

РЕНТГЕНОВСКОЕ И СИНХРОТРОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ — ПУТЬ К ПОЗНАНИЮ СТРУКТУРЫ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

Как известно, до 80% информации об окружающем мире человек получает посредством зрения.

Очевидно, что визуализация исследуемого объекта во многих случаях значительно расширяет возможности его изучения —

такие подходы, в частности, использует структурная биология.

Выяснение строения биомакромолекул и элементов клетки на всех уровнях ее организации, что является предметом этой науки, становится одним из основных движителей развития

современной биологии в целом. Бурный прогресс последних лет в данной сфере во многом связан с достижениями

в области рентгеноструктурного анализа и новых технологий, основанных на использовании синхротронного излучения.

В Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт» создана необходимая инфраструктура для осуществления самых амбициозных проектов в области структурной биологии.

Вместе с тем проведение работ на современном технологическом уровне подразумевает создание уникальных экспериментальных мегаустановок, что зачастую возможно лишь при объединении усилий нескольких стран.

В связи с этим Курчатовский институт активно участвует в международном (Германия, Россия и др.) проекте по строительству лазера на свободных электронах — с успешным его завершением ученые связывают большие надежды в области структурной биологии.

Член-корреспондент РАН Михаил КОВАЛЬЧУК,
 Член-корреспондент РАН Владимир ПОПОВ,
 Центр нано-, био-, информационных, когнитивных,
 социогуманитарных наук и технологий (НБИКС)
 НИЦ «Курчатовский институт» (Москва)

ЗАДАЧИ И МЕТОДЫ ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Расшифровка генома человека, завершившаяся в 2003 г., знаменовала открытие новой эры в развитии наук о жизни и сделала XXI в. веком биологии. Создаются и ускоренными темпами совершенствуются высокопроизводительные методы исследования геномов, транскриптомов*, протеомов**, метаболомов***. Формируются и бурно развиваются системная биология, выросшая из биоинформатики, синтетическая биология, ставящая целью проектирование и построение новых, в том числе несуществующих в природе живых систем. Биология, ранее бывшая в основном описательной дисциплиной, все более превращается в науку количественную, приближается к таким точным отраслям знания, как химия и физика. Во многом этот прогресс связан с успехами структурной биологии — междисциплинарной области, занимающейся изучением строения белков, нуклеиновых кислот, их сложных мультисубъединичных комплексов, клеточных органелл, мембран, элементов цитоскелета и т.п. на всех уровнях организации клетки.

Говорят, увидеть — значит понять. Визуализация, расшифровка пространственной структуры биомолекул позволила выяснить принципы работы

сложных молекулярных «бионаномашин» и белковых комплексов, таких как рибосома, ответственная за «строительство» белков в клетке, АТФ-аза, обеспечивающая синтез универсального клеточного «топлива» — аденозинтрифосфата, фотосинтетические центры, играющие ведущую роль в фотосинтезе. Выяснение структурных особенностей молекул-биомишеней — практически обязательный этап при разработке новых лекарственных препаратов. Без знания пространственной структуры природных катализаторов — ферментов — невозможно понимание молекулярных механизмов действия последних и целенаправленного управления их свойствами.

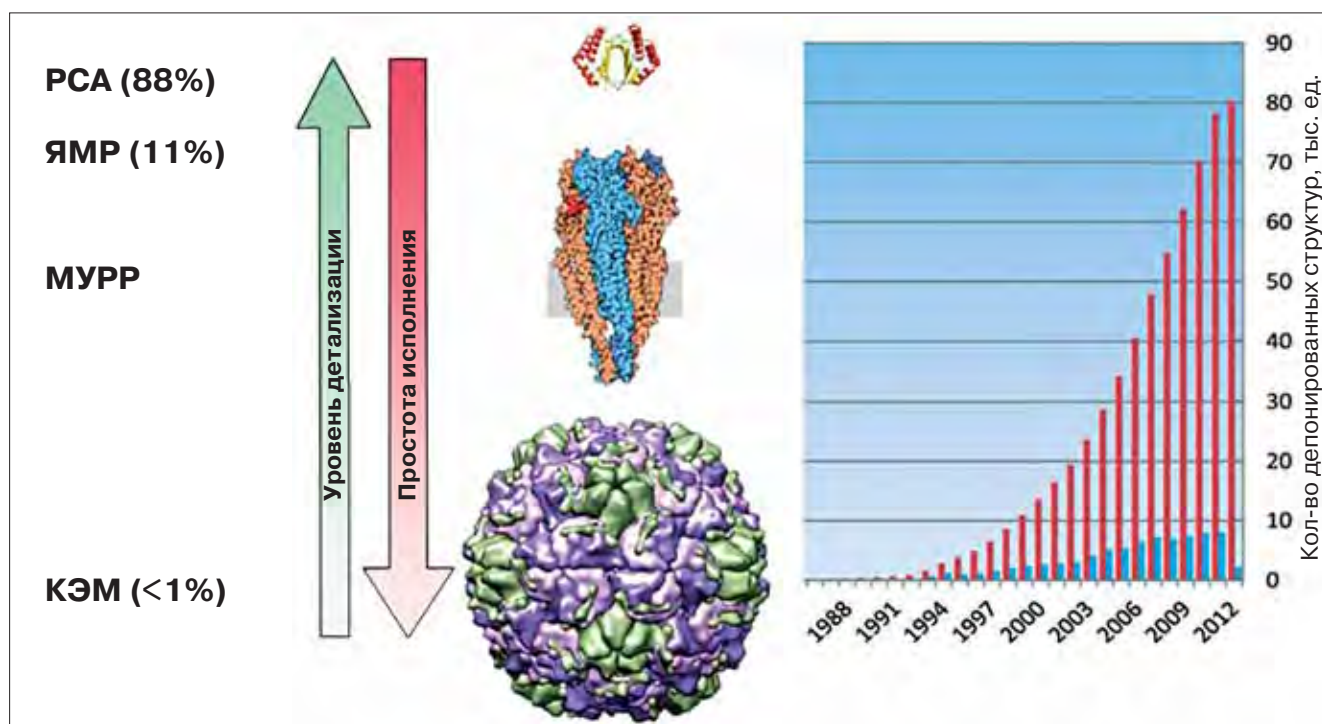
В настоящее время существует множество физико-химических методов, с помощью которых исследуют те или иные особенности организации макромолекул, например, ближайшее окружение атомов металлов в молекулах белков или же специально введенных в них флуоресцентных или парамагнитных меток. Однако только некоторые из подходов позволяют выяснить общее строение объекта и детали его атомной и молекулярной структуры. К таковым в настоящее время относятся рентгеноструктурный анализ (РСА), методы малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и криоэлектронная микроскопия (КЭМ).

Каждый из вышеперечисленных методов имеет не только свои преимущества, но и ограничения. Так, для рентгеноструктурного анализа требуются кристаллы макромолекул, получение которых представляет сложную самостоятельную задачу. Несмотря на значительный прогресс в применении ЯМР, дающего информацию о структуре макромолекул непосредственно в растворе, исследование данным методом крупных биомолекул пока затруднительно. Тем не менее, при совместном использовании эти подходы позволяют получить достаточно детальную инфор-

*Транскрипт — молекула РНК, образующаяся в результате транскрипции — экспрессии соответствующего гена или участка ДНК. Совокупность всех транскриптов, синтезируемая одной клеткой или их группой, называется транскриптомом. В отличие от генома, который, как правило, одинаков для всех клеток одной линии, транскриптом может сильно меняться в зависимости от условий окружающей среды (*прим. ред.*).

**Протеом — термин для обозначения всей совокупности белков (протеинов) организма, производимых клеткой, тканью или организмом в определенный период времени (*прим. ред.*).

***Метаболом — полный набор низкомолекулярных метаболитов (промежуточных и конечных продуктов обмена веществ), которые могут быть найдены как в биологических образцах, так и в единичном организме (*прим. ред.*).



Основные методы исследования пространственных структур макромолекул и статистика роста числа структур в банке данных RCSB (www.rcsb.org).

мацию даже о весьма сложно организованных биологических объектах. Например, получив на основе МУРР или КЭМ общее представление о форме и структуре предмета исследования, можно, разобрав затем его методами молекулярной биологии «на части», изучить на более тонком уровне «планировку» его отдельных фрагментов (доменов, отдельных белков) с помощью ЯМР или PCA, а потом воссоздать детали организации.

Вся информация о структурах макромолекул, полученная учеными разных стран, в настоящее время централизованно хранится в банке данных пространственных структур — Protein Data Bank (www.rcsb.org), созданном в 1971 г. в Брукгейвской национальной лаборатории (США). Статистика показывает: начиная с середины 1990-х годов в нем наблюдается значительный рост числа структур, что связано в первую очередь с бурным развитием методической базы. На октябрь 2012 г. их здесь насчитывалось более 85000, притом что подавляющее большинство данных (88%) было получено с использованием метода PCA. Таким образом, несмотря на все ограничения и сложности, данный подход на сегодня — основа решения задач структурной биологии.

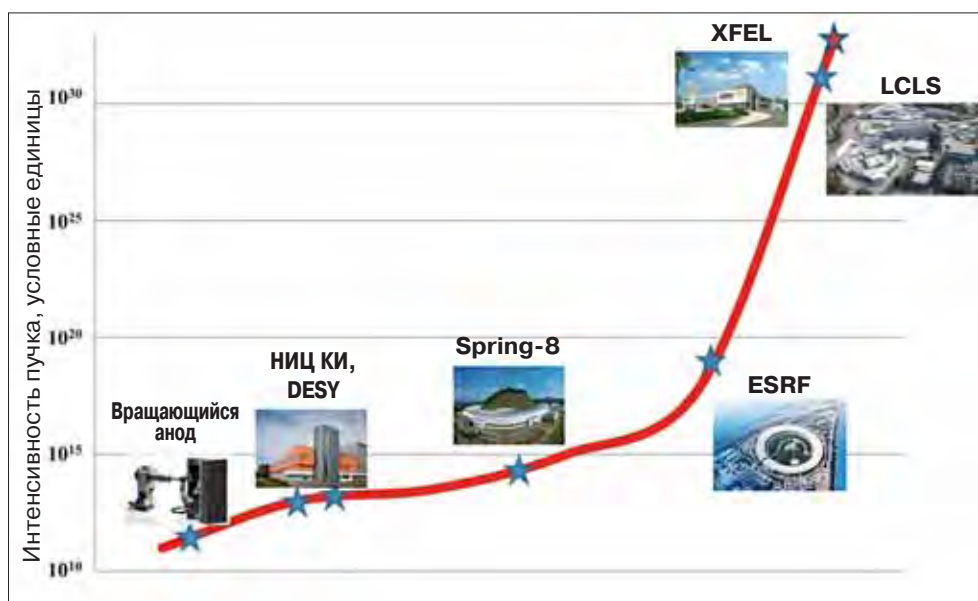
РЕНТГЕНОВСКАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ

Напомним, кристаллография — наука о свойствах кристаллов — первоначально оформилась как часть геологии и использовалась в основном описательные методы (углы, огранка и т.п.) для изучения минералов. В дальнейшем, благодаря успехам химии, она перешла к исследованию их химического состава, но

только в XX в., в первую очередь благодаря открытию возможностей рентгеновского излучения, стала самостоятельной областью физики, а также сыграла и продолжает играть важнейшую роль в развитии современной структурной биологии.

В основе рентгеноструктурного анализа лежит явление дифракции рентгеновских лучей (открыты в 1895 г. немецким физиком Вильгельмом Рентгеном, нобелевским лауреатом 1901 г.) на трехмерной кристаллической решетке. Обнаружил это явление в 1912 г. соотечественник Рентгена Макс фон Лауэ (нобелевский лауреат 1914 г.), а теоретическое обоснование ему дали в 1913 г. британские физики Уильям Генри и Уильям Лоренс Брэгги (нобелевские лауреаты 1915 г.) и независимо в том же году — российский ученый Георгий Вульф (член-корреспондент РАН с 1921 г.).

Активно использовать для изучения макромолекул этот метод начали в 1930-1940-х годах. Первую рентгенограмму белкового кристалла (им оказался пепсин — один из протеолитических ферментов, закристаллизованный в 1929 г. американским биохимиком Джоном Нортропом) получили в 1934 г. британские ученые Джон Бернал и Дороти Ходжкин. В 1941 г. их соотечественник Уильям Эстбюри получил первую рентгенограмму ДНК. На основе рентгенограмм, выполненных британскими биофизиками Розалинд Франклин и Морисом Уилкинсом, американский биолог Джеймс Уотсон и его британский коллега Фрэнсис Крик (последние трое — нобелевские лауреаты 1962 г.) в 1953 г. предложили модель двойной спирали ДНК. А в 1958 г. под руководством английских биохимиков Макса Перутца и Джона Кендрю



Сравнение интенсивности источников рентгеновского излучения различных поколений. Расположение указанных синхротронных источников: НИЦ КИ — Россия (НИЦ «Курчатовский институт»); DESY — Германия (Deutsche Synchrotron); Spring-8 — Япония (RIKEN); ESRF — Франция (Европейская лаборатория молекулярной биологии); CLS — США (SLAC National Accelerator Laboratory); XFEL — Германия (Deutsche Synchrotron, международный проект).

были расшифрованы первые структуры глобулярных белков — миоглобина и гемоглобина. Так началось стремительное продвижение рентгеноструктурного анализа в биологию.

В Советском Союзе огромный вклад в кристаллографию вообще и разработку метода рентгеноструктурного анализа в частности внес академик Борис Вайнштейн, многие годы возглавлявший Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова АН СССР. В его лаборатории работы по кристаллографии биомолекул были инициированы еще в 50-х годах XX в., впервые получены кристаллы ряда важнейших белков и изучена их атомная структура. Под его руководством расшифрованы структуры леггемоглобина (1975 г.) — кислородсвязывающего белка растений, аспаратаминотрансферазы (1978 г.) — фермента, широко используемого в медицинской практике для лабораторной диагностики, и каталазы (1981 г.) — белка с рекордным на то время молекулярным весом более 200 000 Да. Для своего времени это были достижения высшего мирового уровня. Та же лаборатория стала одним из пионеров применения метода РСА к изучению таких крупных биологических объектов, как вирусы.

Школа Вайнштейна заложила прочный фундамент развития структурной биологии и оказала решающее влияние на становление рентгеноструктурного анализа биомолекул в нашей стране. Отдел белковой кристаллографии в Институте кристаллографии (ИК) РАН остается одним из лидеров соответствующих исследований, а ученики и последователи Бориса Вайнштейна ныне активно работают в Национальном исследовательском центре «Курчатовский институт» и учреждениях РАН — Институте молеку-

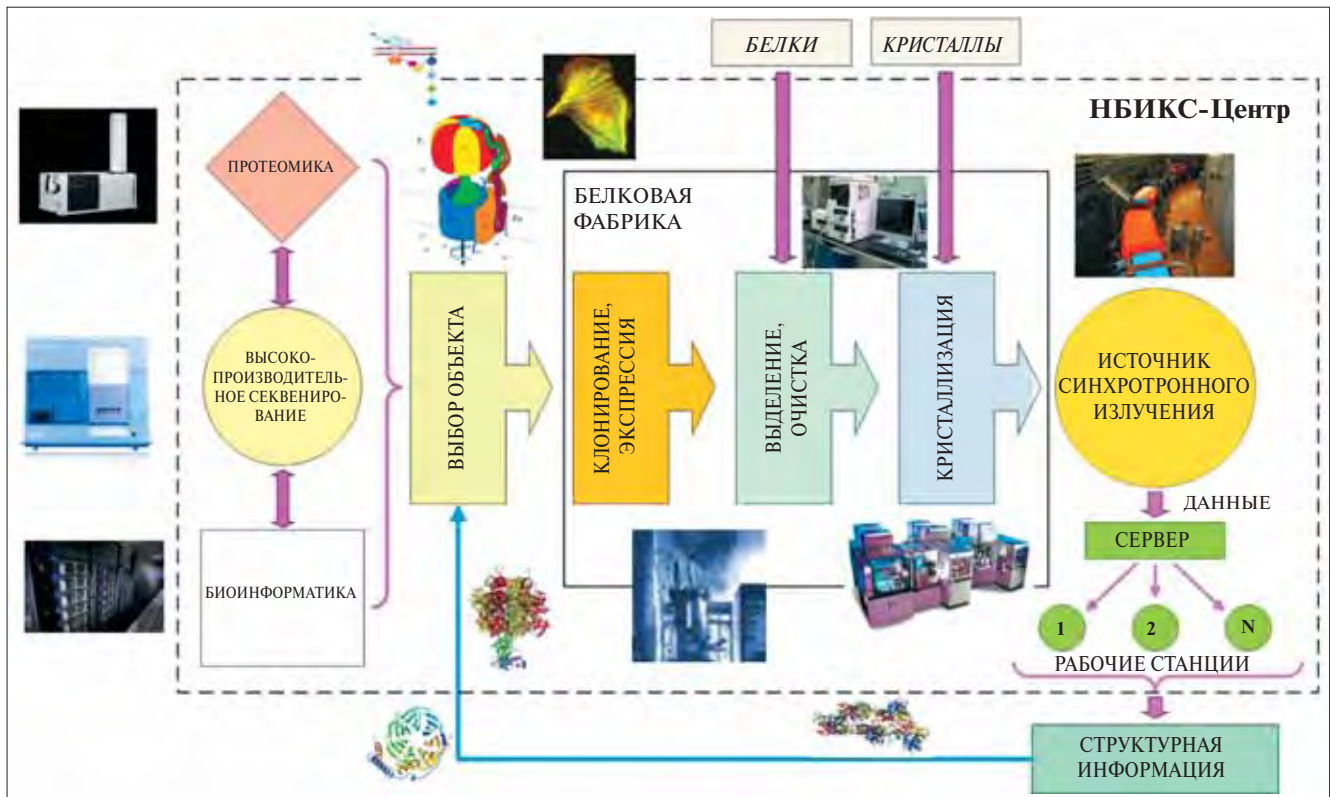
лярной биологии им. В. А. Энгельгардта, Институте белка, Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова, Институте биохимии им. А. Н. Баха.

Значителен вклад российской научной школы и в становление другого направления в использовании рентгеновского излучения для изучения макромолекул — малоуглового рентгеновского рассеяния. Работы Льва Фейгина (ИК РАН) и его ученика Дмитрия Свергуна заложили теоретические основы метода, позволили значительно расширить его применение.

ИСТОЧНИКИ РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В экспериментальных установках, предназначенных для проведения РСА, источник рентгеновского излучения испускает пучок фотонов. Проходя через ряд устройств, необходимых для его фокусировки и монохроматизации, он попадает на кристаллический образец, а получаемая дифракционная картина регистрируется находящимся за ним детектором.

В ранних экспериментах по определению пространственных структур макромолекул в качестве источника рентгеновских волн прибегали к вакуумной рентгеновской трубке. Позднее, во избежание перегрева, стали использовать трубки с вращающимся анодом. Различные модификации этого метода находят применение в лабораторных источниках рентгеновского излучения. Их недостаток — низкая интенсивность получаемого пучка, что накладывает серьезные ограничения на размер кристаллов, используемых в экспериментах (чем ниже интенсивность пучка, тем большего размера должен быть кристалл).



Место и задачи «Белковой фабрики» в структуре НБИК-центра НИЦ «Курчатовский институт».

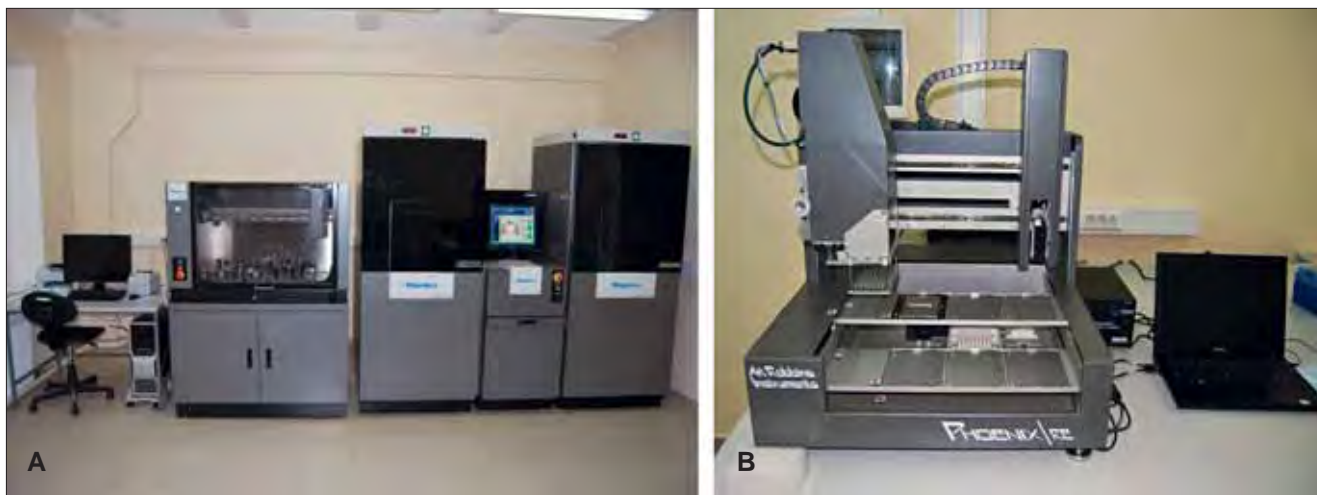
Совершенствованию метода РСА способствовало появление одного из типов резонансных ускорителей заряженных частиц — синхротрона. Основная его задача — разгон электронов, позитронов или протонов до высоких энергий. Сами по себе они для метода РСА не пригодны, однако в процессе отклонения от прямолинейного движения (что и происходит в синхротронах) заряженные частицы испускают фотоны — кванты света различной энергии, которые при определенных условиях могут быть использованы для целей рентгеноструктурного анализа. Рентгеновское синхротронное излучение современных ускорителей характеризуется большой яркостью. Так, поток фотонов от любого синхротронного источника превышает значение, получаемое на вращающихся анодах, на порядки. Увеличение яркости излучения имеет два преимущества: повышение скорости съемки и возможность работы с более мелкими кристаллами, что крайне важно, принимая во внимание сложности, связанные с кристаллизацией биообъектов.

В настоящее время в мире функционируют синхротроны нескольких поколений. Основное различие между ними состоит в типе используемых специальных устройств, отклоняющих пучок заряженных частиц от прямолинейного движения и генерирующих тем самым поток электромагнитного излучения. Такие устройства носят название ондуляторов* или

виглеров и представляют собой периодическую систему отклоняющих (электрических или магнитных) полей. Синхротронное излучение, получаемое в крупных научных центрах на соответствующих установках третьего поколения, позволяет (за счет высокой интенсивности) использовать для целей РСА кристаллы очень малого размера (20 мкм и менее) и проводить полную съемку довольно сложных объектов буквально в считанные минуты.

Новым прорывом в области технологий РСА могут стать рентгеновские лазеры на свободных электронах (XFEL). В них излучение генерируется моноэнергетическим пучком электронов, распространяющимся в ондуляторе. Двигаясь в нем по кривой, близкой к синусоиде, электроны излучают фотоны, энергия которых зависит от энергии электронов и параметров установки, а образующийся лазерный луч собирается и усиливается системой зеркал. XFEL отличается возможностью изменять характеристики получаемого рентгеновского излучения в широких пределах и достигать очень высоких его интенсивностей, существенно превышающих реализуемые на синхротронах третьего поколения. В лазере на свободных электронах для РСА можно использовать микро- или даже нанокристаллы, а в идеале и отдельные макромолекулы, что открывает чрезвычайно заманчивые перспективы, например, в области исследования некристаллических объектов. Важно отметить, что значительную роль в разработке теории лазеров на свободных электронах внесли российские ученые.

*Идею создания магнитного ондулятора предложил английский физик Г. Мотц в 1951 г., а впервые реализовали ее в США в 1953 г. (прим. ред.).



Система роботизированной кристаллизации макромолекул.

**А — слева направо: управляющий сервер, модуль Alchemist, два инкубатора Gallery и модуль Minstrel (между инкубаторами);
В — модуль Phoenix.**

В настоящее время первый источник XFEL уже запущен в Стенфорде (США). Там проведены пилотные эксперименты, получены первые дифрактограммы нанокристаллов и некристаллических объектов, подтвердившие уникальные возможности метода. Самый же мощный рентгеновский лазер на свободных электронах в настоящее время строится на базе германского центра по физике частиц (DESY) в Гамбурге. Реализация столь крупного проекта (стоимость — свыше 1 млрд евро) потребовала концентрации усилий ряда стран. Россия — полноправный его участник, она обеспечивает около 25% общего бюджета и участвует в проектировании и изготовлении уникального оборудования. Ожидается, что XFEL в DESY начнет функционировать в 2015 г.

ОТ ГЕНА — К СТРУКТУРЕ БЕЛКА

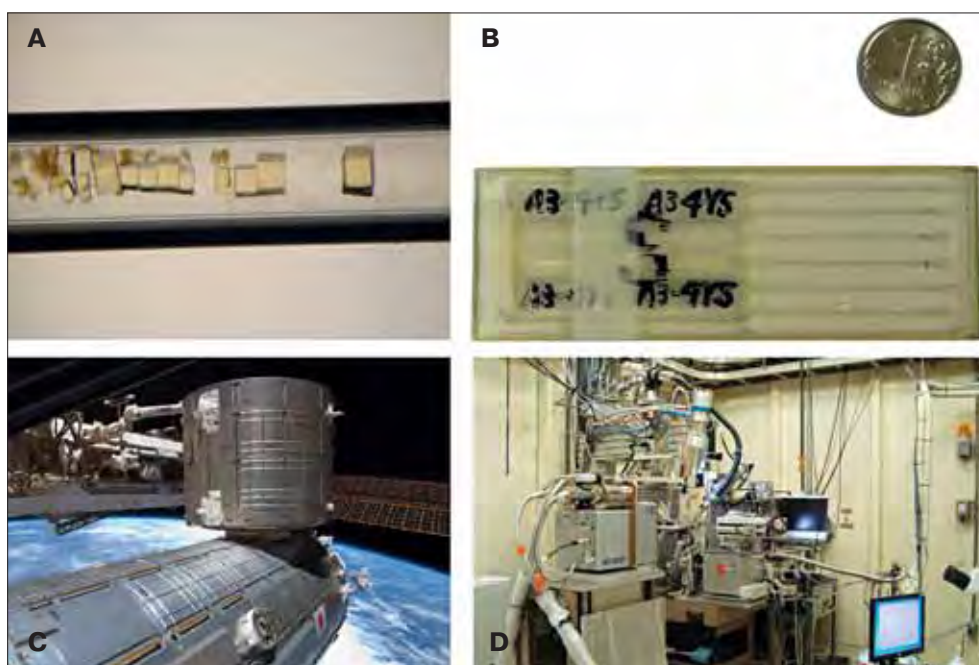
От постановки задачи в любом структурно-биологическом проекте — выбора объекта исследования (например, гена, кодирующего определенный белковый продукт) — до достижения конечного результата, т.е. установленной структуры целевого белка или белкового комплекса, необходимо пройти ряд этапов: провести клонирование выбранного гена, добиться экспрессии (синтеза) функционального белкового продукта, провести его выделение и очистку, получить кристаллы, пригодные для изучения, провести рентгенографический эксперимент, обработать данные, «решить» и уточнить структуру макромолекулы. И каждая из перечисленных стадий, как правило, сама по себе отдельная сложная научная проблема, где стопроцентный успех далеко не гарантирован.

Правда, развитие современных технологий молекулярной и структурной биологии в последние годы значительно повысило шансы специалистов на успех. Тем не менее существует определенная вероятность неудачи практически на каждом из указан-

ных этапов. В частности, одной из самых непредсказуемых, особенно для белков, отличающихся сложной пространственной организацией и/или наличием простетических групп (т.е. групп небелкового происхождения, входящих в состав макромолекул: металлов, железо-серных центров, производных порфиринов и т.п.), является стадия экспрессии белкового продукта в правильном функциональном состоянии и в количествах, которые позволяют перейти к его структурной и физико-химической характеристике.

Не менее сложная стадия — кристаллизация образца. Как указывалось, она ограничивает применение метода PCA, ибо в отсутствие адекватной теории, позволяющей сопоставить определенный объект с конкретными условиями кристаллизации, до сих пор остается самым проблемным и наименее прогнозируемым этапом структурного исследования. Чаще всего задача получения кристаллов решается прямым перебором большого числа вариантов условий кристаллизации (от сотен до нескольких тысяч для одного белка), что требует значительных временных и трудовых затрат.

Таким образом, лишь относительно небольшая часть инициированных проектов заканчивается получением информации о структуре анализируемого объекта, причем за разумный период времени. В случае «несложных» белков типа гидролаз, оксидоредуктаз, не содержащих ковалентно-связанных простетических групп и т.п., общий «процент успеха» колеблется в среднем от 10 до 30%. Причем, как уже отмечалось, наиболее проблемными стадиями являются экспрессия белкового продукта (до 60% неудач), а также получение кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного эксперимента (до 90% неудач). Необходимо учитывать и временные затраты: скажем, процесс получения кристаллов мембранных белков с необходимыми параметрами может потребовать нескольких человеко-лет.



Элементы эксперимента по кристаллизации макромолекул в условиях микрогравитации. А – капилляр с выросшими кристаллами, В – паллета с капиллярами после проведения эксперимента, С – японский модуль Кибо, предназначенный для проведения различных экспериментов в условиях микрогравитации, D – станция рентгеновской кристаллографии на синхротроне Spring-8 (Япония).

НБИКС-ЦЕНТР НИЦ «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», основанный в 1943 г., — один из ведущих мировых научных центров. В настоящее время это многопрофильное научно-исследовательское учреждение с развитой экспериментальной базой, включающей в себя ядерные реакторы и критические стенды, установки для термоядерного синтеза и плазменных технологий, ускорительные комплексы, кластерную технологическую линию для микроэлектроники и др. Основными направлениями его деятельности остаются атомная энергетика, термоядерный синтез, ядерная медицина и др. С недавних пор число научных направлений пополнилось нанобиотехнологиями, наноматериалами и наносистемами.

В 2009 г. в структуре НИЦ «Курчатовский институт» появилось новое подразделение — Центр нано-, био-, информационных, когнитивных, социогуманитарных наук и технологий (НБИКС-центр). Цель его создания — формирование инфраструктурной базы для конвергентного развития различных областей наук и технологий и достижения прорывных результатов при их взаимодействии. В его составе несколько комплексов, в том числе вычислительный (суперкомпьютерный кластер), синхротронно-нейтронный (источник синхротронного излучения и нейтронный реактор ИР-8), ядерной медицины, микроэлектроники и сверхпроводимости, а также Институт НБИКС-исследований и технологий, включающий отделения кристаллографии и материаловедения, молекулярной биологии, нейрофизиологии и когнитивных наук, математического моделирования, робототехники и микросистем, социогуманитарных наук, прикладных проблем.

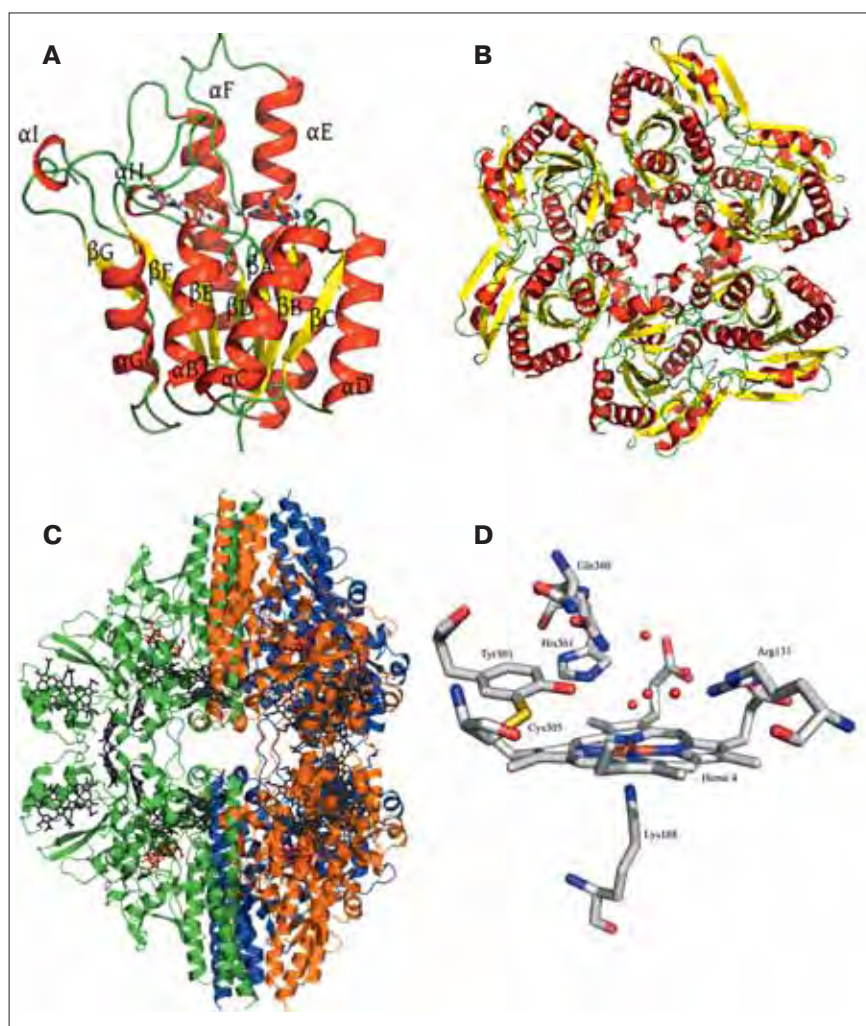
В НБИКС-центре сосредоточены как мегаустановки мирового класса (синхротронный источник, нейтронный реактор), так и высококлассное рентгеновское оборудование, атомно-силовые и электронные микроскопы, различные технологические приборы для работ в области нанобиотехнологий и микроэлектроники, так называемые «чистые» зоны и другое уникальное оборудование.

Располагая источником синхротронного излучения, на базе которого реализуются проекты, связанные с использованием методов рентгеноструктурного анализа и малоуглового рентгеновского рассеяния, уже сейчас НБИКС-центр предоставляет уникальные возможности для исследований в области структурной биологии. Кроме того, в процессе реализации находится создание материальной базы, позволяющей применять методы криоэлектронной микроскопии и ядерного магнитного резонанса для изучения структур макромолекул, что значительно расширит круг решаемых задач.

«БЕЛКОВАЯ ФАБРИКА»

Этому специализированному подразделению НБИКС-центра, запущенному в эксплуатацию весной 2010 г., отводится ключевое место в реализации структурно-биологических проектов НИЦ «Курчатовский институт». «Белковая фабрика» обеспечивает получение, наработку, очистку и структурно-функциональную характеристику исследуемых объектов с использованием синхротронного источника. В качестве исходного объекта исследований могут выступать данные полногеномного секвенирования, полученные в геномном подразделении НБИКС-центра, генетические конструкции для экспрессии конкретных белков, представляющих интерес,

Пространственные структуры ряда ферментов, полученные «Белковой фабрикой»: А — термостабильная алкогольдегидрогеназа из *T.sibiricus* (разрешение — 1,7Å), В — гексамерная уридинфосфорилаза из *S.oneidensis* (0,95Å), кристаллы которой выращены в условиях микрогравитации, С — 48-гемовая цитохром-с-нитритредуктаза из *T.nitratireducens* (1,4Å) и активный центр этого фермента (D).



например, для биомедицины, белки различной степени очистки или даже их готовые кристаллы.

«Фабрика» располагает уникальными возможностями скрининга и оптимизации условий кристаллизации белков. Для решения таких задач здесь помимо традиционных методов имеются два мощных инструмента — система роботизированной кристаллизации и кристаллизация в условиях микрогравитации. Первый из них предназначен для поиска первоначальных условий кристаллизации образцов. Все операции (за исключением стадий переноса образцов между отдельными модулями комплекса, которые производятся оператором), начиная от приготовления исходных растворов и заканчивая фотомониторингом и документированием процесса кристаллизации, осуществляются в автоматическом режиме. Второй инструмент открывает дополнительные перспективы улучшить качество кристаллов, получаемых стандартными (наземными) методами. В условиях микрогравитации отсутствие конвекции и седиментации* обеспечивает

равномерный доступ вещества ко всем растущим граням кристалла и в ряде случаев повышает его качество. Соответствующие космические эксперименты проводятся на борту МКС в рамках международного сотрудничества Роскосмоса с Японским космическим агентством (JAXA).

РЕАЛИЗУЕМЫЕ ПРОЕКТЫ

В настоящее время на базе «Белковой фабрики» и источника синхротронного излучения реализуется ряд проектов в области биотехнологии и биомедицины, в том числе структурно-функциональные исследования ферментов экстремофильных* организмов, структурные исследования сложных белковых комплексов и молекулярных «наномашин», разработка новых терапевтических препаратов.

Цель первого из этих проектов — поиск ферментов с полиэкстремофильными свойствами: термостабильностью, галотолерантностью (солеустойчиво-

*Седиментация — оседание частиц дисперсной фазы в жидкости или газе под действием гравитационного поля или центробежных сил (прим. ред.).

*Экстремофилы — общее название живых существ (в том числе бактерий и микроорганизмов), способных жить и размножаться в экстремальных условиях окружающей среды (экстремально высоких/низких температурах, чрезмерном давлении и т.п.) (прим. ред.).

стью) и стойкостью к органическим растворителям. Исходными данными служат геномы термофильных архей (коллекция доктора биологических наук Елизаветы Бонч-Осмоловской*, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН), секвенированные в Геномном центре НБИКС-центра, возглавляемом академиком Константином Скрыбиным, и Центре «Биоинженерия» РАН**. На основании соответствующего анализа идет отбор ферментов, представляющих интерес для целей биотехнологии и медицины, выясняется взаимосвязь между особенностями структуры этих белков и их способностями сохранять физиологическую активность при экстремальных параметрах окружающей среды.

В частности, подробно изучена алкогольдегидрогеназа из *Thermococcus sibiricus*, обладающая комплексом уникальных полиэкстремофильных свойств: стабильностью вплоть до 100 °С, что является абсолютным рекордом для НАД(Ф)-зависимых ферментов***, способностью сохранять активность в присутствии высоких концентраций солей (до 4 М) и органических растворителей (до 50%) при повышенных (до 55 °С) температурах. В свою очередь, выяснение пространственной структуры фермента при разрешении 1,7 Å позволило выявить структурные особенности, обеспечивающие его сверхвысокую стабильность к внешним воздействиям.

В рамках проекта «Структура сложных молекулярных наномашин» выясняются характеристики мультисубъединичных белков, в том числе включающих различные протетические группы и металллические центры. К таким относятся, например, гексамерная уридинфосфорилаза, а также гексамерная цитохром-с-нитритредуктаза (НР), катализирующая одну из самых сложных в природе реакций 6-электронного восстановления нитрита или сульфита до аммиака и сероводорода соответственно. Следует отметить, что кристаллы уридинфосфорилазы, позволившие достичь сверхвысокого, так называемого атомного разрешения (0,95 Å), что обеспечивает определение положения даже атомов водорода, были получены лишь с использованием метода кристаллизации в условиях микрогравитации на МКС, в то время как в наземных экспериментах качество кристаллов было значительно хуже.

Подробно проанализированы физико-химические, кинетические и спектральные свойства НР из различных источников в растворе, а также получено более десятка структур высокого (1,4–2,0 Å) разрешения для так называемого апо-фермента (активный

центр не содержит связанных молекул) и его комплексов с низкомолекулярными веществами — субстратами и ингибиторами. Фермент существует в растворе и кристалле в виде симметричного и стабильного гексамера и содержит 48 ковалентно связанных гемов*, что является абсолютным рекордом по числу последних, приходящихся на молекулу белка. При этом 8 гемов, содержащихся в каждом из мономеров НР, образуют каноническую пространственную укладку, характерную, как было показано, и для других мультигемовых цитохромов. Высокое разрешение, с которым получены структуры НР и ее комплексов, позволило выявить ряд уникальных особенностей устройства активного центра фермента, объясняющих высокую эффективность катализа.

Коротко скажем и о проекте «Разработка новых терапевтических препаратов». Выясняется, в частности, структура и функции белка паркин — он, как предполагают, играет важную роль в патогенезе болезни Паркинсона. В рамках исследования так называемого механозависимого ростового фактора идет поиск способов усиления процессов репарации и регенерации мышечных тканей. Сотрудниками «Фабрики» клонировано и экспрессировано более 20 различных тирозин-киназ — одной из основных белковых мишеней для разработки новых поколений противораковых препаратов.

В целом за первые два года функционирования «Белковой фабрики» успешно экспрессировано, выделено и очищено свыше 40 белковых препаратов. 29 из них (70%) успешно кристаллизованы. Получено более 80 наборов дифракционных данных (включая комплексы с лигандами) для 22 индивидуальных белков, депонировано в банк данных 27 структур, при этом более 70% всех полученных структур имеют разрешение лучше 2 Å. Эти примеры наглядно показывают: «Белковая фабрика» становится мощным инструментом, позволяющим проводить углубленные структурно-функциональные исследования биомакромолекул на самом современном методическом уровне.

*Гем — небелковая часть (так называемая протетическая группа) многих белков, например, гемоглобина — его красящее вещество (прим. ред.).

*См.: Е. Бонч-Осмоловская. Термофилы: прошлое планеты, будущее биотехнологии. — Наука в России, 2010, № 4 (прим. ред.).

**См.: Н. Равин. Геномный анализ в экологии микроорганизмов. — Наука в России, 2011, № 5 (прим. ред.).

***НАД(Ф) — широко распространенный в природе кофермент дегидрогеназ — ферментов, катализирующих важнейшие окислительно-восстановительные реакции в живых клетках (прим. ред.).