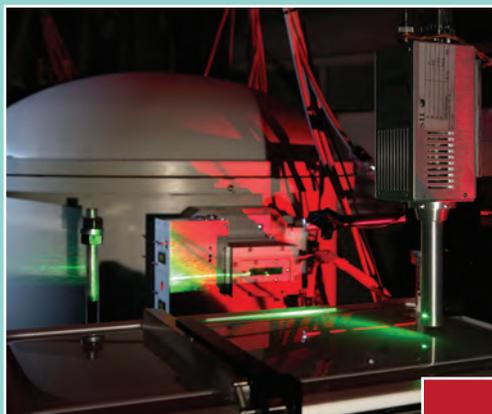


# БЕЛКОВЫЕ КРИСТАЛЛЫ И ОРГАНИЧЕСКИЕ ПЛЕНКИ. СИНТЕЗ И СТРУКТУРА

СБОРНИК НАУЧНО-ПОПУЛЯРНЫХ СТАТЕЙ  
ПОД РЕДАКЦИЕЙ М.В. КОВАЛЬЧУКА



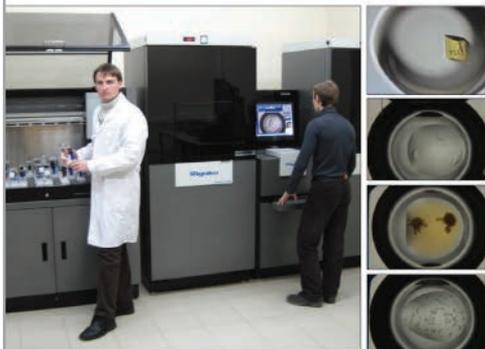
## СОДЕРЖАНИЕ

<b>От редактора</b> .....	<b>5</b>
<b>Новые тенденции в современном материаловедении</b> <i>М.В. Ковальчук. Научные проблемы национальной безопасности. 2002. Вып. 3.</i> .....	<b>6</b>
<b>На пороге новой жизни российских «ростовиков»</b> <i>М.В. Ковальчук. ПЕРСТ (Перспективные технологии): информационный бюллетень. 1999. Том. 6. Вып. 13/14</i> .....	<b>11</b>
<b>Молекулярный конструктор Ленгмюра–Блоджетт</b> <i>М.В. Ковальчук, В.В. Клечковская, Л.А. Фейгин</i> <i>Природа. 2003. № 11</i> .....	<b>17</b>
<b>Органические наноматериалы, наноструктуры и нанодиагностика</b> <i>М.В. Ковальчук. Вестник Российской академии наук. 2003. Том 73. № 5.</i> .....	<b>32</b>
<b>Рентгеновское и синхротронное излучение — путь к познанию структуры биомакромолекул</b> <i>М.В. Ковальчук, В.О. Попов. Наука в России. 2013. № 3.</i> .....	<b>41</b>
<b>Кристаллы для изучения белковых структур</b> <i>И.П. Куранова, М.В. Ковальчук. Природа. 2014. № 2</i> .....	<b>54</b>

**РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ  
НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СТАНЦИЯХ  
Курчатовского источника синхротронного излучения**

**КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ**

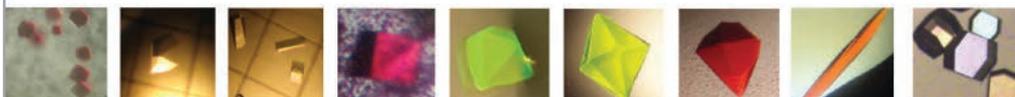
*АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ  
НА ЗЕМЛЕ*



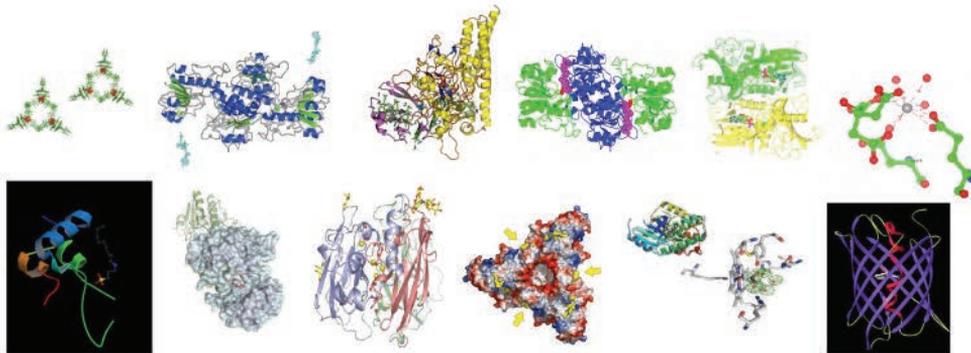
*В КОСМОСЕ*



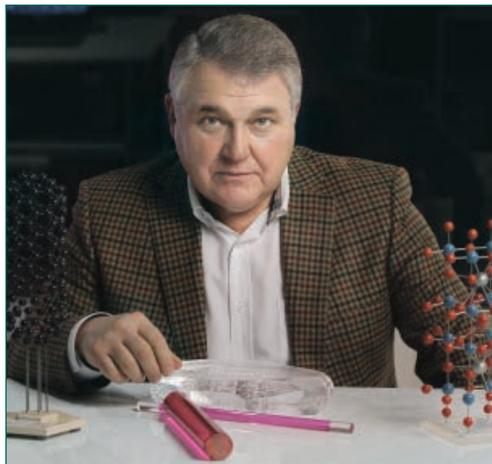
**КРИСТАЛЛЫ БЕЛКОВ**



**Определение пространственной структуры  
белковых молекул по их дифракционным данным**



## ОТ РЕДАКТОРА



*Уважаемые читатели!*

*Сегодня мы присутствуем при рождении нового этапа материаловедения, который можно назвать биоорганическим материаловедением. О чем идет речь? Вся молекулярная биология получила мощнейший толчок, в первую очередь, благодаря рентгеноструктурному анализу, использование которого привело к открытию пространственной структуры белка и нуклеиновых кислот. В результате молекулярная биология стала, во-первых, основой современной биологии в целом, во-вторых, доступной для тонких физических методов.*

*В биоорганическом материаловедении есть немало технологий атомарного конструирования – к примеру, метод Ленгмюра-Блоджетт (по сути, это аналог молекулярно-лучевой эпитаксии для биологических и органических структур), который позволяет создавать двумерные и многослойные системы и сверхрешетки на базе органических и биологических молекул и их сочетаний. Это открывает принципиально новые возможности для создания нанобиоорганических материалов и нанобиотехнологий.*

*М.В. Ковальчук*

## НОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В СОВРЕМЕННОМ МАТЕРИАЛОВЕДЕНИИ

*М.В. Ковальчук*

*Научные проблемы национальной безопасности. 2002. Вып. 3.  
К 10-летию образования Совета безопасности Российской Федерации.*

Любой юбилей – это повод приостановить жизненный каждодневный бег и попытаться заглянуть вперед, в будущее. Но для этого необходимо оглянуться назад, подвести итоги, проанализировать сделанное. Сейчас это особенно важно, поскольку мы живем в период смены тысячелетий, а в действительности являемся свидетелями смены эпох. Во второй половине XX века в результате бурного научно-технического прогресса – освоения космического пространства, рождения ядерной энергетики, информационных технологий, компьютеров, геномной инженерии и создания новых материалов – человечество стало жить в условиях «обновленной среды обитания».

В начале этой статьи, посвященной новым тенденциям в современном материаловедении, я бы хотел отметить, что материалы, технологии их получения и средства их структурно-функционального контроля (диагностики) представляют собой материальную базу любого научно-технического направления и должны рассматриваться в качестве базовых элементов национальной безопасности.

Современное материаловедение – это многоплановая область знаний, которой в нашей стране всегда уделялось особое внимание. И сегодня множество металлов и сплавов, композиционных и кристаллических материалов, полимеров и химических продуктов, соответствующих технологий составляют основу национальной безопасности и свидетельствуют о высочайшем уровне российских технологий в этой области.

На современном бурном этапе развития науки и технологий очень важно одновременно с сохранением большинства существующих и востребованных материаловедческих направлений проводить постоянный мониторинг развития идей и тенденций в этой важной области, чтобы наметить и реализовать ряд новых, прорывных, технологических направлений.

Прежде чем остановиться на новых тенденциях в развитии современного материаловедения, я бы хотел совершить краткий исторический экскурс.

Развитие науки в XX веке шло в основном по пути «от сложного к простому», или по пути «анализа», на котором последовательно были открыты молекулы, атомы, ядра и элементарные частицы. Проникновение в микромир,

связанное с успехами ядерной физики и физики элементарных частиц, оказало определяющее влияние на развитие цивилизации XX века. Конечным результатом пути «анализа» стало понимание того, как природа устроила вещество на уровне атомов и молекул. При этом произошло сближение физики, химии, минералогии и биологии. Но уже с середины века ученые все больше начали двигаться по второму пути – «от простого к сложному», то есть по пути «синтеза». Соединяя определенным образом отдельные атомы и молекулы, стало возможным получать целый набор искусственно синтезированных неорганических и органических веществ, например, различных кристаллов и полимеров.

Расшифровка атомно-молекулярного строения веществ заложила основу технологий нового времени. По всем прогнозам начавшийся XXI век должен стать временем атомарного конструирования различных материалов с заданными свойствами (в английском языке для описания этих материалов существует специальный термин *tailored and smart materials*).

Говоря о новых тенденциях в современном материаловедении, не претендуя в этой краткой статье на полноту охвата проблемы в целом, хотелось бы выделить несколько принципиально важных, на наш взгляд, моментов.

## БИОЛОГИЧЕСКОЕ И БИООРГАНИЧЕСКОЕ МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ

В последнее время в связи с большими успехами в области молекулярной биологии, биоинженерии, рентгеноструктурного анализа различных биологических объектов стало возможным поставить задачу создания новых приборов и систем на основе биоорганических веществ.

Задача состоит в том, чтобы научиться встраивать биоорганические молекулы в различные структуры в качестве элементов для восприятия изображений,



звуковых и химических сигналов (биосенсоры), преобразования сигналов для использования в информатике (биокомпьютеры) и других целей.

Решение этого вопроса с необходимостью требует развития биологического материаловедения и адаптации хорошо развитых твердотельных технологий для работы с биоорганическими материалами.

Напомним, что физическое материаловедение как самостоятельное научное направление возникло в результате использования физических методов исследования и современного математического аппарата в конкретной области знаний. На начальном этапе это было физическое металловедение, затем полупроводниковое материаловедение, а сегодня бурно рождается новая область биологического материаловедения, основанная на взаимодополняющем сочетании физико-математических подходов и физических методов с достижениями молекулярной биологии, биоинженерии и биотехнологии.

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ АРХИТЕКТУРА И ТЕХНОЛОГИИ АТОМАРНОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ МАТЕРИАЛОВ И СТРУКТУР С ЗАДАННЫМИ СВОЙСТВАМИ

Логика развития, например, полупроводникового материаловедения: от объемных трехмерных кристаллов, тонких слоев, многослойных структур к наноструктурам на основе квантовых ям и квантовых точек привела к созданию принципиально новых технологий атомарного конструирования неорганических полупроводниковых материалов – молекулярно-лучевой эпитаксии (МЛЭ) и к использованию принципов самоорганизации.

Фактически полупроводниковое материаловедение и твердотельная электроника, пройдя долгий и сложный путь, пришли к необходимости целенаправленного манипулирования отдельными атомами, к использованию принципов самоорганизации и созданию атомарных нанотехнологий, то есть к тому, что естественно присуще и давно существует для биоорганических систем и материалов. Например, так называемая техника Лэнгмюра-Блоджетт, являясь аналогом молекулярно-лучевой эпитаксии, позволяет создавать двумерные и многослойные системы и сверхрешетки на базе органических и биологических молекул и их сочетаний. Практически эта техника позволяет контролируемым образом создавать наноразмерные биоорганические системы на твердых подложках, тем самым открывая принципиально новые возможности для создания нанобиоорганических материалов, нанобиотехнологий и систем на их основе.

### АТОМАРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИЛИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ НАНОРАЗМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ И СИСТЕМ

Конструирование новых материалов, совершенствование их структуры и свойств, создание наноматериалов и наносистем на основе молекулярной



архитектуры неразрывно связано с использованием адекватных (атомного разрешения) диагностических средств.

Исторически в основе любой диагностики лежало использование прежде всего электромагнитного излучения, начиная с видимого света и кончая жестким рентгеновским излучением. К этому добавились методы, основанные на рассеянии различных частиц: электронов, нейтронов, ионов и других. На смену обычной, а затем электронной микроскопии пришли методы с атомарным разрешением, в первую очередь такие, как атомно-силовая микроскопия и электронная микроскопия атомного разрешения.

В последнее время для исследования и диагностики различных материалов и структур широко используется синхротронное излучение, которое благодаря своим уникальным свойствам – огромной яркости, на 10 порядков превышающей яркость рентгеновских трубок, уникальной временной структуре излучения, высокой степени коллимации – становится мощным инструментом для решения проблем современного материаловедения с атомарным разрешением.

Вышеупомянутые методы в комплексе полностью обеспечивают атомарную диагностику любых наноструктур и биоорганических систем.

Отметим изменение самого процесса научного творчества: все более важными становятся исследования, проводимые на стыке нескольких наук, которые позволяют объединить усилия и интеллектуальный потенциал ученых различных специальностей, стимулируя развитие науки в целом.

---

Такой междисциплинарный подход, становясь методологией развития технологий, позволит развить новые технологии, которые можно назвать **нанобио-технологиями**:

- от отдельных белков – к тканям и органам;
- от отдельных функционирующих молекул – к логическим схемам и комплексам;
- от исправления молекулярных ошибок – к лечению сложных болезней;
- от биополимеров – к созданию молекулярных оптических сетей;
- от манипуляций с отдельными атомами – к квантовому компьютеру.

Развитие науки, изучающей вещество в нанометровом диапазоне, позволит не только лучше понять, как устроена жизнь и природа, но и создать принципиально новые материалы и технологии.

## НА ПОРОГЕ НОВОЙ ЖИЗНИ РОССИЙСКИХ «РОСТОВИКОВ»\*

**М.В. Ковальчук**

*ПЕРСТ (Перспективные технологии): информационный бюллетень.  
1999. Том. 6. Вып. 13/14*

— Михаил Валентинович! На последнем заседании Координационного совета по поисковым исследованиям в области физических наук при Миннауки РФ было принято решение о формировании под вашим руководством направления «Физика процессов кристаллизации» при подпрограмме «Актуальные направления в физике конденсированных сред». Как Вы объясните такое решение и кто его инициатор?

— Я хотел бы начать с небольшого исторического экскурса, может быть, несколько неожиданного. Будем считать, что в XX веке в науке было время разбрасывать камни, а надвигающийся XXI век, по всей видимости, — время их собирать. Это хорошо видно на примере близкой мне области науки — кристаллографии, по своей сути науки междисциплинарной. Она родилась из геологии, занимается изучением минералов чисто описательными методами (углы, огранка и т.д.). Затем, вобрав в себя успехи химии, изучая химический состав минералов и, наконец, овладев физическими методами исследования (в первую очередь, рентгеноструктурным анализом), кристаллография превратилась в самостоятельную область физики. Сегодня кристаллография активно вторгается в биологию, что, прежде всего, связано с уникальными возможностями рентгеноструктурных исследований. Переходя от описания видимых особенностей минералов к их количественному составу, молекулярной и атомной структуре, наука стала проникать дальше в микромир. Фактически движение по пути «от сложного к простому» в последовательном дроблении вещества привело к синтезу и изучению элементарных частиц. Большие вложения, сделанные человечеством в развитие этой линии, обеспечили успехи ядерной физики и физики высоких энергий. На этом пути — пути «анализа» — стало понятно, в частности, как Природа устроила минералы, их трехмерное атомное строение. Уже с середины XX века ученые начали двигаться и «от простого к сложному», то есть по пути «синтеза». Соединяя определенным образом отдельные атомы и молекулы, синтезировали целый набор искусственных веществ, неорганических (здесь

---

\* Статья приведена в сокращении

## МЕЖДИСЦИПЛИНАРНОСТЬ

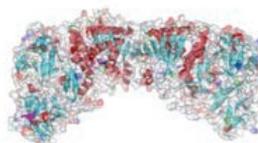
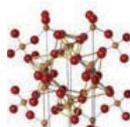
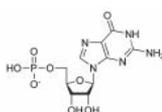
### КРИСТАЛЛОГРАФИЯ

Геология

Химия

Физика

Биология



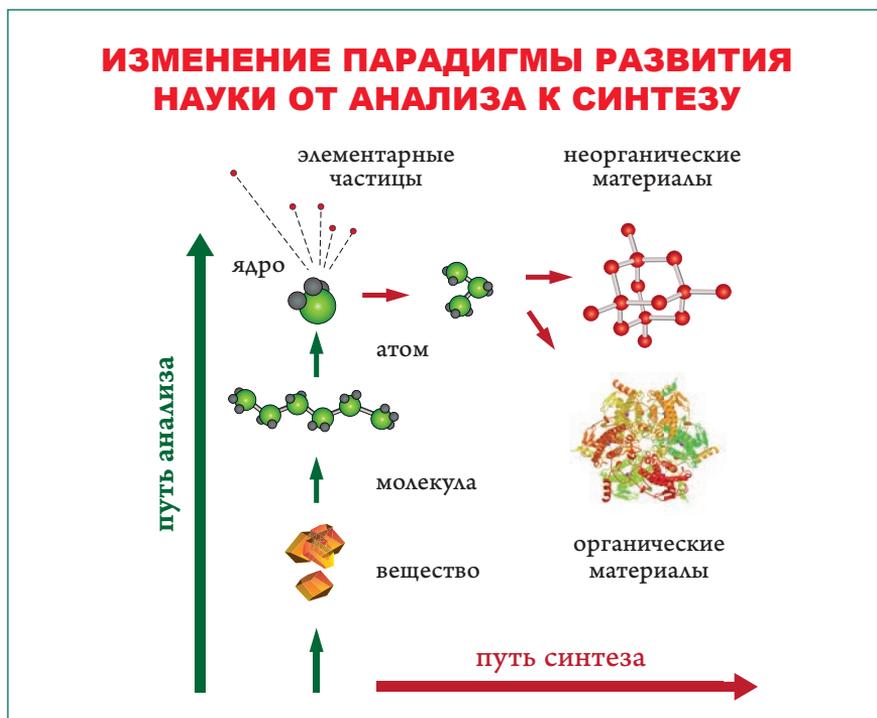
революцию совершил кремниевый монокристалл) и органических. XXI век станет временем атомарного конструирования любых веществ с заданными свойствами. И на этом пути основополагающую роль сыграет как опыт по синтезу монокристаллов и тонких слоев, так и замечательный результат усилий физики высоких энергий — источник синхротронного излучения, позволяющий иметь диагностику, адекватную атомарному конструированию.

Физика высоких энергий создавала огромные установки для очень малого числа людей, а теперь предоставила их всему научному сообществу. Это еще одно подтверждение того факта, что фундаментальные исследования, которые еще сегодня кажутся избыточно затратными, завтра могут окупиться с лихвой.

— *Давайте вернемся к нашей теме — кристаллизации и монокристаллам.*

— Но мы об этом и говорим. Нельзя разделять процесс кристаллизации и методы его диагностики. К упомянутому синхротронному источнику нужно еще добавить другое уникальное детище физики — нейтронный источник как мощный современный исследовательский инструмент.

Возвращаясь к процессам кристаллизации, вспомним, что создание искусственных кристаллов стало возможным в начале XX века после открытия рентгеновского излучения, его дифракции (Нобелевские премии Рентгена и Лауэ),



позволившей видеть, как устроено вещество, и затем повторить то, что создано самой Природой. Сегодня, благодаря достижениям современной технологии, мы можем манипулировать отдельными атомами, создавая новые, еще не известные Природе материалы, а с помощью синхротронного излучения – контролировать и целенаправленно влиять на эти процессы. И здесь я хотел бы обратить внимание на новые аспекты, связанные с кристаллизацией органических, в первую очередь, биологических веществ.

В последние десятилетия кристаллография активно проникла в биологию в значительной мере благодаря развитию методов кристаллизации биологических объектов. У истоков этого направления стоял директор нашего института академик Борис Константинович Вайнштейн, в лаборатории которого впервые были синтезированы трехмерные кристаллы ряда важнейших белков и изучена их атомная структура.

Сегодня эти фундаментальные исследования все более активно влияют на рынок, связанный с производством лекарств и продуктов питания. Здесь мы опять сталкиваемся с решением социальных проблем, нацеленных на то, чтобы прокормить и вылечить растущее количественно человечество. Другой аспект биологических исследований – переход от синтеза конкретных биообъектов и изучения их структуры к созданию искусственного интеллекта – биомашин,

# ВЕХИ РАЗВИТИЯ КРИСТАЛЛОГРАФИИ

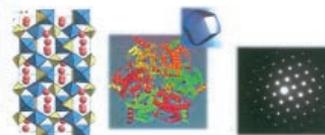
1940<sup>е</sup> – 1960<sup>е</sup> годы

- Копирование природы
- Промышленные технологии роста кристаллов



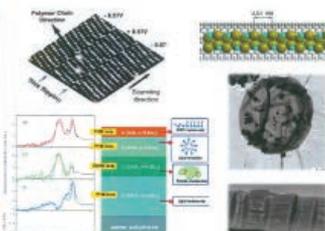
1960<sup>е</sup> - 1990<sup>е</sup> годы

- Структура кристаллов
- Дифракционные методы
- Переход к изучению биоорганических кристаллов
- Развитие аналитических подходов



Качественный переход: с 1990<sup>х</sup> годов

- от кристаллов к неструктурированным средам и живым системам
- от макрообъектов к микро- и нанообъектам
- от трехмерных к двумерным и одномерным объектам
- от дифрактометрии к недифракционным методам
- от специализации к междисциплинарным исследованиям
- от подражания природе к конструированию объектов, не имеющих аналогов в природе
- от анализа к синтезу



представляющей собой предел мечтаний для современной вычислительной техники и микроэлектроники.

Выращивание биологических кристаллов – самостоятельное научное направление. На первом этапе включаются биохимики, которые выделяют и очищают нужный белок, затем с помощью специальной аппаратуры и подбора оптимальных условий проводят кристаллизацию. Получаемый в результате монокристалл белка – это объект для экспериментов по расшифровке его атомной структуры. Трехмерный биокристалл – это сложнейшее образование, содержащее в элементарной ячейке десятки тысяч атомов.

Синхротронное излучение позволит не только изучать кристаллическую структуру биокристаллов, но и исследовать различные происходящие в них процессы.

## **МОЛЕКУЛЯРНЫЙ КОНСТРУКТОР ЛЕНГМЮРА–БЛОДЖЕТТ**

*М.В. Ковальчук, В.В. Клечковская, Л.А. Фейгин*

*Природа. 2003. № 11*

Физическое материаловедение как область знания возникло в 30-х годах XX в. Техника бурно развивалась (в частности, для разработки новых видов вооружения), и понадобились принципиально новые материалы, в первую очередь специальные стали и сплавы цветных и черных металлов, керамика различного состава. Изучение свойств и строения металлов и сплавов потребовало приложения физических методов исследования и современного математического аппарата. В итоге их синтеза и родилось физическое материаловедение.

Следующий его этап связан с широким внедрением полупроводников, прежде всего монокристаллов кремния и арсенида галлия, в технику. На них держится современная электроника – микроэлектроника, которая определила лицо нынешней цивилизации. А затем возникает принципиально иное – биологическое, или биоорганическое, материаловедение [1], зарождение которого можно наблюдать с 60–70-х годов прошлого века, когда была открыта двойная спираль ДНК, установлены структуры ряда белковых молекул и других биополимеров. Физика проникла в молекулярную биологию посредством рентгеноструктурного анализа, благодаря чему этот мир стал для исследователя видимым в объеме. И на базе трехмерного видения стала вырисовываться масса интереснейших биоинженерных, биотехнологических идей. Сегодня мы наблюдаем, как плавное развитие биоорганического материаловедения перешло в стадию взрывного роста.

Современное материаловедение, таким образом, – многоплановая область знаний, где одновременно с сохранением основных существующих и востребованных материаловедческих направлений развиваются качественно новые идеи, прежде всего связанные с созданием наноматериалов различной природы и наносистем на их основе.

### **Вторжение в наномир**

В 1959 г. будущий нобелевский лауреат по физике Р. Фейнман прочитал лекцию с аллегорическим названием «Внизу полным-полно места: приглашение войти в новый мир физики, в мир миниатюризации» [2].

В ней Фейнман рассказал о фантастических перспективах, которые сулит изготовление материалов и устройств на атомном или молекулярном уровне. А в 1974 г. на конференции Японского общества точного машиностроения впервые был использован термин «нанотехнология» (автор, японский ученый Н.Танигучи, хотел обратить внимание специалистов на грядущий переход к обработке материалов с ультравысокой точностью, прогнозируя, что к 2000 г. эта точность шагнет в нанометровый интервал [3]).

В последнее десятилетие приставка «нано» прочно вошла в современный научно-технический обиход. Термины «нанотехнологии», «наноматериалы» и др. уже не кажутся странными, и нанотехнологии – переход с микро- на наноразмеры при создании устройств и систем, структура которых регулируется в соответствующем масштабе, т.е. в диапазоне размеров атомов, молекул и надмолекулярных образований, – это дело уже не будущего, а настоящего времени.

Наноструктуры, построенные с использованием атомномолекулярных элементов, представляют собой мельчайшие объекты, которые могут быть созданы искусственным путем или выделены из природных материалов. Причем проблема не только в уменьшении размеров конструируемых устройств, но и в особых свойствах, которые присущи нанослоям, нанокристаллам и наночастицам и связаны с так называемым размерным эффектом (критический размер нанобъектов хотя бы в одном измерении не должен превышать десятков нанометров). С этой точки зрения следовало бы рассматривать наноструктуры в качестве особого фазового состояния вещества, так как свойства материалов, образованных структурными элементами с подобными размерами, не идентичны свойствам объемной фазы. Причем изменения характеристик обусловлены не только малостью размеров, но и проявлением квантовомеханических эффектов при доминирующей роли поверхностей раздела.

Исследовательские работы последних 10–15 лет открыли важную роль наноструктур в различных областях науки и техники (физике, химии, материаловедении, биологии, медицине и т.д.). Управляя размерами и формой наноструктур, можно придавать таким материалам совершенно новые функциональные качества, резко отличающиеся от имеющихся у обычных материалов. К наиболее известным объектам таких манипуляций относятся нанопорошки, углеродные нанотрубки, «одноэлектронные» транзисторы, белки, ДНК.

Вообще говоря, все природные материалы и системы построены из нанобъектов, так как именно на уровне молекул природа «программирует» основные характеристики веществ, явлений и процессов. Нанотехнологический подход означает уже целенаправленное регулирование свойств объектов на молекулярном уровне. В идеальном варианте при использовании принципов самоорганизации вещества материалы должны создаваться «снизу вверх», в отличие от практикуемого до последнего времени подхода к ультраминиатюризации «сверху вниз» (когда мелкие объекты создаются из крупных, например, путем измельчения).

Одна из особенностей второй половины прошлого века – проникновение «широким фронтом» органических материалов, в частности полимерных, в технологии. Накопив знания и громадный опыт в области создания новых

полимеров (в том числе биополимеров), химики научились синтезировать «умные» полимерные материалы, реагирующие на различные внешние воздействия желательным образом. Это достигается присоединением к основной полимерной цепи различных боковых «привесков», придающих новому материалу помимо материнских (например, термостойких) другие важные свойства – нелинейнооптические, фотопроводящие и др.

Важнейшая задача нанотехнологии – научиться встраивать органические и/или биоорганические молекулы в различные упорядоченные структуры в качестве новых функциональных элементов, в частности для восприятия изображений, запахов, звуковых и химических сигналов, т.е. для создания различных биосенсоров, в качестве преобразователей сигналов в информационных системах (биокомпьютеров) и для многих других целей.

Сейчас уже ясно, что наиболее перспективно создание органонеорганических нанокомпозитов. Для нанoeлектроники оно в какой-то мере подобно формированию сложных микроэлектронных интегральных схем. Так можно построить последовательность из мономолекулярных диэлектрических и проводящих слоев с возможными включениями между ними наночастиц полупроводниковых, металлических, магнитных и др.

Разработка недорогих методов изготовления наноструктур в больших количествах – одно из важнейших направлений исследований, так как нанонаука может добиться реальных успехов лишь тогда, когда предложит экономически выгодные технологии.

### **Как создать слой прогнозируемой структуры**

Одной из наиболее привлекательных технологий для решения такого рода задач оказался метод, разработанный в 30-х годах прошлого столетия И. Ленгмюром и его ученицей К. Блоджетт. Об этом методе на довольно долгий период забыли, но затем, уже после второй мировой войны, вернулись «на новом витке спирали», чтобы использовать его возможности для конструирования сложных слоистых ансамблей из амфифильных молекул. В последующие годы интерес к пленкам Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ-пленкам) лавинообразно возрастал: поток работ был столь велик, что вышел за рамки публикаций в различных научных журналах – стал выходить специальный журнал «Langmuir». Каждый год проводятся специальные международные конференции «ЛБ», посвященные целиком тонким организованным пленкам, на многих физических и химических симпозиумах с широкой тематикой обязательно есть разделы, посвященные ленгмюровским монослоям и ЛБ-пленкам. Следует отметить, что в последние 10 лет открылись значительно более широкие возможности ЛБ-техники для получения органонеорганических нанокомпозитов, чем предполагали ее создатели.

Какие же возможности конструирования сложных наносистем дает ЛБ-метод? Ответим на этот вопрос, рассматривая различные этапы процесса формирования слоистой пленки или композита.

Поскольку в журнале «Природа» о методе Ленгмюра–Блоджетт уже писали в период возрождавшегося интереса к нему [4], напомним лишь главные моменты.

Так называемая ленгмюровская ванна заполняется водой, трижды дистиллированной. На поверхность помещается капля поверхностно-активного вещества в органическом растворителе, который быстро испаряется. Рабочая площадь ванны ограничена подвижными барьерами – с их помощью площадь можно менять. Амфифильные молекулы вещества имеют гидрофобный «хвост» (чаще всего зигзагообразную углеводородную цепочку) и гидрофильную «голову» (например, гидроксильную группу). Благодаря такому строению они не тонут в воде и ориентируются единообразно относительно поверхности – «хвостами» вверх (рис. 1, вставка).

Концентрация раствора рассчитывается таким образом, чтобы молекулы исследуемого вещества (после испарения растворителя) плавали свободно. Следующий этап – формирование конденсированного монослоя с помощью подвижного барьера – осуществляется за счет уменьшения рабочей площади ванны.

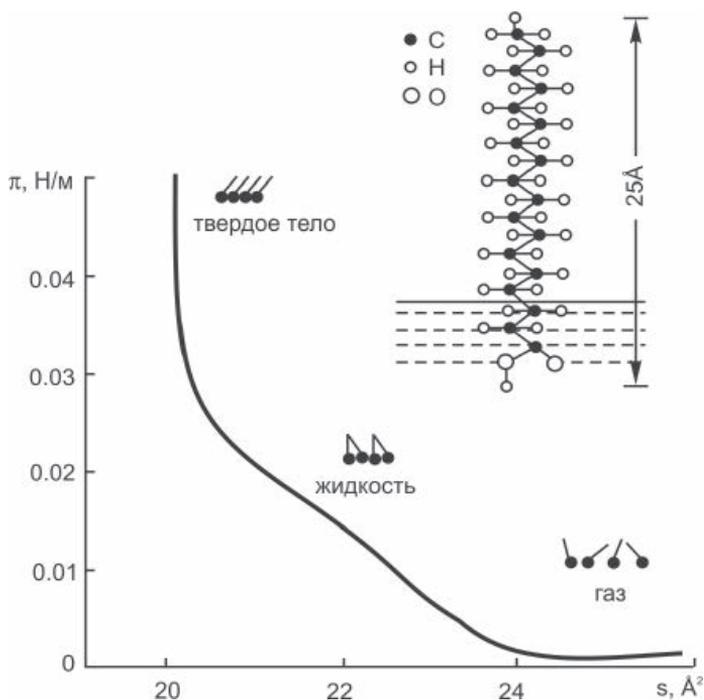


Рис. 1. Строение молекулы жирной кислоты и  $p$ - $A$  изотерма. Три участка изотермы отвечают различным степеням уплотнения слоя, условно обозначенным на рисунке по аналогии с объемными фазами

Для характеристики структуры монослоя строят изотерму сжатия (рис. 1) – зависимость размера площади, приходящейся на одну молекулу, от поверхностного давления (регистрируется изменяющаяся площадь рабочей поверхности ванны и с помощью весов Вильгельми измеряется соответствующее поверхностное давление). Можно контролировать также вязкость, электростатический потенциал монослоя (при этом один электрод помещается под монослоем, а второй над монослоем, так что по изменению потенциала можно почувствовать, например, переориентацию молекул), трансформацию микроструктуры монослоя (с помощью исследования в микроскопе при отражении света от монослоя под углом Брюстера).

Фазовая диаграмма формируемого монослоя даже для простейшего поверхностно-активного вещества – жирной кислоты – достаточно сложна (рис. 2). Изменяются симметрия и параметры элементарных ячеек, взаимные наклоны цепочек в упорядоченных доменах. Но, изучив фазовое состояние монослоя данного вещества, можно понять, в каком диапазоне параметров эксперимента удастся получить монослои с заранее заданной структурой.

Однако пока наш монослой плавает в ванне, и следующий важный этап – перенос его на твердую подложку. Для этого подложка вертикально погружается в воду через монослой и затем поднимается (метод Ленгмюра–Блоджетт, вертикальный «лифт», рис. 3, а) или горизонтально касается поверхности (метод Ленгмюра–Шеффера, горизонтальный «лифт», рис. 3, б). Последовательным

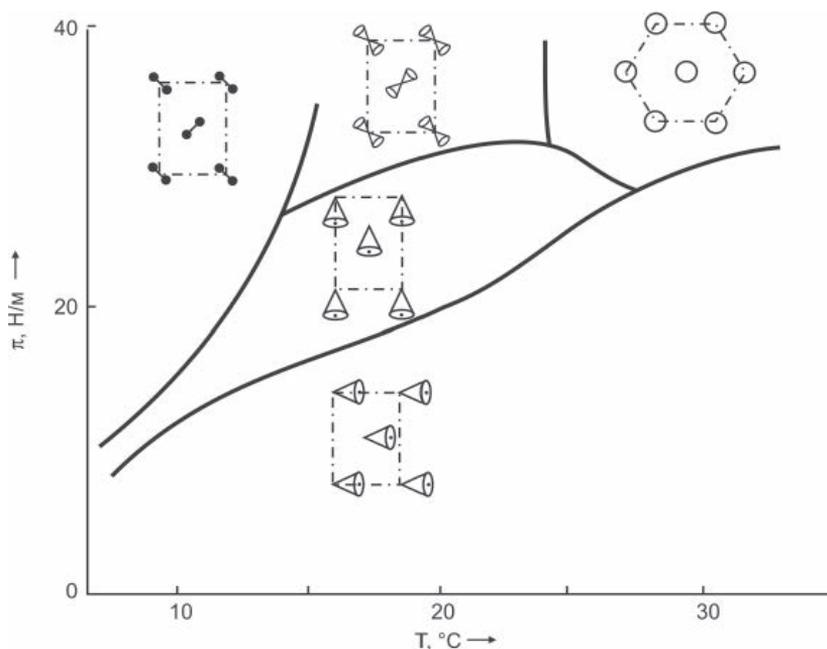


Рис. 2. Фазовая диаграмма состояния монослоя арахидиновой кислоты

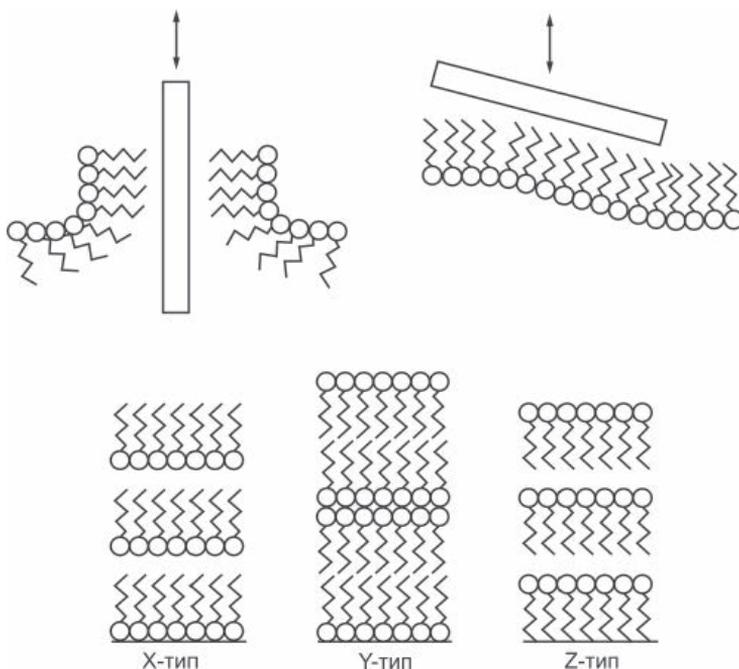


Рис. 3. Перенос монослоя на твердую подложку вертикальным (а) и горизонтальным (б) лифтом и типы (X, Y, Z) формируемых слоистых структур (в)

переносом монослоев мы можем приготовить многослойную наноразмерную пленку из мономолекулярных (по толщине) слоев, причем в зависимости от способа переноса и типа подложки (гидрофильной или гидрофобной), формируются структуры с различной укладкой молекул в смежных слоях, так называемые X-, Y-, Z-структуры (рис. 3, в).

Такая технология позволяет усложнить конструкцию многослойной нанопленки, осаждавая последовательно монослои различных веществ, но и это еще не ставит точку в проектировании и строительстве ЛБ-пленок. Где, на каких этапах и каким образом мы можем вмешаться в процесс?

### Коктейли из молекул в монослое

Дело в том, что на поверхности воды в ЛБ-ванне можно формировать монослой не только из молекул одного типа поверхностно-активного вещества – ничто не препятствует нам получить смешанный монослой из молекул различных веществ. Так были созданы модели разнообразных биологических липидных мембран, в том числе с включениями белковых молекул.

Структура многокомпонентного монослоя зависит от ряда факторов: взаимного соотношения количества веществ в монослое, соотношения длин главных осей молекул и их строения. Так, при одинаковых длинах главных осей молекул и близком строении длинноцепочечных фрагментов при определенном соотношении концентраций можно получить практически равномерно перемешанный слой. При том же соотношении, но существенно разных длинах цепочек, молекулы каждого сорта будут собираться в самостоятельные домены. На рис. 4 приведены фрагменты профилей интенсивности рассеяния электронов на ЛБ-пленках из 10 молекулярных бислоев, существенно различающихся по строению и концентрации, и модели соответствующих структур в монослое. Наблюдается постепенный переход: от структуры с компактным размещением молекул одного вида и редкими вкраплениями молекул другого сорта по границам доменов первых – сначала к смешанным монослоям, где возможно возникновение при определенных соотношениях компонентов упорядоченной двух-

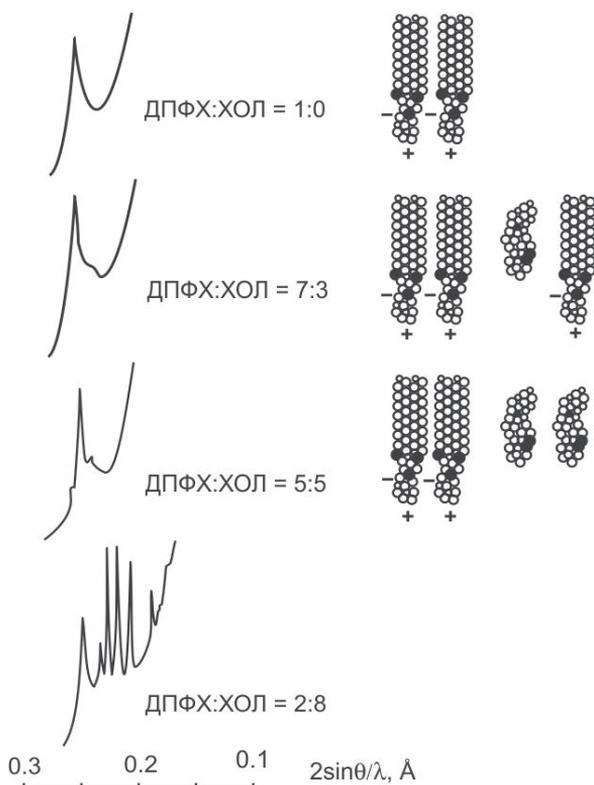


Рис. 4. Профили электронной дифракции от двухкомпонентных ЛБ-пленок из монослоев с различным соотношением диметилфосфатидилхолина (ДПФХ) и холестерина (ХОЛ) и модели структурных элементов соответствующих монослоев.  $\lambda$  – длина волны электронов,  $\theta$  – угол рассеяния

фазной структуры, а затем – к кристаллической доменной структуре второго компонента монослоя.

О методе исследования структуры тонких пленок («на просвет») и тонких слоев на поверхности («на отражение») (рис. 5), использующем дифракцию электронов (методе электронографического структурного анализа), который сейчас оказался наиболее информативным для получения трехмерной информации о структуре тонких ЛБ-пленок, можно прочесть в журнале «Природа» за 1997 год [5].

Здесь обратим внимание на то, что особенности используемых в ЛБ-технологии молекул, единообразно ориентирующихся на водной поверхности «хвостами» вверх, и сам способ формирования монослоя (равномерным поджатием) приводят к образованию текстуры (ориентированного поликристалла, у которого одна из осей перпендикулярна подложке). Если такую структуру перенести на подложку и получить от нее дифракционную картину, то при падении пучка электронов на пленку под прямым углом мы увидим кольцевую картину, которая соответствует двумерной решетке в плоскости слоя. Но более ценными для полного представления о структуре оказываются дифракционные картины, полученные при наклоне образца относительно электронного луча, когда у текстуры выявляется упорядоченность и в третьем направлении (рис. 6). По

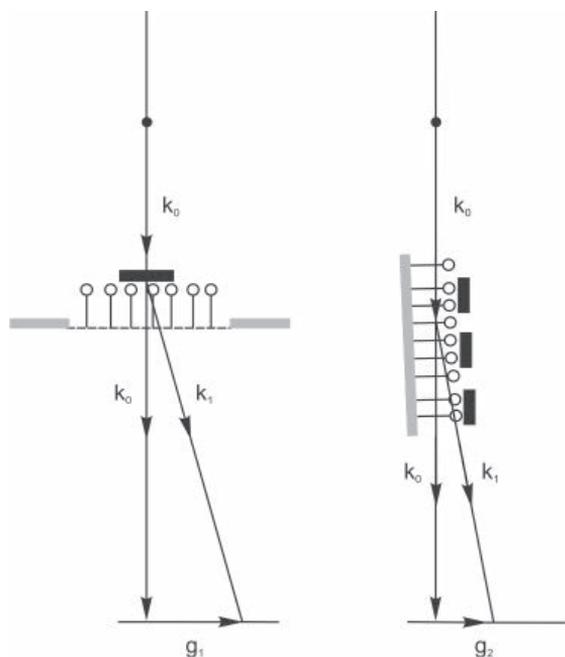


Рис. 5. Схема формирования дифракционных картин при облучении образца электронным пучком «на просвет» (а) и «на отражение» (б) ( $k_0$  и  $k_1$  – векторы падающей и рассеянной волны соответственно,  $g_1$ ,  $g_2$  – векторы рассеяния)

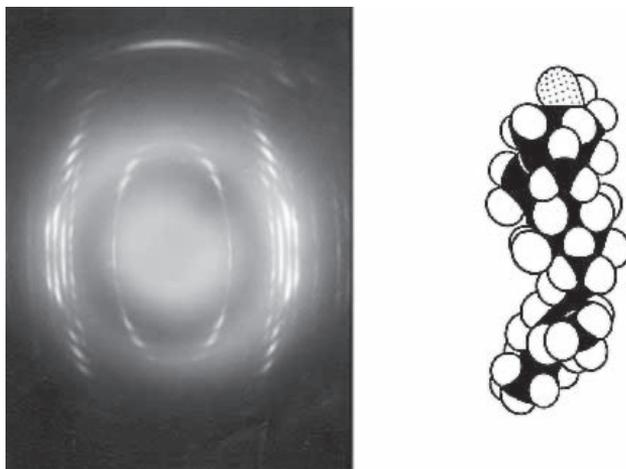


Рис. 6. Электронограмма от ЛБ-пленки холестерина, полученная при наклоне образца по отношению к электронному пучку на угол в  $60^\circ$  (а), структура холестерина (б). Параметры элементарной ячейки:  $a = 14.17 \text{ \AA}$ ,  $b = 34.21 \text{ \AA}$ ,  $c = 10.48 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 94.64^\circ$ ,  $\beta = 90.67^\circ$ ,  $\gamma = 96.32^\circ$

таким картинам можно провести полное структурное определение: установить симметрию, найти параметры элементарной ячейки кристалла и расположение в ней каждого атома. Если же в укладке молекул в конденсированном монослое имеются нарушения (отклонения от кристаллической упаковки), то на электронограммах от текстур четкие «дужки» будут размываться, и по характеру и местоположению этих «размытий» можно оценить степень и тип нарушений в укладке молекул [6].

Что же, теперь мы исчерпали все возможности конструирования наносистем методом Ленгмюра, планируя дизайн слоистых гетероструктур из различных монослоев, в том числе многокомпонентных, и перенося их разными способами? Как оказалось, нет. Интерес исследователей обратился в первую очередь к водной фазе. Что будет, если ее модифицировать?

### Подключим к работе воду

Чтобы заставить воду служить активным рабочим элементом, будем менять ее рН (кислотность), растворять в ней различные вещества, т.е. используем водную субфазу для проведения реакций взаимодействия монослоя с новыми ионами и молекулами.

Величина рН раствора играет очень важную роль: от нее зависит активизация гидрофильных «голов» молекул, погруженных в субфазу. Продемонстрируем влияние состава субфазы на простейшем примере: растворим в воде под монослоем жирной кислоты соль —  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ . В результате диссоциации в

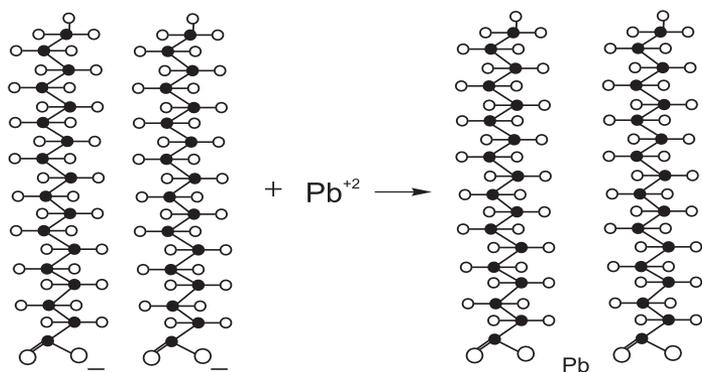


Рис. 7. Схематичное представление формирования монослоя металла под слоем жирной кислоты

субфазе появятся ионы свинца, которые могут присоединиться к карбоксильным группам молекул поверхностно-активного вещества (рис. 7), и при переносе на подложку мы получим уже не пленку жирной кислоты, а пленку ее соли. Так, используя субфазу, можно химически модифицировать монослой. Причем операция с субфазой, содержащей ионы металлов, в итоге дает возможность получить в зависимости от валентности ионов слои металлов (по толщине в один и более атомов), внедренные в органическую матрицу (которая обычно бывает диэлектрической). Если растворять соли редкоземельных элементов (например, гадолиния), получим прослойки с магнитным материалом и т.д. Процент поверхностно-активного вещества, участвовавшего во взаимодействии с ионами металла, зависит от pH раствора.

Таким же методом можно модифицировать монослои, присоединяя к ним из субфазы не только ионы металлов, но и белковые молекулы, нуклеиновые кислоты и т.д. Причем для формируемой структуры очень важны не только само вещество, из которого строится монослой на границе раздела вода-воздух, и «участник» из субфазы, но и их взаимодействие. Поместим в субфазу ДНК, а на поверхности сформируем монослой октадециламина или диметилаллиламина. В результате получим ЛБ-пленку с включением между липидными слоями расплетенной (в первом случае) или спиральной (во втором) ДНК.

Итак, мы выбирали молекулы вещества, варьировали среду, на которой создается монослой. Остался еще один незадействованный фактор – атмосфера над поверхностью ванны. Что будет, если и ее привлечь к работе?

### Воздушный десант

Рассмотрим такой пример. На поверхности имеем монослой стеариновой кислоты, а в субфазе – ионы металла. Ограничим воздушный объем над ванной

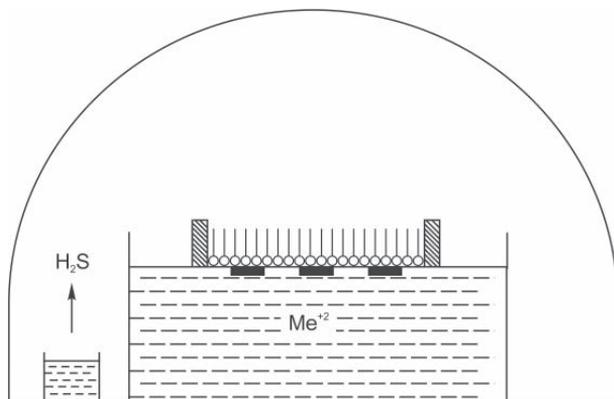


Рис. 8. Схема установки для роста нанокристаллов неорганических сульфидов *in situ* в ленгмюровской ванне

и создадим в нем определенную концентрацию паров  $H_2S$  (рис. 8). Часть молекул газа растворится в воде, таким образом субфаза обогатится анионами серы. Тогда между катионами металла и анионами серы будет протекать химическая реакция, в результате которой могут образоваться кристаллы сульфида.

Упорядоченный ленгмюровский монослой (структурной организацией которого, как помним, мы можем в определенных границах управлять) с присоединенными ионами металла — хорошая основа-подложка для зародышеобразования неорганических кристаллитов. Если подобрать условия эксперимента так, что активные группы молекул монослоя вблизи поверхности раздела создадут решетку, близкую по параметрам к решетке соответствующего сульфида, и обеспечить малую скорость поступления ионов  $S^{2-}$  в зону реакции (чтобы избежать спонтанного образования кластеров), то нанокристаллы сульфида будут расти эпитаксиально. Ориентированный рост неорганических кристаллов на органической матрице и их морфология важны, если предполагать дальнейшее использование такого рода структур в наноэлектронике. Заметим, что при этом ориентация нанокристаллов сульфида зависит как от структуры монослоя, так и от структуры самого сульфида. Например, на рис. 9, *a* можно видеть электронномикроскопическое изображение наночастиц  $PbS$ , выращенных под монослоем стеариновой кислоты, в форме треугольников (кубические кристаллы со структурой  $NaCl$ , растут плоскостью (111) параллельно монослою). А на рис. 9, *б* — электронномикроскопическое изображение кристаллитов  $CdS$ , выращенных в аналогичных условиях (их решетка также кубическая, с близкими параметрами элементарной ячейки, но относится к другому структурному типу). В этом случае наблюдается дендритный рост.

Процесс применения структурированной органической матрицы для синтеза и выращивания неорганических кристаллов получил название «биомиметика», что означает подражание живой природе. Материалы — органонеорганические наноконкомпозиты, полученные таким способом, в зарубежной литературе именуют керамикой или биокерамикой.

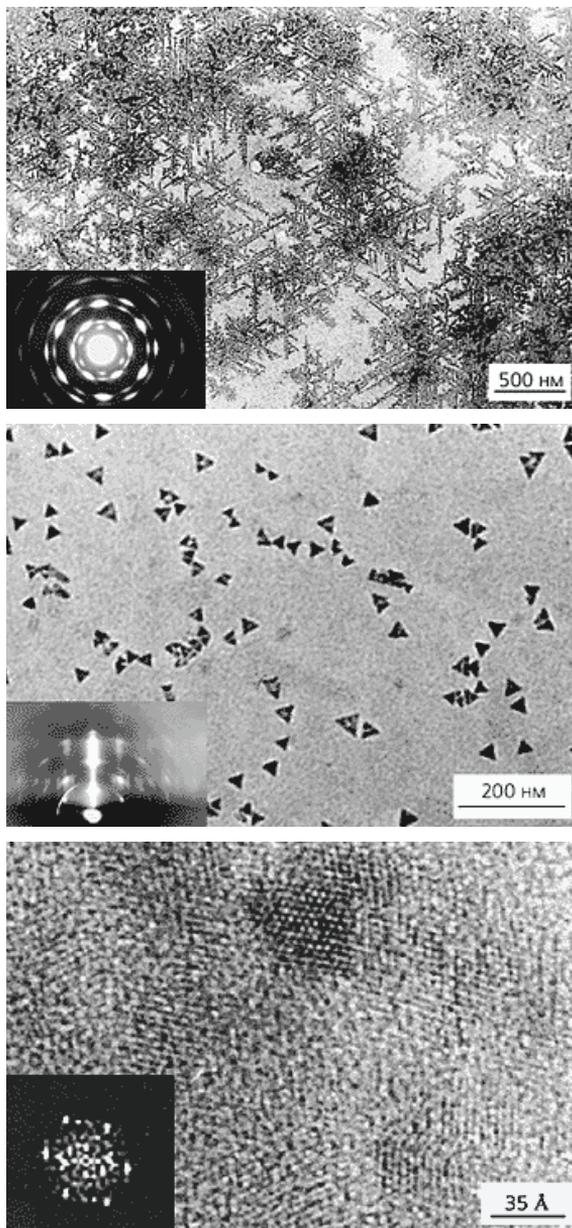


Рис. 9. Электронномикроскопическое изображение нанокристаллов PbS (вверху) и CdS (средняя), выращенных под монослоем стеариновой кислоты в ленгмюровской ванне в течение 3 ч при поверхностном давлении 28 мН/м, температуре 15 °С. Электронномикроскопическое изображение наночастицы сульфида кадмия с высоким разрешением (внизу). На вставках представлены электронограммы от тех же объектов

В природе биоминерализация представляет собой процесс образования и роста неорганических кристаллов на органических тканях, в результате которого в живых организмах формируются кости, зубы, защитные панцири и т.д. Зарождение кристаллов происходит на биополимерной матрице, которая самоорганизуется в систему ориентированных ячеек, волокон или плоскостей и осуществляет биологический контроль за ростом кристаллов. Основные результаты использования принципов биоминерализации для выращивания кристаллов и тонких пленок, один из примеров которого мы только что рассмотрели, обобщены в книге Дж. Фендлера [7] и ряде обзоров [8].

Исследования процессов биоминерализации важны для разработки принципиально новых технологий получения высокодисперсных и тонкопленочных материалов. Для успешного проведения биоминералогического синтеза необходимо ясное понимание природы молекулярного взаимодействия на границе органической и неорганической фаз, а также факторов, влияющих на зародышеобразование кристаллитов и последующий рост неорганической пленки. Существенно, что возможность модификации структуры монослоя на поверхности ЛБ-ванны открывает более широкие возможности при подборе условий для эпитаксиального роста, чем в случае твердых подложек.

Ленгмюровские пленки и наноккомпозиты на их основе уже нашли применение в качестве длинноволновых рентгеновских дифракционных решеток, резистов, газовых сенсоров, рабочих элементов первапорационных мембран (в последнем случае очень важно, что покрытия имеют контролируемую структуру и управляемую толщину), наноразмерных диэлектрических полимерных покрытий и прослоек в различных устройствах и т.д.

### **Ложка дегтя напоследок**

Практически мы рассмотрели все возможные «инструменты» ленгмюровской технологии, с помощью которых можно конструировать гетероструктуру — наноккомпозит сложной слоистой архитектуры. Все выглядит очень привлекательно и действительно перспективно, но на самом деле это правильная, но довольно упрощенная схема. Почему ЛБ-метод еще не внедрен повсеместно? Потому что на кажущемся таким очевидным пути встречаются подводные камни. ЛБ-техника внешне проста и дешева (не нужен сверхвысокий вакуум, высокие температуры и т.п.), однако первоначально требует значительных затрат для создания особо чистых помещений, так как любая пылинка, осевшая даже на одном из монослоев в гетероструктуре, — это незалечиваемый дефект. С помощью электронной микроскопии и электронной дифракции мы обнаружили, что присутствующей в воздухе углекислоты достаточно, чтобы на ленгмюровском монослое в ходе рассмотренного выше биомиметического процесса при определенных условиях могли вырасти еще и незапланированные кристаллы гидрокарбоната свинца. Структура монослоя полимерного материала, как выяснилось, существенно зависит от типа растворителя, в котором готовится раствор для нанесения на ванну, и т.д., и т.п.

В заключение следует сказать, что сейчас уже достигнуто понимание принципов, согласно которым можно планировать и осуществлять конструирование и производство наноструктур с помощью ленгмюровской технологии. Однако требуются новые методы исследования характеристик уже изготовленных наноустройств, поскольку наш сегодняшний опыт ограничен моделями, работающими в диапазоне размеров  $>100$  нм. Поэтому мы сможем добиться большего прогресса в проектировании, изготовлении и сборке наноструктур только после того, как глубже поймем закономерности, определяющие физико-химические свойства таких материалов и их структурную обусловленность.

Рассказывая в своей лекции о фантастических перспективах, которые сулит изготовление материалов и устройств на атомном или молекулярном уровне, Фейнман указал, что тогда возникнет необходимость в создании совершенно нового класса рабочей и измерительной аппаратуры, требуемой для обращения со столь малыми, наноразмерными объектами. Предсказанная Фейнманом аппаратура появилась лишь в 80-х годах (сканирующие туннельные и атомно-силовые микроскопы, электронные микроскопы высокого разрешения нового поколения и другие приборы). Теперь исследователи обрели новые «глаза и руки», необходимые для создания и изучения структуры и свойств таких объектов. Одновременно значительный прогресс в вычислительной технике позволил моделировать характеристики материалов в наномасштабе.

Для исследования ЛБ-пленок, предмета нашего сегодняшнего рассмотрения, традиционно применяется рентгеновская и нейтронная рефлектометрия и дифракция электронов (о которой было несколько слов сказано выше) [9]. Однако дифракционные данные всегда усреднены по области, на которой сфокусирован пучок излучения. Поэтому они дополняются в настоящее время атомно-силовой и электронной микроскопией (при помощи электронной микроскопии высокого разрешения научились рассматривать строение отдельной наночастицы с атомным разрешением, рис. 9, в). Наконец, самые последние достижения в структурных исследованиях связаны с запуском синхротронных источников. Стали создаваться станции, в которых совмещаются ЛБ-ванна и рентгеновский дифрактометр, благодаря чему структуру монослоев можно исследовать непосредственно в процессе формирования на водной поверхности. В настоящее время развиваются методики, дающие спектрально-селективную структурную информацию, такие, например, как метод стоячих рентгеновских волн [10], адаптированный к кристаллическим слоистым системам. Этот метод основан на сочетании рентгеновского эксперимента в условиях дифракции или полного внешнего отражения рентгеновских лучей с регистрацией вторичного характеристического излучения (например, флуоресценции), возбужденного при фотоэлектрическом поглощении падающего рентгеновского пучка. Он удачно объединяет возможности высокоразрешающих структурных методик со спектральной чувствительностью получаемых данных.

Из вышесказанного следует, что нанонаука и развитие нанотехнологий еще находятся на начальной стадии развития, но потенциальные перспективы их

широки, методы исследования постоянно совершенствуются. Пустое пространство внизу, о котором говорил Фейнман, постепенно заполняется, и работы впереди – непочатый край.

### **Литература**

1. Ковальчук М.В. Органические наноматериалы, наноструктуры и нанодиагностика // Вестн. РАН. 2003. Т. 73. № 5. С. 405–411.
2. Feynman R. // Eng. Sci. 1960. V. 23. P. 22.
3. Taniguchi N. // Proc. Int. Conf. Prog. Eng. Part II. Tokyo, 1974.
4. Левченко Е.Б., Львов Ю.М. Молекулярное зодчество // Природа. 1990. № 3. С. 3–11.
5. Клечковская В.В. Дифракция электронов как метод изучения структуры // Природа. 1997. № 7. С. 32–40.
6. Вайнштейн Б.К., Клечковская В.В. // Кристаллография. 1994. Т. 39. № 2. С. 301–309.
7. Fendler J.H. Membrane-mimetic approach to advanced materials. Berlin, 1994.
8. Bunker V.C., Rieke P.C., Tarasevich B.J. et al. // Science. 1994. V. 264. P. 48–55.
9. Клечковская В.В., Фейгин Л.А. // Кристаллография. 1998. Т. 41. № 6. С. 975–982.
10. Novikova N., Zheludeva S., Konovalov O., Kovalchuk M. et al. // J. Appl. Cryst. 2003. V. 36. P. 727–731.

## ОРГАНИЧЕСКИЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ, НАНОСТРУКТУРЫ И НАНОДИАГНОСТИКА

*М.В. Ковальчук*

*Вестник Российской академии наук. 2003. Том 73. № 5*

Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, который я представляю и которому в 2003 г. исполняется 60 лет, известен своими фундаментальными работами в области синтеза различных кристаллических материалов и их комплексов, исследованиями их структуры и свойств. При этом особое место занимало и занимает изучение наноматериалов и нанообъектов. Среди них в первую очередь можно назвать тонкие эпитаксиальные слои и пленки, мембранные структуры, острийные кристаллы, различные нанокристаллы и целый комплекс органических материалов, включая ленточные пленки, жидкие кристаллы, биоорганические кристаллы и материалы. Для получения наноматериалов и наносистем на их основе используется атомарное и молекулярное конструирование (методы «атомномолекулярной архитектуры»).

Одновременно развиваются адекватные новым технологиям методы атомарной диагностики, которые позволяют контролировать структурное состояние создаваемых материалов. Ключевая роль в диагностике материалов всегда принадлежала рентгеновским методам. Физическое материаловедение как наука возникло после двух величайших открытий: рентгеновского излучения в 1895 г. и дифракции рентгеновских лучей на кристаллических материалах в 1912 г., позволивших «увидеть» трехмерное атомное строение материалов, прежде всего кристаллических, исследовать происходящие в нем процессы, а также разработать пути целенаправленного влияния на изменение строения и свойств материалов.

Сегодня рентгеновская физика переживает второе рождение благодаря созданию специализированных источников синхротронного излучения. Они генерируют электромагнитное излучение, обладающее уникальными свойствами: непрерывным спектром от инфракрасного до  $\gamma$ -излучения; высокой степенью естественной коллимации; возможностью использования периодической последовательности ультракоротких рентгеновских импульсов длительностью в несколько десятков пикосекунд; определенным состоянием поляризации; яркостью излучения, на 8–10 порядков превосходящей яркость существующих лабораторных рентгеновских трубок. Успехи рентгеновских дифракционных исследований, подкрепленные уникальными свойствами синхротронного

излучения, дают основание назвать сегодняшнее время ренессансом рентгеновской физики.

Сотрудники Института кристаллографии внесли общепризнанный вклад в развитие рентгеновских методов изучения структуры кристаллов и различных материалов. К настоящему времени здесь накоплен огромный опыт в постановке и проведении исследований с использованием синхротронного излучения. Именно поэтому на меня возложено также руководство работами в Курчатовском центре синхротронного излучения НИЦ «Курчатовский институт». Главная цель этой деятельности – сделать реальной возможность практического использования синхротронного излучения российскими организациями, в первую очередь институтами РАН.

Современное материаловедение – многоплановая область знаний, которой в нашей академии всегда уделялось особое внимание. На современном этапе развития науки и технологий очень важно одновременно с сохранением большинства существующих и востребованных материаловедческих направлений развивать принципиально идеи и направления, прежде всего связанные с созданием наноматериалов различной природы на их основе.

Развитие науки в XX в. шло в основном по пути от сложного к простому, или по пути анализа, на котором последовательно были открыты молекулы, атомы, затем – ядра и элементарные частицы. Одним из результатов явилось понимание того, как природа устроила вещество на уровне атомов и молекул. При этом произошло сближение физики, химии, минералогии и биологии. Но уже с середины века началось движение по второму пути – от простого к сложному, то есть по пути синтеза. Соединяя определенным образом, отдельные атомы и молекулы, стало возможным получать целый набор искусственно синтезированных неорганических и органических веществ, например кристаллов, полимеров и даже белковых молекул.

Расшифровка атомно-молекулярного строения веществ заложила основу технологий нового времени. По всем прогнозам, XXI век будет временем атомарного конструирования различных материалов с заданными свойствами. При этом особо важными становятся исследования, проводимые «на стыке» наук, которые позволяют объединять усилия и интеллектуальный потенциал ученых разных специальностей, стимулируя развитие науки в целом. Фактически междисциплинарный подход можно считать методологией развития науки на рубеже веков.

Один из ярких примеров такого подхода – кристаллография, которая по сути своей междисциплинарна (см., например [1]). Она родилась из минералогии, начавшись с изучения материалов чисто описательными способами, затем вобрала в себя достижения химии, когда науку заинтересовал химический состав минералов, и, наконец, пополнившись физическими методами исследования (в первую очередь рентгеноструктурным анализом), превратилась также в область физики. Сегодня кристаллография активно вторгается в биологию, что, прежде всего, связано с уникальными возможностями рентгеноструктурных исследования.

В последнее время в связи с большими успехами в области молекулярной биологии, биоинженерии, рентгеноструктурного анализа биологических объектов появилась перспектива создания новых приборов и систем на основе биоорганических веществ. Задача состоит в том, чтобы научиться встраивать биоорганические молекулы в различные структуры в качестве элементов для восприятия изображений, звуковых и химических сигналов (биосенсоры), преобразования сигналов для использования в информатике (биокомпьютеры) и многих других целей.

Для решения такой задачи необходимо развитие биоорганического материаловедения, адаптация хорошо развитых твердотельных технологий к работе с биоорганическими материалами. Напомним, что физическое материаловедение как самостоятельное научное направление возникло в результате использования физических методов исследования и современного математического аппарата в конкретной области знаний. На начальном этапе это было физическое материаловедение, затем полупроводниковое материаловедение, а сегодня бурно рождается новая область биологического материаловедения, основанная на сочетании математических подходов и физических методов с достижениями молекулярной биологии, биоинженерии и биотехнологии.

Логика развития полупроводникового материаловедения, например, такова: от объемных трехмерных кристаллов, тонких слоев, многослойных структур — к наноструктурам на основе квантовых ям и квантовых точек, затем к созданию принципиально новых технологий атомарного конструирования неорганических полупроводниковых материалов — молекулярно-лучевой эпитаксии и использованию принципов самоорганизации. Фактически полупроводниковое материаловедение и твердотельная электроника, пройдя долгий и сложный путь, пришли к необходимости целенаправленного манипулирования отдельными атомами, использованию принципов самоорганизации и созданию атомарных нанотехнологий, то есть к тому, что естественным образом присуще и давно существует для биоорганических систем и материалов.

Например, так называемая техника Ленгмюра–Блюджетт, являясь аналогом молекулярно-лучевой эпитаксии, позволяет создавать двумерные и многослойные системы и сверхрешетки на базе органических и биологических молекул и их сочетания. Практически с использованием этой техники можно целенаправленно, под контролем создавать наноразмерные органические и биоорганические системы на твердых подложках, тем самым открывая принципиально новые возможности для создания нанобиоорганических материалов, нанобиотехнологий и систем на их основе. В Институте кристаллографии РАН с использованием вышеупомянутого метода Ленгмюра–Блюджетт были получены сверхтонкие (~1 нм) пленки из сополимера винилиден-фторида с трифторэтиленом (ПВДФ.ТрФЭ), в которых впервые обнаружено явление двумерного сегнетоэлектричества [2]. Подобного рода структуры открывают возможность разработки элементов памяти на органических монослоях (рис. 1).

Конструирование новых материалов, совершенствование их структуры и свойств, создание наноматериалов и наносистем на основе молекулярной архитектуры неразрывно связано с применением адекватных (атомного разрешения)

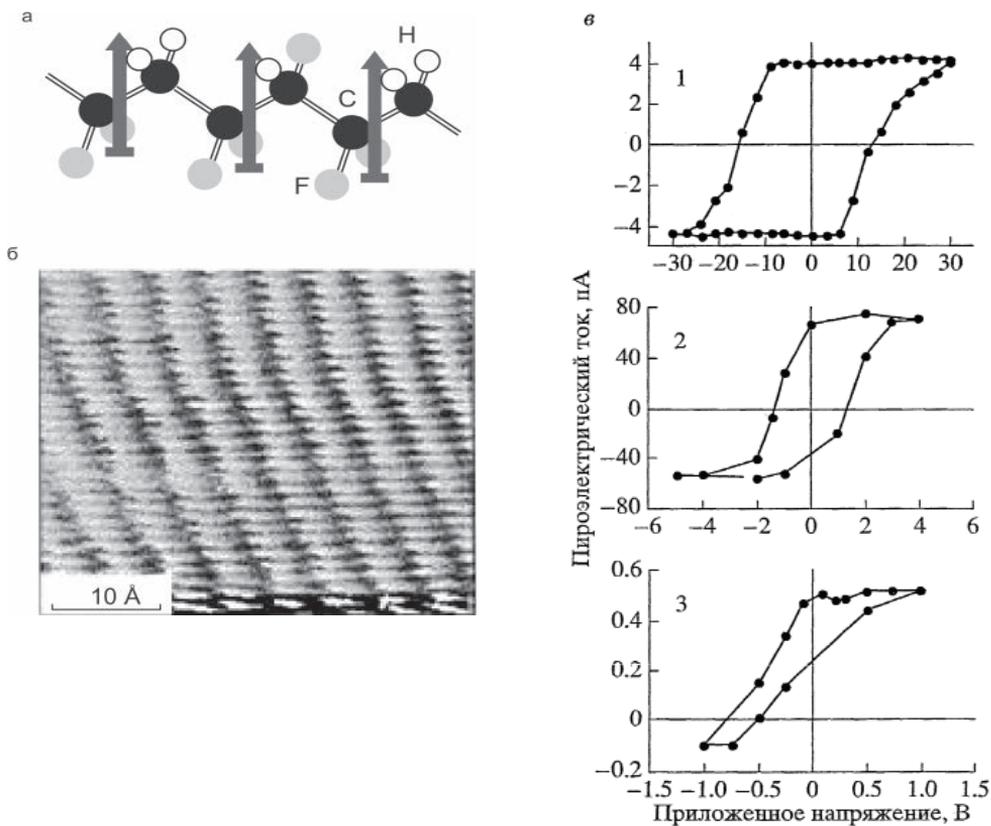
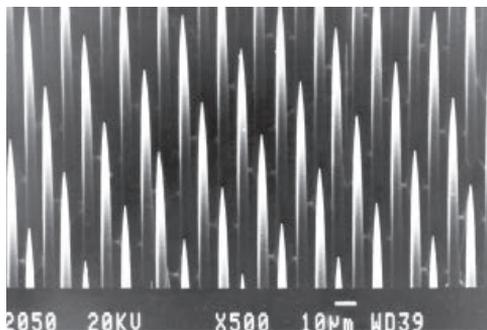


Рис 1. Обнаружение сегнетоэлектрического эффекта в ультратонких слоях сополимера винилиден-фторида с трифторэтиленом (ПВДФ.ТрФЭ)- $((-\text{CH}_2-\text{CF}_2)_x(-\text{CH}_2-\text{CHF}-)_{1-x})_n$ : а – структура полимерной молекулы, б – СТМ-изображение монослоя (ПВДФ.ТрФЭ), в – переключение поляризации в пленках с разным числом монослоев: 1 – 30, 2 – 5, 3 – 2

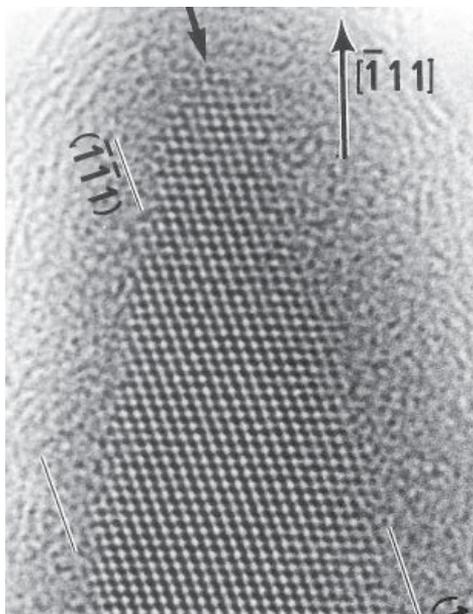
диагностических средств. Исторически в основе любой диагностики лежало использование прежде всего электромагнитного излучения, начиная с видимого света и кончая жестким рентгеновским излучением. К этому добавились методы, основанные на рассеянии различных частиц: электронов, нейтронов, ионов и др.

На смену обычной, а затем электронной микроскопии пришли методы с атомарным разрешением, такие как атомно-силовая микроскопия и электронная микроскопия атомного разрешения.

На рис. 2, где приведено изображение острой наноструктуры на основе кремния, а также отдельного острия [3], можно четко видеть, что вершина острия состоит всего лишь из нескольких атомов кремния. Эти наноструктуры можно использовать при разработке принципиально новых экранов для дис-



а



б

Рис. 2. Кремниевая острейшая наноструктура: а – изображение в растровом микроскопе; б – высокоразрешающее электронно-микроскопическое изображение отдельного острия

плевей и телевизоров, они уже выступают в качестве кантилеверов для зондовой микроскопии и различных эмиттеров.

Как уже говорилось, рентгеновские методы сыграли ключевую роль в развитии современной науки о материалах. Однако применение рентгеновского излучения для анализа наноматериалов и наноструктур связано с решением ряда сложных задач в области физики рассеяния рентгеновских лучей. Во-первых, говоря о наноструктурах и наноматериалах, мы всегда имеем в виду либо системы с малым числом атомов, рассеивающих рентгеновское излучение, либо поверхность, рентгеновский сигнал от которой трудно выделить на фоне сильного рассеяния объемом исследуемого объекта. Во-вторых, выделив это слабое рентгеновское рассеяние от поверхности или наносистемы, необходимо измерить его с достаточной точностью. И, наконец, важнейшая принципиальная задача физики рассеяния рентгеновского излучения заключается в сочетании возможностей дифракции и спектроскопии.

Напомним, что спектроскопические методы основаны на измерении различных вторичных (неупругих) излучений – отклика кристалла на поглощение части падающего рентгеновского излучения. Регистрация вторичных излучений (флуоресценция, фото- и оже-электроны и др.), имеющих малую глубину выхода, позволяет анализировать состав поверхности и нанобъемов, например,

определять концентрацию атомов различного сорта. Вместе с тем спектроскопические методы не дают ответа на вопрос о пространственном (структурном) расположении атомов. В то же время рентгено-дифракционные методы, давая информацию о пространственном расположении атомов, оставляют без ответа вопрос о типе атомов, входящих в состав изучаемого объекта.

Все сформулированные выше проблемы были решены в процессе создания нового рентгеновского метода: структурно-чувствительной спектроскопии поверхности конденсированных сред и наноструктур с помощью стоячих рентгеновских волн. Определяющий вклад в его создание внесли сотрудники Института кристаллографии РАН (см., например, [4–12]).

Физическая сущность метода стоячих рентгеновских волн достаточно проста: при падении плоской рентгеновской волны на совершенный кристалл под углом Брэгга формируется сильная дифрагированная волна. Когерентная суперпозиция падающей и дифрагированной волн образует стоячую рентгеновскую волну с периодом, равным межплоскостному расстоянию. Фактически в кристалле и над его поверхностью образуется «масштабная линейка» с ценой деления в несколько ангстрем, соответствующей межплоскостному расстоянию.

Изменение угла падения рентгеновского пучка на кристалл сопровождается перемещением стоячей волны относительно неподвижных атомных плоскостей в направлении, перпендикулярном плоскостям. Это приводит к изменению интенсивности поля стоячей волны на атомных плоскостях, что, в свою очередь, ведет к модуляции интенсивности выхода любого вторичного излучения. Практически регистрация вторичных излучений в условиях дифракции (метод стоячих рентгеновских волн) позволяет определять пространственное (структурное) положение атомов определенного сорта в наноматериалах и наноструктурах различной природы.

На рис. 3 в первом эксперименте наглядно продемонстрирована возможность использования стоячей рентгеновской волны с целью определить распределение атомов определенного сорта (в данном случае – свинца) в органической наноструктуре, состоящей из восьми лентгмюровских монослоев на твердой (кремниевой) подложке. Показано, что атомы свинца проникают в каждый монослой изучаемой наноструктуры. Во втором эксперименте, регистрируя флуоресцентное излучение, возбуждаемое стоячей рентгеновской волной, впервые удалось определить пространственное положение одного органического монослоя на поверхности жидкости.

Перспективы развития и применения новых рентгеновских методов диагностики наноструктур связаны с использованием обладающего уникальными свойствами синхротронного излучения. Сегодня ситуация в этой области в нашей стране существенно изменилась в связи с вводом в эксплуатацию первого в России специализированного источника синхротронного излучения в НИЦ «Курчатовский институт», разработанного в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (энергия электронов 2.5 ГэВ, ток 100 мА).

В Институте кристаллографии РАН совместно с НИЦ «Курчатовский институт» и рядом академических институтов в последние годы был разработан и создан комплекс экспериментального оборудования для проведения

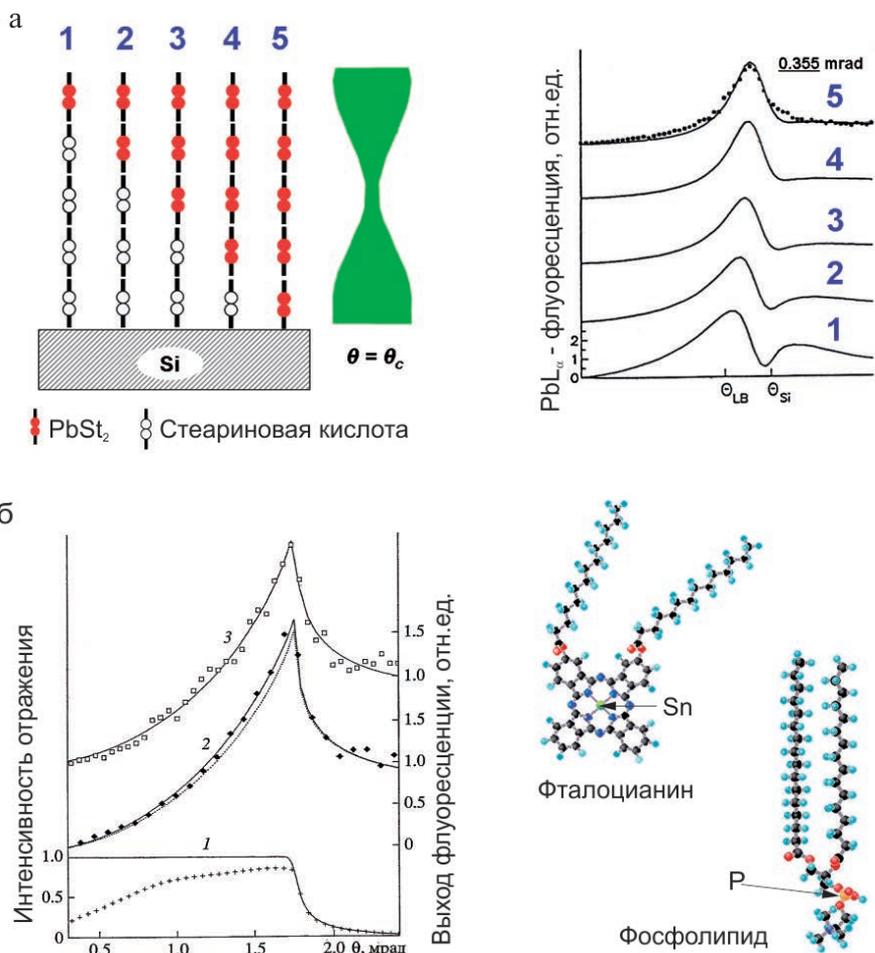


Рис. 3. Экспериментальные результаты при локализации атомов на твердой подложке и на поверхности раздела воздух–жидкость: а – экспериментальная и расчетные угловые зависимости выхода  $PbL_{\alpha}$ -флуоресценции от пленки Ленгмюра–Блоджетт (8 монослоев стеариновой кислоты на Si-подложке). Угловые зависимости выхода флуоресценции рассчитаны для различных распределений ионов свинца; 1 – ионы свинца содержатся в одном верхнем периоде пленки, 2 – ионы свинца содержатся в двух верхних периодах пленки, 3 – ионы свинца содержатся в трех верхних периодах пленки и т.д.; б – экспериментальные и расчетные угловые зависимости флуоресценции от ленгмюровских пленок на поверхности жидкой субфазы: 1 – рентгеновское отражение; 2 – угловая зависимость интенсивности  $SnK_{\alpha}$ -флуоресценции от монослоя фосфолипида

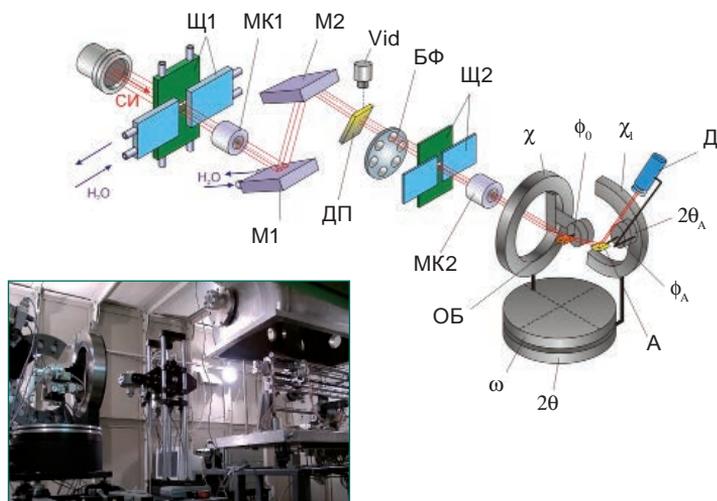


Рис. 4. Рентгенооптическая схема и общий вид станции прецизионной рентгеновской оптики Щ1, Щ2 – щелевые диафрагмы; М1, М2 – кристаллы-монохроматоры; ДП – датчик положения пучка; МК1, МК2 – мониторные камеры; БФ – блок фильтров; ОБ – образец; А – кристалл-анализатор; Д – детектор сцинтилляционный;  $\omega$ ,  $2\theta$ ,  $\phi$  и  $\chi$  – оси многокрусного гониометра

исследований на источнике синхротронного излучения. Станция прецизионной рентгеновской оптики (рис. 4) предназначена для проведения описанных выше экспериментов и представляет собой комплекс уникального оборудования, созданного российскими учеными и инженерами. Она соответствует мировому уровню и включает в себя двухкристальный монохроматор, многокрусный гониометр, элементы вакуумного канала, блоки формирования пучка и юстировки объектов.

Наряду с обсуждаемыми здесь исследованиями на Курчатовском источнике синхротронного излучения разворачиваются многоплановые исследования в области микро- и нанотехнологий, материаловедения и др. Для этого построена целая серия станций на пучках синхротронного излучения: станции глубокой рентгеновской литографии, рентгеновской кристаллографии и физического материаловедения, белковой кристаллографии, EXAFS-спектроскопии, медицинской диагностики, фотоэлектронной спектроскопии, оптических исследований в области вакуумного ультрафиолета и др. [13,14].

Развитая экспериментальная база для реализации методов молекулярной архитектуры в органическом материаловедении, высокий уровень рентгеновских и синхротронных исследований, общепризнанные достижения в диагностике наноразмерных систем позволяют утверждать, что органические наноматериалы и наносистемы, являясь одним из главных направлений современной науки, станут основой многих новых технологий XXI в.

## Литература

1. Ковальчук М.В. Кристаллография на рубеже веков: итоги и перспективы // Кристаллография. 1999. Т. 44. № 6.
2. Випе А.В., Fridkin V.M., Ducharme S. e.a. Two-dimensional ferroelectric films // Nature. 1998. V. 391.
3. Kiselev N.A., Hutchison J.L., Stepanova A.N. e. a. HREM of Nanometric Tips Prepared from Epitaxially Grown Silicon Whiskers // Micron. 1997. V. 28. № 1.
4. Ковальчук М.В., Кон В.Г. Рентгеновские стоячие волны — новый метод исследования структуры кристаллов // Успехи физ. наук. 1986. Т. 149. Вып. 1.
5. Вартаньянц И.А., Ковальчук М.В., Кон В.Г. и др. Прямое определение фазы амплитуды отражения с помощью стоячих рентгеновских волн // Письма в ЖЭТФ. 1989. Т. 49. Вып. 11.
6. Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., Novikova N.N. e.a. X-ray total external reflection fluorescence study of L-Bfilms on solid substrate // J. Phys. D.: Appl. Phys. 1993. N 26.
7. Kovalchuk M.V., Kazimirov A.Yu., Zheludeva S.I. Surface-sensitive X-ray diffraction methods: physics, applications and related X-ray and SR instrumentation // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. 1995. V. 101.
8. Zheludeva S.I., Kovalchuk M.V., Novikova N.N. Total reflection X-ray fluorescence study of organic nanostructures // Spectrochim. Acta. 2001. B56.
9. Zheludeva S.I., Novikova N.N., Konovalov O.V. e.a. Characterization of Langmuir monolayers on water surface by X-ray total reflection fluorescence study / SAS2002 XII International Conference on Small-Angle Scattering.
10. Bedzyk M.J., Materlik G., Kovalchuk M.V. X-ray-standing-wave-modulated electron emission near absorption edges in centrosymmetric crystals // Physical Review. B. 1984. V. 30. № 5.
11. Vartanyants I.A., Kovalchuk M.V. Theory and applications of X-ray standing waves in real crystals // RepProg. Phys. 2001. V. 64.
12. Афанасьев А.М., Ковальчук М.В., Чуев М.А., Медведев П.Т. Линии Косселя как новый тип источника рентгеновского излучения // Письма в ЖЭТФ 2002. Т. 122. Вып. 3.
13. Арутюнян Э.Г., Ковальчук М.В., Хейкер Д.М. и др. Станция белковой кристаллографии на источнике синхротронного излучения «Сибирь-2»; Поверхность. Рентгеновские, синхротронные: нейтронные исследования. 1999. № 12.
14. Kovalchuk M.V., Shilin Yu. N., Zheludeva S.I. e.a. X-ray instrumentation for SR beamlines // Nuclear Instr. and Methods in Physics Research. A. 2000. V. 488.

## РЕНТГЕНОВСКОЕ И СИНХРОТРОННОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ — ПУТЬ К ПОЗНАНИЮ СТРУКТУРЫ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

*М.В. Ковальчук, В.О. Попов*

*Наука в России. 2013. № 3*

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 двигателей 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.

### 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\*\*, мета-

---

\*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, транскрипт 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.*).

боломов\*. 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 физикохимических 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 информацию 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 «плани-

---

\*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.*).

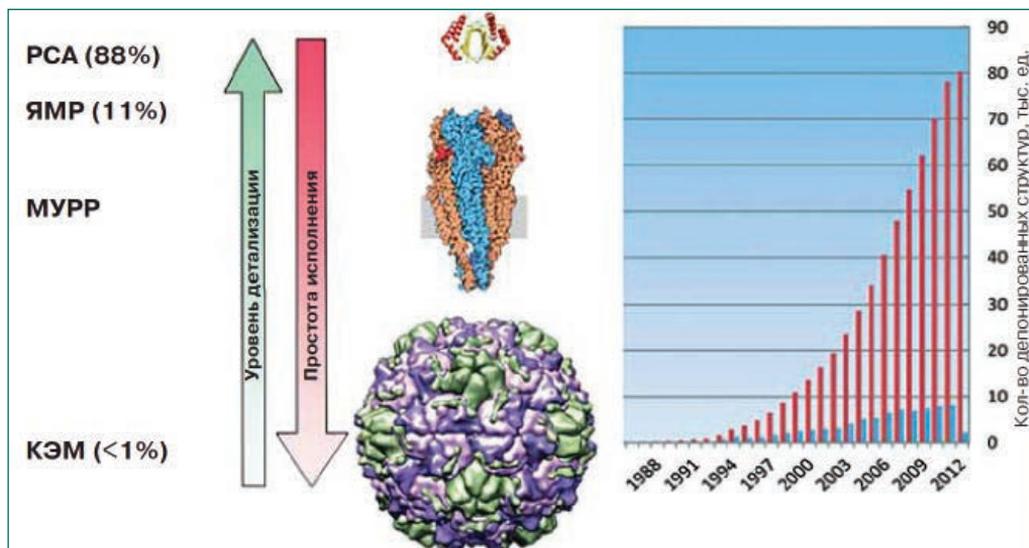


Рис. 1. Основные методы исследования пространственных структур макромолекул и статистика роста числа структур в банке данных RCSB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org))

ровку» его отдельных фрагментов (доменов, отдельных белков) с помощью ЯМР или РСА, 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](http://www.rcsb.org)), созданном в 1971 г. в Брукхейвенской 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 РСА. 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 использовала 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

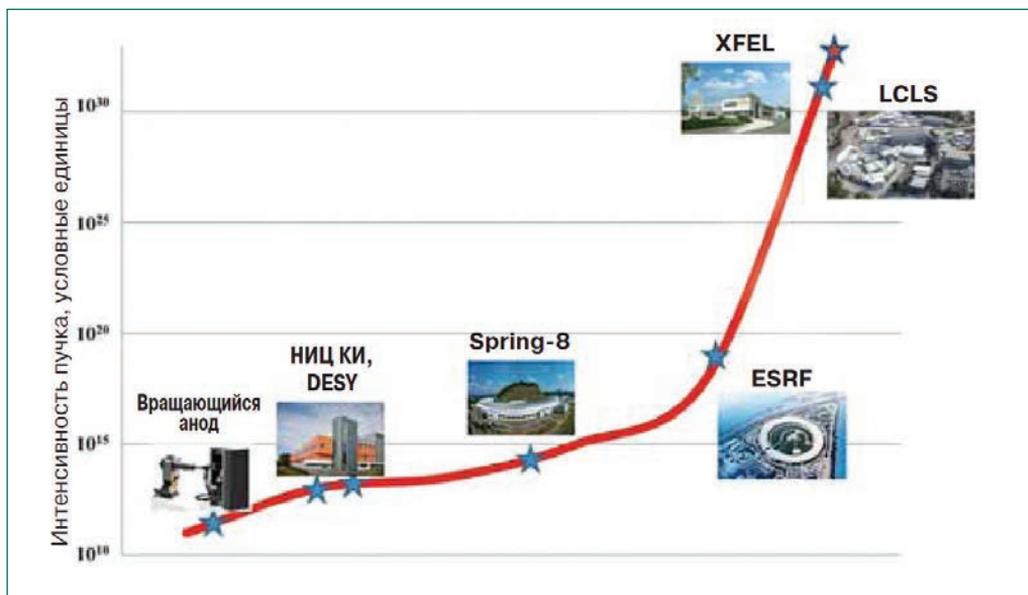


Рис. 2. Сравнение интенсивности источников рентгеновского излучения различных поколений. Расположение указанных синхротронных источников: НИЦ КИ — Россия (НИЦ «Курчатовский институт»); DESY — Германия (Deutsche Synchrotron); Spring-8 — Япония (RIKEN); ESRF — Франция (Европейская лаборатория молекулярной биологии); CLS — США (SLAC National Accelerator Laboratory); XFEL — Германия (Deutsche Synchrotron, международный проект)

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 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 биомакромолекул 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, аспартатаминотрансферазы (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 биомакромолекул 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 молекулярной 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

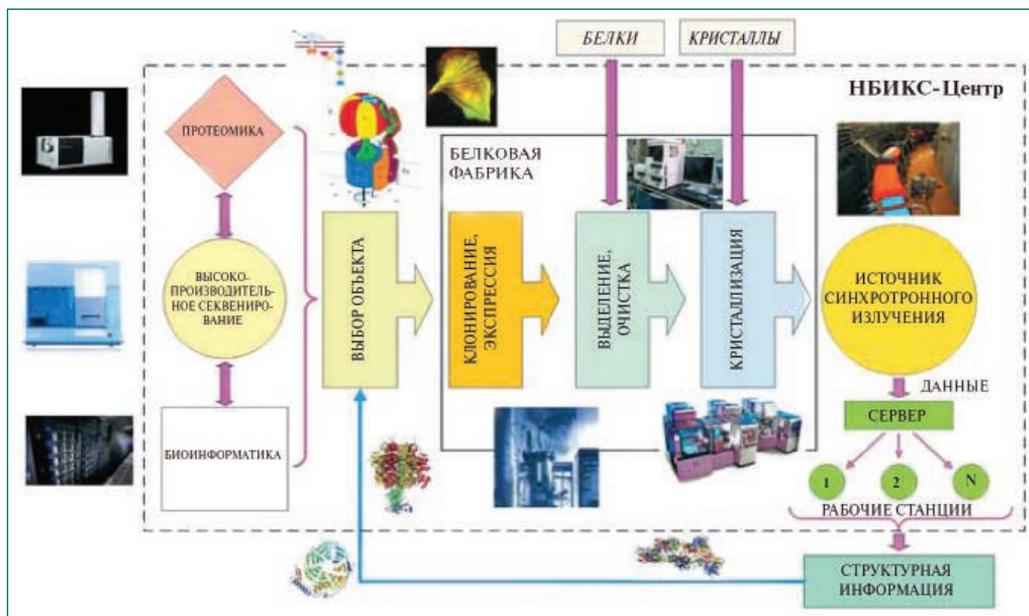


Рис. 3. Место и задачи «Белковой фабрики» в структуре НБИКС-центра НИЦ «Курчатовский институт»

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).

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 непригодны, 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.



Рис. 4. 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 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 отличает возможность 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

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

объектов. Важно отметить, что значительную роль в разработку теории лазеров на свободных электронах внесли российские ученые.

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 указанных 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 РСА, 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.

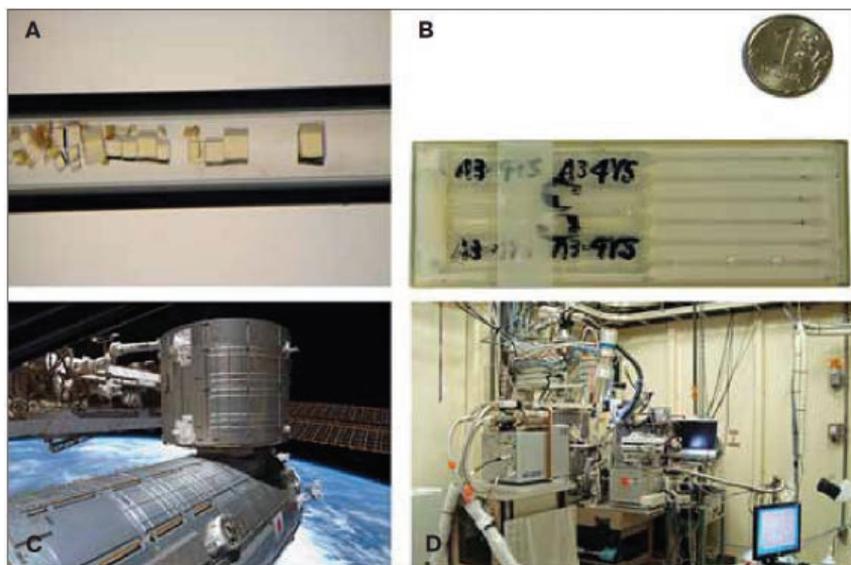


Рис. 5. Элементы эксперимента по кристаллизации макромолекул в условиях микрогравитации. А — капилляр с выросшими кристаллами, В — паллета с капиллярами после проведения эксперимента, С — японский модуль Кибо, предназначенный для проведения различных экспериментов в условиях микрогравитации, D — станция рентгеновской кристаллографии на синхротроне Spring-8 (Япония)

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.

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

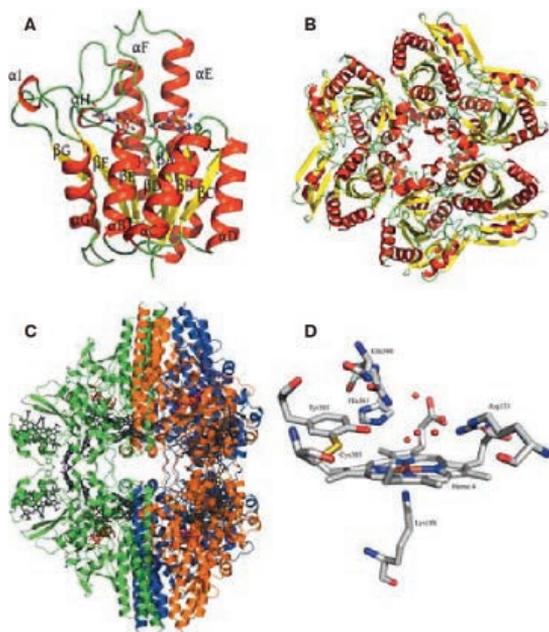


Рис. 6. Пространственные структуры ряда ферментов, полученные «Белковой фабрикой»: А — термостабильная алкогольдегидрогеназа из *T.sibiricus* (разрешение — 1,7 Å), В — гексамерная уридинфосфорилаза из *S.oneidensis* (0,95 Å), кристаллы которой выращены в условиях микрогравитации, С — 48-гемовая цитохром-с-нитритредуктаза из *T.nitratireducens* (1,4 Å) и активный центр этого фермента (D)

«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\* обеспечи-

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

вает 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 (солеустойчивостью) 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 Скрябиным, 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.

---

\*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.).

\*\*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.).

В рамках проекта «Структура сложных молекулярных наномашин» выясняются характеристики мультисубъединичных белков, в том числе включающих различные простетические группы и металлические 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 апофермента (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 тирозинкиназ — 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 закристаллизованы. 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 биомолекул на самом современном методическом уровне.

---

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

## КРИСТАЛЛЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ БЕЛКОВЫХ СТРУКТУР

*И.П. Куранова, М.В. Ковальчук*

*Природа. 2014. № 2*

Огромные успехи в изучении механизмов работы биологических макромолекул и их ансамблей в значительной степени основаны на результатах рентгеноструктурного анализа (РСА) этих молекул. Этот метод дает возможность определить атомные координаты составляющих кристалл атомов и воссоздать атомную структуру молекулы посредством математических расчетов по дифракционной картине, получаемой при рассеянии рентгеновских лучей белковым кристаллом. Хотя в настоящее время для исследования пространственных структур применяются и другие методы (например, ядерного магнитного резонанса), ведущая роль рентгеноструктурного анализа сохраняется — более 80% пространственных структур, представленных в Международном банке белковых данных, установлены именно этим методом [1, 2]. В этом банке сегодня уже хранятся координаты десятков тысяч различных глобулярных белков, но для белковой инженерии, биотехнологии, медицины, фармакологии требуются данные о все новых и новых структурах.

В Институте кристаллографии изучение пространственных структур белковых молекул начал Б.К. Вайнштейн\* еще в 1959 г. В созданной им лаборатории выращиванием пригодных для структурного исследования белковых монокристаллов и расшифровкой пространственных структур занималась группа сотрудников, в состав которой входили биологи, физики и химики. Работы по определению и анализу пространственных структур гемовых белков (леггемоглобина и каталазы), неорганических пирофосфатаз, участвующих в биосинтезе и трансформации энергии в живых организмах, L-аспарагиназы, используемой при лечении ряда видов опухолей, вируса крапчатости гвоздики, а также саикарсинтазы, вовлеченной в биосинтез пуринов, получили международное признание [3].

Сегодня технические возможности для структурных исследований существенно расширились: снижены требования к размеру белковых кристаллов, а для получения более совершенных успешно применяются новые методы их выращивания; усовершенствовано получение дифракционных наборов; совре-

---

\*Подобнее см.: Вайнштейн Б.К. Кристаллография сегодня // Природа. 1974. № 3. С. 44—53.

менная вычислительная техника ускорила обработку дифракционных данных. Значительный прогресс в белковой кристаллографии достигнут благодаря созданию новых мощных источников рентгеновского излучения — синхротронов. В нашей стране такие исследования успешно ведутся на Курчатовском источнике синхротронного излучения (СИ) [4, 5]. К настоящему времени сотрудники Института кристаллографии установили строение и механизмы функционирования многих белков, внесли в международную базу данных атомные координаты более чем 150 белков и их комплексов с функционально важными молекулами.

Изучаются структуры и механизмы действия ряда белков, важных для медицины и биотехнологии, таких как тимидинфосфорилаза, фосфопантетеинаденилилтрансфераза из туберкулезной бактерии, бактериальная карбоксипептидаза [6—8] и др. В лаборатории рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения ИК РАН успешно продолжают эксперименты по выращиванию кристаллов белков в невесомости.

### **Как получают кристаллы белков**

Рентгеноструктурный анализ и в настоящее время остается методом, дающим наиболее полную информацию о пространственной структуре белков и нуклеиновых кислот\*.

Рентгеноструктурное исследование протекает в несколько этапов. Начинается оно с получения кристаллов выбранного для исследования вещества. На последующих этапах от белковых кристаллов на источниках рентгеновского излучения собирают дифракционные наборы, которые с помощью математического аппарата и специальных программ позволяют расшифровать строение изучаемой молекулы, т.е. установить пространственные координаты всех атомов (кроме водородных, положение которых определяют при разрешении менее 1 Å).

Биохимики давно обратили внимание на способность белков образовывать кристаллы и использовали кристаллизацию как одну из стадий очистки белков. Еще в 1840 г. немецкий исследователь Ф.Л. Хунефельд наблюдал под микроскопом формирование кристаллов гемоглобина червя; американский химик Дж.Б. Самнер в 1926 г. получил кристаллы фермента уреазы. За выделение и кристаллизацию ферментов он вместе с Дж.Х. Нортропом в 1946 г. был отмечен Нобелевской премией.

Однако для структурного исследования белковые кристаллы должны удовлетворять ряду требований [9]. Так, дифракционная картина от монокристаллов должна давать разрешение не ниже 2.5 Å. Для выращивания кристаллов с нужными свойствами разработаны специальные методики. Все они сводятся к

---

\*О методе РСА для исследования пространственных структур белков подробнее см.: Владимирюв Ю. А. Зачем нужна белковая кристаллография // Природа. 2003. № 11. С. 26—40.

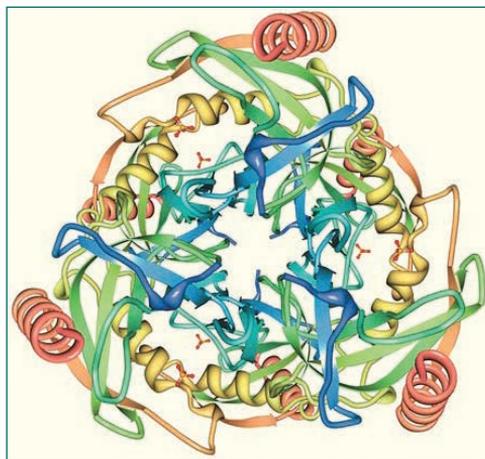


Рис. 1. Пространственная структура молекулы неорганической пиррофосфатазы *Thermus thermophilus*

смешиванию малых объемов растворов белка и осадителя (вещества, понижающего растворимость белка), но отличаются способом смешивания. В качестве осадителей обычно используют неорганические соли, амфифильные органические растворители, растворимые в воде органические полимеры, например, полиэтиленгликоли. Самый распространенный метод кристаллизации — диффузия паров растворителя в капле. Тогда на дне замкнутого сосуда находится раствор осадителя, а капля концентрированного раствора белка — например, на «пьедестале». Другой метод — свободная диффузия через поверхность раздела между растворами белка и осадителя. В этом случае осадитель аккуратно наносят на поверхность белкового раствора, помещенного в капилляр или пробирку малого диаметра, после чего оба раствора смешиваются посредством диффузии. Очень проста кристаллизация под слоем парафинового масла, когда несколько микролитров раствора с равными объемами белка и осадителя заливают слоем парафинового масла. Медленное испарение раствора уменьшает скорость кристаллизации и способствует увеличению размера кристалла.

### Сложности кристаллизации

Несмотря на усовершенствование техники рентгеновского анализа и методов кристаллизации, получение качественных белковых кристаллов продолжает оставаться наименее предсказуемым этапом, от которого зависит не только успех структурного исследования, но и время, затраченное на его проведение.

Одна из причин возникновения трудностей при поиске условий кристаллизации — отсутствие критериев для рационального выбора осадителя, способствующего формированию кристалла. Чтобы ускорить постановку проб для



Рис. 2. Фазовая диаграмма, показывающая растворимость белка как функцию концентрации осадителя. Приведены кривая растворимости (1) и кривая критического пересыщения (2), над которой белок выпадает в виде аморфного или мелкокристаллического осадка. В зоне нуклеации одновременно происходит образование кристаллических зародышей и рост мелких кристаллов. Оптимальные условия для роста крупных кристаллов — в метастабильной зоне (показано стрелками)

поиска условий, сегодня используют специальные роботы, которые позволяют поставить тысячи кристаллизационных проб в ограниченное время.

Другие затруднения вызваны тем, что, в отличие от кристаллов низкомолекулярных соединений, белковые кристаллы начинают формироваться только в сильно пересыщенном растворе. В этом случае одновременно происходят образование зародышей кристаллов (нуклеация), и их рост. Из-за большого количества зародышей и высокой скорости роста появляется много мелких кристаллов. Для получения кристаллов большего размера и лучшего качества необходимо выращивать их в минимально пересыщенном растворе, в метастабильной зоне. Часто для разделения стадий нуклеации и роста используют так называемые затравки: вносят в слабо пересыщенный белковый раствор ограниченное число зародышей или несколько микрокристаллов.

Однако главные причины, затрудняющие получение кристаллов растворимых глобулярных белков, кроются в свойствах самой белковой молекулы. Построенная из уникально уложенной полипептидной цепи, эта молекула с высокой молекулярной массой (от 1.5 до 500 КДа) имеет несколько уровней пространственной структуры — первичную, вторичную, третичную и четвертичную. Белковая глобула, поддерживаемая водородными связями и гидрофобными взаимодействиями, сохраняет свою структуру только в водном растворе (обычно в присутствии различных солей) и лишь в ограниченном интервале температур и значений pH. Очень часто молекула белка состоит из нескольких

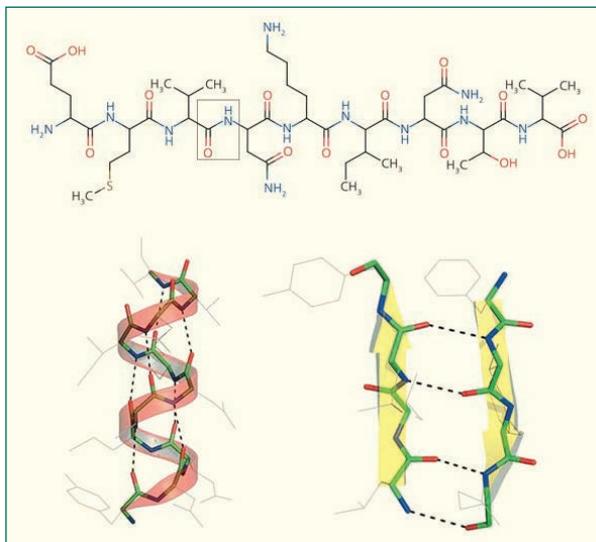


Рис. 3. Элементы структуры белковой молекулы. Вверху — фрагмент полипептидной цепи (первичная структура); внизу — фрагменты вторичной структуры:  $\alpha$ -спираль (слева) и  $\beta$ -слой (справа). Пунктирными линиями обозначены водородные связи

глобул (четвертичная структура), когда для повышения стабильности глобулы возникает необходимость спрятать оказавшиеся на поверхности гидрофобные аминокислотные остатки. Объем белковой глобулы с длиной цепи 220—250 аминокислотных остатков может достигать  $1500 \text{ \AA}^3$ , а площадь ее поверхности около  $8000\text{--}10\,000 \text{ \AA}^2$ .

Полипептидная цепь белка распадается при бактериальном заражении. Белки денатурируют при высоких концентрациях органических растворителей и других реагентов, разрушающих водородные связи и гидрофобные взаимодействия. Кроме того, белки склонны к агрегации, имеют несколько минимумов растворимости и наряду с кристаллами образуют аморфные осадки. В то время как ядро белковой глобулы сформировано из гидрофобных боковых цепей, на ее поверхности имеется много полярных функциональных групп — нейтральных и несущих положительные или отрицательные заряды, а их сумма зависит от величины pH (меняется вместе с ней). Обилие на поверхности различных полярных групп создает сложный рельеф поверхности белка, так что его молекулу можно рассматривать как поливалентный ион. Хотя белковая глобула в определенных условиях имеет фиксированную структуру молекул в кристаллическую решетку и может быть одной из причин неупорядоченности белкового кристалла. Высокая молекулярная масса белков, ограниченная устойчивость глобулы, нерегулярность поверхностного рельефа, переменная величина заряда, подверженность конформационным изменениям, а также способность образовывать неупорядоченные агрегаты — все это осложняет кристаллизацию белков.

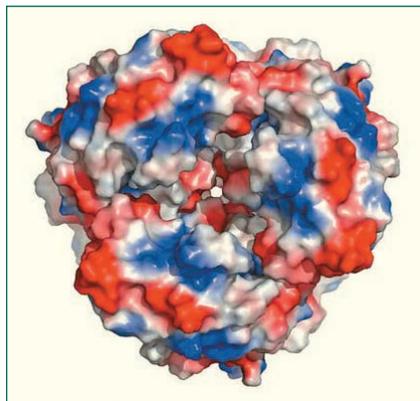


Рис. 4. Поверхность белка фосфопантетеин-аденилилтрансферазы *Mycobacterium tuberculosis*, окрашенная соответственно знаку заряда: серым — нейтральные полярные остатки; синим — положительно заряженные, красным — отрицательно заряженные аминокислотные остатки на поверхности молекулы

### Свойства белковых кристаллов

В отличие от кристаллов обычных молекул, белковые имеют значительные параметры элементарной ячейки, часто более 100 Å, но размеры их невелики (до 0.3—0.5 мм). Сложный рельеф поверхности и обилие полярных функциональных групп, образующих связи с осаждающим раствором, способствуют появлению в белковом кристалле большого количества молекул воды. При этом кристаллическая решетка напоминает сеть, где пространство между молекулами занято каналами, заполненными растворителем.

Высокое содержание воды в кристаллической решетке и малое число межмолекулярных связей на единицу поверхности молекулы определяют повышенную хрупкость белковых кристаллов, их подверженность радиационному распаду приводит к появлению дефектов и к разупорядоченности кристаллической решетки. Такие кристаллы с высокой степенью мозаичности не дают четкой дифракционной картины и непригодны для рентгеноструктурного исследования. С другой стороны, именно благодаря большому количеству воды (от 30 до 80% объема кристалла) структура белка в кристалле не отличается от таковой в растворе.

Атомная модель молекулы, построенная с использованием координат, полученных при рентгеновском исследовании, позволяет найти корреляции между структурой и функцией белка. Анализ атомной модели дает возможность определить функционально важные участки и выделить аминокислотные остатки, подходящие для точечных замен, которые способны в нужном направлении изменить свойства молекулы, что особенно важно для модификации ферментов, используемых в биотехнологии. Чтобы изучить изменения, происходящие

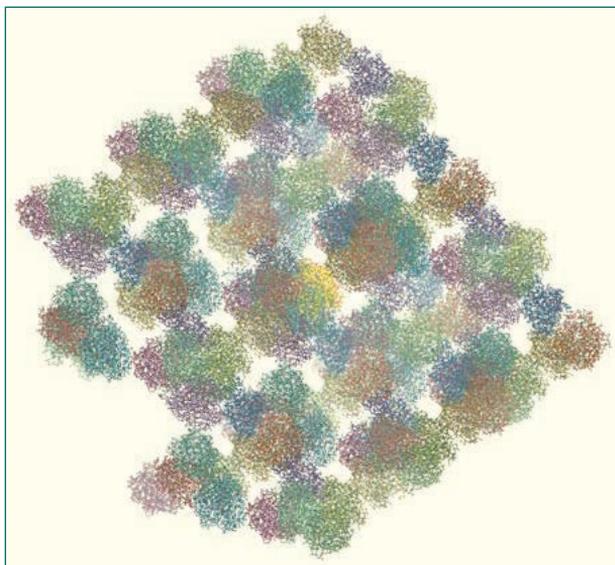


Рис. 5. Укладка молекул белка в кристалле карбоксипептидазы *T.vulgaris*. Просветы внутри кристаллической решетки — заполненные водой каналы

в молекуле белка при его функционировании, наряду со структурой «свободного» белка исследуют пространственную структуру его комплексов с субстратами, аналогами субстратов или ингибиторами реакции. Сравнивая полученные структуры, можно выявить конформационные изменения, сопровождающие работу белковой молекулы.

Координаты атомной модели — это основа для изучения молекулярных механизмов работы белков методами компьютерного моделирования: молекулярной динамикой и докинг. Последний особенно востребован при поиске селективных ингибиторов ферментов, последующая модификация которых позволяет разработать лекарственные препараты нового поколения.

Чем точнее атомные координаты, полученные при рентгеноструктурном исследовании, тем надежнее результаты анализа пространственной структуры и эксперименты по моделированию. Приготовление кристаллов белков высокого дифракционного качества — важная и актуальная задача.

### **Кристаллизация в невесомости**

Один из эффективных путей, позволяющих увеличить размер и улучшить дифракционное качество кристаллов белка, — это выращивание их в условиях невесомости [10]. Величина гравитации влияет на характер транспорта вещества к растущему кристаллу, от чего в значительной степени зависят степень упоря-

доченности кристаллической решетки и, следовательно, дифракционные качества кристалла. На Земле, при единичной гравитации, вещества доставляются к поверхности кристалла конвекционными потоками. По мере роста вокруг кристалла формируется обедненная белком зона, в которой раствор, имеющий меньшую плотность, поднимается вверх. Образующиеся при этом конвекционные потоки создают неодинаковые условия роста на разных участках поверхности кристалла, что отрицательно влияет на его качество.

В условиях невесомости (при пониженной гравитации) по мере встраивания молекул белка в кристаллическую решетку вокруг кристалла возникает стабильный концентрационный градиент белковых молекул. Благодаря этому растущая поверхность кристалла контактирует со слабо пересыщенным раствором, и кристалл растет в оптимальных условиях. Кроме того, при диффузионном транспорте, преобладающем в этих условиях, скорость роста замедляется, и молекулы с большей энергией, первоначально присоединившиеся неправильно, могут диссоциировать от кристалла и при повторном присоединении занять оптимальное положение. Это понижает мозаичность кристаллов и увеличивает их совершенство.

На Земле и в невесомости кристалл в растворе — объект броуновского движения. В наземных условиях кристаллы, достигшие определенного размера, осаждаются и продолжают расти на дне сосуда, что может нарушить их конечную форму. В невесомости кристалл плавает вблизи поверхности раствора и не опускается на дно. Сферическая симметрия диффузионного поля обеспечивает равномерную доставку вещества ко всем граням кристалла, способствуя росту изометричных кристаллов.



Рис. 6. Выращенные на российском сегменте Международной космической станции в аппарате Модуль-1 кристаллы: лизоцима в ячейках прибора (а) и формиатдегидрогеназы *Arabidopsis thaliana*, полученные в том же приборе (б)

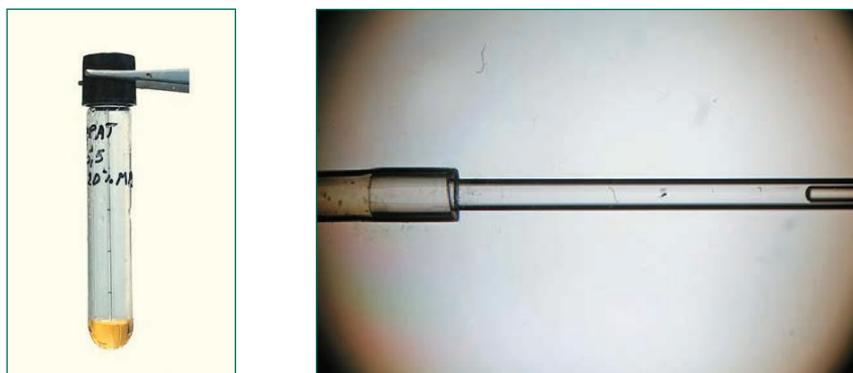


Рис. 7. Выращивание кристаллов в невесомости методом встречной диффузии в капилляре. Слева — подготовительный наземный эксперимент: капилляр с белковым раствором погружен в пробирку с осадителем; справа — кристалл в капилляре с надетой силиконовой трубкой, наполненной агарозным гелем

Эксперименты по кристаллизации белков на космических летательных аппаратах, главным образом на российской космической станции «Мир» (1981—1996), показали, что дифракционное качество белковых кристаллов, выращенных в условиях невесомости, превосходит таковое контрольных наземных кристаллов.

С 2005 г. Институт кристаллографии совместно с Центральным научно-исследовательским институтом машиностроения Роскосмоса участвует в проекте «Кристаллизатор», задача которого — выращивание в невесомости белковых кристаллов высокого дифракционного качества [11]. Для этой работы в конструкторском бюро института были сконструированы несколько специальных аппаратов, в частности аппарат «Модуль-1», в котором кристаллизация осуществлялась методом свободной диффузии\*. Кристаллы рекомбинантного инсулина человека, формиатдегидрогеназы растений, карбоксипептидазы и пирофосфатазы, выращенные в этом аппарате, по величине и разрешению превосходили кристаллы тех же белков, полученные в наземных условиях [10—13].

В настоящее время эксперименты по кристаллизации белков в невесомости продолжаются в рамках международного сотрудничества между Роскосмосом и Японским аэрокосмическим агентством JAXA. В этих опытах применяется метод встречной диффузии в капилляре, предложенный учеными из Университета Гранады и усовершенствованный японскими исследователями [14]. Здесь раствор осадителя проникает в раствор белка, находящегося в капилляре, через надетую на его конец силиконовую трубку, которая заполнена агарозным гелем и погружена в раствор осадителя. При этом смешивание растворов белка и осадителя

\*Ковальчук М.В. и др. Патент № 2307204 (от 27.09.2007 г.) на изобретение: «Устройство для кристаллизации».

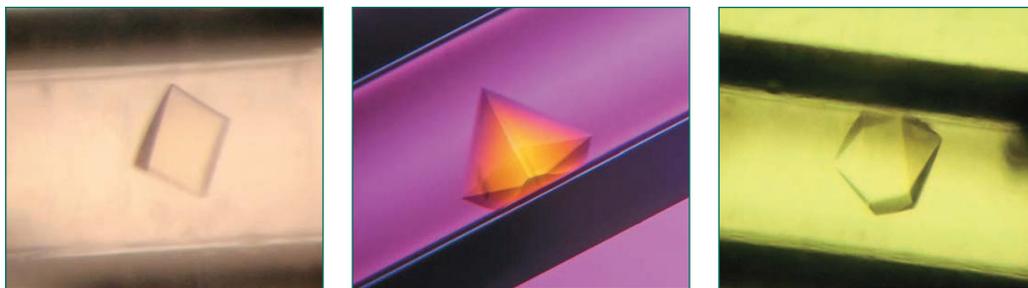


Рис. 8. Кристаллы фосфопантетеин аденилилтрансферазы, тимидинфосфорилазы и карбоксипептидазы *T.vulgaris*, выращенные на Международной космической станции в японском модуле «Кибо» методом встречной диффузии (российско-японский проект)

теля замедляется, а по длине капилляра устанавливается градиент концентрации осадителя. По мере удаления от начала капилляра кристаллы растут при уменьшающемся пересыщении. Таким способом в невесомости выращены кристаллы ряда белков: бактериальной карбоксипептидазы *Thermoactinomyces vulgaris*; фосфопантетеинаденилилтрансферазы *Mycobacterium tuberculosis* и ее комплексов с субстратом, ингибитором и продуктами реакции; тимидинфосфорилазы из *E.coli* в комплексе с терапевтически важными аналогами природных нуклеозидов [15]. Как показало рентгеновское исследование, дифракционное поле «космических» кристаллов на 0.3—0.4 Å превышает поле контрольных наземных. С помощью выращенных кристаллов пространственная структура исследуемых белков установлена в интервале разрешений от 1.05 до 1.7 Å.

### От кристалла к пространственной структуре

Вот несколько примеров, которые иллюстрируют применение атомных моделей, полученных при рентгеновском исследовании, для изучения структурных основ функционирования белковой макромолекулы.

Фермент аспарагиназа, катализирующий превращение аспарагина в аспарагиновую кислоту (аспартат), — редкий пример белка, непосредственно используемого в онкотерапии. Этот фермент создает в клетках, особенно в лейкозных, дефицит аспарагина, который активно участвует в метаболизме и входит в состав белков. Наиболее чувствительны к действию аспарагиназы опухолевые клетки, в которых собственный аспарагин не синтезируется. Из-за его отсутствия синтез белка уменьшается или вовсе прекращается, одновременно прекращается рост опухоли. Недостаток аспарагиназы как лекарственного средства — ее токсичность: наряду с аспарагином она с малой скоростью расщепляет и глутамин, основной переносчик аминокрупп в организме. Понизить токсичность аспарагиназы можно, уменьшив ее глутаминазную активность.

Большой объем белковой молекулы обеспечивает стабильность пространственной структуры, в частности фиксированную геометрию аминокислот, расположенных в активном центре белка фермента. В то же время активный центр, в котором непосредственно протекает катализируемая ферментом реакция, обычно расположенный в углублении на поверхности фермента, занимает лишь небольшой участок поверхности. Замечательная особенность белков — высокая избирательность их действия (специфичность): белок способен отбирать из окружающего раствора и связывать в активном центре только соединения строго определенного строения. Такие соединения называют субстратами, если после связывания они подвергаются действию фермента, или ингибиторами, если, оказавшись в активном центре, они не испытывают дальнейших превращений. Замечательная особенность субстратов — их комплементарность (соответствие) поверхности активного центра, к которой они подходят, как ключ к замку или как хрустальная туфелька Золушке. Связывание субстрата в центре с комплементарной ему поверхностью существенно снижает энергетический барьер для протекания реакции, на чем и основан катализ ферментами.

Поскольку реакция, катализируемая аспарагиназой, обратима, аспарат, продукт ферментативной реакции, при определенных условиях остается связанным в активном центре. Проведенное нами исследование пространственной структуры аспарагиназы и ее комплексов с глутаматом и аспаратом показало, что молекула аспартата, комплементарная поверхности активного центра, свободно в него вписывается, в то время как связывание большей по объему молекулы глутамата пространственно затруднено [16]. Полученные данные о строении активного центра и топологии его поверхности дают возможность выбрать место для точечной замены в активном центре и получить мутантную форму фермента с более низким сродством к глутамату.

Данные о пространственной структуре белков широко используются для рационального поиска эффективных лекарственных средств. Развитие многих заболеваний можно остановить, если заблокировать работу белков, необходимых для жизни болезнетворных вирусов и бактерий, или активность ферментов, требующихся, например, для роста опухоли. Белки, инактивация которых вызывает гибель патогенных организмов или прекращает развитие определенной болезни, являются белками-мишенями. Их ингибиторы могут стать лечебными средствами, но, чтобы превратить их в настоящие лекарства, необходимо химически модифицировать их структуру, увеличив их сродство к белку-мишени. Данные о строении и топологии поверхности активного центра белка-мишени, полученные в результате рентгеноструктурного исследования, существенно облегчают и ускоряют рациональный поиск соединений-ингибиторов.

Таким белком-мишенью для конструирования лекарств против туберкулеза стал недавно изученный нами белок — фосфопантетеинаденилилтрансфераза из *Mycobacterium tuberculosis* (PPATMt). Одна из трудностей борьбы с туберкулезом связана с чрезвычайно высокой адаптивностью его возбудителя, бактерии *M.tuberculosis*, к действию антибиотиков. PPATMt катализирует предпоследнюю стадию биосинтеза кофермента А (CoA), жизненно важного для туберкулезной бактерии. Поскольку катализируемая PPAT реакция является ключевой, опре-

деляющей скорость всего процесса, РРАТМт служит подходящей мишенью для действия противотуберкулезных лекарств, а ингибиторы РРАТ являются потенциальными противотуберкулезными препаратами.

Мы исследовали пространственные структуры свободного фермента и комплексов РРАТ с субстратом, ингибитором и продуктом реакции [17]. Поскольку каждая из структур отражает состояние молекулы на одной из стадий катализируемой реакции, мы проследили сопровождающие ее конформационные изменения и установили ее структурный механизм. Оказалось, что на разных стадиях реакции четвертичная структура молекулы фермента перестраивается, так что в гексамерной молекуле меняется диаметр внутреннего канала, через который субстраты доставляются в активный центр. Нами выявлены аминокислотные остатки, запускающие эти конформационные изменения. Данные о топологии связывающих участков активного центра важны для рационального конструирования ингибиторов фермента — потенциальных противотуберкулезных лекарств.

Еще один важный для медицины и биотехнологии фермент, недавно исследованный нами при разрешении  $1.55 \text{ \AA}$ , — тимидинфосфорилаза (ТФ) *E.coli* [15]. Тимидинфосфорилаза, катализирующая фосфоролитический распад нуклеозидов, будучи ключевым ферментом нуклеозидного обмена, играет важную роль в так называемом запасном (дополнительном) пути синтеза нуклеозидов. Природные нуклеозиды служат структурными компонентами нуклеиновых кислот, выступают кофакторами ферментов и участвуют в процессах трансформации энергии, в передаче сигналов и т.д. Аналоги природных нуклеозидов находят широкое применение в качестве противораковых и противовирусных средств. Например, азидотимидин (фармакологическое название — зидовудин), который отличается от

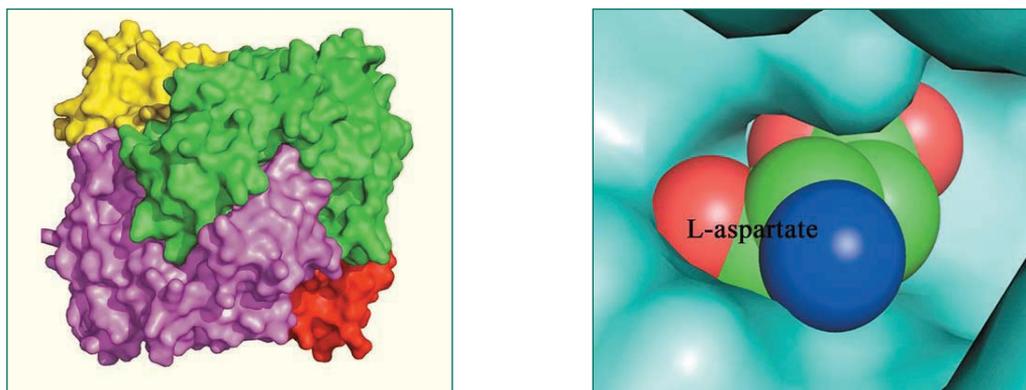


Рис. 9. Тетрамерная молекула аспарагиназы *Erwinia carotovora* (субъединицы молекулы окрашены в разные цвета). Справа — молекула аспартата в активном центре аспарагиназы. Атомы аспартата показаны сферами радиуса Ван-дер-Ваальса

природного субстрата тимидинфосфорилазы только присутствием азидогруппы в дезоксирибозном кольце, используется для лечения синдрома приобретенного иммунодефицита человека (СПИДа).

Тимидинфосфорилаза *E.coli* широко применяется в биотехнологии как катализатор для синтеза производных нуклеозидов. В высших организмах ТФ вовлечена в процессы ангиогенеза, в том числе в раковых клетках.

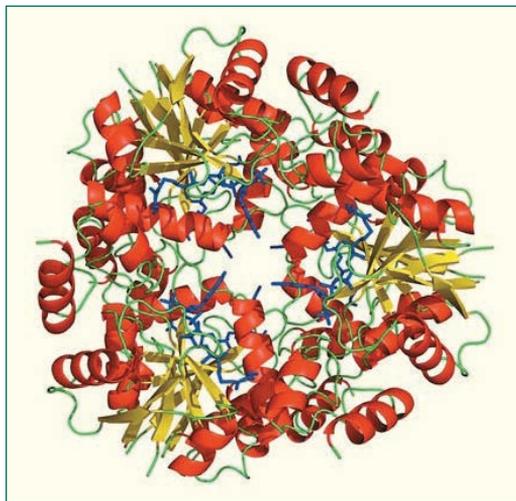


Рис. 10. Гексамерная молекула фосфопантетеин-аденилилтрансферазы *M.tuberculosis* со связанным лигандом — дефосфокоферментом А (показан синим цветом). В центре гексамера находится заполненный растворителем канал, внутри которого, на обращенной внутрь канала поверхности молекулы, расположены активные центры субъединиц

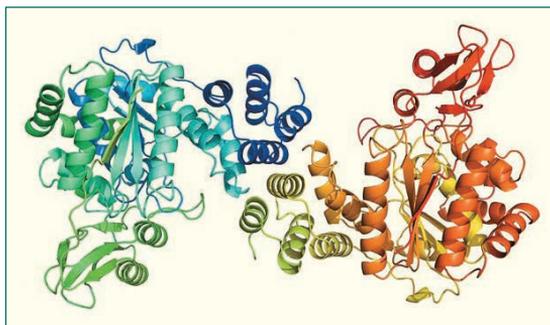


Рис. 11. Димерная молекула тимидинфосфорилазы *E.coli*. Домены в каждой субъединице окрашены в разные цвета

Стимулируя рост кровеносных сосудов, она способствует росту опухоли. В то же время тимидинфосфорилаза участвует в активации некоторых антираковых препаратов. Двойная роль тимидинфосфорилазы делает актуальным поиск как ингибиторов этого фермента, потенциальных антиопухолевых лекарств, так и соединений, регулирующих ее активность.

Мы показали, что такие терапевтически важные соединения, как азидотимидин и 3'-азидо-2'-фтор-2', 3'-дидезоксиуридин являются обратимыми ингибиторами тимидинфосфорилазы [15]. Благодаря выращенным в невесомости кристаллам структура ТФ установлена при более высоком ( $1.52 \text{ \AA}$ ), чем ранее ( $2.8 \text{ \AA}$ ), разрешении, а также впервые определены пространственные структуры комплексов ТФ с аналогами нуклеозидов, содержащими азидогруппу, в том числе с азидотимидином. Оказалось, что используемые в медицине в качестве лекарственных препаратов аналоги нуклеозидов, содержащие азидогруппу, не являются строго селективными и, наряду с белком-мишенью (для зидовудина это обратная транскриптаза), взаимодействуют и с другими ферментами нуклеозидного обмена. Полученные структурные результаты объясняют также, почему эти соединения, очень мало отличающиеся по строению от субстратов, не расщепляются ферментом. Оказалось, что, хотя они связаны в том же центре, что и субстрат, и пиримидиновые основания в них частично перекрываются с пиримидиновым основанием субстрата, в азидонуклеозидах пиримидиновые основания нуклеозидов повернуты по отношению к субстрату на  $180^\circ$  вокруг оси, соединяющей атомы N3 и C6 основания. Благодаря этому подлежащая расщеплению гликозидная связь в азидонуклеозидах оказывается удаленной от аминокислотных остатков активного центра, катализирующих реакцию фосфо-ролиза.

\* \* \*

Мы рассказали о наиболее распространенных методах, которые применяются (в том числе и в условиях невесомости) для выращивания кристаллов водорастворимых глобулярных белков, пригодных для структурного исследования; описали особенности строения белков, влияющие на их способность образовывать кристаллы, а также строение самих белковых кристаллов. Привели примеры пространственных структур некоторых важных для медицины и биотехнологии белков, которые исследуются с помощью выращенных в Институте кристаллографии кристаллов; показали, как результаты структурного анализа используются для изучения механизмов функционирования макромолекул.

В настоящее время число работ в области белковой кристаллографии постоянно растет. Это объясняется значительным вкладом этого направления в решение таких задач, как рациональный дизайн лекарств, изучение механизмов ферментативных реакций и работы биосистем, объяснение влияния мутаций, конструирование новых искусственных ферментов, надежная оценка динамики белков. Появляются новые методы кристаллизации белков, например, кристал-

лизация *in vivo* — непосредственно после экспрессии в клетке. В числе приоритетных задач остаются кристаллизация и исследование структур сложных белковых ансамблей, а также мембранных белков. Они составляют около 30% общего количества белков, но пространственные структуры известны только для 300. Это объясняется главным образом трудностями кристаллизации мембранных белков. Можно надеяться, что использование новейших источников рентгеновского излучения, например, рентгеновских лазеров на свободных электронах (XFEL), позволит в ближайшем будущем изучать сложные биологические структуры, используя для этой цели микрокристаллы или даже отдельные биомacroмолекулы.

## Литература

1. Ковальчук М.В., Попов В.О. Рентгеновское и синхротронное излучение — путь к познанию структуры биомacroмолекул // Наука в России. 2013. № 3. С. 4—12.
2. Ковальчук М.В. Кристаллография на рубеже веков: итоги и перспективы // Кристаллография. 1999. Т. 44. № 6. С. 967—975.
3. Куранова И.П. Рентгеноструктурные исследования биологических макромолекул в Институте кристаллографии РАН // Кристаллография. 2001. Т. 46. № 4. С. 667—686.
4. Kovalchuk M.V., Shilin Yu.N., Zeludeva S.I. et al. XRay instrumentation for SR beamlines // Nuclear Instr. and Methods in Physics Research. 2000. V. A448. P. 112—119.
5. Хейкер Д.М., Ковальчук М.В., Шилин Ю.Н. и др. Станция белковой кристаллографии на пучке СИ из поворотного накопителя «Сибирь-2» // Кристаллография. 2007. Т. 52. № 2. С. 374—380.
6. Тимофеев В.И., Абрамчик Ю.А., Фатеев И.В. и др. Пространственная структура тимидинфосфорилазы *E.coli* в комплексе с 3'-азидо-2'-фтор-2',3'-дидезоксиуридином // Кристаллография. 2013. Т. 58. № 6. С. 828—839.
7. Тимофеев В.И., Смирнова Е.А., Чупова Л.А. и др. Пространственная структура фосфопантетеин-аденилилтрансферазы из *Mycobacterium tuberculosis* в апоформе и в комплексах с коферментом А и с дефосфокоферментом А // Кристаллография. 2012. Т. 57. № 1. С. 26—34.
8. Тимофеев В.И., Кузнецов С.А., Акпаров В.Х. и др. Пространственная структура карбоксипептидазы Т из *Thermoactinomyces vulgaris* в комплексе с N-БОК-L-лейцином // Биохимия. 2013. Т. 78. № 3.
9. Куранова И.П. Выращивание кристаллов растворимых белков // Биохимия. 1990. Т. 55. Вып. 11. С. 1923—1940.
10. Куранова И.П. Кристаллизация белков на Земле и в невесомости // Поверхность. 2004. № 6. С. 4—12.
11. Смирнова Е.А., Кислицын Ю.А., Сосфенов Н.И. и др. Выращивание кристаллов белков на российском сегменте Международной космической станции // Кристаллография. 2009. Т. 54. № 5. С. 948—958.
12. Timofeev V.I., ChuprovNetochin R.N., Samygina V.R. et al. Xray investigation of geneengineered human insulin crystallized from a solution containing polysialic acid // Acta Cryst. 2010. V. F66. P. 259—263.
13. Шабалин И.Г., Серов А.Е., Скиргелло О.Е. и др. Рекомбинантная формиатдегидрогеназа

- Arabidopsis thaliana*. Получение, кристаллизация в условиях невесомости и предварительное рентгеновское исследование кристаллов // Кристаллография. 2010. Т. 55. № 5. С. 855—859.
14. *Tanaka H., Inaka K., Sugiyama Sh. et al.* A simplified counter diffusion method combined with a 1D simulation program for optimizing crystallization conditions // J. Synchrotron Rad. 2004. V. 11. P. 45—48.
15. *Куранова И.П., Смирнова Е.А., Абрамчик Ю.А. и др.* Выращивание кристаллов фосфопантетеин-аденилилтрансферазы, карбоксипептидазы Т и тимидинфосфорилазы на Международной космической станции методом встречной диффузии в капилляре // Кристаллография. 2011. Т. 56. № 5. С. 941—948.
16. *Kravchenko O.V., Kislitsin Yu.A., Popov A.N. et al.* Three-dimensional structures of Lasparaginase from *Erwinia carotovora* complexed with aspartate and glutamate // Acta Cryst. 2008. V. D64. P. 248—256.
17. *Timofeev V., Smirnova E., Chupova L. et al.* Xray study of the conformational changes in the molecule of phosphopantetheine adenylyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* during the catalyzed reaction // Acta cryst. 2012. V. D68. P. 1660—1670.