

На правах рукописи

СВАНИДЗЕ Анна Владимировна

РАССЕЯНИЕ СВЕТА И НЕЙТРОНОВ
ПРИ ФАЗОВЫХ ПРЕВРАЩЕНИЯХ ЛИЗОЦИМА

(01.04.07 - физика конденсированного состояния)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2007

Работа выполнена в Физико-техническом институте им. А.Ф. Иоффе РАН.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук
Лушников Сергей Германович,

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Романов Вадим Петрович,

доктор физико-математических наук,
Вахрушев Сергей Борисович.

Ведущая организация Московский институт радиотехники,
электроники и автоматики (МИРЭА).

Защита состоится “ _____ ” _____ 2007 г. в _____ часов
на заседании диссертационного совета К 002.205.01 при Физико-техническом институте
им. А.Ф. Иоффе РАН по адресу:
194021, Санкт-Петербург, Политехническая ул., д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Физико-технического института
им. А.Ф. Иоффе РАН.

Автореферат разослан “ _____ ” _____ 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета К 002.205.01
кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник

С.И. Бахолдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Изучение фазовых переходов является основным направлением исследований в физике твердого тела на протяжении последних нескольких десятилетий. Успехи развития физики конденсированных сред привели к возможности изучения более сложных, разупорядоченных, самоорганизующихся систем, таких как биополимеры. В последнее время все большее внимание уделяется изучению фазовых превращений ДНК, белков, и других биополимеров, которые могут приводить к изменению их активности и функции. При этом продуктивным оказывается применение широкого арсенала современных методов исследований твердых тел и кристаллов к изучению биологических объектов.

Настоящая работа посвящена исследованию поведения структуры и динамики белков при фазовых переходах и фазовых превращениях. Известно, что динамика биополимеров в диапазоне частот от 1 до 1000 ГГц обычно отражает локальные конформационные изменения, т.е. прыжки атомов от одной конфигурации к другой и коллективные возбуждения. Динамика биополимеров в этом диапазоне частот имеет много общего с динамикой стекол, переохлажденных жидкостей и других конденсированных сред. Например, в колебательном спектре белков обнаружены бозонный пик, быстрые ангармонические движения, подобные быстрой пикосекундной релаксации в стеклах и др. Более того, делаются попытки определить температуру динамического (или стекольного) фазового перехода T_g в ряде биополимеров в низкотемпературной области [1]. Другим примером фазовых превращений является переход ДНК из А в В форму при гидратации. При этом фазовом превращении принципиальными оказались исследования низкочастотной динамики ДНК – в экспериментах по неупругому рассеянию света была обнаружена мягкая оптическая мода [2]. Это показывает, что при анализе фазовых превращений биополимеров может быть успешно использована концепция мягкой моды, которая была предложена Кохреном и Андерсоном для описания фазовых переходов второго рода, а затем успешно применялась при исследовании структурных фазовых переходов в кристаллах. Характерным примером фазового превращения белков является денатурация – изменение нативной пространственной структуры молекулы белка под воздействием различных факторов, например, при повышении/понижении температуры, воздействии органическими растворителями, детергентами и др.

Необходимо отметить, что исследования низкочастотной области колебательного спектра белков при этом фазовом превращении практически не проводились.

В последнее время для описания структуры белковой молекулы широкое распространение получил фрактальный подход [3]. Использование этого подхода позволяет корректно оценить изменение пространственной организации белка при денатурации [4]. Из работ Александера и Орбаха следует, что на фрактальных структурах реализуется низкочастотное возбуждение – фрактон [5]. Это возбуждение хорошо изучено экспериментально и теоретически для аэрогелей и ряда других соединений. Вопрос о существовании фрактона в колебательном спектре белков обсуждался только теоретически [6]. В настоящей работе впервые проведены экспериментальные исследования, которые позволили идентифицировать фрактон в колебательном спектре белков.

Таким образом, исследования фазовых превращений биополимеров, направленные на воссоздание полной картины наблюдаемых явлений в колебательном спектре и развитие новых теоретических подходов на базе существующих концепций, являются актуальными.

Целью диссертационной работы являлось исследование фазовых превращений лизоцима, который является модельным объектом при изучении глобулярных белков, с помощью неупругого рассеяния нейтронов (НРН), малоуглового рассеяния нейтронов (МРН) и мандельштам-бриллюэновского рассеяния (МБР) света. В качестве объектов исследований использовались монокристаллы, порошки и растворы лизоцима.

Для изучения физических свойств кристаллов лизоцима были получены кристаллы максимального размера с заданной симметрией. Хрупкость, малый размер и особенности существования (в растворе или в парах) белковых кристаллов затрудняли проведение систематического рентгеноструктурного анализа образцов, поэтому необходимо было использовать морфологический подход к описанию структуры кристаллов. Отметим, что в ряде работ по рентгеноструктурным исследованиям кристаллов лизоцима и изучению их оптической активности при повышении температуры указывалось на возможность существования фазового перехода, однако имеющиеся данные по этому поводу были весьма противоречивы. Для решения этих проблем предполагалось исследование динамики решетки

тетрагональных кристаллов лизоцима в области температур предполагаемого фазового перехода с помощью МБР.

Исследование денатурации лизоцима проводилось двумя методами: МБР света, что позволяет изучать низкочастотную динамику белка, и МРН – метод, который дает прямую информацию о пространственной организации белка. Предположение ряда теоретических работ о существовании собственного локализованного возбуждения – фрактон в колебательном спектре белков инициировало использование неупругого рассеяния нейтронов для исследования низкочастотной области колебательного спектра лизоцима. Анализ данных по МРН и НРН в рамках фрактального подхода позволяет определить фрактальную размерность лизоцима (и ее изменение при денатурации) и фрактонную размерность.

Основные положения, выносимые на защиту и их новизна

- Определены оптимальные условия роста тетрагональных кристаллов лизоцима наибольших размеров из растворов, приготовленных на тяжелой воде. С помощью морфологического анализа показано, что три различные формы кристаллов лизоцима, обнаруженные при росте, являются тетрагональным. Эти результаты подтверждены рентгеноструктурным анализом.
- В тетрагональных кристаллах лизоцима в окрестности 307 К обнаружен структурный фазовый переход.
- В результате экспериментов по малоугловому рассеянию нейтронов определена фрактальная размерность лизоцима. Показано, что тепловая денатурация лизоцима приводит к уменьшению фрактальной размерности от 2.77 до 2.50.
- В низкочастотной области колебательного спектра лизоцима выделено локализованное возбуждение – фрактон и определена его спектральная размерность.
- Обнаружено влияние изотопического обмена водорода на дейтерий на обобщенную функцию плотности колебательных состояний лизоцима. Изотопический эффект наиболее выражен в диапазоне частот от 420 до 800 см⁻¹.
- При тепловой денатурации лизоцима наблюдались аномалии в скорости и затухании гиперзвука, а также в поведении интегральной интенсивности

компонент Мандельштама – Бриллюэна, которые отражают всю последовательность фазовых превращений. Это позволяет использовать МБР света как эффективный метод при исследовании динамики биополимеров.

Представленные в работе результаты и выводы являются оригинальными.

В работе впервые:

- Оптимизировались условия роста дейтерированных тетрагональных кристаллов лизоцима, и проводился их морфологический анализ.
- Исследовалось температурное поведение акустических гиперзвуковых фононов в тетрагональных кристаллах лизоцима с помощью МБР света.
- Исследовалось изменение пространственной организации лизоцима при тепловой денатурации с помощью МРН. При этом использовался фрактальный подход к описанию пространственной организации белка, а именно, определялась фрактальная размерность и ее поведение при тепловой денатурации лизоцима.
- Проводился детальный анализ низкочастотной области функции плотности колебательных состояний лизоцима в рамках фрактального подхода, что позволило определить фрактонную размерность. Исследовалось влияние изотопического замещения водорода на дейтерий на функцию плотности состояний лизоцима.
- Изучалась температурная эволюция спектров МБР в растворе лизоцима при тепловой денатурации и денатурации 6M гуанидингидрохлоридом.

Научно-практическая значимость работы. Исследования, проведенные в представленной работе, расширяют и, в заметной степени, меняют существующие представления о низкочастотной динамике белков. Впервые наблюдался структурный фазовый переход в тетрагональном кристалле лизоцима в окрестности 307 К. Впервые исследовались фазовые превращения лизоцима при денатурации с помощью МБР света, которые показали эффективность использования этого метода при изучении динамики биополимеров. Показано, что структура лизоцима адекватно описывается в рамках фрактального подхода. Анализ результатов экспериментов по МРН в растворах лизоцима позволил предложить фрактальную размерность как количественный параметр для характеристики изменений пространственной организации белков при денатурации. В низкочастотной области колебательного

спектра лизоцима идентифицирован фрактон и определена его спектральная размерность. Полученные результаты являются важными для понимания механизмов функционирования белков.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на XIV Международной конференции по росту кристаллов (Гренобль, Франция, 2004), Конкурсе молодых ученых ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН (Санкт-Петербург 2004, 2006), Международной зимней школе по физике полупроводников (С.-Петербург-Зеленогорск, 2005), XVII Всероссийской конференции по физике сегнетоэлектриков (Пенза, Россия, 2005), 3-ей Европейской школе по рассеянию нейтронов (Будапешт, Венгрия, 2005), IV Симпозиуме “Исследования на импульсном реакторе ИБР-2” (Дубна, Россия, 2006), JCBSF-8 – Япония-СНГ/Балтия (Тсукуба, Япония, 2006), 20-ой Международной конференции по рамановской спектроскопии ICORS’06 (Йокогама, Япония, 2006), Международном семинаре “Динамика молекул и материалов” (Гренобль, Франция, 2007), на научных семинарах отдела физики сегнетоэлектричества и магнетизма ФТИ им. А.Ф. Иоффе.

Публикации. По результатам работы опубликовано 11 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения и библиографии; содержит 56 рисунков, 1 таблицу. Полный объем диссертации 145 страниц. Список цитируемой литературы содержит 113 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, научная и практическая значимость исследований по теме диссертации, сформулированы цели работы и новизна проведенных исследований.

Первая глава посвящена исследованиям по оптимизации роста дейтерированных тетрагональных кристаллов лизоцима и их морфологическим особенностям. Для изучения физических свойств белковых кристаллов, которые отражают как особенности пространственной организации кристалла, так и особенности строения и свойств его отдельных структурных единиц – белковых молекул, требуются кристаллы с достаточно большими размерами. Существует огромное количество работ по изучению роста белковых кристаллов, в которых можно найти результаты исследований влияния на кристаллизацию белков различных

факторов, таких как пересыщение, концентрация и тип осаждающей соли, pH, температура, наличие магнитного и электрического полей и т.д. Большинство из этих работ посвящены изучению роста кристаллов из растворов, приготовленных на обычной воде. В тоже время оставался открытым вопрос о влиянии изотопического замещения водорода на дейтерий на рост белковых кристаллов.

Анализ зависимости размеров кристаллов лизоцима от условий роста позволяет выбрать оптимальные условия выращивания крупных кристаллов. В работе определялась зависимость размеров кристаллов лизоцима, выращенных методом диффузии паров в висячей капле, от концентрации осаждающей соли, в качестве которой использовался натрий хлорид. Опыты по выращиванию кристаллов лизоцима проводились как с использованием обычной, так и тяжелой воды (D_2O). Было показано, что при выращивании как протонированных, так и дейтерированных кристаллов лизоцима, характер зависимостей размеров кристаллов от содержания соли в растворе подобен и имеет куполообразную форму с ярко выраженным максимумом. Оптимальными условиями роста как дейтерированных, так и протонированных кристаллов являются: 0.1 М натрий ацетатный буфер (pH=4.6), концентрация белка 20 мг/мл, 3% раствор хлорида натрия, $T=15^{\circ}C$, 0.01М раствора азиды натрия.

При исследовании влияния концентрации соли на размеры кристаллов лизоцима было обнаружено появление в процессе кристаллизации кристаллов с тремя различными видами габитуса: «объемные» кристаллы, «пластинки» и «пирамиды» (рис. 1). Для того чтобы выявить причины появления трех различных форм кристаллов проводился морфологический анализ как дейтерированных, так и протонированных кристаллов лизоцима. Он показал, что все кристаллы с тремя различными габитусами являются тетрагональными и образуются путем комбинации трех простых форм. Первый вид габитуса кристаллов лизоцима соответствует выпуклому многоугольнику, образованному комбинацией двух простых форм – тетрагональной призмы и тетрагональной бипирамиды, второй («пирамиды») – многогранник, образованный комбинацией этих же простых форм, что и первый вид, но усеченный по диагонали тетрагональной бипирамиды, а третий («пластинки») – многогранник, образованный комбинацией тетрагональной призмы и тетрагональной пирамиды (рис. 1). Результаты рентгеноструктурного анализа на установке MAR 345

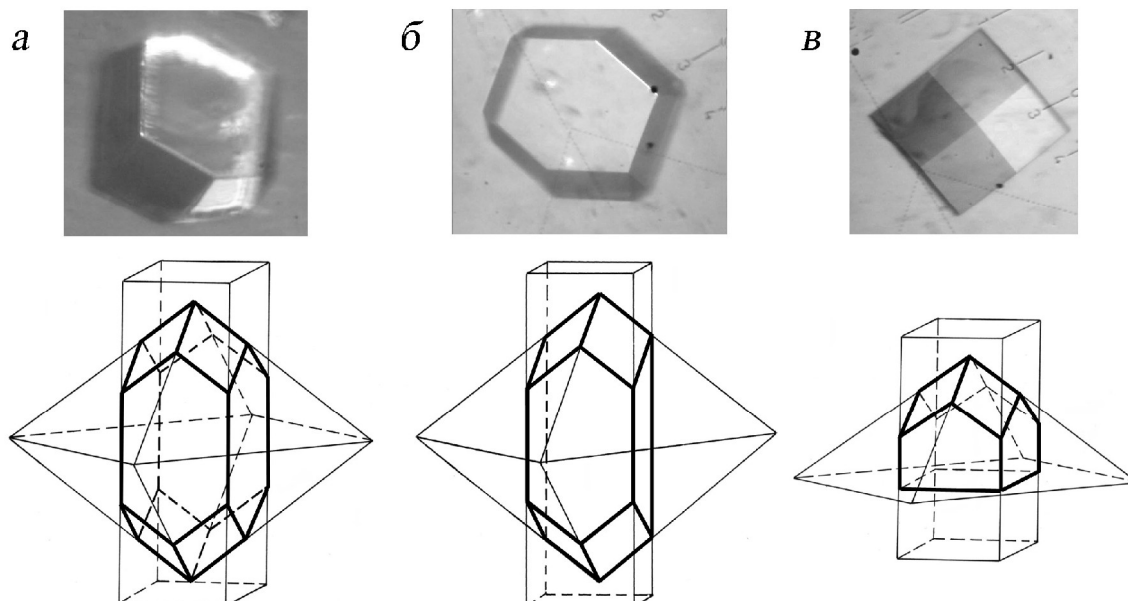


Рис. 1: Фотографии кристаллов лизоцима и формирование кристаллов с тремя разными габитусами, путем комбинации простых форм: **а** – «объемные» кристаллы, **б** – «пластинки», **в** – «пирамиды»

на длине волны $\lambda=1.5417$ А (Институт кристаллографии РАН им. А.В. Шубникова) показали, что все кристаллы лизоцима, имеющие различный габитус, относятся к пр. гр. $R4_32_12$; определены параметры элементарной ячейки протонированного ($a=b=79.535$ А, $c=38.118$ А) и дейтерированного ($a=b=79.551$ А, $c=38.017$ А) кристаллов лизоцима. Появление кристаллов с тремя видами габитуса обусловлены преимущественным развитием тех или иных граней при изменении концентрации лизоцима в растворе в ходе кристаллизации [7].

Вторая глава описывает результаты экспериментальных исследований поведения гиперзвуковых акустических фононов в тетрагональных кристаллах лизоцима с габитусом «пластинки» при повышении температуры от 298 К до 330 К с помощью МБР света.

В начале главы обсуждаются акустические свойства тетрагональных кристаллов лизоцима, рассмотрены основные принципы МБР света в кристаллах, особенности устройства и работы высококонтрастных интерферометров Фабри-Перо. Использование 6-проходного тандема интерферометра Фабри-Перо с оптическим микроскопом, вмонтированным в оптическую схему, позволило исследовать образцы с размерами 0.2 мм х 0.4 мм. В экспериментах применялась 180^0 геометрия рассеяния, причем анализировалось рассеяние света падающего перпендикулярно плоскости

кристалла (110). В работе описываются результаты экспериментов на кристаллах лизоцима с использованием двух схем: в первой – исследовался кристалл, находящийся в капле раствора, в которой он вырос, и луч лазера фокусировался непосредственно в кристалле; во втором случае – кристалл был вынут из капли и помещен в стеклянный капилляр. Использование этих двух схем позволило выбрать оптимальные экспериментальные условия и идентифицировать акустические фононы, распространяющиеся непосредственно в кристалле лизоцима.

Показано, что в спектре МБР света в кристалле, находящемся в капилляре, можно выделить пик упругого рассеяния и три дуплета, которые соответствуют медленному поперечному фонону TA1 с частотой $\Delta\nu_{TA1} \cong 5.44$ ГГц, быстрому поперечному фонону TA2 с частотой $\Delta\nu_{TA2} \cong 8.16$ ГГц и продольному фонону LA с частотой $\Delta\nu_{LA} \cong 12.89$ ГГц. Пик упругого рассеяния описывался с помощью функции Гаусса, а фононы – с помощью функции Лоренца. Значения частоты позволили рассчитать величину скорости соответствующих акустических фононов. Интегральная интенсивность фононных дублетов в спектрах МБР, пропорциональная фононной восприимчивости, определялась как площадь под лоренцианом.

Расчеты позволили построить температурные зависимости скорости и интегральной интенсивности для LA и TA2 фононов. Проследить поведение TA1 фонона при изменении температуры оказалось достаточно сложно – слишком велика погрешность расчетов из-за слабой интенсивности сигнала и вклада от упругого рассеяния света. На рис. 2 показаны температурные зависимости скорости и восприимчивости TA2 фонона. Скорость TA2 фонона при повышении температуры от 297 до 307 К медленно уменьшается и достигает минимума при 307 К. При дальнейшем нагревании кристалла от 307 до 322 К наблюдается существенное увеличение скорости от 1371 до 1432 км/с. Температурные зависимости интегральной интенсивности LA и TA2 компонент МБР имеют аномалию в той же области температур.

Аномальное поведение скорости и интегральной интенсивности LA и TA2 фононов в кристалле лизоцима в окрестности 307 К характерно для структурных фазовых переходов в кристаллах. Важным аргументом в пользу существования структурного фазового перехода является скачок в температурной зависимости показ-

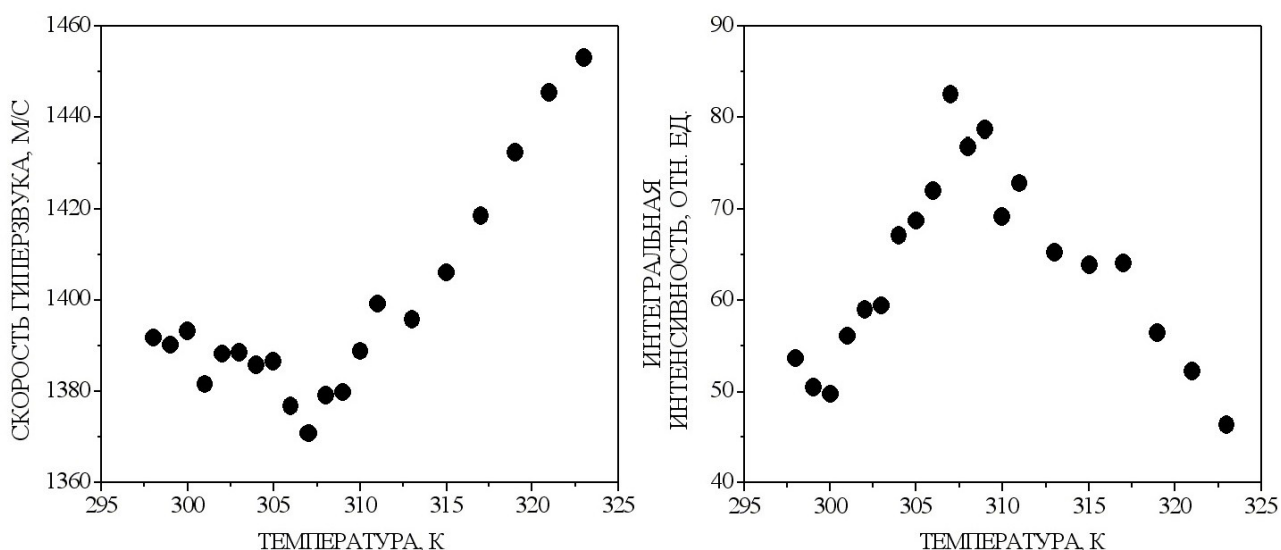


Рис. 2: Температурные зависимости скорости и интегральной интенсивности быстрого поперечного фонона ТА2

теля двулучепреломления при температуре 306.5 К [8]. Таким образом, в результате настоящих исследований показано, что в тетрагональном кристалле лизоцима в окрестности 307 К реализуется структурный фазовый переход. Можно только предположить, что он связан с перестройкой внутримолекулярной структуры лизоцима.

Третья глава посвящена исследованию того, как влияет изменение пространственной организации белковой молекулы при денатурации на эволюцию спектров МБР света. В настоящей главе рассмотрена тепловая денатурация лизоцима и денатурация под воздействием гуанидингидрохлорида (GdnHCl). Выбор таких денатурирующих факторов обусловлен тем, что они по-разному изменяют конформацию белка. Нагревание лизоцима приводит к его переходу из нативного состояния в состояние «расплавленной» глобулы. При этом белковая молекула «плавится», разупорядочивается, но вместе с тем остается сравнительно компактной и имеет вторичные структуры, характерные для нативной молекулы. В отличие от тепловой денатурации, при воздействии на белок GdnHCl высокой концентрации (например, 6М) нативная молекула разворачивается. Механизмы действия GdnHCl на белковую молекулу еще до конца не изучены. Предполагают, что различные участки молекулы GdnHCl с одной стороны способны образовывать стабильные связи с гидрофобными аминокислотными остатками белковой молекулы и, особенно с остатками ароматических аминокислот, а с другой стороны с полярными молекулами растворителя, что облегчает разворачивание белковой молекулы. Однако необходимо

отметить, что третичная структура молекулы лизоцима стабилизируется четырьмя дисульфидными связями, и даже в растворе с достаточно большой концентрацией GdnHCl молекула лизоцима может оставаться относительно компактной.

Рассмотрим вначале изменения в поведении гиперзвука в растворе лизоцима при тепловой денатурации. В экспериментах по исследованию МБР света в растворах лизоцима использовалась та же установка и те же условия, что и при исследовании кристаллов. Для того чтобы выделить изменения в поведении гиперзвука, связанные с особенностями низкочастотной динамики лизоцима, сравнивалось поведение МБР света в i) растворе лизоцима с концентрацией 250 мг/мл в натрий ацетатном буфере (0.1 М, pH=4.6), и ii) в натрий ацетатном буфере. По результатам экспериментов были построены температурные зависимости относительного изменения скорости и затухания гиперзвука и интенсивности компонент МБ для обоих растворов.

На рис. 3 а показаны температурные зависимости поведения скорости гиперзвука. Хорошо видно, что скорость гиперзвука в натрий ацетатном буфере монотонно увеличивается при повышении температуры до 343 К, а затем незначительно уменьшается при дальнейшем нагревании. Это соответствует классическим представлениям о поведении упругих волн в вязкой среде при изменении температуры.

Температурное поведение скорости гиперзвука в растворе лизоцима иное (рис. 3). Хорошо видно, что в области температур, близких к комнатной 294-305 К, поведение скорости гиперзвука в растворе лизоцима такое же, как и в буфере. По мере нагревания раствора лизоцима до 333 К различия в поведении скорости гиперзвука в растворе белка и в буфере нарастают. Учитывая результаты исследований тепловой денатурации лизоцима с помощью малоуглового рассеяния рентгена [9], можно предположить, что изменения поведения скорости гиперзвука в растворе лизоцима выше 305 К обусловлены изменениями внутримолекулярной динамики белка. Причем предполагается, что изменение внутримолекулярной структуры в диапазоне температур выше комнатной имеет характер фазового перехода второго рода. Дальнейшее нагревание раствора лизоцима приводит к «скачку вниз» скорости гиперзвука в окрестности 333 К, затем в диапазоне от 333 до 336 К наблюдается участок, где отсутствует зависимость скорости от температуры и при 336 К скорость скачком увеличивается (рис. 3 б). Такое аномальное уменьше-

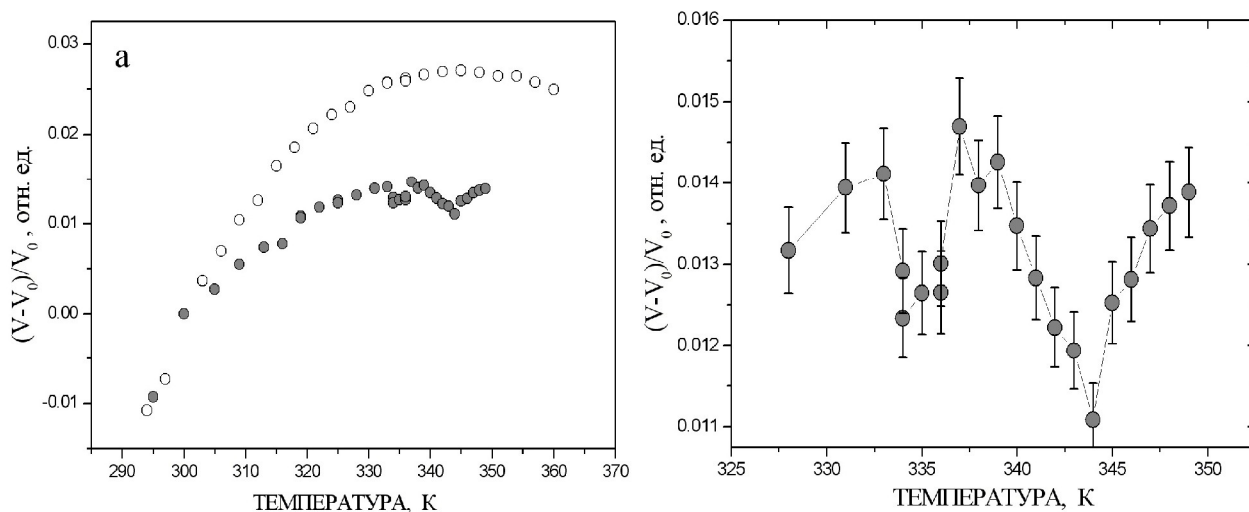


Рис. 3: **а** – Температурное поведение скорости гиперзвука в растворе лизоцима с концентрацией 250 мг/мл в натрий ацетатном буфере (темные кружки), ii) в натрий ацетатном буфере (светлые кружки); **б** – Область аномального поведения гиперзвука в белковом растворе в увеличенном масштабе

ние скорости гиперзвука в окрестности 333 К свидетельствует о резких изменениях свойств раствора, которое согласуется с изменением пространственной организации молекулы лизоцима, а именно, с переходом в состояние «расплавленной» глобулы. Денатурированные молекулы образуют агрегаты путем формирования межмолекулярных антипаралельных β -складчатых контактов. По-видимому, образование агрегатов в растворе лизоцима приводит к увеличению скорости гиперзвука в окрестности 336 К. Еще один аномальный участок на обсуждаемой зависимости локализован в температурном диапазоне 336-350 К и имеет характерный минимум при 342 К. Можно предположить, что наблюдаемая аномалия в температурном поведении скорости связана с образованием и ростом агрегатов в белковом растворе и переходом его из жидкого в гелеобразное состояние. Температурные зависимости затухания гиперзвука и интенсивности компонент МБР в растворе лизоцима показывают аномальное поведение только в окрестности 342 К, что связано с изменением вязкости раствора и увеличением светорассеяния при переходе раствор-гель.

Для того чтобы понять, как будет изменяться поведение спектров МБР в растворе изначально денатурированного белка с повышением температуры, исследовался раствор лизоцима, денатурированного 6М GdnHCl. Как и

предполагалось, в этом случае не наблюдались никаких аномалий в МБР света при увеличении температуры.

Четвертая глава посвящена результатам исследований тепловой денатурации лизоцима с помощью малоуглового рассеяния нейтронов.

В первой части главы обсуждаются литературные данные по МРН в растворах белков, вводятся основные понятия о фракталах и обсуждаются результаты использования фрактальной идеологии для описания структуры белков. При этом белковую молекулу представляют как «массовый» фрактал. В этом случае фрактальная размерность D_f описывает закон возрастания массы фрактального объекта как функции его линейных размеров

$$M(r) \propto r^{D_f} \quad (1),$$

а плотность становится убывающей функцией размера фрактального объекта:

$$\rho(r) \propto r^{D-D_f}, \quad D > D_f \quad (2)$$

где D – топологическая размерность пространства, в которое вложен фрактал. Образно говоря, чем больше различаются топологическая D и фрактальная D_f размерности, тем более рыхлым становится фрактальный объект. Предполагают, что дробная величина размерности Хаусдорфа – Безиковича белков объясняется особенностями пространственной организацией белковой молекулы. Согласно модельным расчетам, проведенным для 200 различных белков, значение фрактальной размерности лежит в диапазоне от 2.25 до 2.75.

Во второй части четвертой главы рассмотрена схема и принцип работы спектрометра малоуглового рассеяния нейтронов и детально описаны все этапы обработки экспериментальных данных. Эксперименты по МРН в растворах лизоцима проводились на малоугловом нейтронном дифрактометре «Yellow Submarine» (Будапештский нейтронный центр, Венгрия). Исследуемые образцы представляли собой растворы лизоцима с концентрациями 50 мг/мл и 250 мг/мл в натрий ацетатном буфере (0.1М, рН=4.6), приготовленном на тяжелой воде с целью увеличения контраста. Длина волны падающего на образец пучка нейтронов была 0.408 нм. Для интерпретации данных по МРН в растворах лизоцима использовался фрактальный подход. А именно, определялась фрактальная размерность лизоцима с помощью соотношения:

$$I(q) \propto q^{-D_f} \quad (3)$$

где $I(q)$ – зависимость интенсивности рассеяния от волнового вектора. Определенная таким образом фрактальная размерность нативного лизоцима равна 2.72, что хорошо согласуется с модельными расчетами. Зная диапазон волновых векторов, на котором реализуется фрактальность $0.1578 \text{ \AA}^{-1} < q < 0.2574 \text{ \AA}^{-1}$, можно определить масштабы, на которых объект можно рассматривать как фрактал $L < r < \xi$, где $L = 24 \text{ \AA}$, корреляционная длина $\xi = 38 \text{ \AA}$. Данный диапазон близок к размерам молекулы лизоцима. Таким образом, именно белковая молекула является фракталом.

Можно предположить, что при изменении пространственной организации белка в результате денатурации величина D_f будет изменяться. На рис. 4 представлена температурная зависимость фрактальной размерности лизоцима в диапазоне от 300 до 347.5 К, полученная по результатам МРН. Хорошо видно, что при 333 К величина D_f начинает уменьшаться и достигает своего минимального значения 2.50 при 343 К. Уменьшение фрактальной размерности связано с переходом лизоцима из нативного состояния в состояние «расплавленной» глобулы. Изменение величины D_f фактически отражает степень «разрыхления» белковой молекулы.

В конце главы обсуждается температурное поведение функции распределения по расстояниям $p(r)$, рассчитанной с помощью программы gnom45qw программного пакета Atsas. Было показано, что величина радиуса инерции лизоцима, полученная при анализе $p(r)$, а также с помощью приближения Гинье, не меняется с повышением

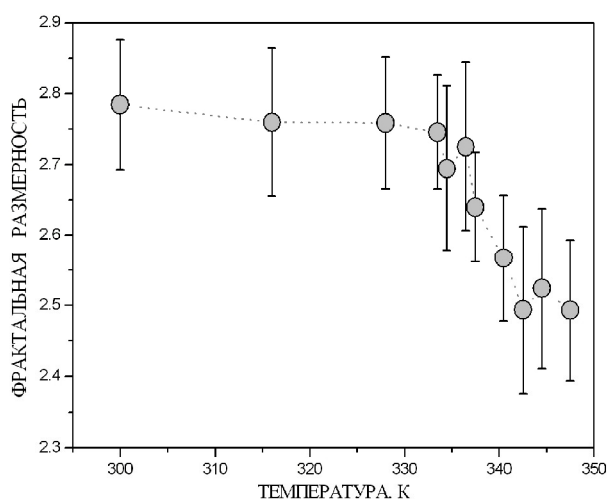


Рис. 4: Температурная зависимость фрактальной размерности, полученной при обработке экспериментальных данных по МРН в растворе лизоцима с концентрацией 50 мг/мл

температуры. Рассматриваются возможные причины такого температурного поведения радиуса инерции.

Пятая глава посвящена изучению низкочастотной области колебательного спектра лизоцима с помощью неупругого рассеяния нейтронов.

Из теории Александера – Орбаха известно, что в колебательном спектре объекта с фрактальной структурой реализуется локализованное возбуждение – фрактон [5]. Согласно теоретическим расчетам, величина фрактонной размерности различных белков лежит в диапазоне $1 < \tilde{d} < 2$. В данной работе была поставлена задача проведения экспериментов по идентификации фрактона в колебательном спектре лизоцима. Для этого с помощью НРН была получена функция плотности колебательных состояний $G(\omega)$ и проанализирована ее низкочастотная область.

Спектры НРН для дейтерированного и протонированного порошкообразного лизоцима были получены на времяпролетном спектрометре обратной геометрии КДСОГ-М, установленного на 10-ом канале импульсного реактора ИБР-2 (ЛНФ, ОИЯИ, Дубна). Измерения проводились одновременно для восьми углов рассеяния в диапазоне от 30^0 до 140^0 в режиме сброса энергии нейтронами при температурах 280 К и 311 К, 200 К. После вычитания фона от держателя образца и криостата экспериментальные данные обрабатывались в рамках однофононного некогерентного приближения. При этом обобщенная плотность колебательных состояний вычислялась согласно соотношению:

$$G(\omega) = \frac{\omega}{n(\omega)+1} \frac{\vec{k}_0}{\vec{k}_1} \frac{1}{Q^2} \left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega'} \right)_{incoh}$$

где \vec{k}_0 и \vec{k}_1 – волновые вектора падающего и рассеянного нейтронов, $\vec{Q} = \vec{k}_0 - \vec{k}_1$, $\hbar\omega'$ – энергия рассеянного нейтрона, $\left(\frac{d^2\sigma}{d\Omega d\omega'} \right)_{incoh}$ – дважды дифференциальное сечение некогерентного рассеяния, $n(\omega)$ – фактор Бозе – Эйнштейна.

С динамической точки зрения различия структурных свойств на разных масштабах выражаются в существовании частоты кроссовера ω_{co} . При частотах $\omega \ll \omega_{co}$, выполняется хорошо известный закон Дебая $G(\omega) \propto \omega^{d-1}$. Если же $\omega \gg \omega_{co}$, то плотность фрактонных состояний характеризуется спектральной размерностью \tilde{d} : $G(\omega) \propto \omega^{\tilde{d}-1}$. Таким образом, анализ показателя степени

низкоэнергетической области плотности колебательных состояний позволяет разделить вклады различных процессов.

На рис. 5 представлена низкочастотная часть $G(\omega)$ лизоцима в диапазоне переданных энергий от 1.8 мэВ до 25 мэВ в двойном логарифмическом масштабе, полученная при 280 К. Видно, что в данной зависимости можно выделить два линейных участка. Линейная аппроксимация проводилась по экспериментальным точкам с помощью метода наименьших квадратов. Первый линейный участок в диапазоне переданных энергий от 1.8 мэВ до 3.0 мэВ соответствует спектральной размерности 2.91 ± 0.05 , что согласуется с моделью Дебая для плотности состояний акустических мод твердого тела. Второй линейный участок функции плотности колебательных состояний лизоцима находится в диапазоне переданных энергий от 7.0 до 14.0 мэВ и соответствующая спектральная размерность \tilde{d} равна 1.47 ± 0.05 . Эта величина попадает в интервал значений фрактонных размерностей, рассчитанных при компьютерном моделировании фрактальной структуры различных белков. Анализ данных, полученных с помощью комплиментарных методов (комбинационного

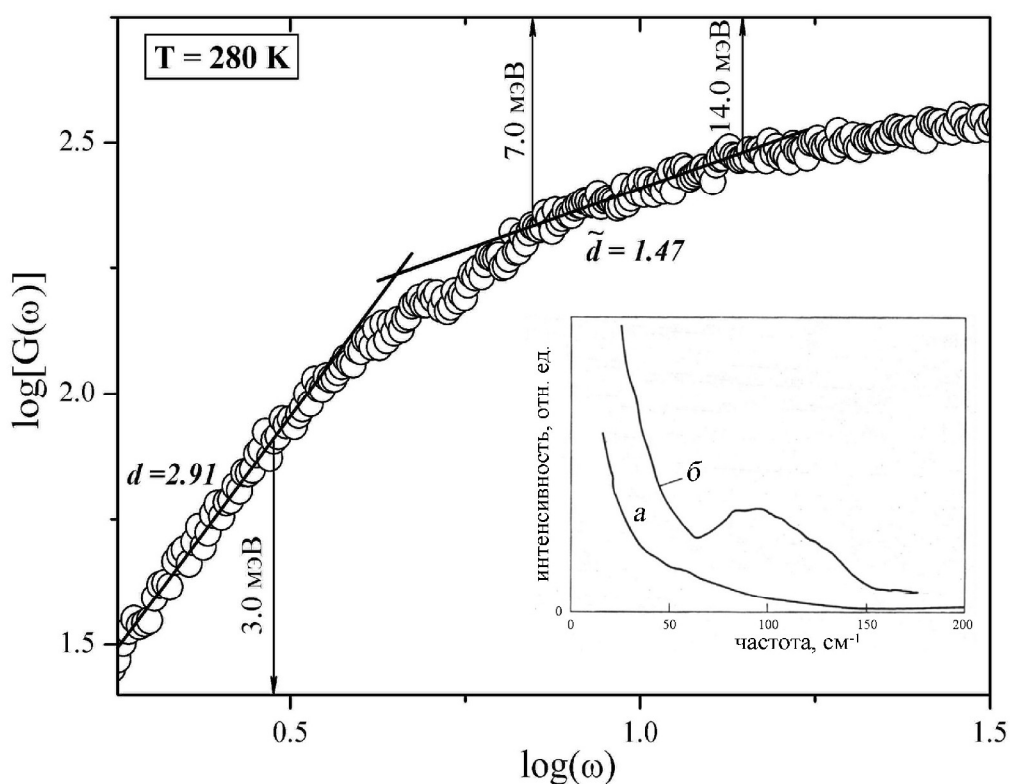


Рис. 5: Низкочастотная область обобщенной функции плотности состояний лизоцима при $T=280$ К. На вставке показан спектр комбинационного рассеяния света **а** – в буферном растворе и **б** – в растворе лизоцима [10]

Табл. 1: Спектральные размерности фононного и фрактонного режимов протонированного и дейтерированного лизоцима при различных температурах

	Диапазон переданных энергий, меВ	Температура, К	Спектральная размерность для <i>протонированного</i> лизоцима	Спектральная размерность для <i>дейтерированного</i> лизоцима
<i>фононный режим</i>	1.5-3.0	200	3.00±0.05	2.97±0.05
		280	2.91±0.05	2.82±0.05
		311	2.86±0.05	2.89±0.05
<i>фрактонный режим</i>	8.0-14.0	200	1.32±0.05	1.31±0.05
		280	1.47±0.05	1.40±0.05
	7.0-14.0	311	1.48±0.05	1.45±0.05

рассеяния света в кристаллах и растворах лизоцима и др.), показал существование в данном диапазоне частот возбуждения, природа которого не была установлена (см. вставку в рис. 5). Сопоставление наших данных по НРН и литературных данных позволяет утверждать, что нам удалось выявить фрактон в колебательном спектре лизоцима. Фононный и фрактонный режимы были идентифицированы и при температурах 311 К и 200 К (см. табл. 1).

Изучение дейтерированного лизоцима с помощью НРН позволило определить, как влияет изотопический обмен водорода на дейтерий на функцию плотности колебательных состояний белка. Из табл. 1 хорошо видно, что изотопический обмен водорода на дейтерий в лизоциме не приводит к существенным изменениям его низкочастотной динамики.

Различия между функциями плотности колебательных состояний протонированного и дейтерированного лизоцима наблюдались в диапазоне частот от 420 до 800 см⁻¹, а именно: i) уменьшалась функция плотности состояний после проведения изотопического обмена водорода на дейтерий в белке и ii) при дейтерировании лизоцима исчезают пики с максимумами в окрестности 575 см⁻¹ и 650 см⁻¹. Все эти различия свидетельствуют о существовании изотопического эффекта в колебательном спектре лизоцима.

В заключении сформулированы основные результаты диссертации. В более широком аспекте основные результаты рассматриваются в начале автореферата в пункте “Основные положения, выносимые на защиту”.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Svanidze A.V., Lushnikov S.G., Shuvalov L.A. Tetragonal lysozyme crystals: optimization of growth and morphology. // Abstracts of the 14th International Conference on crystal growth in conjunction with the 12th International Conference on vapor growth and epitaxy, Grenoble. – 2004. – P. 593.
2. Сванидзе А.В., Лушников С.Г., Шувалов Л.А. Дейтерированные кристаллы лизоцима: оптимизация роста и морфология. // Кристаллография. – 2005. – Т. 50. – № 5. – С. 850-856.
3. Лушников С.Г., Сванидзе А.В., Сашин И.Л. Функция плотности колебательных состояний лизоцима. // Письма в ЖЭТФ. – 2005. - Т. 82. - № 1. – С. 30-33.
4. Сванидзе А.В. Температурные изменения плотности состояний лизоцима и его дейтерированного аналога. // Научные сообщения молодых ученых. Международная зимняя школа по физике полупроводников, С.-Петербург–Зеленогорск. – 2005. – С. 16.
5. Сванидзе А.В., Сашин И.Л., Лушников С.Г. Изучение низкочастотной области функции плотности колебательных состояний лизоцима и ее температурной зависимости. // Тезисы докладов XVII Всероссийской конференции по физике сегнетоэлектриков, Пенза. – 2005. – С. 117.
6. Сванидзе А.В., Лушников С.Г., Kojima S. Аномальное температурное поведение гиперзвуковых акустических фононов в кристалле лизоцима // Письма в ЖЭТФ. – 2006. – Т. 84. – № 10. – С. 646-651.
7. Сванидзе А.В., Сашин И.Л., Лушников С.Г. Изучение влияния изотопического обмена водорода на дейтерий на колебательный спектр лизоцима с помощью неупругого рассеяния нейтронов. // Программа и аннотации докладов V Рабочего совещания по исследованиям на реакторе ИБР-2, Дубна. – 2006. – С. 43.
8. Lushnikov S.G., Svanidze A.V., Fedoseev A.I., Kojima S. Brillouin light scattering investigation of thermal denaturation of hen egg white lysozyme. // Abstracts of 20th International Conference on Raman Spectroscopy, Yokohama. – 2006. – P. 356.
9. Svanidze A.V., Sashin I.L., Lushnikov S.G., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Kojima S. Inelastic incoherent neutron scattering in some proteins. // Abstract book

- of the 8th Russian/CIS/Baltic/ Japan Symposium on Ferroelectricity, Tsukuba. – 2006. – P. 106.
10. Svanidze A.V., Lushnikov S.G. Phase transformations of lysozyme: Brillouin light scattering evidence. // Abstracts of International Workshop on Dynamics of Molecules and Materials, Grenoble. – 2007. – P. 17.
11. Lushnikov S.G., Svanidze A.V., Gvasaliya S.N., Sashin I.L. Inelastic incoherent neutron scattering investigations of the isotopic effect in hen egg white lysozyme. // Abstracts of International Workshop on Dynamics of Molecules and Materials, Grenoble. – 2007. – P. 58.

Цитируемая литература:

1. Iben I.E.T., Braunstein D., Doster W., Frauenfelder H., Hong M.K., Johnson J.B., Luck S., Ormos P., Schulte A., Steinbach P.J., Xie A.H., Young R.D. Glassy behavior of a protein. // *Phys. Rev. Lett.* – 1989. – V. 62. – № 16. – P. 1916-1919.
2. Weidlich T., Lindsay S.M. and Rupprecht A. Counterion effects on the structure and dynamics of solid DNA. // *Phys. Rev. Lett.* – 1988. – V. 61. – № 14. – P. 1674-1677.
3. Helman J.S., Coniglio A. and Tsallis C. Fractons and the fractal structure of proteins. // *Phys. Rev. Lett.* – 1984. – V. 53. – № 12. – P. 1195-1197.
4. Chen S.-H., Teixeira J. Structure and fractal dimension of protein-detergent complexes. // *Phys. Rev. Lett.* – 1986. – V. 57. – № 20. – P. 2583-2586.
5. Nakayama T., Yakubo K., Orbach R.L. Dynamical properties of fractal network: scaling, numerical simulations, and physical realizations. // *Rev. Mod. Phys.* – 1994. – V. 66. – № 2. – P. 381-443.
6. Ben-Avraham D. Vibrational normal-mode spectrum of globular proteins. // *Phys. Rev. B.* – 1993. – V. 47. – № 21. – p. 14559-14560.
7. Durbin S.D., Feher G. Crystal growth studies of lysozyme as a model for protein crystallization. // *J. Crystal. Growth.* – 1986. – V. 76. – P. 583-592.
8. Kobayashi J., Asahi T., Sakurai M., et al. The optical activity of lysozyme crystals // *Acta Cryst.* – 1998. – V. A54. – P. 581-590.

9. Arai S. and Hirai M. Reversibility and hierarchy of thermal transition of hen egg-white lysozyme studied by small-angle X-ray scattering. // *Biophys. J.* – 1999. – V. 76. – P. 2192-2197.
10. Genzel L., Keilmann F., Martin T.P., Winterling G., Yacoby Y., Frohlich H., Makinen M.W. Low-frequency Raman spectra of lysozyme. // *Biopolymers.* – 1976. – V. 15. – P. 219-225.

Диссертационная работа была выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований грант № 05-02-17678 и грант № 05-02-17822, программой ООФА РАН и Ведущей Научной Школой НШ-5169.2006.2.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.