

УДК 577; 57.088.5

НЕЙТРОННЫЕ И КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ МЕТОДЫ В СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ И БОЛЬШИХ МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ

© 2021 г. Д. В. Лебедев^{1,2}, В. В. Егоров^{1,2,3}, А. В. Швецов^{1,2,4}, Я. А. Забродская^{1,2,4,5},
В. В. Исаев-Иванов¹, А. Л. Коневега^{1,2,4,*}

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра “Курчатовский институт”, Гатчина, Россия

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

³ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

⁵ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородиной Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: konevega_al@npfi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 12.06.2020 г.

После доработки 21.10.2020 г.

Принята к публикации 21.10.2020 г.

В обзоре рассмотрено применение методов малоуглового рассеяния (МУР) нейтронов и комплементарных методов исследования для изучения структуры биомолекул. Рассмотрены такие техники МУР, как вариация контраста, нейтронное спин-эхо, решение прямой и обратной задачи восстановления структуры макромолекул по спектрам МУР при помощи молекулярного моделирования. Отдельный раздел посвящен описанию особых объектов изучения, таких как супрамолекулярные комплексы, нуклеопротеин вируса гриппа и хроматин.

DOI: 10.31857/S0023476121020107

ОГЛАВЛЕНИЕ

- Введение
- 1. МУРН и комплементарные методы
- 2. Вариация контраста
- 3. Времяразрешенное МУР
- 4. Нейтронное спин-эхо
- 5. Молекулярное моделирование и МУР
 - 5.1. Формула Дебая
 - 5.2. Разложение по сферическим гармоникам
 - 5.3. Прямой расчет спектров МУРН и МУРР через плотность длин рассеяния
 - 5.4. Анализ результатов НСЭ
- 6. Уникальные применения
 - 6.1. Супрамолекулярные комплексы
 - 6.2. Нуклеопротеин вируса гриппа
 - 6.3. Хроматин
- 7. Будущее биологических исследований на реакторе ПИК НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ
- Заключение

ВВЕДЕНИЕ

Решение актуальных проблем в области современной медицины и биологии требует исследования структурной и структурно-динамической организации природных белков, их отдельных функциональных доменов, синтетических полипептидов с заданной последовательностью, а также надмолекулярных биологических комплексов на всех уровнях организации с применением физических методов, позволяющих охватывать широкий спектр объектов. Разработка комплексных экспериментальных подходов с использованием высокопоточных источников нейтронов, других физических методов исследования и методов молекулярного и молекулярно-динамического моделирования открывает новые возможности для изучения взаимодействий биомолекул, приводящих к образованию, диссоциации и реорганизации макромолекулярных комплексов и крупных надмолекулярных структур, позволяет выявить структурные основы и выяснить молекулярные механизмы функционирования молеку-

лярных и надмолекулярных биологических комплексов.

Нейтронное рассеяние является уникальным инструментом для получения структурной информации о функциональных состояниях биологических макромолекулярных комплексов в нативных условиях водного раствора. Применение нейтронов в отличие от рентгеновского излучения исключает радиационные повреждения биологических макромолекул. Нейтронные методы позволяют изучать конформации макромолекул и комплексов, не способных к кристаллизации, исследовать лабильные супрамолекулярные комплексы, нативная структура которых не может быть сохранена в экспериментах с использованием атомно-силовой и электронной микроскопии, наблюдать динамику макромолекул, получать структурное описание кинетики ферментов и характеризовать сложные иерархические системы, в том числе в живой ткани *ex vivo*, на масштабах от единиц до сотен нанометров [1]. Важным преимуществом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) также является относительная простота использования метода вариации контраста, позволяющего разделить вклад в рассеяние компонентов системы с различной плотностью рассеяния, таких как белки, липиды, нуклеиновые кислоты, сахара, а также исследовать доступность различных компартментов исследуемого образца для растворителя.

Для решения важных задач, связанных с исследованиями биологических структур, представляется необходимым развитие всего диапазона методов нейтронного рассеяния. Эти методы позволяют получить структурную информацию о биологическом образце, характерных размерах, степени полидисперсности образца, наличии ближнего порядка структуры, в ряде случаев о внутренней структуре частиц, а также интегральные характеристики крупномасштабной структуры ("*large-scale structure*"), такие как фрактальная размерность в полимерных и сложных иерархических системах. Возможности современных и планируемых на реакторе ПИК инструментов позволяют исследовать такие системы в чрезвычайно широком для одного физического метода диапазоне размеров – от 6–7 Å (МУРН) до 15 мкм (ультрамалоугловое рассеяние нейтронов, УМУРН) и десятков микрометров (спин-эхо малоугловое рассеяние нейтронов, СЭМУРН [2]).

Современные высокопоточные реакторы и спектрометры МУРН и УМУРН позволяют снизить время измерений, необходимое для получения достаточного сигнала рассеяния, до нескольких минут и менее, что дает возможность исследовать кинетику процессов с достаточным временным разрешением для наблюдения струк-

турных изменений, связанных с биологической функцией объектов исследования, поиска и характеристики промежуточных состояний системы. Для этого необходима разработка методов анализа и интерпретации данных времязрешенного МУРН, в том числе с применением методов понижения размерности (методы главных компонент, сингулярного разложения и другие).

1. МУРН И КОМПЛЕМЕНТАРНЫЕ МЕТОДЫ

Способность к самоорганизации – одно из основных свойств, присущих живым системам. Специфические взаимодействия биомолекул лежат в основе всех процессов в живом организме. Исторически молекулярная биология развивалась от изучения функций, присущих отдельным молекулам, к функциям, присущим ансамблям биомолекул [3]. Параметры белок-белковых взаимодействий и структура отдельных макромолекул были уже доступны для изучения с использованием таких методов, как рентгеновская кристаллография (РК) [4, 5], спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [6], позволяющих получать данные о полноатомной структуре белковых комплексов, а также всего спектра биохимических процессов. При этом иерархически более высокие уровни организации биомолекул (20–200 нм) – от макромолекулярных комплексов до компонентов органелл – были недоступны для изучения в связи с невозможностью кристаллизации и большим числом перекрывающихся сигналов в спектре ЯМР, и практически единственным доступным для структурных исследований методом оставалась электронная микроскопия (ЭМ) [7]. В то же время особенности подготовки образцов для ЭМ и проведения эксперимента, в частности необходимость высушивания и осуществление измерений в вакууме, не позволяли с уверенностью говорить о соответствии наблюдаемых структур функциональным и существующим в нативных условиях. Более того, метод не позволял изучать влияние температуры на структуру изучаемых объектов. Появившиеся позднее, с развитием лазерной техники, метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) [8] и метод лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС) [9] также не лишены недостатков. Несмотря на возможность реализации измерений в жидкости, проведение АСМ в таких условиях приводит к снижению разрешения при сохранении необходимости прикрепления изучаемых комплексов биомолекул к подложке и учета геометрии зонда в процессе обработке изображений. Метод ЛКС при всех его преимуществах, связанных с возможностью измерения гид-

родинамического радиуса комплексов макромолекул в нативном окружении при заданной температуре, обладает очень низким разрешением, не позволяющим сделать вывод о морфологии изучаемых комплексов.

Впервые описанное в [10] применение малоуглового рассеяния (МУР) для изучения биологических объектов обладает рядом преимуществ перед описанными выше методами. Несмотря на то что МУР относится к методам низкого разрешения, с его помощью можно охарактеризовать размер, форму, массу, глобальные конформационные перестройки белка, в том числе происходящие в процессе фолдинга; взаимодействие биомолекул и их взаимное расположение в комплексе [11]. В то же время обратная задача получения структурных параметров биомолекулярных комплексов из спектра рассеяния математически некорректна: одинаковые спектры рассеяния могут быть получены при МУР на объектах различной структуры. В связи с этим для дискриминации заведомо не соответствующих структурам решений метод МУР требует дополнительной информации о полной или частичной структуре, полученной комплементарными методами, например при помощи РК, ЭМ или АСМ. Отдельного рассмотрения заслуживает метод, позволяющий сопоставлять решение прямой задачи получения спектра рассеяния, полученного из данных молекулярного моделирования, и решение обратной задачи. В сочетании с возможностью получения спектров при различных температурах это открывает перспективы изучения зависимости структуры макромолекулярных комплексов от температуры, что необходимо для решения широкого спектра фундаментальных и прикладных задач [12, 13]. Особого внимания также заслуживает возможность применения методов МУР при изучении супрамолекулярных комплексов в растворе. Слабые нековалентные взаимодействия, определяющие ключевые свойства этих комплексов, такие как способность к мультицентровому связыванию [14, 15], чувствительны к изменению внешних условий, происходящих при подготовке образцов для ЭМ или разделении комплексов при проведении аналитической гелефильтрации. Отметим, что криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) [16], как и МУР, позволяет получать структуры биомолекул в нативном окружении, учитывать зависимость структуры от температуры, а также регистрировать кинетические изменения [17, 18], но значительно превосходит все методы МУР по разрешению. Однако, как и в обычной ЭМ, в методе криоЭМ восстановление пространственной структуры биомолекулярных комплексов ведется с учетом только изображений комплек-

сов, способных существовать в условиях измерения. В то же время соотношение комплексов в различных конформациях в растворе может существенно отличаться от наблюдаемого методом криоЭМ в силу различной способности комплексов к сорбции и агрегации [19]. В этом случае МУР может быть использовано в качестве комплементарного метода, в то время как структуры, полученные при помощи криоЭМ, могут выступать в качестве исходных для решения прямой задачи. Это позволяет сопоставлять со спектрами МУР и верифицировать данные, полученные при помощи криоЭМ. Таким образом, методы МУР позволяют изучать структуру макромолекулярных белковых комплексов в нативном окружении, хотя и требуют для получения структурных данных использования комплементарных методов в силу некорректности решения обратной задачи и невозможности получения структур с высоким разрешением.

2. ВАРИАЦИЯ КОНТРАСТА

Метод МУР реализуется в двух вариантах: с использованием нейтронного (малоугловое рассеяние нейтронов, МУРН) или же рентгеновского (малоугловое рентгеновское рассеяние, МУРР) излучения, воздействующего на изучаемый объект. При использовании МУРН в исследованиях структуры биомолекулярных комплексов следует отметить существенное преимущество перед МУРР, которым можно воспользоваться при изучении многокомпонентных смесей, содержащих различные классы биомолекул. Различие биомолекул (белков, нуклеиновых кислот, липидов) в плотностях длин рассеяния позволяет контрастировать отдельные компоненты, варьируя плотность длины рассеяния буфера за счет изменения соотношения H_2O/D_2O . В так называемой точке контраста плотность длины рассеяния буфера соответствует плотности длины рассеяния макромолекулярного компонента — и компонент перестает вносить вклад в интенсивность рассеяния. Варьируя плотность длины рассеяния буфера, можно изучать взаимное расположение макромолекул различной природы в сложных комплексах. Такая методика называется вариацией контраста [20].

Классическим примером применения вариации контраста является исследование структуры рибосомы. В первую очередь было установлено взаимное расположение структурных элементов рибосомы (рибосомной РНК и белков) в ее пространственной организации. Было показано, что, во-первых, сами рибосомные белки являются компактными, глобулярными макромолекулами [21], а во-вторых, рибосомная РНК расположена

главным образом в центральной части частицы [22]. Селективно дейтерированные белки применялись для картирования расположения белков на малой субъединице [23]. Для изучения процесса транслокации использовали набор в разной степени дейтерированных рибосом (при этом степень дейтерирования различалась для субъединиц 30S и 50S в структуре одной рибосомы). Было показано, что в процессе биосинтеза белка рибосома осциллирует между двумя главными состояниями, различающимися их гидродинамическими радиусами, что определяется изменением положения 30S-субъединицы относительно 50S [24]. Значительно позднее функциональные состояния транслоцирующей рибосомы были ассоциированы с конформационными изменениями в рибосомном комплексе методами криоЭМ [25] и времяразрешенной криоЭМ [18].

Метод вариации контраста также может быть применен при исследовании организации хроматина, состоящего из нуклеиновой и белковой компонент [26], а также для изучения гликозилирования белков [27].

3. ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОЕ МУР

Для понимания структурно-функциональных свойств биологических объектов на всех уровнях организации необходимо не только получить их структурные характеристики, но и иметь информацию об изменении этой структуры во времени. Функциональность большинства белков связана с крупномасштабной конформационной подвижностью самого белка и динамикой компонентов комплексов и надмолекулярных систем, в составе которых он функционирует. Нейтронные методы дают широкие возможности для исследования функциональной динамики макромолекул в широком диапазоне времен и размеров. Одним из применяемых подходов является модификация метода МУР для исследования изменений структуры во времени (времяразрешенное малоугловое рассеяние, **ВРМУР**) [28, 29]. Реализация этого метода путем установки аппаратов остановленного потока на синхротронных источниках с высокой яркостью позволяет отслеживать изменения структуры макромолекул в процессе химической реакции с временным разрешением 30 мс и выше [30, 31]. Для анализа времяразрешенных данных МУР могут применяться как стандартные методы обработки данных МУР (получение интегральных характеристик объекта, подгонка простыми моделями, *ab initio*-моделирование), так и методы понижения размерности (такие как метод главных компонент [32]), позволяющие получить структурную информацию как для основных, так и промежуточных конформационных состояний

макромолекул, присутствующих в реакционной смеси в ходе реакции [28, 33].

Использование нейтронов для времяразрешенных измерений ограничено значительно более низким потоком по сравнению с синхротронными источниками и, как следствие, значительно более низким временным разрешением (от десятков и сотен миллисекунд до десятков минут). Вместе с тем значительными преимуществами ВРМУР, как и МУР вообще, являются полное отсутствие радиационных повреждений образца и легкость применения метода вариации контраста. Несмотря на ограниченное применение в биологии вследствие высоких требований к объему образца, метод в разное время успешно применялся для исследования конформационных изменений в белках [34, 35], изменений структуры вирусных частиц [36] и липидных везикул [37, 38]. К настоящему времени установки быстрого смешивания для реализации метода остановленного потока (например, Stopped-flowSFM-300, Bio-Logic, Seyssinet-Pariset, France) становятся стандартным оснащением современных малоугловых спектрометров, таких как D22 (ILL), KWS-2 и KWS-3 (MLZ) [39, 40].

4. НЕЙТРОННОЕ СПИН-ЭХО

Нейтронное спин-эхо (**НСЭ**) – уникальный метод, позволяющий получать информацию о структуре и динамике макромолекулярных систем, а также нашедший широкое применение в области физики полимеров. Использование этого метода в биологии позволяет получать пространственно-временные характеристики конформационной подвижности компонентов различных белковых и нуклеопротеидных комплексов. Характерные времена регистрируемых на современных НСЭ-спектрометрах конформационных изменений лежат в диапазоне от долей пикосекунд до нескольких сотен наносекунд, а характерные размеры – от единиц до десятков нанометров, что позволяет наблюдать такие функциональные конформационные изменения, как движение отдельных субдоменов белков и внутримолекулярную диффузию в крупных макромолекулярных комплексах.

Нейтронное спин-эхо основано на регистрации крайне малых (вплоть до нескольких нановольт) изменений энергии взаимодействующих с образцом нейтронов путем регистрации разницы фаз Ларморовской прецессии спинов падающего и рассеянного нейтрона в магнитном поле [41]. Измеряемая этим методом промежуточная функция рассеяния $S(q, t)$ представляет собой фурье-преобразование в пространстве

пространственно-временной корреляционной функции плотности длин рассеяния в образце.

Доступный для регистрации диапазон характерных времен движений (от десятков пикосекунд до сотен наносекунд) и размеров, на которых эти движения происходят (от единиц до десятков нанометров), делают НСЭ практически единственным прямым методом, позволяющим наблюдать динамику биологических объектов на молекулярном уровне. Нейтронное спин-эхо активно используется в первую очередь для изучения характера внутримолекулярной диффузии и межмолекулярных взаимодействий в полимерах и растворах белков в высокой концентрации [42–44]. Исследование конформационной подвижности белковой молекулы этим методом требует тщательного анализа полученных данных, разделения вкладов трансляционной, вращательной и внутримолекулярной диффузии в общую картину релаксации, а затем интерпретации вклада внутримолекулярной компоненты с использованием моделей конформационных движений различной степени сложности и реалистичности [17, 45–47]. Со времени первого применения для описания внутримолекулярной динамики молекулы иммуноглобулина [48] методом НСЭ были охарактеризованы функциональные движения доменов в фосфоглицераткиназе [49], алкогольдегидрогеназе [50], ртутной редуктазе [51], Таq-полимеразе [52], белке NHERF1 [53] и человеческом лактоферрине [54]. В то же время следует отметить возможности использования этого метода для изучения изменений физико-химических и структурных свойств белков в условиях макромолекулярного краудинга [55] и свойств липидных структур при взаимодействии с полипептидными молекулами [56].

В перспективе дальнейшее развитие технической базы НСЭ в сторону как увеличения чувствительности за счет использования высокопоточных источников нейтронов, так и расширения диапазона времен может позволить получать не только пространственно-временные характеристики конформационной подвижности небольших индивидуальных ферментов, но и исследовать функциональные движения в крупных белковых олигомерах и нуклеопротеидных комплексах. Характерные времена релаксации в таких системах могут составлять десятки и сотни наносекунд. В современных установках такие времена достигаются за счет использования сверхпроводящих магнитов, обеспечивающих интеграл магнитного поля прецессии до 1.5 Т м, и источников холодных нейтронов, способных обеспечить достаточный поток на длинах волн 15–25 Å. Так, модернизированный спектрометр J-NSE на реакторе FRM-2 (Мюнхен, Германия) имеет верхнюю границу диапазона регистрируемых времен релакса-

ции 500 нс при длине волны нейтронов 16 Å [57], планируемый аналогичный прибор в Центре нейтронных исследований (Мэриленд, США) – до 700 нс (20 Å [58], модернизированный IN-15 (Гренобль, Франция) – до 1000 нс (25 Å [59]). В числе объектов исследований, которые могут использовать потенциал этого метода, следует упомянуть функциональные рибосомные частицы, комплексы ремодуляции хроматина, системы белок–ДНК, в частности комплексы рекомбинации и репарации ДНК, мембранные белки и белки, взаимодействующие с мембранами клеток.

5. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И МУР

Как упоминалось выше, МУРН и МУРР можно успешно применять в структурной биологии совместно с методами молекулярного моделирования. При совместной интерпретации данных, полученных с использованием молекулярного моделирования и МУР, в некоторых случаях удастся получить полноатомные модели биомолекулярных комплексов [60–63]. При решении обратной задачи МУР построение молекулярных моделей может быть использовано в качестве комплементарного метода, позволяющего провести дискриминацию части структур, т.е. исключить из рассмотрения структуры, спектр которых идентичен экспериментальному, однако не несет физического и биологического смысла [61, 64, 65]. С другой стороны, при решении прямой задачи МУР позволяет верифицировать структуры, полученные при помощи молекулярного моделирования [61]. Такое сопоставление данных, полученных двумя методами, требует решения прямой задачи – вычисления спектров МУРР или МУРН по структуре, полученной с помощью методов молекулярного моделирования. Наиболее часто используемыми для решения прямой задачи являются три подхода.

5.1. Формула Дебая

Наиболее старым методом расчета, впервые описанным в 1915 г. [66], является применение формулы Дебая для решения прямой задачи. Данный подход представляет собой упрощение полной формулы, описывающей сечение рассеяния на объекте с учетом усреднения по всем ориентациям. Для построения спектра необходимо провести расчет функции распределения парных расстояний, что является довольно трудоемкой операцией. Как следствие, формула Дебая позволяет описывать рассеяние от молекул в растворе только при условии отсутствия преимущественных ориентаций. Другим явным недостатком метода является невозможность корректного учета влия-

ния растворителя на спектр рассеяния, иными словами, метод не позволяет моделировать вариацию контраста. Тем не менее формула Дебая в настоящее время широко применяется для расчета теоретических спектров МУРР и МУРН на структурах, полученных в результате молекулярного моделирования [60, 67].

5.2. Разложение по сферическим гармоникам

Метод позволяет учитывать вклад в рассеяние растворителя и гидратных оболочек белков и нуклеиновых кислот в водных растворах [68, 69]. В основе метода лежит предположение о том, что биомолекулы имеют однородную плотность длин рассеяния, значение которой зависит от типа молекулы (белок, нуклеиновая кислота или липид). Спектр МУРР или МУРН может быть рассчитан на основе информации о форме молекулы и размере гидратной оболочки при использовании модели молекулы с гидратной оболочкой, полученной в приближении набора сферических гармонических функций. Такое описание обычно не требует большого числа сферических гармоник, вследствие чего расчет не является трудоемким. Метод обладает и рядом недостатков. В частности, он хорошо зарекомендовал себя при расчете спектров рассеяния глобулярных белков; но в случае с протяженными структурами, такими как филаменты, или с плоскими структурами, его применение может приводить к возникновению артефактов.

5.3. Прямой расчет спектров МУРН и МУРР через плотность длин рассеяния

Данный метод предполагает получение спектров МУРР или МУРН через вычисление функции плотности длин рассеяния для всей системы. Он позволяет напрямую учитывать как эффекты, связанные с контрастированием в МУРН, так и эффекты, связанные с гидратными оболочками молекул и флуктуациями плотности растворителя вблизи макромолекулы. Одним из недостатков метода является его трудоемкость, особенно при вычислении функции плотности длин рассеяния. При этом данный метод вычисления спектров МУРН и МУРР является более универсальным, чем предыдущие два: в частности, в зависимости от исследуемой системы он позволяет либо учитывать наличие выделенной ориентации молекул, либо проводить усреднение по ориентациям.

Все перечисленные выше методы применимы в случае использования в качестве исходных данных для расчета спектров МУРН и МУРР статической структуры молекулы, полученной в результате моделирования. В то же время существенная часть биологических систем, исследуе-

мых в водной среде, являются динамическими. Как следствие, при применении указанных методов зачастую ни одна из используемых в качестве модели структур биомолекулы, представляющих собой отдельно взятую статичную конформацию, не приводит к совпадению построенных с ее использованием теоретических спектров с экспериментальными спектрами МУРР или МУРН, так как рассеяние происходит на ансамбле молекул, имеющих близкие, но не совпадающие конформации. В таких случаях необходимо использовать данные, полученные с помощью методов молекулярно-динамического моделирования в водных растворах, что позволяет учитывать конформационную подвижность системы. Для ряда систем учет внутренней динамики является критическим фактором при расчете спектров МУРН и МУРР. К таким системам можно отнести, например, филаменты белков семейства RecA [61, 70], мультидоменные белки и мультикомпонентные комплексы [27].

В случае построения теоретического спектра МУРН мультикомпонентных систем, содержащих гликозилированные белки, может потребоваться учесть динамику обмена водорода на дейтерий при контрастировании.

Отметим, что в последнее время появился ряд методов, позволяющих напрямую учитывать спектры МУРР или МУРН, полученные в эксперименте, при расчетах молекулярной динамики. Для этого в энергетические функции добавляют специальный член, учитывающий корреляцию экспериментального спектра МУР и спектра, рассчитанного из данных молекулярной динамики [62, 63, 71, 72]. Несмотря на то что потенциально такой подход позволяет получать структуры с атомарным разрешением, он учитывает единственную структуру при расчетах, в то время как биомолекулы в растворе достаточно подвижны, и единственная структура не является репрезентативной.

5.4. Анализ результатов НСЭ

Метод НСЭ позволяет проводить прямые измерения параметров, связанных с динамикой макромолекулярной системы. Основная сложность его использования заключается в интерпретации полученных результатов. Для этого могут использоваться как упрощенные модели динамических систем, так и результаты полноатомного молекулярно-динамического моделирования, а также весь арсенал методов анализа траекторий молекулярной динамики. Оба подхода требуют решения прямой задачи — получения набора данных НСЭ из данных моделирования. В качестве упрощенной модели при изучении крупномасштабных движе-

ний может выступать обобщенное описание движения компонентов системы, что часто применяют при описании небологических полимеров и протяженных филаментов (*Rose model, reptation model* [73]). Упрощенные методы используются и при интерпретации НСЭ при помощи полноатомных молекулярно-динамических моделей, например применяется разложение динамики системы по нормальным модам [45] или по главным компонентам [52, 74, 75]. При этом становится возможным использование для интерпретации НСЭ довольно протяженных по времени траекторий молекулярной динамики. Альтернативным способом является прямое вычисление спектров НСЭ из траекторий молекулярной динамики. Это может быть реализовано как через формулу Дебая, так и прямым расчетом спектров из функций плотности длин рассеяния [76].

6. УНИКАЛЬНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ

6.1. Супрамолекулярные комплексы

Одним из перспективных подходов является применение методов МУР в изучении свойств супрамолекулярных комплексов в растворах [77]. Одна из особенностей большинства таких комплексов — это существование их только в растворе, в состоянии динамического равновесия, и, как следствие, диссоциация при изучении их такими методами, как аналитическая гель-фильтрация, электрофоретическое разделение и другие. Взаимодействие с подложкой и локальное изменение концентрации, приводящее к изменению структуры при пробоподготовке для атомно-силовой или электронной микроскопии, недостаточная для криоЭМ молекулярная масса (менее 100 кДа), большое число идентичных элементов, затрудняющее интерпретацию сигналов ЯМР, энергия взаимодействия, несравнимо меньшая энергии взаимодействия в кристаллической решетке, делают методы МУР и динамического светорассеяния единственными, позволяющими изучать структурные особенности таких систем [78]. При этом только методы МУР позволяют получать структурные данные приемлемого разрешения, а в сочетании с методами молекулярного моделирования — и полноатомные модели таких систем [79]. В то же время изучение супрамолекулярных систем важно как при изучении патогенеза ряда заболеваний [80], так и при разработке новых препаратов [81–83]. Отметим, что МУР в отличие от многих других методов позволяет проводить кинетические измерения и следить за эволюцией структурных особенностей биомолекулярных комплексов в реальном времени [84] на малых временных масштабах при помощи МУРР, на больших — при помощи

МУРН в силу различий в скорости накопления сигнала вследствие разницы в интенсивности рассеиваемого потока. Использование высокопоточного реактора [85] позволит улучшить диапазон изучаемых временных интервалов для МУРН.

Одной из важных и своего рода уникальных областей применения МУР при изучении структуры и динамики биомолекулярных комплексов является исследование крупных объектов, размеры которых составляют десятки и сотни нанометров, в частности таких, как олигомерные комплексы белков и нуклеиновых кислот, изолированные ядра клеток, амилоидоподобные фибриллы.

6.2. Нуклеопротеин вируса гриппа

Комбинация методов МУРН и молекулярной динамики позволяет изучать крупномасштабные изменения структуры биомолекулярных комплексов, связанные с минимальными изменениями в их первичной структуре, например в виде единичных аминокислотных замен в белках. Примером такого применения может служить изучение влияния точечной мутации в *нуклеопротеине вируса гриппа* на приобретение им новых функциональных свойств. Нуклеопротеин вируса гриппа — это белок, который в олигомерной форме (около 100 мономеров) служит для упаковки вирусной РНК, при этом полученный рибонуклеопротеиновый (РНП) комплекс организуется в пространстве в виде вытянутого спирального филамента длиной около 100 нм [86]. Показана связь между мутацией E292G и возникновением у штамма вируса гриппа холодо-адаптированных свойств (т.е. вирус гриппа приобретает способность к репликации при пониженной температуре) [87]. Молекулярно-динамическое моделирование нормального и мутантного РНП и анализ траекторий показали, что наиболее существенно в их пространственных структурах различаются расстояния между цепями нуклеопротеиновых комплексов. Такие различия составляют единицы ангстрем. Изучение с помощью МУРН супрамолекулярных структур изолированных РНП при пониженной и нормальной температурах показало, что структуры комплексов при повышенной температуре отличаются от модели стержнеобразных частиц и по-разному реагируют на изменения температуры. Сопоставление данных, полученных методами молекулярного моделирования и МУРН, свидетельствует о том, что механизм холодовой адаптации штамма, несущего замену E292G, связан с ослаблением взаимодействия между цепями РНП и, как следствие, появлением лабильности связей между цепями,

необходимой для функционирования комплекса при низкой температуре [13].

6.3. Хроматин

Примером более сложной структурной организации биологических макромолекул является хроматин — нуклеопротеидный комплекс, несущий клеточную ДНК. Хроматин представляет собой иерархическую структуру, базисным конститутивным элементом которой является нуклеосома, гетерооктамер гистоновых белков, вокруг которого располагается петля ДНК, содержащая порядка 150 пар оснований. Структура нуклеосома была получена с атомарным разрешением с помощью рентгеноструктурного анализа [88], а их биологическая функция интенсивно исследовалась последние тридцать лет методами молекулярной биологии и биофизики. Более высокие уровни организации структуры хроматина до сих пор являются предметом научных исследований и дискуссий. Регулярные структуры компонентов хроматина, выделенного в растворе со средней ионной силой (30 нм фибриллы), были впервые получены с помощью электронной микроскопии [89]. Однако в отличие от нуклеосомы существование таких структур *in vivo* не было установлено, а все наблюдения могут быть интерпретированы с использованием модели нерегулярной упаковки 10 нм хроматиновой нити [90–92].

Поскольку при участии элементов хроматина осуществляются такие важнейшие клеточные процессы, как транскрипция, репликация, рекомбинация и репарация генома, изучение его структурной и динамической организации в ядрах эукариотических клеток в физиологических условиях необходимо для полного понимания любого из этих процессов на молекулярном уровне.

В последнее время все больше подтверждений находит фрактальная модель упаковки хроматина на наднуклеосомном уровне [93]. Из работ, посвященных моделям упаковки ДНК, отметим статью [94], в которой на основе теоретических предпосылок теории полимеров показано, что ДНК может укладываться в структуру с фрактальными свойствами. Наблюдения за диффузией флуоресцентных меток *in vivo* в ядрах клеток почки крысы и фибробластов мыши также поддерживают гипотезу о фрактальной организации хроматина [95]. Полученные с помощью методов флуоресцентной корреляционной спектроскопии данные о диффузии олигомеров зеленого флуоресцентного белка, данные прямого наблюдения за перемещениями одиночной квантовой точки и локальной фотоактивации взаимодействующих с хроматином белковых маркеров были

интерпретированы в рамках теории аномальной диффузии, описывающей поведение частиц во фрактальной среде. Фрактальные размерности, рассчитанные этим методом, оказались различными для эухроматина (2.6) и гетерохроматина (2.2). Применение экспериментальной техники фиксации конформации генома (метод Hi-C) к ядрам клеток лимфобластомы человека [96] привело к появлению модели упаковки хроматина в виде фрактальной глобулы [97, 98], которая предсказывает значение фрактальной размерности, равное 3, и имеет свойства самоподобия и территориальной организации, отсутствующие в случайной упаковке полимерной цепи. Несмотря на ее широкое признание, отметим, что ряд экспериментальных данных, полученных в том числе методом Hi-C высокого разрешения, требует дальнейшего уточнения этой модели [99, 100].

Таким образом, проблема системного и количественного сравнительного исследования феномена фрактальной организации упаковки ДНК в составе хроматина клеток животных, в том числе человека, представляет собой, с одной стороны, одно из бурно развивающихся направлений исследований, с другой стороны, очевидно, что существующие работы — это только начало пути к решению проблемы описания структуры нативного хроматина. Очень многое в этом направлении на сегодня остается неясным с точки зрения физики полимеров, как это видно из обзора [101].

Среди методов, используемых для исследования фрактальных структур, наиболее информативными и точными являются неразрушающие методы измерения в обратном пространстве (в импульсном пространстве), основанные на анализе фурье-образов фрактальных объектов, полученных при рассеянии ими света, рентгеновских лучей и нейтронов [102, 103]. Выбор вида излучения зависит как от размеров исследуемых объектов, так и от природы исследуемого материала. Наилучшие результаты дает взаимодополняющее использование разных видов, например, рентгеновского и нейтронного излучения, что значительно расширяет и дополняет информативность полученных данных. В экспериментах МУР на фрактальных структурах наблюдается степенная зависимость интенсивности рассеяния от переданного импульса вида $I(q) \sim q^{-n}$ ($n \leq 6$) в определенном диапазоне переданных импульсов $q > 1/R$, где R — характерный масштаб рассеивающей системы. По величине n , а точнее по ее отклонению от асимптотики Порода ($n = 4$), можно судить о фрактальности системы [103]. Для объемных и массовых фракталов n совпадает с фрактальной размерностью D_V , причем $1 < D_V < 3$. Для рассеяния на трехмерных объектах с фрактальными по-

верхностями $3 < n \leq 4$, при этом $n = 6 - D_S$, где D_S – фрактальная размерность поверхности, $2 < D_S < 3$. Таким образом, применение метода МУР позволяет не только напрямую измерить фрактальную размерность исследуемого объекта, но и определить, получены его фрактальные свойства следствием распределения неоднородностей внутри объекта или формы его поверхности.

МУРН на сегодняшний день выглядит одним из наиболее мощных методов для определения фрактальных свойств структуры нативного хроматина. Современные спектрометры МУРН позволяют получить данные рассеяния в большом диапазоне характерных размеров, от нуклеосомных до 1 мкм и выше. Применение уникальных ультрамалоугловых установок [40] позволяет расширить верхнюю границу наблюдаемых размеров неоднородностей до 10 мкм и более, т.е. довести ее до размеров клеточного ядра. Дополнительными преимуществами метода МУРН являются сохранение близких к нативным условий изучения структуры хроматина и простота реализации метода вариации контраста, что, как уже говорилось выше, позволяет разделить вклад в рассеяние белковой и нуклеиновой компонент хроматина. Вместе с тем использование этого метода требует тщательного подбора режимов пробоподготовки, не нарушающих целостности хроматина, которые в то же время позволят обеспечить длительность измерений, необходимую для получения спектров в широком диапазоне амплитуд переданных импульсов. Недавние работы указывают, что дополнительное воздействие на хроматин высокими сдвиговыми напряжениями может оказывать существенное влияние на его крупномасштабную структуру с образованием вырожденных структур типа логарифмического фрактала [104]. Предпочтительными являются режимы получения и очистки клеточных ядер, ограничивающие механические воздействия на хроматин, в сочетании с мягким режимом фиксации глутаровым альдегидом в концентрации до 0.5%, что позволяет проводить длительные измерения и не нарушает наднуклеосомную структуру хроматина [26, 105].

Проведенное с использованием комбинации малоугловых и ультрамалоугловых методов и вариации контраста в 2005 г. исследование упаковки хроматина в ядрах эритроцитов курицы [24] показало, что как белковая структура хроматина, так и упаковка нуклеиновой компоненты проявляют свойства масс-фрактала, при этом последняя имеет два уровня организации или две фазы с различными фрактальными размерностями с точкой кроссовера в области, соответствующей размерам рассеивающих неоднородностей порядка 300–400 нм. Позднее методами МУРН и

МУРП получены прямые наблюдения фрактальной структуры ядер лимфоцитов крыс [105], поток линий глиомы крыс (C6), аденокарциномы человека (HeLa) и эмбриональных клеток дрозофилы [106, 107]. В совокупности данные, полученные методами МУР, позволяют сделать вывод, что фрактальная структура хроматина с двумя режимами – масс-фрактала на малых размерах и фрактальной глобулы либо поверхностного фракталана размерах, приближающимся к хромосомным, является универсальной для клеток эукариот. В то же время в различных типах клеток наблюдаемые фрактальные размерности и точки кроссовера могут существенно различаться в зависимости от размера генома, степени геномных перестроек и транскрипционной активности. При этом упаковка хроматина в клетках с неактивным хроматином близка на больших размерах к фрактальной глобуле, в то время как активный хроматин, в особенности в клетках злокачественных линий, проявляет свойства поверхностного фрактала с размерностью 2.2–2.4 [106, 108].

Соотнести интегральные характеристики распределения плотности хроматина с наблюдаемыми другими методами элементами наднуклеосомной структуры возможно путем построения математических моделей упаковки хроматина в клеточном ядре. Одна из таких моделей на основе рандомизированного алгоритма построения кривой Коха позволила получить систему нуклеосом, заключенных в заданный объем, с заданным значением фрактальной размерности или двумя различными значениями фрактальной размерности (структуры с кроссовером) [109]. Для проверки соответствия модели малоугловому эксперименту разработали метод расчета спектров МУРН [97] и проанализировали фрактальную молекулярную модель наднуклеосомной структуры хроматина геномного размера с двумя фрактальными размерностями, описывающая двухуровневую фрактальную организацию хроматина [109]. Несмотря на то что модель достаточно хорошо описывает имеющиеся экспериментальные данные на размерах больше нуклеосомных и в целом отражает свойства фрактальной глобулы, ее применение было ограничено низкой реалистичностью учета динамики хроматина как на хромосомном, так и на нуклеосомном уровне. В настоящее время на основе карт частоты контактов, полученных методами Hi-C, стало возможно более реалистичное моделирование пространственного распределения генома [110], что открывает новые возможности для интерпретации результатов экспериментов с использованием МУРН.

Важнейшим вопросом исследования упаковки хроматина является выявление функционального значения ее структурных и динамических характеристик. Интегральные свойства упаковки хроматина как полимерной цепи исключительно важны для понимания механизмов взаимодействия удаленных участков хроматина, образования петель и, в конечном счете, формирования и динамики топологически-ассоциированных доменов хроматина — участков генома, ассоциированных в пространстве и имеющих сходные характеристики транскрипционной активности [111, 112]. Самоорганизация и эволюция таких доменов происходит под действием целого комплекса биохимических (пост-трансляционная модификация гистонов, нуклеосомная динамика, взаимодействие хроматина со специфическими ядерными белками) [113, 114] и физико-химических (зарядовые взаимодействия, макромолекулярный краудинг) [115, 116] факторов, а при определенных условиях, вероятно, и под воздействием ряда неядерных белков и белковых комплексов [108].

Методы МУРН могут в перспективе применяться как для определения механизмов воздействия различных факторов на эпигенетическую регуляцию в клетке, так и для изучения структурных изменений в хроматине и их связи с изменениями профиля экспрессии в процессах дифференцировки, злокачественной трансформации и программируемой гибели клетки.

7. БУДУЩЕЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА РЕАКТОРЕ ПИК НИЦ “КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ” – ПИЯФ

Наряду с несомненными преимуществами обсуждаемых в обзоре нейтронных методов исследования структуры и динамики макромолекулярных комплексов наиболее существенным недостатком является сравнительно малое число доступных для исследователей источников нейтронов во всем мире, приводящее к большой загруженности имеющихся установок. В результате возникает большая конкуренция между научными группами за время, предоставляемое на измерения, в связи с чем зачастую заявки, получившие высокие оценки экспертов, отклоняются. В связи с этим отметим, что единственным современным экспериментальным комплексом, который будет включен в линейку экспериментальных возможностей в ближайшем будущем, является реакторный комплекс ПИК в НИЦ “Курчатовский институт” – ПИЯФ (Гатчина). Особые надежды российское научное сообщество возлагает на введение в эксплуатацию запланированных эксперименталь-

ных станций, в том числе установок МУР, близких по параметрам к самым современным установкам типа D22 и D33 (ILL, Гренобль), и спин-эхо-спектрометра со сверхпроводящими магнитами, который позволит достичь больших характеристических измеряемых времен (около 2 мкс при длине волны нейтронов 25 Å) и, таким образом, станет лучшим в мире, превосходя по своим параметрам установки J-NSE “PHOENIX”, функционирующие на реакторе FRM-2 (Исследовательский центр Хайнц Майер-Лейбниц, ФРГ) [57] и IN15 (ILL, Гренобль). Это откроет возможность исследовать как структурную динамику движения отдельных доменов в белковых структурах, так и крупномасштабную конформационную подвижность белковых и нуклеопротеидных комплексов. Получение таких ультрасовременных установок будет тем самым уникальным, переломным моментом в развитии методов нейтронного рассеяния в биологических исследованиях в Российской Федерации и позволит расширить спектр применения для целей фундаментальной молекулярной биофизики, а также современной биомедицины, фармацевтики и биотехнологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение метода малоуглового рассеяния позволяет решать широчайший круг задач, охватывающий как изучение структурной организации макромолекул и биомacroмолекулярных комплексов, так и их динамические характеристики.

При сравнительно невысокой пространственной разрешающей способности и невозможности в общем случае *ab initio*-решения обратной задачи определения структуры по данным МУР важной составляющей успешного использования методов нейтронного рассеяния является развитие подходов, основанных на использовании нейтронного рассеяния в составе целого комплекса методов структурной биологии, включая рентгеноструктурный анализ, криоэлектронную микроскопию, спектроскопию ядерного магнитного резонанса, атомно-силовую и флуоресцентную микроскопию, молекулярное моделирование.

Работа выполнена при поддержке НИЦ “Курчатовский институт” (приказ № 1363 от 25.06.2019 г.) Исследования структурно-функциональных характеристик рибосомных комплексов выполнены при поддержке Российского научного фонда (грант № 17-14-01416, А.Л.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. KWS-3. Very small angle scattering diffractometer with focusing mirror.
<https://mlz-garching.de/kws-3>
2. *Rekvelde M.T.* // Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B. 1996. V. 114. № 3–4. P. 366.
[https://doi.org/10.1016/0168-583X\(96\)00213-3](https://doi.org/10.1016/0168-583X(96)00213-3)
3. *Бреслер С.Е.* Введение в молекулярную биологию. Изд. 2-е. М.: Наука, 1966. 524 с.
4. *Kendrew J.C., Bodo G., Dintzis H.M. et al.* // Nature. 1958. V. 181. № 4610. P. 662.
<https://doi.org/10.1038/181662a0>
5. *Watson J.D., Crick F.H.C.* // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1953. V. 18. P. 123.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1953.018.01.020>
6. *Saunders M., Wishnia A., Kirkwood J.G.* // J. Am. Chem. Soc. 1957. V. 79. № 12. P. 3289.
<https://doi.org/10.1021/ja01569a083>
7. *Luria S.E., Anderson T.F.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1942. V. 28. № 4. P. 127.
<https://doi.org/10.1073/pnas.28.4.127>
8. *Binnig G., Quate C.F., Gerber C.* // Phys. Rev. Lett. 1986. V. 56. № 9. P. 930.
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
9. *Berne B.J., Pécora R.* Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics. NY: John Wiley and Sons, 1976. 376 p.
10. *Schneider R., Mayer A., Schmatz W. et al.* // J. Mol. Biol. 1969. V. 41. № 2. P. 231.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(69\)90388-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(69)90388-X)
11. *Mertens H.D.T., Svergun D.I.* // J. Struct. Biol. 2010. V. 172. № 1. P. 128.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.012>
12. *Егоров В.В., Шалдэян А.А., Горшков А.Н. и др.* // Поверхность. Рентген., синхротр. и нейтр. исследования. 2016. № 3. С. 62.
<https://doi.org/10.7868/S0207352816030069>
13. *Shvetsov A.V., Lebedev D.V., Zabrodskaya Y.A. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1776636>
14. *Egorov V.V., Zabrodskaya Y.A., Lebedev D.V., Gorshkov A.N.* // J. Phys. Conf. Ser. 2017. V. 848. № 1. P. 012022.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/848/1/012022>
15. *Shvetsov A.V., Zabrodskaya Y.A., Nekrasov P.A., Egorov V.V.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2018. V. 36. № 10. P. 2794.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1367329>
16. *Henderson R., McMullan G.* // Microscopy. 2013. V. 62. № 1. P. 43.
<https://doi.org/10.1093/jmicro/dfs094>
17. *Biehl R., Richter D.* // J. Phys. Condens. Matter. 2014. V. 26. № 50. P. 503103.
<https://doi.org/10.1088/0953-8984/26/50/503103>
18. *Fischer N., Konevega A.L., Wintermeyer W. et al.* // Nature. 2010. V. 466. № 7304. P. 329.
<https://doi.org/10.1038/nature09206>
19. *Shvetsov A., Pichkur E., Shtam T. et al.* // Int. J. Biomed. 2019. V. 9. Suppl. 1. P. S32.
https://doi.org/10.21103/IJBM.9.Suppl_1.P36
20. *Jacrot B.* // Reports Prog. Phys. 1976. V. 39. № 10. P. 911.
<https://doi.org/10.1088/0034-4885/39/10/001>
21. *Serdyuk I.N., Zaccai G., Spirin A.S.* // FEBS Lett. 1978. V. 94. № 2. P. 349.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)80974-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)80974-0)
22. *Serdyuk I.N., Grenader A.K., Zaccai G.* // J. Mol. Biol. 1979. V. 135. № 3. P. 691.
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(79\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(79)90172-4)
23. *Capel M.S., Engelman D.M., Freeborn B.R. et al.* // Science. 1987. V. 238. № 4832. P. 1403.
<https://doi.org/10.1126/science.3317832>
24. *Serdyuk I., Baranov V., Tsalkova T. et al.* // Biochimie. 1992. V. 74. № 4. P. 299.
[https://doi.org/10.1016/0300-9084\(92\)90107-P](https://doi.org/10.1016/0300-9084(92)90107-P)
25. *Julián P., Konevega A.L., Scheres S.H.W. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. V. 105. № 44. P. 16924.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0809587105>
26. *Lebedev D.V., Filatov M.V., Kuklin A.I. et al.* // FEBS Lett. 2005. V. 579. № 6. P. 1465.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.052>
27. *Шмидт А.Е., Швецов А.В., Куклин А.И. и др.* // Кристаллография. 2016. Т. 61. № 1. С. 163.
<https://doi.org/10.7868/S0023476116010227>
28. *Fowler A.G., Foote A.M., Moody M.F. et al.* // J. Biochem. Biophys. Methods. 1983. V. 7. № 4. P. 317.
[https://doi.org/10.1016/0165-022X\(83\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0165-022X(83)90057-X)
29. *Kirby N.M., Cowieson N.P.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2014. V. 28. № 1. P. 41.
<https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.07.007>
30. *Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F. et al.* // J. Appl. Cryst. 2015. V. 48. № 2. P. 431.
<https://doi.org/10.1107/S160057671500254X>
31. *Narayanan T., Sztucki M., Van Vaerenbergh P. et al.* // J. Appl. Cryst. 2018. V. 51. № 6. P. 1511.
<https://doi.org/10.1107/S1600576718012748>
32. *Golub G.H., Reinsch C.* // Singular Value Decomposition and Least Squares Solutions. Handbook for Automatic Computation. Berlin, Heidelberg: Springer, 1971. P. 134.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-86940-2_10
33. *Chen Y., Tokuda J.M., Topping T. et al.* // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. № 13. P. 8767.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku562>
34. *Stegmann R., Manakova E., Röble M. et al.* // J. Struct. Biol. 1998. V. 121. № 1. P. 30.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.1997.3938>

35. *Ibrahim Z., Martel A., Moulin M. et al.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 40948. <https://doi.org/10.1038/srep40948>
36. *Aramayo R., Mériçoux C., Larquet E. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 2005. V. 1724. № 3. P. 345. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.05.020>
37. *Maric S., Lind T.K., Raida M.R. et al.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 7591. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43713-6>
38. *Mahabir S., Small D., Li M. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* 2013. V. 1828. № 3. P. 1025. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.002>
39. D22 – Large dynamic range small-angle diffractometer // ILL Neutrons for Society – Instrument layout. <https://www.ill.eu/users/instruments/instruments-list/d22/description/instrument-layout/> (accessed: 28.05.2020).
40. *Pipich V., Fu Z.* // *J. Large-Scale Res. Facil. JLSRF.* 2015. V. 1. P. A31. <https://doi.org/10.17815/jlsrf-1-28>
41. *Mezei F.* // *Z. Phys. A: Hadron. Nucl.* 1972. B. 255. № 2. S. 146. <https://doi.org/10.1007/BF01394523>
42. *Longeville S., Doster W., Kali G.* // *Chem. Phys.* 2003. V. 292. № 2–3. P. 413. [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(03\)00292-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(03)00292-1)
43. *Porcar L., Falus P., Chen W.-R. et al.* // *J. Phys. Chem. Lett. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 1. № 1. P. 126. <https://doi.org/10.1021/jz900127c>
44. *Yearley E.J., Godfrin P.D., Perevozchikova T. et al.* // *Biophys. J.* 2014. V. 106. № 8. P. 1763. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.02.036>
45. *Smolin N., Biehl R., Kneller G.R. et al.* // *Biophys. J.* 2012. V. 102. № 5. P. 1108. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.01.002>
46. *Callaway D.J., Bu Z.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2017. V. 42. P. 1. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.10.001>
47. *Callaway D.J.E., Farago B., Bu Z.* // *Eur. Phys. J. E.* 2013. V. 36. № 7. P. 76. <https://doi.org/10.1140/epje/i2013-13076-1>
48. *Alpert Y., Cser L., Faragó B. et al.* // *Biopolymers.* 1985. V. 24. № 9. P. 1769. <https://doi.org/10.1002/bip.360240908>
49. *Inoue R., Biehl R., Rosenkranz T. et al.* // *Biophys. J.* 2010. V. 99. № 7. P. 2309. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.017>
50. *Biehl R., Hoffmann B., Monkenbusch M. et al.* // *Phys. Rev. Lett.* 2008. V. 101. № 13. P. 138102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.101.138102>
51. *Hong L., Sharp M.A., Poblete S. et al.* // *Biophys. J.* 2014. V. 107. № 2. P. 393. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.013>
52. *Bu Z., Biehl R., Monkenbusch M. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. V. 102. № 49. P. 17646. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503388102>
53. *Farago B., Li J., Cornilescu G. et al.* // *Biophys. J.* 2010. V. 99. № 10. P. 3473. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.09.058>
54. *Sill C., Biehl R., Hoffmann B. et al.* // *BMC Biophys.* 2016. V. 9. № 1. P. 7. <https://doi.org/10.1186/s13628-016-0032-3>
55. *Ciepluch K., Radulescu A., Hoffmann I. et al.* // *Bioconjug. Chem.* 2018. V. 29. № 6. P. 1950. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00203>
56. *Ricci C., Maccarini M., Falus P. et al.* // *J. Phys. Chem. B.* 2019. V. 123. № 3. P. 631. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b11719>
57. *Pasini S., Holderer O., Kozielski T. et al.* // *Rev. Sci. Instrum.* 2019. V. 90. № 4. P. 043107. <https://doi.org/10.1063/1.5084303>
58. A new Neutron Spin Echo Spectrometer on NG-A | NIST. <https://www.nist.gov/ncnr/installation-upgraded-cold-source/new-neutron-spin-echo-spectrometer-ng>
59. IN15 Spin-echo spectrometer with time-of-flight option and focusing option // ILL Neutrons for Society – Characteristics. <https://www.ill.eu/users/instruments/instruments-list/in15/characteristics>
60. *Швецов А.В., Шмидт А.Е., Лебедев Д.В., Исаев-Иванов В.В.* // *Поверхность. Рентген., синхротронейтр. исследования.* 2013. № 12. С. 10. <https://doi.org/10.7868/S0207352813120160>
61. *Shvetsov A.V., Lebedev D.V., Chervyakova D.B. et al.* // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. № 6. P. 948. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.053>
62. *Björling A., Niebling S., Marcellini M. et al.* // *J. Chem. Theory Comput.* 2015. V. 11. № 2. P. 780. <https://doi.org/10.1021/ct5009735>
63. *Niebling S., Björling A., Westenhoff S.* // *J. Appl. Cryst.* 2014. V. 47. № 4. P. 1190. <https://doi.org/10.1107/S1600576714009959>
64. *Olsson C., Swenson J.* // *Mol. Phys.* 2019. V. 117. № 22. P. 3408. <https://doi.org/10.1080/00268976.2019.1640400>
65. *Штыкова Е.В., Богачева Е.Н., Дадинова Л.А. и др.* // *Кристаллография.* 2017. Т. 62. № 6. С. 907. <https://doi.org/10.7868/S0023476117060224>
66. *Debye P.* // *Ann. Phys.* 1915. V. 351. № 6. P. 809. <https://doi.org/10.1002/andp.19153510606>
67. *Chen P., Hub J.S.* // *Biophys. J.* 2014. V. 107. № 2. P. 435. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.06.006>
68. *Svergun D.I., Richard S., Koch M.H. J. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998. V. 95. № 5. P. 2267. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2267>

69. *Merzel F., Smith J.C.* // *Acta Cryst. D.* 2002. V. 58. № 2. P. 242.
<https://doi.org/10.1107/S0907444901019576>
70. *Garmay Y., Shvetsov A., Karelov D. et al.* // *J. Phys. Conf. Ser.* 2012. V. 340. P. 012094.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/340/1/012094>
71. *Kimanius D., Pettersson I., Schluckebier G. et al.* // *J. Chem. Theory Comput. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 11. № 7. P. 3491.
<https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00299>
72. *Chen P., Hub J.S.* // *Biophys. J.* 2015. V. 108. № 10. P. 2573.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.062>
73. *Richter D.* // *Hyperfine Interact.* 1997. V. 106. № 1–4. P. 3.
<https://doi.org/10.1023/A:1012624631098>
74. *Lal J., Fouquet P., Maccarini M., Makowski L.* // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 397. № 2. P. 423.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.029>
75. *Biehl R., Monkenbusch M., Richter D.* // *Soft Matter.* 2011. V. 7. № 4. P. 1299.
<https://doi.org/10.1039/C0SM00683A>
76. *Lindner B., Smith J.C.* // *Comput. Phys. Commun.* 2012. V. 183. № 7. P. 1491.
<https://doi.org/10.1016/j.cpc.2012.02.010>
77. *Rho J.Y., Cox H., Mansfield E.D.H. et al.* // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4708.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-12586-8>
78. *Vestergaard B.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 602. P. 69.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.02.029>
79. *Frederix P.W.J.M., Patmanidis I., Marrink S.J.* // *Chem. Soc. Rev.* 2018. V. 47. № 10. P. 3470.
<https://doi.org/10.1039/C8CS00040A>
80. *Wolff M., Zhang-Haagen B., Decker C. et al.* // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 2493.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-02370-3>
81. *Zabrodskaya Y.A., Shvetsov A.V., Tsvetkov V.B., Egorov V.V.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. № 12. P. 3041.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1507837>
82. *Gallardo R., Ramakers M., De Smet F. et al.* // *Science.* 2016. V. 354. № 6313. P. aah4949.
<https://doi.org/10.1126/science.aah4949>
83. *Zabrodskaya Y.A., Lebedev D.V., Egorova M.A. et al.* // *Biophys. Chem.* 2018. V. 234. P. 16.
<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.01.001>
84. *Sauter A., Zhang F., Szekely N.K. et al.* // *J. Phys. Chem. B.* 2016. V. 120. № 24. P. 5564.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b03559>
85. Реактор ПИК. <http://www.pnpi.nrcki.ru/ustanovki/reaktor-pik>
86. *Arranz R., Coloma R., Chichón F.J. et al.* // *Science.* 2012. V. 338. № 6114. P. 1634.
<https://doi.org/10.1126/science.1228172>
87. *Цыбалова Л.М., Горев Н.Е., Потанчук М.В. и др.* // *Вопросы вирусологии.* 2012. Т. 57. № 6. С. 13.
88. *Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K. et al.* // *Nature.* 1997. V. 389. № 6648. P. 251.
<https://doi.org/10.1038/38444>
89. *Finch J.T., Klug A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1976. V. 73. № 6. P. 1897.
<https://doi.org/10.1073/pnas.73.6.1897>
90. *Fussner E., Ching R.W., Bazett-Jones D.P.* // *Trends Biochem. Sci.* 2011. V. 36. № 1. P. 1.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.002>
91. *van Holde K., Zlatanova J.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 15. P. 8373.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.15.8373>
92. *Tremethick D.J.* // *Cell.* 2007. V. 128. № 4. P. 651.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.008>
93. *Bancaud A., Lavelle C., Huet S., Ellenberg J.* // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 18. P. 8783.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks586>
94. *Grosberg A.Y., Nechaev S.K., Shakhnovich E.I.* // *J. Phys.* 1988. V. 49. № 12. P. 2095.
<https://doi.org/10.1051/jphys:0198800490120209500>
95. *Bancaud A., Huet S., Daigle N. et al.* // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 24. P. 3785.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2009.340>
96. *Lieberman-Aiden E., van Berkum N.L., Williams L. et al.* // *Science.* 2009. V. 326. № 5950. P. 289.
<https://doi.org/10.1126/science.1181369>
97. *Grosberg A., Rabin Y., Havlin S., Neer A.* // *Europhys. Lett.* 1993. V. 23. № 5. P. 373.
<https://doi.org/10.1209/0295-5075/23/5/012>
98. *Mirny L.A.* // *Chromosom. Res.* 2011. V. 19. № 1. P. 37.
<https://doi.org/10.1007/s10577-010-9177-0>
99. *Huang K., Backman V., Szleifer I.* // *bioRxiv.* 2018. P. 413872.
<https://doi.org/10.1101/413872>
100. *Sanborn A.L., Rao S.S.P., Huang S.-C. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2015. V. 112. № 47. P. E6456.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1518552112>
101. *Halverson J.D., Smrek J., Kremer K., Grosberg A.Y.* // *Reports Prog. Phys.* 2014. V. 77. № 2. P. 022601.
<https://doi.org/10.1088/0034-4885/77/2/022601>
102. *Guinier A., Fournet G.* *Small-angle scattering of X-rays.* NY: John Wiley and Sons Inc., 1955. 268 p.
103. *Schmidt P.W.* // *Modern Aspects of Small-Angle Scattering.* Dordrecht: Springer Netherlands. 1995. P. 1.
https://doi.org/10.1007/978-94-015-8457-9_1
104. *Яшина Е.Г., Григорьев С.В.* // *ЖЭТФ.* 2019. Т. 156. № 3(9). С. 540.
<https://doi.org/10.1134/s0044451019090177>
105. *Лебедев Д.В., Филатов М.В., Куклин А.И. и др.* // *Кристаллография.* 2008. Т. 53. № 1. С. 111.

106. *Lebedev D., Filatov M., Konev A. et al.* // FEBS J. 2013. V. 280. Suppl 1. P. 19.
<https://doi.org/10.1111/febs.12340>
107. *Исаев-Иванов В.В., Лебедев Д.В., Лаутер Х. и др.* // ФТТ. 2010. Т. 52. № 5. С. 996.
108. *Lebedev D.V., Zabrodskaia Y.A., Pipich V. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 520. № 1. P. 136.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.09.116>
109. *Платовский А.В., Лебедев Д.В., Филатов М.В. et al.* // J. Phys. Conf. Ser. 2012. V. 351. P. 012007.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/351/1/012007>
110. *Kinney N.A., Sharakhov I.V., Onufriev A.V.* // Epigenetics Chromatin. 2018. V. 11. № 1. P. 3.
<https://doi.org/10.1186/s13072-018-0173-5>
111. *Roy S.S., Mukherjee A.K., Chowdhury S.* // Hum. Genomics. 2018. V. 12. № 1. P. 8.
<https://doi.org/10.1186/s40246-018-0140-z>
112. *Jost D., Carrivain P., Cavalli G., Vaillant C.* // Nucleic Acids Res. 2014. V. 42. № 15. P. 9553.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku698>
113. *Moronta-Gines M., Van Staveren T.R.H., Wendt K.S.* // Essays Biochem. 2019. V. 63. № 1. P. 167.
<https://doi.org/10.1042/EBC20180064>
114. *Hauer M.H., Gasser S.M.* // Genes and Development. 2017. V. 31. № 22. P. 2204.
<https://doi.org/10.1101/gad.307702.117>
115. *Huet S., Lavelle C., Ranchon H. et al.* // Int. Rev. Cell Mol. Biol. 2014. V. 307. P. 443.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800046-5.00013-8>
116. *Erdel F., Rippe K.* // Biophys. J. 2018. V. 114. № 10. P. 2262.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.03.011>