кружки соответствуют температуре 20°C, светлые – 10°C. Концентрация белка составляла 20 мг/мл, концентрация осадителей – 0.2 М.

чем для одновалентных. При одинаковой концентрации хлора в растворе для солей двухвалентных металлов концентрация октамеров значительно ниже, чем для одновалентных.

Из растворов с осадителями NiCl₂, CuCl₂, LiCl, NaCl, KCl были выращены кристаллы, от которых были собраны рентгенодифракционные наборы, позволившие определить структуры дан-

ных кристаллов. В полученных структурах локализованы ионы хлора и соответствующего катиона. Предварительный анализ структур выявил существенное различие в положении одновалентных и двухвалентных катионов осадителя, в частности показано, что катионы меди связываются в пяти местах, а катионы никеля – в двух, в отличие от катиона натрия, который связывается только в одном месте и стабилизирует в молекуле

лизосома подвижную петлю 53–79. Наличие дополнительных ионов меди приводит к конформационным изменениям в молекуле белка, в частности меняют конформацию боковые группы аминокислотных остатков, образующих координационные связи с ионами меди, кроме того, наблюдается смещение α атомов ряда аминокислотных остатков. Такие конформационные изменения могут влиять на способность белка образовывать октамеры, приводя к уменьшению их концентрации в растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом МУРР изучена структура растворов белка лизоцима при добавлении различных типов осадителей, хлоридов металлов (NaCl , KCl , LiCl , CoCl_2 , NiCl_2 и CuCl_2) при температурах 10 и 20°C. Во всех случаях помимо мономеров в растворах обнаружены димеры и октамеры. Других олигомеров, в том числе более высокого порядка, чем октамер, не обнаружено.

Показано, что доля октамеров возрастает в ряду одновалентных ионов $\text{Li}^+ - \text{Na}^+ - \text{K}^+$ с увеличением ионного радиуса, что хорошо согласуется с данными по растворимости лизоцима в присутствии различных солей [6]. При этом для всех типов осадителя наблюдается увеличение доли октамеров с ростом концентрации осадителя и понижением температуры.

Авторы выражают благодарность Европейскому центру синхротронного излучения (Гренобль, Франция) за доступ к установке, предоставленное время и помощь в проведении эксперимента (Марк Тьюлли, ВМ 29).

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 1927).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McPherson A., Gavira J.A.* // *Acta Cryst. F*. 2014. V. 70. P. 2.
2. *Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Y.A. et al.* // *Cryst. Growth Des.* 2016. V. 16. № 4. P. 1792.
3. *Дьякова Ю.А., Ильина К.Б., Конарев П.В. и др.* // *Кристаллография*. 2017. Т. 62. № 3. С. 364.
4. *Бойкова А.С., Дьякова Ю.А., Ильина К.Б. и др.* // *Кристаллография*. 2017. Т. 62. № 6. С. 876.
5. *Бойкова А.С., Дьякова Ю.А., Ильина К.Б. и др.* // *Кристаллография*. 2018. Т. 63. № 6. С. 857.
6. *Ducruix A., Guilloteau J.P., Ries-Kautt M.* // *J. Cryst. Growth*. 1996. V. 168. № 1–4. P. 28.
7. *Pernot P., Round A., Barrett R. et al.* // *J. Synchrotron Rad.* 2013. V. 20. P. 660.
8. *Round A., Felisaz F., Fodinger L. et al.* // *Acta Cryst. D*. 2015. V. 71. P. 67.
9. *Brennich M.E., Kieffer J., Bonamis G. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2016. V. 49. P. 203.
10. *Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2003. V. 36. P. 1277.
11. *Konarev P.V., Petoukhov M.V., Volkov V.V. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2006. V. 39. P. 277.
12. *Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2012. V. 45. P. 342.
13. *Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V. et al.* // *J. Appl. Cryst.* 2017. V. 50. P. 1212.
14. *Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J.* // *J. Appl. Cryst.* 1995. V. 28. P. 768.
15. *Кордонская Ю.В., Тимофеев В.И., Дьякова Ю.А. и др.* // *Кристаллография*. 2018. Т. 63. № 6. С. 889.
16. *Hyde A.M., Zultanski S.L., Waldman J.H. et al.* // *Org. Process Res. Dev.* 2017. V. 21. P. 1355.