

ВОЗМОЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА УСТАНОВКЕ ИМПУЛЬСНОГО РЕАКТОРА

© 2023 г. А.В. Власов*, **, Ю.Л. Рижиков*, **, И.В. Манухов**, С.В. Баженов**,
С.А. Куракин*, ***, Т.Н. Муругова*, А.И. Иванов*, В.В. Ской*, А.В. Рогачев*,
Д.П. Вертелецкий****, А.Х. Исламов*, Н. Кучерка*, *****, В.И. Горделий*, А.И. Куклин*.*
*Объединенный институт ядерных исследований, ул. Жолио-Кюри, 6, Дубна Московской области, 141980, Россия
**Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Волоколамское шоссе, 11, Москва, 125080, Россия
***Институт физики Казанского федерального университета, Кремлёвская ул., 16а, Казань, 420111, Россия
****Mainchemproject South, LLC, Ереван 0051, Армения
*****Department of Physical Chemistry of Drugs, Comenius University in Bratislava,
Mlynská dolina, 832 32, Bratislava, Slovakia
#E-mail: kuklin@nf.jinr.ru
Поступила в редакцию 07.12.2022 г.
После доработки 20.12.2022 г.
Принята к публикации 21.12.2022 г.

Малоугловое рассеяние позволяет решать задачи структурной биологии без проведения специальной пробоподготовки, характерной для таких методов, как рентгеновская дифракция на белковых кристаллах или криоэлектронная микроскопия белков. В обзоре приведены примеры использования малоуглового рассеяния для решения биологических задач. Предложено внедрение в практику использования малоуглового рассеяния как способа контроля качества сборки белков и белковых комплексов, а также тестирования идентичности структурной организации биологических объектов в нативном состоянии в подготовленных пробах перед измерениями методами рентгеновской дифракции или криоэлектронной микроскопии. Показаны возможности спектрометра малоуглового нейтронного рассеяния ЮМО на импульсном реакторе ИБР-2 (Лаборатория нейтронной физики Объединенного института ядерных исследований, Дубна, Россия) для решения широкого спектра задач, в том числе в биофизике, структурной биологии и биотехнологии. Рассмотрены основные результаты исследований разнообразных биологических систем с использованием малоуглового рассеяния нейтронов на установке ЮМО. Показаны возможности развития методов структурной биологии с помощью малоуглового рассеяния, в том числе белковой кристаллизации.

Ключевые слова: малоугловое рассеяние, биофизика, структурная биология, мембранные белки.

DOI: 10.31857/S0006302923020096, EDN: CAVHTJ

Несмотря на длинную, более чем полувековую историю исследований нанообъектов, метод малоуглового рассеяния (МУР) считается некоторой экзотикой для целого ряда специалистов, сконцентрированных на решении биологических задач. Частично информацию об исследовании разных биологических образцов на малоугловом спектрометре в Дубне можно найти в работе [1].

Там же есть более подробное изложение некоторых особенностей спектрометра, позволивших

получать кривые рассеяния в широком диапазоне значений модулей векторов длин рассеяния. Есть и некоторый исторический экскурс. Приведено сравнение методов рассеяния, используемых при изучении структурных параметров, включая микроскопию. Актуальным также остается и обзор [2].

Существует фактор, усложняющий расшифровку надмолекулярной структуры методом МУР, — это полидисперсность. С одной стороны, полидисперсным является почти все, что производится в нанометровом диапазоне, и как только станут получаться монодисперсные объекты, можно будет говорить о новом промышленном скачке, а с другой стороны, в нативном виде биологические объекты (белки, комплексы) характеризуются монодисперсностью, но даже в слабо-

Сокращения: МУР — малоугловое рассеяние, МУРН — малоугловое рассеяние нейтронов, МУРР — малоугловое рентгеновское рассеяние, ДМФХ — 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, ДПФХ — 1,2-дипальмитоилфосфатидилхолин, ПОФХ — 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин, ДОФХ — 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин.

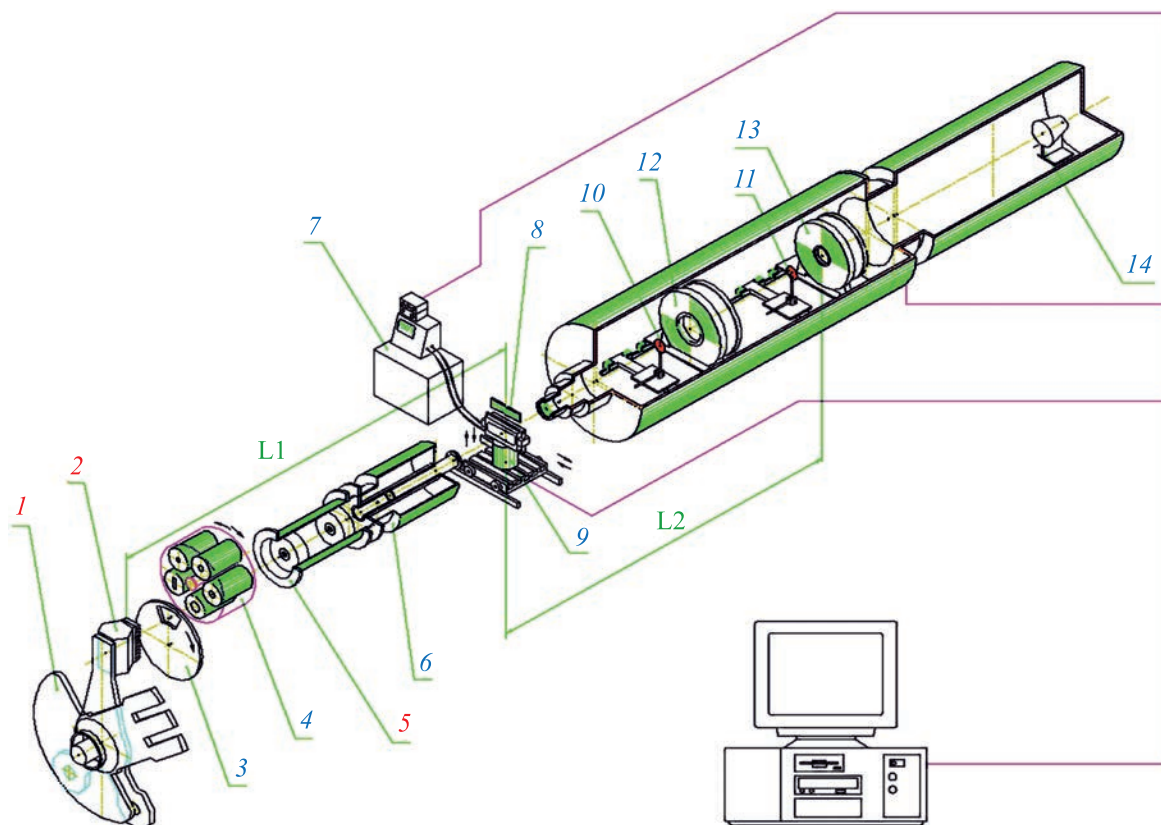


Рис. 1. Принципиальная схема спектрометра ЮМО: 1 – два рефлектора, 2 – зона реактора с замедлителем, 3 – прерыватель, 4 – первый коллиматор, 5 – вакуумная труба, 6 – второй коллиматор, 7 – термостат, 8 – стол образцов, 9 – гониометр, 10 и 11 – ванадиевые стандарты, 12 и 13 – детекторы, 14 – детектор прямого пучка.

концентрированном виде образуются димеры и олигомеры белков. Это ограничивает возможности получать структуры с низким разрешением. Применяя технику сгона на нулевую концентрацию, частично можно избежать влияния этого фактора [3].

Особенностью нейтронов в МУР является определенная «мягкость», что для биологии исключительно важно. На синхротронных источниках потоки столь велики, что приходится их ослаблять с помощью фильтров, чтобы не потерять образец. И хотя мы говорим о высоких потоках импульсного реактора [4] – потоки на порядки ниже, чем на синхротронах и даже на рентгеновских установках [5, 6]. Но импульсный характер работы реактора дает поток с пиковым значением, в 2000 раз превышающим среднее, что позволяет измерять даже слабо рассеивающие белки с концентрацией до процента в тяжеловодном растворе. Существенное различие длин рассеяния нейтронов на водороде и дейтерии позволяет проводить вариацию контраста и определять плотности отдельных частей макромолекулы.

Данный обзор посвящен исследованию биологических объектов методом малоуглового рассеяния нейтронов на примере установки импульсного реактора ИБР-2 (рис. 1) в Объединенном институте ядерных исследований (Дубна Московской области). Отличительными чертами четвертого канала реактора ИБР-2, на котором расположен спектрометр ЮМО, является отсутствие нейтронвода и достаточно большой (около 5 м, включая расстояние под шибером) участок пролета нейтронов в воздухе (в кольцевом коридоре). При этом угол между перпендикулярным направлением к замедлителю и осью канала составляет примерно 18 градусов. Общая длина спектрометра составляет более 40 м.

Основой установки являются детекторы с центральным отверстием и ванадиевым стандартом перед каждым детектором и детектор прямого пучка. Пучок тепловых нейтронов формируется коллиматорной системой (рис. 1, 4, 6), так что попадающие на образец нейтроны имеют максимальное сечение 22 мм (обычно 14 мм) и интенсивность потока на образце до $3 \cdot 10^7$ нейтронов/с [7].

Компьютерно контролируемый первый коллиматор (рис. 1, 4) совместно с юстируемым коллиматором (рис. 1, 6) составляют основу системы формирования пучка нейтронов. На столе образцов размещается платформа с горизонтально перемещаемым перпендикулярно пучку термостатируемым боксом. Стол имеет возможность перемещаться в горизонтальном и вертикальном направлениях. Образцы, как правило, помещаются в алюминиевый бокс (внутри которого расположены каналы для протока жидкости), подогреваемый и охлаждаемый с помощью компьютерно-управляемого термостата с рабочим диапазоном температур от -10°C до 180°C . Одновременно в бокс может помещаться до 25 кювет. Стол образцов находится на воздухе, что позволяет легко монтировать различные оснастки, например: источник света, камеру высокого давления и сам температурный бокс.

Фокусом и основой установки является двухдетекторная система [8, 9]. В свою очередь, ключевым звеном здесь были разработанные еще в конце семидесятых годов и модернизированные кольцевые детекторы тепловых нейтронов [10, 11] и вновь запускаемый позиционно-чувствительный детектор специфической конструкции.

Принцип действия многодетекторной системы состоит в следующем. Часть рассеянных на образце нейтронов регистрируется ближайшим к образцу детектором, другая часть проходит через центральное отверстие этого детектора и регистрируется следующим детектором. Прошедшая через центральное отверстие второго детектора и незарегистрированная часть нейтронов попадает на третий детектор, и так далее. Перекрытие спектров от двух детекторов обеспечивается время-пролетной методикой. На момент написания статьи установка работает с двумя детекторами для регистрации рассеянных нейтронов и одним детектором прямого пучка.

Таким образом, основными специфическими характеристиками спектрометра являются: двухдетекторная система сбора экспериментальных данных, прямая видимость замедлителя с позиции образца, ванадиевые стандарты для получения кривых малоуглового рассеяния в абсолютных значениях сечений, измерение пропускания, и, соответственно, полного нейтронного сечения образца [12, 13].

Разумеется, это далеко не полный список проведенных измерений, однако мы даем довольно широкий спектр исследований, проведенный на спектрометре. В этой работе мы приводим примеры исследований в области структурной биологии, белков и белковых комплексов, липидных систем, а также предлагаем внедрение в практику применение метода МУР при получении белко-

вых структур высокого разрешения комплементарно с методами рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии и функциональными тестами.

Также в нашем обзоре мы рассматриваем исследования биомембран, которые являются ключевыми объектами в биологии и имеют большое значение для медицины. Тонкие (несколько нанометров) квазидвумерные жидкокристаллические мембраны с жесткостью на изгиб в несколько кТ демонстрируют необычные свойства, а их исследования проходят на стыке теоретической и экспериментальной физики. Например, плавление цепей липидных мембран (фазовый переход первого рода) наблюдается как квазикритическое поведение физико-химических свойств мембран и может быть исследовано с помощью метода МУР.

ПРИМЕНЕНИЕ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ НЕЙТРОНОВ ДЛЯ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ

Современные задачи структурной биологии имеют высокие требования как к инструментам, необходимым для получения белковых структур высокого разрешения, так и к пробоподготовке образцов для измерений. Так, например, при проведении современной белковой кристаллографии с использованием лазеров на свободных электронах (XFEL — X-ray Free Electron Laser) требуется наличие большого количества белковых кристаллов ($N \sim 10^3 - 10^4$) размером ~ 10 мкм каждый. Все эти кристаллы должны находиться в одной кристаллизационной пробе, состоящей из мембранно-имитирующей среды, образующей липидные мезофазы. При использовании криоэлектронной микроскопии требуется тщательная подготовка сеток, подбор условий нанесения белков на сетки и т. д.

Многopараметрический подбор оптимальных условий для подобного рода подготовки образцов как правило занимает от нескольких месяцев до нескольких лет и является «бутылочным горлышком» для многих задач структурной биологии по получению белковых структур высокого разрешения. Поэтому для некоторых биологических задач крайне эффективным является использование метода малоуглового рассеяния рентгеновских лучей или нейтронов.

Метод малоуглового рассеяния используется для получения структурных данных белковых молекул, липидных и липидно-белковых систем, и т. д. Метод также позволяет охарактеризовать липидные мезофазы, классифицировать их тип симметрии и найти параметры решетки. Хотя использование метода МУР не предполагает получение структур высокого разрешения, он часто

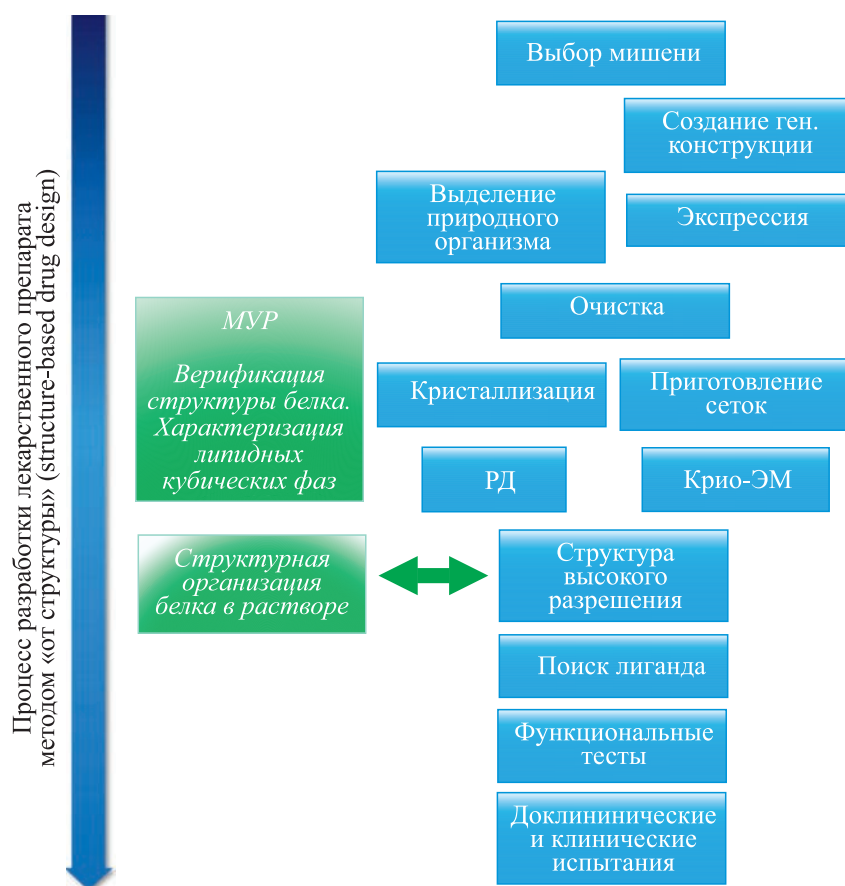


Рис. 2. Процесс разработки лекарственных препаратов методом «от структуры» (structure-based drug design). Курсивом отмечены элементы, которые предлагается использовать в процессе разработки лекарственных препаратов: исследования методом МУР и анализ данных, сравнение структурной организации белка в растворе со структурой высокого разрешения, а также анализ олигомерного состояния белка.

используется комплементарно с другими методами структурной биологии, поскольку служит доказательством идентичности структурной организации исследуемого биологического объекта в нативных условиях и в условиях пробоподготовки для методов рентгеновской кристаллографии (кристалл белка) или криоэлектронной микроскопии (белок, нанесенный на сетку). Очевидно, что условия, когда белок находится в кристаллической решетке или нанесен на сетку для исследований методом криоэлектронной микроскопии, существенно отличаются от нативных и могут сильно влиять на структуру белка или белкового комплекса.

Данная проблема соответствия не решена до сих пор и является ограничением методов структурной биологии. При получении белковых структур высокого разрешения для подтверждения соответствия полученной структуры и исследуемого объекта используются функциональные тесты. Однако такой подход может оказаться не-

состоятельным в случаях, когда конформация белка или белкового комплекса слишком чувствительна к внешним условиям. В таком случае функциональные тесты могут подтвердить функциональность белка, однако, его структурная организация будет отличаться от полученной методами рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии.

Таким образом, сильным доказательством идентичности структур биологических объектов может служить метод МУР, который позволяет получить структурные данные исследуемых образцов (например, белков в растворе) и не требует создания специфических условий при пробоподготовке (рис. 2). В нашем обзоре мы демонстрируем широкий спектр биологических задач, решаемых с помощью МУР как самостоятельно, так и комплементарно с другими методами структурной биологии.

КОНТРОЛЬ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БЕЛКОВ И БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В БИОТЕХНОЛОГИИ

Метод МУР пока недооценен как метод рутинного анализа и контроля качества структурной организации при биотехнологических производствах ферментов и белковых комплексов. Несмотря на уникальность и высокую стоимость установки для проведения исследований методов МУР, в России есть возможность ее применения в режиме потоковых исследований большого количества образцов. Помимо нейтронного рассеяния метод МУР может быть реализован с источниками рентгеновского излучения, такие установки имеют меньшие габариты и стоимость, что позволит в перспективе развивать данный метод для рутинного применения на производствах в отделах разработок и контроля качества. На сегодняшний день есть опыт применения методов МУР для следующих объектов в биотехнологии:

— Липаза — фермент, катализирующий расщепление липидов. В работе [14] методом малоуглового рассеяния нейтронов (МУРН) исследовано взаимодействие липазы с липидными мицеллами, которые активируют фермент. Также методом МУР проведены исследования модифицированной липазы [15], в этой работе было показано образование ламеллярной структуры липазы, модифицированной стеариновой кислотой, в *n*-гексане и в водном буфере, и была доказана перспективность такой модификации для биотехнологии.

— Фитаза — фермент, гидролизующий фитиновую кислоту. В работе [16] методом МУР исследовано влияние гликозилирования на межбелковые взаимодействия фитазы. Показано, что гликаны стабилизируют раствор развернутых форм ферментов и предотвращают их агрегацию.

— Ксиланаза — еще один важнейший фермент в биотехнологии, расщепляющий полисахариды ксиланы. В работе [17] МУР применяли для исследования термостабильности фермента, так как для данного фермента термостабильность является одним из важнейших параметров при применении в промышленности [18].

— Амилаза — фермент, расщепляющий крахмал. Методом МУР были получены структурные данные [19], свидетельствующие об образовании ферментом тетрамера, а также был исследован процесс его сборки.

— Лизоцим — важнейший антибактериальный фермент, гидролизующий пептидогликаны [20]. МУР активно применялось для исследования множества параметров данного белка [21–23].

— Шапероны — белки, обеспечивающие корректный фолдинг других белков в процессе синтеза и после поддерживающие их нативную форму за счет рефолдинга [24]. В отличие от апофер-

ритина, самопроизвольно сворачивающегося в правильную конформацию и образующего 24-мерный комплекс в широком диапазоне значений внешних условий [25], многие целевые белки склонны к мисфолдингу и агрегации. Важной биотехнологической задачей при создании штамма-продуцента является подбор реципиента с подходящим набором шаперонно-протеазного комплекса, для экспрессии целевого белка в нативной форме в гетерологичных условиях [26–28]. МУР может применяться не только для проверки качества сборки белков и белковых комплексов в присутствии различных шаперонов в клетке-продуценте, но и в комбинации с другими биотехнологическими, прежде всего биосенсорными, методами [29, 30] для изучения молекулярных механизмов работы самих шаперонов [31].

Также биотехнологические разработки новых рекомбинантных вакцин на основе белка апоферритина и других белков-адъювантов могут сопровождаться применением метода МУР для контроля структурной организации и сборки белковых комплексов. В работе [32] проведены измерения апоферритина методом малоуглового рассеяния. Апоферритин использовали как модельный объект с известным форм-фактором. В работе [33] апоферритин исследован комплементарными методами малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния. В работе [34] показана зависимость димеризации белкового комплекса апоферритина от pH методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), а в работе [35] разработан подход высокоэффективного контроля самосборки химерных рекомбинантных белковых комплексов, использующихся в том числе и для разработки вакцин против SARS-CoV-2. Интересными для биотехнологии являются исследования методом МУР ферригидритных частиц, произведенных микроорганизмами [36, 37], доставки лекарств в липосомах [38], структурные исследования гликозилированных белков [39] или капсидов вирусов [40].

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕТА-АМИЛОИДОВ МЕТОДОМ МУР

Бета-амилоиды представляют собой кластеры из A β -пептидов, которые играют важную роль в развитии болезни Альцгеймера [41]. Исследования методом МУР могут помочь определить структурную организацию кластеров, улучшить понимание процессов их образования и разработать методы терапии, предотвращающие их появление.

Так, например, в работе [42] авторы с помощью МУР показывают структурную организацию A β -пептидов и идентифицируют ключевые стадии формирования амилоидные бляшки, а в работе [43] показывают влияние триазиавина на

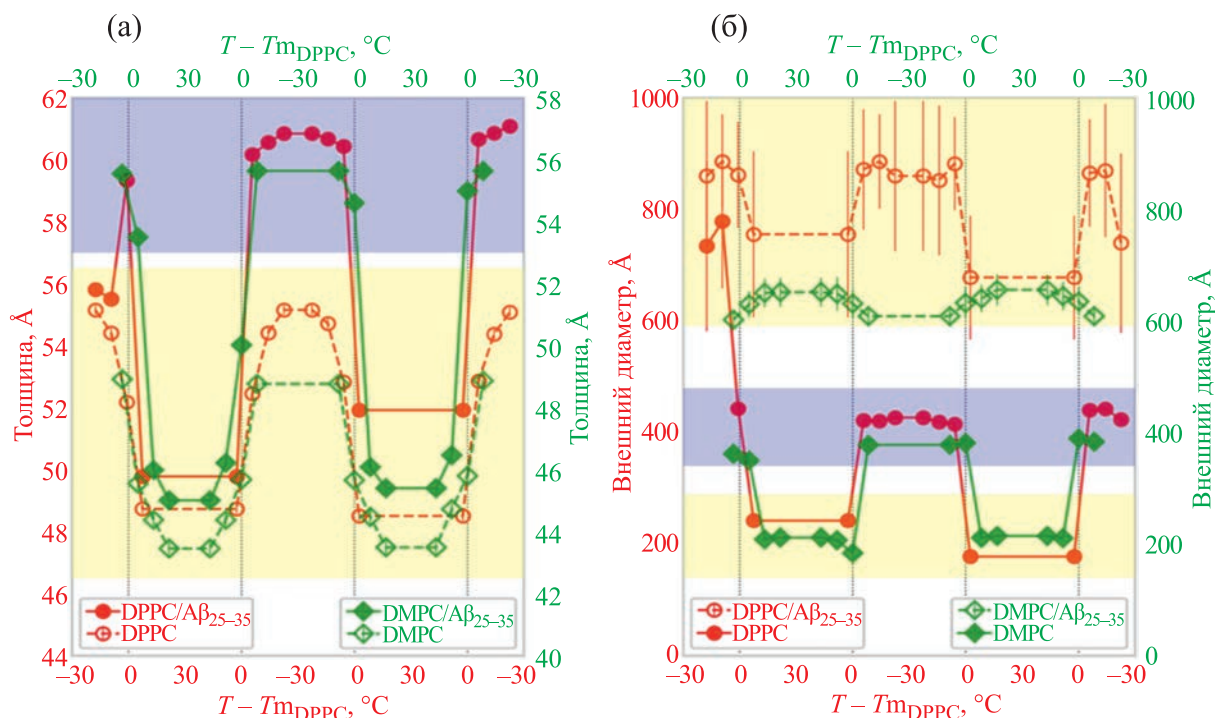


Рис. 3. Изменение толщины модельной мембраны (а) и размеров агрегатов (б) в зависимости от сдвига температуры относительно главного фазового перехода для ДМФХ (ромбы) и ДПФХ (кружки). На графике чистые системы представлены полными фигурами, со встроенным пептидом — заполненными.

диссоциацию кластеров амилоидогенных пептидов. Метод малоуглового рассеяния нейтронов используется комплементарно с методом электронной микроскопии.

Для понимания амилоидогенеза также необходимо исследовать процессы взаимодействия Аβ-пептидов с биологическими мембранами. В работе [44] авторы исследуют такие взаимодействия методом МУР и обнаруживают влияние ионов, гидратации и холестерина на структурную организацию модельных мембран. Также важно влияние температуры на структурную организацию мембран и Аβ-пептидов [45], что показано методом малоуглового рассеяния нейтронов для систем ДПФХ/Аβ₂₅₋₃₅ и ДМФХ/Аβ₂₅₋₃₅. Межбелковое взаимодействие амилоидогенных пептидов и их конформационные изменения исследуются в работе [46], модельная система для транспорта противовирусных препаратов исследована в работе [47].

Использование метода малоуглового рассеяния нейтронов позволило продемонстрировать морфологические изменения в модельных липидных мембранах, вызванные встраиванием амилоид-бета пептида. Показано, что данные изменения связаны непосредственно с фазовым состоянием системы. Изменения, связанные с встраиванием амилоид-бета пептида оказывают влияние как на структуру агрегатов, так и внут-

реннюю структуру мембраны в целом и на ее толщину в частности.

На рис. 3 представлены изменения толщины мембраны и размера агрегата для систем сформированных из липидов димиристоилфосфатидилхолина (ДМФХ) и дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Данные липиды отличаются так называемой температурой главного фазового перехода. Данные изменения толщины мембраны и размеров агрегатов представлены в зависимости от температурного сдвига температуры относительно температуры главного фазового перехода. Эти зависимости свидетельствуют об унифицированном характере взаимодействия пептида с мембраной.

Указанные выше морфологические изменения были подтверждены методом просвечивающей электронной микроскопии [48].

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ МУР

Отличным образом методы малоуглового нейтронного рассеяния можно применить к структурным исследованиям различных белковых комплексов от бактериальных до эукариотических.

В работе [49] с помощью малоуглового нейтронного рассеяния на спектрометре ЮМО (им-

пульсный реактор ИБР-2, ОИЯИ, Дубна Московской области) была изучена структура сенсора двухкомпонентной системы — полноразмерного фоторецепторного комплекса сенсорного родопсина с его родственным трансдюсером из экстремофильной археи *N. pharaonis*. Гомодимеры хеморецепторов (или комплексов «родопсин—трансдюсер») в клеточной мембране образуют тримеры, составляющие функциональные единицы. Тримеры димеров (гексамеры, образованные тремя димерами) образуют структурно-функциональную единицу при образовании сигнальных двумерных массивов — компактных мембранных суперкомплексов, отвечающих за усиление входящего сигнала. В упомянутой работе [49] представлена молекулярная модель гексамера (тримера димеров), построенная с помощью комбинации методов малоуглового рассеяния и молекулярного моделирования. Таким образом, показано, что контакт между димерами *NpSRII/NpNtrII* в гексамере опосредован только цитоплазматическими частями, трансмембранные части димеров при этом не контактируют друг с другом, то есть имеет место «tripod»-образная модель, отличная от предложенных ранее в литературе «О»- и «Y»-образных моделей.

Еще один важный белковый комплекс для исследований в том числе и методом малоуглового рассеяния — АТФ-синтаза [50]. В работе [51] получена структура высокого разрешения (2.3 Å) с-ринга АТФ-синтазы из хлоропластов *Spinacia oleracea*, показано наличие дополнительных электронных плотностей внутри с-ринга, не ассоциированных с белком. Также найдены дополнительные плотности в структурах с-рингов из других организмов (от архей до эукариот). Выдвинута гипотеза о возможном наличии изопреноидных хинонов внутри с-рингов различных организмов и найдены ее косвенные экспериментальные подтверждения. В работе [52] продемонстрированы структуры низкого разрешения V-образных димеров АТФ-синтазы из хлоропластов *Spinacia oleracea*, полученные методом малоуглового рассеяния. Таким образом, показана возможность образования димеров АТФ-синтазы из хлоропластов, проведена реконституция АТФ-синтазы в нанодиски, проведены измерения с использованием метода малоуглового рассеяния и обработка данных.

Также исследования методом малоуглового рассеяния применяются для различных белков и белковых комплексов. Так, например, для пигмент-белкового комплекса фикоцианина показана структура тримера методом малоуглового рассеяния [53]. В работе [54] получена структура низкого разрешения модульных нанотранспортеров (рекомбинантных химерных белков, используемых для доставки противораковых препаратов напрямую в опухоли) методом малоуглового

рентгеновского рассеяния. В работе [55] методом малоуглового рассеяния исследовано замедление фотоцикла мембранного белка бактериородопсина при добавлении 100 мМ гуанидин-гидрохлорида. Показана фиксация промежуточного М-состояния белка. Исследование различных состояний фотоциклов протонных помп может быть полезно для различного рода приложений, например, для ориентирования бактериородопсина в пурпурных мембранах и разработан прототип фотоконденсатора на основе бактериородопсина [56].

Перспективным представляется использование МУР для исследования взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами. В работе [57] рассматривались стратегии контрастной вариации в МУРР, которые позволяют целенаправленно изучать структуры ДНК или связанных с ней партнеров. Описаны возможности структурных исследований РНК-белковых комплексов методами гидродинамики, МУР и вычислительными методами [58]. Данное направление важно прежде всего для изучения регуляторных белков. Например, белки LuxR-семейства являются регуляторами транскрипции и образуют комплекс с ДНК, активируя и репрессируя различные промоторы [59], причем эффективность образования комплексов может зависеть как от последовательности ДНК, так и от взаимодействия с лигандами [60]. Получение структур белков этого семейства значительно затруднено в силу их низкой растворимости и нестабильности [61], а такие вопросы, как «образуется ли димер до посадки на ДНК или он формируется непосредственно в комплексе с ДНК», все еще не закрыты [62], а в некоторых работах даже встречаются чрезмерно уверенные утверждения по этому поводу, не подтвержденные экспериментальными данными [63].

ИССЛЕДОВАНИЕ ДВУХКОМПОНЕНТНЫХ СИСТЕМ МЕТОДОМ МУР

Двухкомпонентные системы отвечают за коммуникацию микроорганизмов с окружающей средой; они присутствуют почти во всех доменах и являются наиболее распространенными сигнальными системами в живой природе [49, 64]. Рецепторы этих систем, как правило, являются трансмембранными белками. Несмотря на широкий интерес научного сообщества к изучению двухкомпонентных систем, в настоящее время были описаны в литературе структуры с высоким разрешением только фрагментов этих белков. Трудности изучения структуры полноразмерных рецепторов двухкомпонентных систем связаны с большим размером и высокой динамичностью их водорастворимой части.

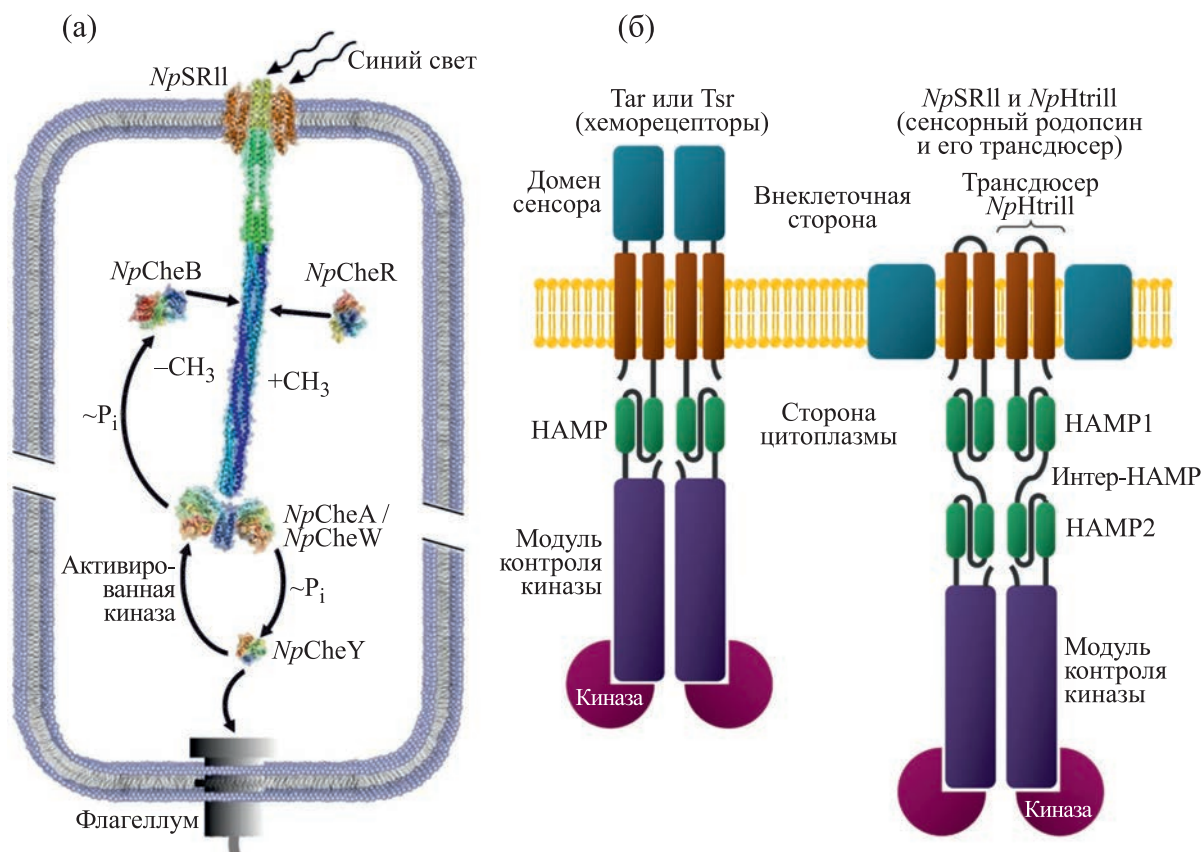


Рис. 4. (а) — Схема сигнального каскада в случае двухкомпонентной системы отрицательного фототаксиса *Natronomonas pharaonis*; (б) — схема доменной архитектуры димера хеморецепторов (Tar и Tsr в комплексе с киназами) из *E. coli* (слева) и димера фотосенсорного комплекса сенсорного родопсина II с его родственником трансдюсером NpHtrII из *N. pharaonis* (справа) [49].

С помощью малоуглового нейтронного рассеяния на спектрометре ЮМО была получена структура сенсора двухкомпонентной системы — полноразмерного фоторецепторного комплекса сенсорного родопсина с его родственником трансдюсером из экстремофильной археи *Natronomonas pharaonis*. Активированный при воздействии света сенсорный родопсин II (NpSRII) индуцирует структурные и/или динамические изменения в трансдюсере (NpHtrII), которые преобразуются двумя HAMP-доменами и передаются вдоль цитоплазматического киназного модуля длиной 200 Å до крайней области цитоплазматической части NpHtrII. Активированная трансдюсером гистидинкиназа CheA (связанная с адаптерным белком CheW) подвергается автофосфорилированию и дополнительно переносит фосфатную группу в регуляторы ответа CheY или CheB. CheY влияет на смещение вращения жгутика, в то время как метилэстераза CheB наряду с метилтрансферазой CheR контролирует механизм адаптации.

Общая схема молекулярного механизма передачи сигнала предполагает последовательные ди-

намические изменения в цитоплазматических доменах (рис. 4). Как хеморецепторы, так и трансдюсеры сенсорных родопсинов демонстрируют различную динамику в соседних модулях, что коррелирует с передачей сигнала вдоль цитоплазматического «стержня». Гомодимеры хеморецепторов (или комплексов «родопсин–трансдюсер») в клеточной мембране образуют тримеры, составляющие функциональные единицы. Тримеры димеров образуют структурно-функциональную единицу при образовании сигнальных двумерных массивов — компактных мембранных супер-комплексов, отвечающих за усиление входящего сигнала.

Представлена молекулярная модель гексамера (тримера димеров) построенная с помощью комбинации методов малоуглового рассеяния и молекулярного моделирования (рис. 5). Таким образом, показано, что контакт между димерами NpSRII/NpHtrII в гексамере опосредован только цитоплазматическими частями, трансмембранные части димеров при этом не контактируют друг с другом, то есть имеет место «tripod»-образ-

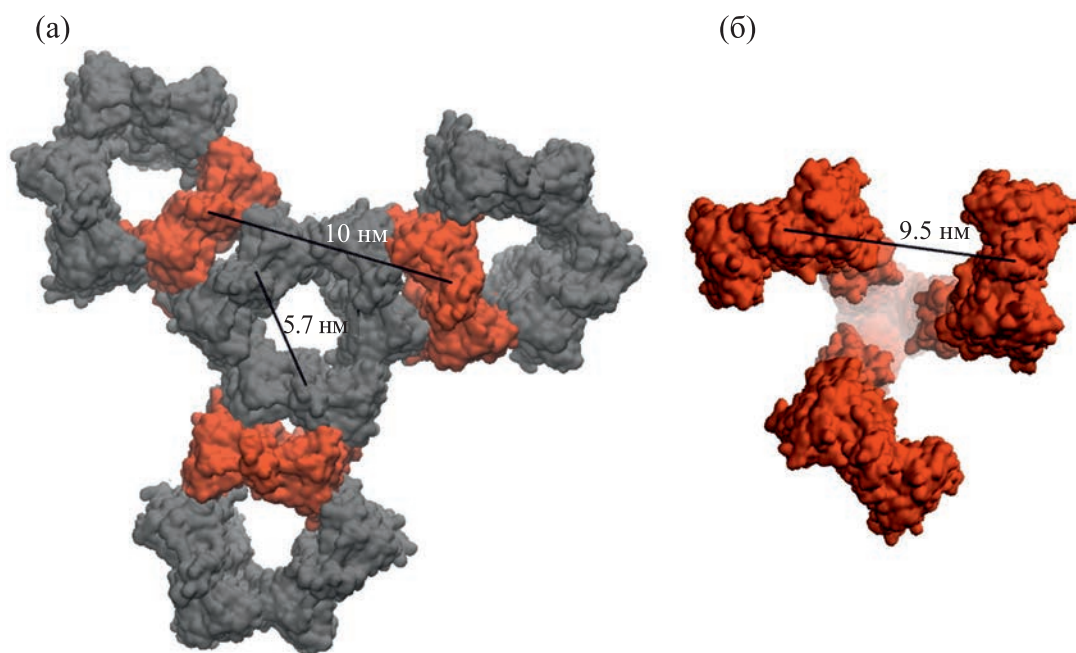


Рис. 5. Изображения трансмембранных доменов комплекса NpSRII/NpHtrII: (а) — фрагмент гексагональной упаковки «О»-образных тримеров димеров; (б) — изображение «tripod»-образного тримера димеров [49].

ная модель, отличная от предложенных ранее в литературе «О»- и «У»-образных моделей.

Эти результаты в полном объеме изложены в работах [49, 64]. В работе [64] на примере комплекса *NpSRII/NpHtrII* были проанализированы неоднозначности в интерпретации данных малоуглового рассеяния от мембранных белков. Среди существенных факторов, требующих внимания при обработке данных малоуглового рассеяния от мембранных белков выделены такие аспекты, как вклад мембрано-имитирующей среды в профиль малоугловой кривой и полидисперсности по олигомерному состоянию. В работе рассмотрены способы для их преодоления этих неоднозначностей. В работах [49, 64–66] проведены эксперименты по созданию генно-инженерных конструкций, экспрессии и очистке белкового комплекса *NpSRII/NpHtrII*, проведены измерения с использованием методов малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния, обработка и интерпретация данных. В работе [67] также проведены структурные исследования двухкомпонентных сигнальных систем с помощью нейтронного рассеяния. В работе [68] проведена обработка и интерпретация данных малоуглового рассеяния, полученных для сенсорной гистидинкиназы NarQ, выполняющей функцию нитрит-нитратного сенсора *E. coli*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДНЫХ СИСТЕМ ПРИ ВЫСОКОМ ДАВЛЕНИИ МЕТОДОМ МУРН

Фазовое состояние липидных систем зависит не только от температуры, но и от приложенного к системе гидростатического давления, особенно в области высоких давлений (более 1 кбар), при этом фазовые переходы при таких условиях могут быть успешно охарактеризованы методом МУРН [69, 70].

Для установки ЮМО в Лаборатории нейтронной физики ОИЯИ была разработана и создана камера для измерений при высоком давлении биологических объектов в растворе методом МУРН [71]. При структурных исследованиях биологических объектов при высоком давлении метод МУРН имеет существенное преимущество перед аналогичным методом МУРР, поскольку широкий ряд материалов — титан, титан-циркониевые сплавы, алюминий, кварц, сапфир — обладают сравнительно низким сечением поглощения и рассеяния тепловых нейтронов, что предоставляет возможность создания прочных и прозрачных для тепловых нейтронов систем окружения образца.

В последнее время проведены успешные исследования фазовых переходов модельных липидных систем с помощью Р-V-T- и МУРН-методов. Так, например, липид ДПФХ в легкой и тяжелой воде был исследован при помощи МУРН при высоких давлениях (от 10 до 400 бар). Показа-

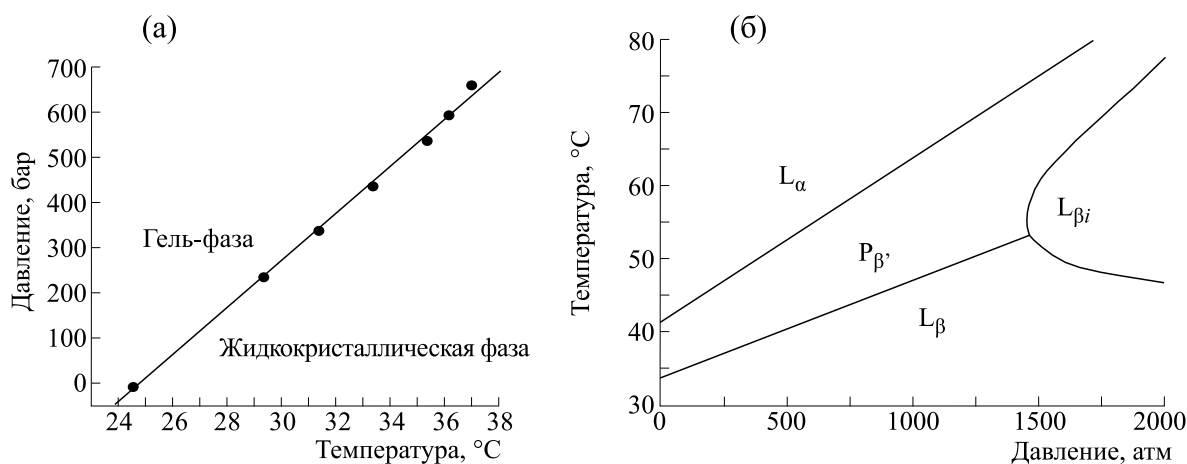


Рис. 6. Фазовые диаграммы ДПФХ: (а) — в диапазоне давлений от 1 до 800 бар и диапазоне температур от 30 до 80°C [73], (б) — в диапазоне давлений 0–2000 атм. и диапазоне температур от 30 до 80°C [74].

но увеличение площади, приходящейся на одну липидную головку, на $6 \text{ \AA}^2$ при фазовом переходе из «рипл-фазы» в жидкокристаллическую фазу [72]. Также многослойные везикулы, образованные липидом ДПФХ, исследовали в более широком диапазоне давлений (от 1 до 800 бар) и температур (20–40°C) в работе [73]. Показано характерное смещение дифракционного пика, соответствующего периоду повторяемости (толщине липидного бислоя и водной прослойки между бислоями), полученного методом МУРР при 20 и 40°C, а также построена фазовая диаграмма в области от 0 до 700 бар и от 23 до 38°C (рис. 6а). По результатам аналогичных исследований в работе [74] показана фазовая диаграмма в диапазоне 0–2000 атм. от 30 до 80°C для четырех фазовых состояния ДПФХ в водном растворе (рис. 6б).

Подробно исследования липидных систем 1,2-дипальмитоилфосфатидилхолин/1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ/ПОФХ) при различных температурах и давлениях описано в работе [75]. Дополнительным инструментом при исследовании биологических объектов методом МУР является метод денсиметрии [76]. Изменение параметров липидных везикул вблизи температуры фазового перехода рассмотрено в работе [77].

КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ БЕЛКОВ

Метод МУР может быть эффективно использован для характеристики липидных мезофаз, используемых при кристаллизации мембранных белков. Так, например, показано успешное применение МУР при исследовании кристаллизации бактериородопсина, определен тип симметрии $Pn3m$ липидной кубической фазы в течение всего времени кристаллообразования [78]. Показана

возможность кристаллизации мембранных белков в новых синтезированных матрикс-образующих липидах [79], а также в бицеллах [80] и в нанодисках [81]. Липидные кубические фазы были охарактеризованы методом малоуглового рассеяния, проведена кристаллизация бактериородопсина в липидных кубических фазах из новых матрикс-образующих липидов и получен новый тип кристаллической упаковки бактериородопсина.

В ряде работ показана возможность высокоэффективной характеристики липидных кубических фаз методом малоуглового рассеяния нейтронов, проведены эксперименты в различных условиях, которые позволяют исследовать проблему увеличения диаметров водных каналов в липидных кубических фазах — основную проблему при кристаллизации больших мембранных белковых комплексов методом *in meso* [82–84].

Комплементарно методу МУР может быть использована рамановская спектроскопия белковых кристаллов [85], которая имеет множество применений, начиная от изучения биологических систем и заканчивая медицинскими приложениями. Работа [85] основана на публикации [86] по детектированию субмикронных кристаллов мембранных белков методом когерентного анти-стоксового рамановского рассеяния.

Одним из расширений возможностей белковой кристаллизации является подход, описанный в работе [81], где показана возможность кристаллизации мембранных белков, встроенных в нанодиски, в липидных мезофазах. Еще одним вариантом является кристаллизация мембранных белков из амфигольного окружения [87].

Таким образом, метод МУР активно используется для улучшения методов кристаллизации мембранных белков в липидных мезофазах; для характеристики липидных кубических фаз и

определения параметров решеток различных матрикс-образующих липидов в различных условиях; для исследования мембранных белков, встроенных в нанодиски или амфиполи для доказательства идентичности структурной организации биологических объектов в растворе и в кристаллической решетке.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМ МЕТОДОМ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ

Исследования мембранных систем методом МУР позволяют решать широкий спектр задач. Успешно исследуются липидные и липид-белковые системы. Интересны исследования фоточувствительных мембранных белков родопсинов, которые представляют огромный интерес как с точки зрения фундаментальной биологии и прикладных медицинских применений (например, начиная с оптогенетики [88–93] и заканчивая биоэнергетикой [94]).

Например, исследование структурной организации [95] и супрамолекулярной организации [96] зрительного пигмента родопсина в фоторецепторной модельной мембране методом малоуглового рассеяния нейтронов с вариацией контраста показало наличие во фрагментах «палочек» слоистой структуры с размерами, соответствующими поперечному размеру «дисков». Было показано что родопсин равномерно распределен в мембране, так же, как и в случае с образцами «дисков» выделенных из фрагментов «палочек». Зрительный пигмент родопсин является типичным представителем огромного семейства рецепторов, сопряженных с G-белками. Эти рецепторы в мембране функционируют в димерном или олигомерном состоянии. Однако для родопсина и всего класса A родопсин-подобных рецепторов, сопряженных с G-белками, функциональная роль димерного состояния до сих пор не установлена [95].

Для понимания фундаментальных процессов липид-белкового взаимодействия важны исследования модельных мембран [97]. Например, широко применяются эксперименты методом МУР для определения толщины мембраны и ее изменения при различных условиях (рН, температура, ионная сила, добавки). Толщину мембраны можно легко измерить методом МУР. Например, влияние *n*-декана на толщину липидного бислоя 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина (ДОФХ) было измерено методом МУР и составило около 2.4 Å [98, 99] (рис. 7), влияние N,N-диметил-N-алкил амин-N-оксидов на бислои ДОФХ также было измерено методом МУР [100].

Методом МУР было исследовано влияние на модельные липидные мембраны различных веществ: ионов [101], антибиотиков [102], холесте-

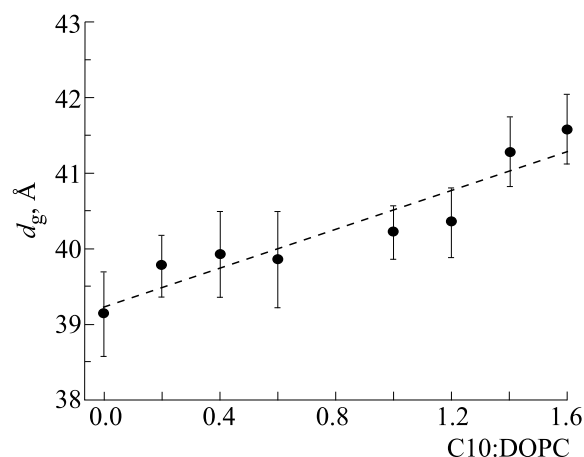


Рис. 7. Влияние *n*-декана на толщину мембраны, сформированной из ДОФХ [98].

рола или мелатонина [103, 104], фруктанов (полимеров фруктозы) [105]; также были исследованы пространственные структуры белков, встроенных в липосомы, например, димерного трансмембранного домена рецептора фактора роста [106].

Существует интересное направление исследований методом МУР фазовых переходов в липидных системах. Так, например, показано необычное поведение параметра расстояния между липидными бислоями в окрестности главного фазового перехода и подчеркнута важность критических флуктуаций [107], исследовано влияние ионов кальция на фазовые переходы в модельных липидных системах [108]. Были исследованы структурные изменения в мембранах, составленных из цвиттер-ионных фосфолипидов различной латеральной площади (ДМФХ, ДПФХ, ПОФХ, ДОФХ) при добавлении биологически значимых катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Co^{2+} . На основе полученных структурных параметров этих липидных бислоев были предложены различные механизмы липид-ионных взаимодействий, которые регулируются посредством латеральной площади, т.е. плотностью упаковки мембраны. В бислоях с плотной упаковкой фосфолипидов (сформированных из ДМФХ и ДПФХ) среднее межлипидное расстояние достаточно мало, что приводит к формированию ионных мостиков «липид–ион–липид», уплотняющих мембрану [109, 110]. С другой стороны, в липидном бислое с менее плотной упаковкой (сформированных из ДОФХ) ионы преимущественно связываются с липидами отдельно (липид-ионные пары), что повышает разупорядоченность липидного бислоя [110]. В случае ПОФХ, среднее межлипидное расстояние в котором примерно равно длине отсечки липид-ионных взаимодействий, соответствующей латеральной площади $\sim 64 \text{ Å}^2$, реализуется смешан-

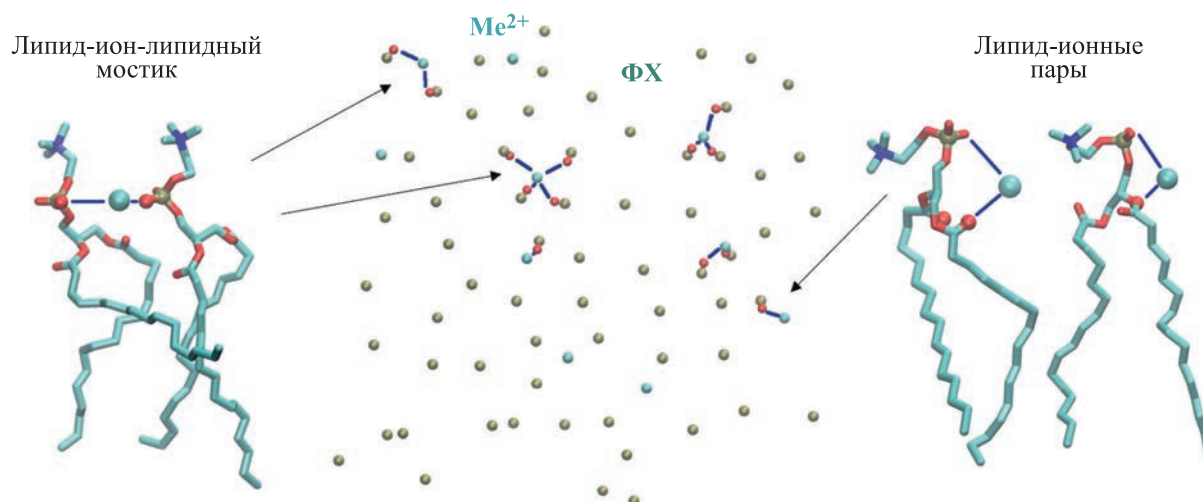


Рис. 8. Предложенные типы липид-ионных взаимодействий, реализующиеся в бислоях с различной плотностью упаковки липидов.

ный тип взаимодействий, при котором влияние ионных мостиков и липид-ионных пар на структуру мембраны взаимно компенсируется (рис. 8) [101].

Еще одним направлением исследований мембранных систем методом МУР является исследование клеточных мембранных органелл, таких как митохондрии [111]. С помощью метода МУРН удалось обнаружить изменение структурной организации митохондриальных крист при осмотическом набухании органелл. Серия работ показывает что в митохондриальных кристах при осмотическом набухании происходит перестройка внутренних мембран митохондрий от ламеллярной к гексагональной упаковке. Данные также подтверждены методом электронной микроскопии [112–114]. Дополнительно исследованы субмитохондриальные частицы методом МУРН, получены их основные характеристики, в частности, установлена толщина мембраны, равная $52.4 \pm 0.7 \text{ \AA}$ [115].

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФРАКТАЛЬНЫХ СТРУКТУР МЕТОДОМ МУР

Фрактальные структуры представляют собой множества объектов, обладающих самоподобием. Другими словами, часть такого множества подобна целому на любых масштабах. Крайне интересно исследовать такие объекты с точки зрения математики, однако, еще более интересно изучать фрактальные структуры в биологических системах. Для исследования фрактальных структур в биологии также можно использовать метод МУР [116, 117].

Фрактальная организация имеет важное значение для понимания механизмов функциониро-

вания биологических систем. Например, на основе работы [116] с использованием спектрометра ЮМО были проведены сравнительные исследования упаковки хроматина на границе фрактального режима (в области малых размеров) в ядрах нормально пролиферирующих и опухолевых клеток [118], а позднее показано, что изменение фрактальных параметров хроматина может являться одним из механизмов эпигенетической регуляции [119].

При исследовании ядер эритроцитов курицы [120] выяснилось, что кривая малоуглового рассеяния ведет себя линейно в «log-log»-представлении интенсивности рассеяния (I) в широком диапазоне значений модуля вектора рассеяния (Q). Такое поведение $I(Q)$ может свидетельствовать о фрактальном характере организации структуры ядер эритроцитов курицы. Поскольку биологические объекты могут быть исключительно монодисперсными [6], для анализа данных необходимо использовать подход детерминистских фракталов, который подробно описан в серии работ [116, 121–125].

Также достаточно подробно описаны работы по исследованию конкретных фрактальных структур. Например, исследование фракталов Вичека [116], множества Кантора [126] или снежинки Коха [127]. Рассмотрены случаи мультифазных фракталов [128] и показано применение вышеописанных подходов для исследования реальных структур, например, композитных мембран [129] (рис. 9).

РАЗВИТИЕ МЕТОДОВ

Исследование биологических объектов методами малоуглового рассеяния открывают широ-

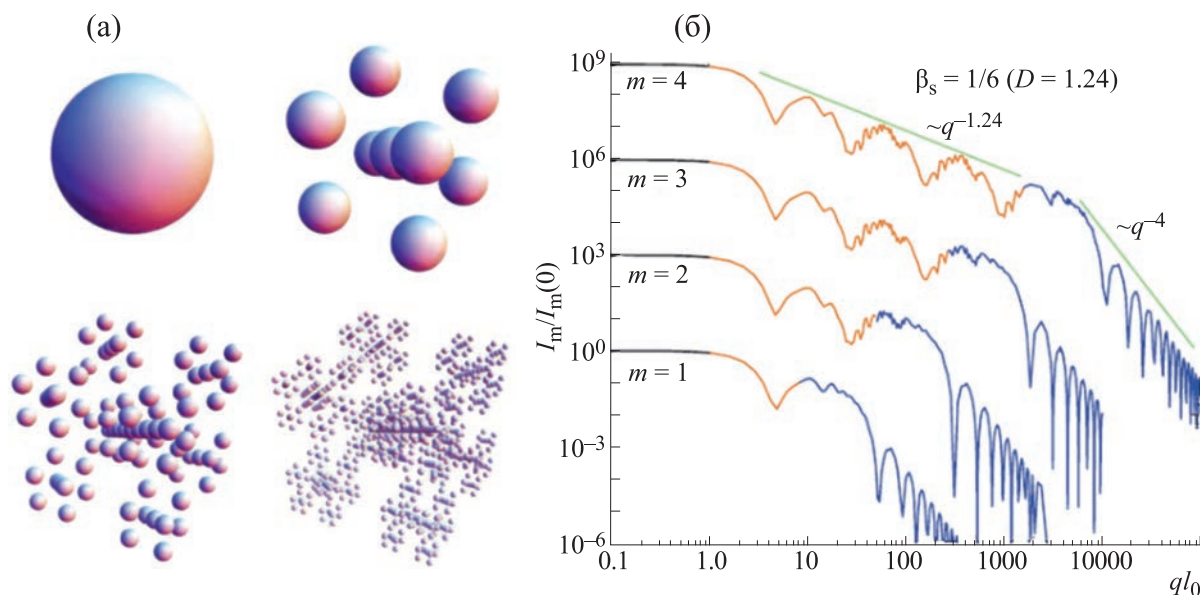


Рис. 9. Обобщенные самоподобные фракталы Вичека: (а) — инициатор и первые три итерации фрактала; (б) — интенсивность рассеяния для первых четырех итераций фрактала [121].

кие возможности развития методов в различных областях, начиная от фундаментальной биологии, структурной биологии, заканчивая биотехнологией и медицинскими приложениями.

В работе [130] показана возможность проведения высокоэффективных экспериментов по малоугловому нейтронному рассеянию на двухдетекторной системе на установке ЮМО. Сравнительный анализ методов МУРН и МУРР показал возможность комплементарного использования рентгеновского и нейтронного рассеяния для решения задач структурной организации белков [131].

Для водорастворимых белков были показаны возможности развития метода малоуглового рассеяния, соединенного с гель-фильтрацией [6], а для мембранных белковых комплексов продемонстрирована важность учета детергентного пояса в мембранной части белкового комплекса при анализе данных МУР и восстановлении трехмерной структуры белкового комплекса [64]. Также разработан метод нахождения основных структурных параметров для спиралевидных структур белковых комплексов на примере белков ResA [132].

Метод МУР также может быть полезен в развитии методов кристаллизации мембранных белков в липидных мезо фазах [79] благодаря высокоэффективной характеристике липидных мезофаз с определением параметра решетки и классификацией типа симметрии. Также потенциально возможно использовать метод МУР при детектировании микрокристаллов белков. Уже существует и разрабатывается ряд методов для ре-

шения аналогичных задач, например детектирование кристаллов с помощью рамановского рассеяния [85], однако метод МУР может оказаться более высокоэффективным и производительным методом, поскольку детектирование дифракционных пиков в образце требует гораздо меньше времени для сбора статистики, чем определение форм-фактора частиц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейтроны очень деликатны к биологическим объектам, органеллам и тканям. Нейтроны могут широко использоваться для специальных камер, начиная от температурных и заканчивая толсто-стенными камерами для измерений при высоких давлениях. А главное, нейтроны широко используются в так называемом методе вариации контраста и методе меток. Действительно, смесь растворов легкой и тяжелой воды может либо контрастировать часть объекта, либо, наоборот, скрывать лишние детали. Это открывает широкий простор для работы с белками, находящимися в олигомерном состоянии. Дополнительный бонус за счет контрастирования достигается из-за разных концентраций протонов в легкой воде и дейтерия в тяжелой воде (рН и рD соответственно). Это, в свою очередь, усложняет анализ данных, однако открывает новый вектор в исследованиях. Незначительное (до 10%) отличие в свойствах тяжелой воды от легкой может использоваться и для контроля гравиметрического поведения образцов. Всплывание-осаждение и, вообще, равновесное состояние образца харак-

терно для биологических объектов. Применение разноплотных легкой и тяжелой воды позволяет частично компенсировать этот эффект для, например, липидных мембран. И, наконец, вариация контраста — пожалуй, единственный метод позволяющий оценить плотности исследуемых объектов на наномасштабной шкале. Таким образом, ожидается дальнейшее увеличение спроса на измерительное время на малоугловых нейтронных установках.

В нашем обзоре мы отметили, что использование МУР принципиально важно для решения задач, связанных с олигомеризацией и с пониманием ограниченности парадигмы «один белок — одна функция». Следовательно, поле применимости МУР становится существенно шире для задач структурной биологии. Метод МУРН имеет свои достоинства и преимущества и является комплементарным к МУРР. Начиная с того факта, что профиль плотности длины рассеяния для мембран и мембранных белков при измерениях методом МУРР довольно сложен по сравнению с профилем плотности при измерениях методом МУРН. Мы предлагаем внедрение МУР в практику биотехнологических работ для контроля качества сборки белков и белковых комплексов, а также тестирования идентичности структурной организации биологических объектов в нативном состоянии.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Обзор применимости МУР для исследования образования комплексов LuxR-белков был подготовлен при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-1164.2022.1.4. Написание главы «Контроль структурной организации белков и белковых комплексов в биотехнологии» выполнено при финансировании Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект 1022060200069-0-1.6.2; 1.6.4; 1.6.5; 1.6.10; 1.6.19 по теме «Разработка технологии рационального и высокопродуктивного использования агро- и биоресурсов, их эффективной переработки и получения безопасных и качественных источников пищевых и не пищевых продуктов»).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. I. Kuklin, O. I. Ivankov, A. V. Rogachev, et al., *Crystallogr. Rep.*, **66** (2), 231 (2021). DOI: 10.1134/S1063774521020085
2. Ю. М. Останевич и И. Н. Сердюк, *Успехи физ. наук*, **137** (5), 85 (1982). DOI: 10.3367/UFNR.0137.198205D.0085
3. A. I. Kuklin, A. N. Ozerin, A. Kh. Islamov, et al., *J. Appl. Crystallogr.*, **36** (3), 679 (2003). DOI: 10.1107/S0021889803006186
4. A. I. Kuklin, A. D. Rogov, Y. E. Gorshkova, et al., *Phys. Part. Nuclei Lett.*, **8** (2), 119 (2011). DOI: 10.1134/S1547477111020075
5. T. N. Murugova, A. V. Vlasov, O. I. Ivankov, et al., *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, **17** (9–10), 1397 (2015).
6. D. V. Zabelskii, A. V. Vlasov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **994** (1), 012017 (2018). DOI: 10.1088/1742-6596/994/1/012017
7. А. И. Куклин, А. Д. Рогов, Ю. Е. Горшкова и др., *Письма в ЭЧАЯ*, **8** (2), 200 (2011).
8. A. I. Kuklin, A. K. Islamov, and V. I. Gordeliy, *Neutron News*, **16** (3), 16 (2005). DOI: 10.1080/10448630500454361
9. А. И. Куклин, А. Х. Исламов, Ю. С. Ковалев и др., *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*, № 6, 74 (2006).
10. Б. Н. Ананьев, А. Б. Кунченко, В. И. Лазин и др., *Отчет ОИЯИ № 3-11502* (1978), http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:9414980.
11. Б. Н. Ананьев, Ю. М. Останевич и Е. Я. Пикельнер, *Авт. свид. № 690959* от 14 июня 1979 г.
12. A. G. Soloviev, T. M. Solovjeva, O. I. Ivankov, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **848** (1), 012020 (2017). DOI: 10.1088/1742-6596/848/1/012020
13. А. Г. Соловьев, Т. М. Соловьева, А. В. Стадник и др., *Сообщения ОИЯИ*, P10-2003–86 (2003).
14. D. Pignol, L. Ayzazian, B. Kerfelec, et al., *J. Biol. Chem.*, **275** (6), 4220 (2000). DOI: 10.1074/jbc.275.6.4220
15. T. Maruyama, M. Nakajima, S. Ichikawa, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (4), 1003 (2014). DOI: 10.1271/BBB.65.1003
16. R. Høiberg-Nielsen, P. Westh, and L. Arleth, *Biophys. J.*, **96** (1), 153 (2009). DOI: 10.1529/BIOPHYSJ.108.136408
17. M. Kozak, *Biopolymers*, **83** (6), 668 (2006). DOI: 10.1002/BIP.20605
18. D. E. Stephens, S. Singh, and K. Permaul, *FEMS Microbiol. Lett.*, **293** (1), 42 (2009). DOI: 10.1111/J.1574-6968.2009.01519.X
19. N. P. Chandrasekharan, C. M. Ravenburg, I. R. Roy, et al., *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol.*, **76** (4), 357 (2020). DOI: 10.1107/S2059798320002016
20. T. Wu, Q. Jiang, D. Wu, et al., *Food Chem.*, **274**, 698 (2019). DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2018.09.017
21. A. Stradner, F. Cardinaux, and P. Schurtenberger, *J. Phys. Chem. B*, **110** (42), 21222 (2006). DOI: 10.1021/JP0639804
22. Q. Han, K. M. Smith, C. Darmanin, et al., *J. Colloid Interface Sci.*, **585**, 433 (2021). DOI: 10.1016/J.JCIS.2020.10.024

23. A. Stenstam, G. Montalvo, I. Grillo, and M. Gradziel-ski, *J. Phys. Chem. B*, **107** (44), 12331 (2003). DOI: 10.1021/JP0352783
24. H. Saibil, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **14** (10), 630 (2013). DOI: 10.1038/nrm3658
25. V. V. Sudarev, S. M. Dolotova, S. M. Bukhalovich, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **224** (1), 319 (2022). DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2022.10.126
26. E. Gnuchikh, A. Baranova, V. Schukina, et al., *PLoS One*, **14** (12), e0226576 (2019). DOI: 10.1371/JOUR-NAL.PONE.0226576
27. E. Y. Gnuchikh, I. V. Manukhov, and G. B. Zavil-gelsky, *Russ. J. Genet.*, **56** (9), 1070 (2020). DOI: 10.1134/S1022795420090070
28. M. N. Konopleva, S. A. Khrulnova, A. Baranova, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **473** (4), 1158 (2016). DOI: 10.1016/J.BBRC.2016.04.032
29. G. B. Zavilgelsky, V. Y. Kotova, M. M. Mazhul', and I. V. Manukhov, *Biochemistry (Moscow)*, **67** (9), 986 (2002). DOI: 10.1023/A:1020565701210
30. Е. Ю. Гнучих, И. В. Манухов и Г. Б. Завильгель-ский, *Биотехнология*, **36** (6), 68 (2020). DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-68-77
31. T. Inobe, M. Arai, M. Nakao, et al., *J. Mol. Biol.*, **327** (1), 183 (2003). DOI: 10.1016/S0022-2836(03)00087-1
32. D. V. Zabelskii, A. V. Vlasov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **994** (1), 012017 (2018). DOI: 10.1088/1742-6596/994/1/012017
33. T. N. Murugova, A. V. Vlasov, O. I. Ivankov, et al., *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, **17**, 1397 (2015).
34. A. S. Kazantsev, A. V. Vlasov, Y. L. Ryzhykau, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 548 (2018).
35. A. Vlasov, A. Vlasova, S. Bazhenov, et al., in *Proc. 2nd Int. Online Conf. on Crystals (Basel, Switzerland, 2020)*, p. 8466. DOI: 10.3390/IOCC_2020-08466
36. M. Bălăsoiu, S.V. Stolyar, R.S. Iskhakov, et al., *Rom. J. Phys.*, **55** (7–8), 782 (2010).
37. L. Anghel, M. Balasoiu, L. A. Ishchenko, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **351** (1), 012005 (2012). DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012005
38. B. S. Pattni, V. V. Chupin, and V. P. Torchilin, *Chem. Rev.*, **115** (19), 10938 (2015). DOI: 10.1021/ACS.CHEMREV.5B00046
39. A. E. Schmidt, A. V. Shvetsov, A. I. Kuklin, et al., *Crys-tallogr. Rep.*, **61** (1), 149 (2016). DOI: 10.1134/S1063774516010223
40. V. V. Egorov, A. A. Shaldzhyan, A. N. Gorshkov, et al., *J. Surf. Investig.*, **10** (2), 322 (2016). DOI: 10.1134/S1027451016020063
41. T. Kondela, P. Hrubovčák, D. Soloviov, et al., *Springer Proc. Physics*, **266**, 265 (2022). DOI: 10.1007/978-3-030-80924-9_10
42. O. M. Selivanova, A. K. Surin, Yu. L. Ryzhykau, et al., *Langmuir*, **34** (6), 2332 (2018). DOI: 10.1021/acs.lang-muir.7b03393
43. V. V. Egorov, Y. A. Zabrodskaya, D. V. Lebedev, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **848** (1), 012022 (2017). DOI: 10.1088/1742-6596/848/1/012022
44. O. I. Ivankov, E. V. Ermakova, T. N. Murugova, et al., *Adv. Biomembranes Lipid Self-Assembly*, **31**, 185 (2020). DOI: 10.1016/BS.ABL.2020.02.002
45. O. Ivankov, T. N. Murugova, E. V. Ermakova, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 1 (2021), DOI: 10.1038/s41598-021-01347-7
46. V. V. Kadochnikov, V. V. Egorov, A. V. Shvetsov, et al., *Crystallogr. Rep.*, **61** (1), 98 (2016). DOI: 10.1134/S1063774516010089
47. Я. А. Забродская, Ю.Е. Горшкова, А.-П. С. Шуры-гина и др., *Кристаллография*, **66** (6), 902 (2021). DOI: 10.31857/S0023476121050258
48. O. Ivankov, T. N. Murugova, E. V. Ermakova, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 1 (2021), DOI: 10.1038/s41598-021-01347-7
49. Y. L. Ryzhykau, Ph. S. Orekhov, M. I. Rulev, et al., *Sci. Rep.*, **11** (1), 10774 (2021). DOI: 10.1038/s41598-021-89613-6
50. A. V. Vlasov, S. D. Osipov, N. A. Bondarev, et al., *Cell. Mol. Life Sci.*, **79** (3), 1 (2022). DOI: 10.1007/S00018-022-04153-0
51. A. V. Vlasov, K. V. Kovalev, S.-H. Marx, et al., *Sci. Rep.*, **9** (1), 18547 (2019), DOI: 10.1038/s41598-019-55092-z
52. A. V. Vlasov, Y. L. Ryzhykau, V. I. Gordeliy, and A. I. Kuklin, *FEBS J.*, **284** (s1), 87 (2017).
53. G. V. Tsoraev, E. A. Protasova, E. A. Klimanova, et al., *Struct. Dynamics*, **9** (5), 054701 (2022). DOI: 10.1063/4.0000164
54. Y. V. Khramtsov, A. D. Vlasova, A. V. Vlasov, et al., *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol.*, **76** (12), 1270 (2020). DOI: 10.1107/S2059798320013765
55. A. I. Kuklin, A. V. Vlasov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 129 (2018).
56. A. Vlasov, Y. Kovalev, Y. Ryzhykau, et al., *FEBS J.*, **283** (S1), 218 (2016).
57. J. M. Tokuda, S. A. Pabit, and L. Pollack, *Biophys. Rev.*, **8** (2), 139 (2016). DOI: 10.1007/S12551-016-0196-8/FIGURES/3
58. T. R. Patel, G. Chojnowski, Astha, et al., *Methods*, **118–119**, 146 (2017). DOI: 10.1016/J.JMETH.2016.12.002
59. J. Zhang, B. Liu, D. Gu, et al., *Nucl. Acids Res.*, **49** (6), 3274 (2021). DOI: 10.1093/NAR/GKAB150
60. S. V. Bazhenov, E. S. Scheglova, V. V. Fomin, et al., *Russ. J. Genetics*, **58** (2), 143 (2022). DOI: 10.1134/S1022795422020028
61. Г. Б. Завильгельский и И. В. Манухов, *Генетика*, **30** (3), 337 (1994).
62. M. N. Konopleva, S. A. Khrulnova, A. Baranova, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **473** (4), 1158 (2016). DOI: 10.1016/J.BBRC.2016.04.032
63. A. M. Stevens, Y. Queneau, L. Soulère, et al., *Chem. Rev.*, **111** (1), 4 (2011). DOI: 10.1021/CR100064S
64. Y. L. Ryzhykau, A. V. Vlasov, P. S. Orekhov, et al., *Acta Crystallogr. D: Struct. Biol.*, **77** (11), 1386 (2021). DOI: 10.1107/s2059798321009542
65. Y. L. Ryzhykau, M. Y. Nikolaev, D. V. Zabelskii, et al., *FEBS J.*, **284**, 154 (2017).
66. Yu. L. Ryzhykau, M. I. Rulev, D. V. Zabelskii, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 577 (2018).
67. Y. L. Ryzhykau, in *Life Sciences at Frank Laboratory of Neutron Physics*, Ed. by N. Kučerka, O. Culicov, D. Chudoba, et al. (Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, 2021), pp. 12–13.
68. V. Nazarenko, A. Remeeva, Yu. Ryzhykau, et al., *FASEB J.*, **35** (S1), 05129 (2021). DOI: 10.1096/FASE-BJ.2021.35.S1.05129

69. C. R. Haramagatti, A. Islamov, H. Gibhardt, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8** (8), 994 (2006). DOI: 10.1039/B513588E
70. N. Gorski, J. Kalus, A. I. Kuklin, and L. S. Smirnov, *J. Appl. Cryst.*, **30** (5), 739 (1997). DOI: 10.1107/S0021889897002860
71. N. I. Gorski, A. N. Ivanov, A. I. Kuklin, and L. S. Smirnov, *High Pressure Res.*, **14** (1–3), 215 (2006). DOI: 10.1080/08957959508200922
72. D. Soloviov, Y. Zabashta, L. Bulavin, et al., *Macromol. Symp.*, **335** (1), 58 (2014). DOI: 10.1002/MASY.201200122
73. D. V. Solov'ev, A. I. Kuklin, P. K. Utrobin, et al., *J. Surf. Investig.*, **5** (1), 7 (2011). DOI: 10.1134/S1027451011010174
74. D. V. Soloviov, L. Bulavin, V. I. Gordeliy, et al., *Nucl. Phys. Atom. Energy*, **13** (1), 83 (2012).
75. D. V. Soloviov, Yu. E. Gorshkova, O. I. Ivankov, et al., *J. Phys.: Conf. Ser.*, **351** (1), 012010 (2012). DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012010
76. V. V. Skoi, M. I. Rulev, A. S. Kazantsev, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 584 (2018).
77. M. Rulev, A. A. Pavlova, O. I. Ivankov, et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, **50** (6), 569 (2018).
78. R. Efremov, G. Shiryaeva, G. Bueldt, et al., *J. Cryst. Growth*, **275** (1–2), e1453 (2005). DOI: 10.1016/J.JCRYSGRO.2004.11.235
79. A. Ishchenko, L. Peng, E. Zinovev, et al., *Cryst. Growth Des.*, **17** (6), 3502 (2017). DOI: 10.1021/acs.cgd.7b00458
80. T. N. Murugova, O. I. Ivankov, Yu. L. Ryzhykau, et al., *Sci. Rep.*, **12** (1), 11109 (2022). DOI: 10.1038/s41598-022-13945-0
81. M. Nikolaev, E. Round, I. Gushchin, et al., *Cryst. Growth Des.*, **17** (3), 945 (2017). DOI: 10.1021/acs.cgd.6b01631
82. A. Vlasov, et al., in *Abstr. VII Eur. Conf. on Neutron Scattering* (St-Petersburg, 2019), p. 631.
83. A. V. Vlasov, et al., *FEBS J.*, **282** (SI 1), 234 (2015).
84. Yu. L. Ryzhykau, et al., *FEBS J.*, **282** (SI 1), 235 (2015).
85. A. V. Vlasov, N. L. Maliar, S. V. Bazhenov, et al., *Crys-tals (Basel)*, **10** (1), 38 (2020). DOI: 10.3390/cryst10010038
86. G. M. Arzumanyan, N. V. Doroshkevich, K. Z. Matmatkulov, et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **138** (41), 13457 (2016). DOI: 10.1021/jacs.6b04464
87. V. Polovinkin, I. Gushchin, M. Sintsov, et al., *J. Mem-brane Biol.*, **247** (9–10), 997 (2014). DOI: 10.1007/s00232-014-9700-x
88. R. Astashkin, K. Kovalev, S. Bukhdruker, et al., *Nature Commun.*, **13** (1), 6460 (2022). DOI: 10.1038/s41467-022-34019-9
89. V. Borshchevskiy, K. Kovalev, E. Round, et al., *Nature Struct. Mol. Biol.*, **29** (5), 440 (2022). DOI: 10.1038/s41594-022-00762-2
90. T. Balandin, D. Volkov, A. Alekseev, et al., *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 109 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_5
91. T. I. Rokitskaya, N. L. Maliar, S. A. Siletsky, et al., *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 259 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_12
92. K. Kovalev, R. Astashkin, V. Gordeliy, and V. Cherezov, *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 125 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_6
93. A. Alekseev, V. Gordeliy, and E. Bamberg, *Methods Mol. Biol.*, **2501**, 71 (2022). DOI: 10.1007/978-1-0716-2329-9_3
94. A. V. Vlasov, Y. S. Kovalev, P. K. Utrobin, et al., *Opto-electron. Adv. Mater., Rapid Commun.*, **11** (1–2), 65 (2017).
95. T. B. Feldman, O. I. Ivankov, T. N. Murugova, et al., *Dokl. Biochem. Biophys.*, **465**, 420 (2016). DOI: 10.1134/S1607672915060186
96. T. B. Feldman, O. I. Ivankov, A. I. Kuklin, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1861** (10), 183000 (2019). DOI: 10.1016/J.BBAMEM.2019.05.022
97. V. I. Gordeliy, L. V. Golubchikova, A. I. Kuklin, et al., *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **93**, 252 (1993).
98. D. Uhríková, N. Kučerka, A. Islamov, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes*, **1611** (1–2), 31 (2003). DOI: 10.1016/S0005-2736(02)00705-8
99. D. Uhríková, P. Balgavý, N. Kučerka, et al., *Biophys. Chem.*, **88** (1–3), 165 (2000). DOI: 10.1016/S0301-4622(00)00211-8
100. M. Belička, N. Kučerka, D. Uhríková, et al., *Eur. Bio-phys. J.*, **43**, 179 (2014). DOI: 10.1007/S00249-014-0954-0
101. S. Kurakin, O. Ivankov, V. Skoi, et al., *Front. Mol. Biosci.*, **9**, 680 (2022). DOI: 10.3389/FMOLB.2022.926591/BIBTEX
102. M. Hereć, A. Islamov, A. Kuklin, et al., *Chem. Phys. Lipids*, **147** (2), 78 (2007). DOI: 10.1016/J.CHEMPHYSLIP.2007.03.007
103. J. Gallová, D. Uhríková, A. Islamov, et al., *Gen. Physiol. Biophys.*, **23**, 113 (2004).
104. T. Murugova, O. Ivankov, E. Ermakova, et al., *Gen. Physiol. Biophys.*, **39** (2), 135 (2020). DOI: 10.4149/GPB_2019054
105. I. J. Vereyken, V. Chupin, A. Islamov, et al., *Biophys. J.*, **85** (5), 3058 (2003). DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74724-9
106. E. V. Bocharov, K. S. Mineev, P. E. Volynsky, et al., *J. Biol. Chem.*, **283** (11), 6950 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M709202200
107. A. Kuklin, D. Zabelskii, I. Gordeliy, et al., *Sci. Rep.*, **10** (1), 5749 (2020). DOI: 10.1038/s41598-020-62577-9
108. Y. E. Gorshkova, A. I. Kuklin, and V. I. Gordeliy, *J. Surf. Investig.*, **11** (1), 27 (2017). DOI: 10.1134/S1027451016050499
109. S. A. Kurakin, E. V. Ermakova, A. I. Ivankov, et al., *J. Surf. Investig.*, **15** (2), 211 (2021). DOI: 10.1134/S1027451021020075
110. N. Kucerka, E. Ermakova, E. Dushanov, et al., *Lang-muir*, **37** (1), 278 (2021). DOI: 10.1021/ACS.LANG-MUIR.0C02876
111. T. N. Murugova, I. M. Solodovnikova, V. I. Yurkov, et al., *Neutron News*, **22** (3), 11 (2011). DOI: 10.1080/10448632.2011.598800
112. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. K. Islamov, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **14**, 524 (2006).
113. Т. Н. Муругова, В. И. Горделий, А. И. Ку克林 и др., *Кристаллография*, **52** (3), 545 (2007).
114. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. I. Kuklin, et al., *Crystallogr. Rep.*, **52**, 521 (2007). DOI: 10.1134/S1063774507030339
115. T. N. Murugova, V. I. Gordeliy, A. K. Islamov, et al., *Materials Structure*, **13** (2), 68 (2006).

116. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Phys. Rev. E*, **106** (2), 024108 (2022). DOI: 10.1103/PHYSREVE.106.024108
117. M. Bălăsoiu and G. M. Arzumanyan, *Modern Trends in Nanoscience* (Editura Academiei Române, Bucharest, 2013).
118. В. В. Исаев-Иванов и др., *Физика твердого тела*, **52** (5), 996 (2010).
119. D. V. Lebedev, Ya. A. Zabrodskaia, V. Pipich, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **520** (1), 136 (2019). DOI: 10.1016/J.BBRC.2019.09.116
120. D. V. Lebedev, M. V. Filatov, A. I. Kuklin, et al., *Crystallogr. Rep.*, **53** (1), 110 (2008). DOI: 10.1134/S1063774508010136
121. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Phys. Rev. E*, **84** (3), 036203 (2011). DOI: 10.1103/PHYSREVE.84.036203
122. E. M. Anitas, V. A. Osipov, A. I. Kuklin, and A. Yu. Cherny, *Rom. J. Phys.*, **61** (3–4), 457 (2016).
123. A. Yu. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Rom. J. Phys.*, **60** (5–6), 658 (2015).
124. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, A. I. Kuklin, et al., *J. Surf. Investig.*, **4** (6), 903 (2010). DOI: 10.1134/S1027451010060054
125. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *J. Appl. Crystallogr.*, **50** (3), 919 (2017). DOI: 10.1107/S1600576717005696
126. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, A. I. Kuklin, et al., *J. Appl. Crystallogr.*, **43** (4), 790 (2010). DOI: 10.1107/S0021889810014184
127. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **19** (3), 2261 (2017). DOI: 10.1039/C6CP07496K
128. A. Y. Cherny, E. M. Anitas, V. A. Osipov, and A. I. Kuklin, *J. Appl. Crystallogr.*, **47** (1), 198 (2014). DOI: 10.1107/S1600576713029956
129. E. M. Anitas, I. Bica, R. V. Erhan, et al., *Rom. Journ. Phys.*, **60** (5–6), 653 (2015).
130. A. I. Kuklin, A. I. Ivankov, D. V. Soloviov, et al., *J. Phys. Conf. Ser.*, **994** (1), 012016 (2018). DOI: 10.1088/1742-6596/994/1/012016
131. A. I. Kuklin, T. N. Murugova, O. I. Ivankov, et al., *J. Phys. Conf. Ser.*, **351** (1), 012009 (2012). DOI: 10.1088/1742-6596/351/1/012009
132. D. V. Lebedev, D. M. Baitin, A. Kh. Islamov, et al., *FEBS Lett.*, **537** (1–3), 182 (2003). DOI: 10.1016/S0014-5793(03)00107-8

Possibilities of Studying Biological Objects on a Pulsed Reactor

A.V. Vlasov*, **, Yu.L. Ryzykau*, **, I.V. Manukhov, S.V. Bazhenov**, S.A. Kurakin*, ***, T.N. Murugova*, A.I. Ivankov*, V.V. Skoy*, A.V. Rogachev*, D.P. Verteletskiy****, A.Kh. Islamov*, N. Kucherka*, *****, V.I. Gordeliy*, and A.I. Kuklin***

*Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie 6, Dubna, Moscow region, 141980 Russia

**Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Volokolamskoe shosse 11, Moscow, 125080 Russia

***Institute of Physics, Kazan Federal University, Kremlevskaya ul. 16a, Kazan, 420111 Russia

****Mainchemproject South, LLC, Yerevan 0051, Armenia

*****Department of Physical Chemistry of Drugs, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina, 832 32, Bratislava, Slovakia

Small-angle scattering makes it possible to solve structural biology problems without specific sample preparation, which is typical for methods such as X-ray diffraction of protein crystals or cryo-electron microscopy of proteins. In our review, it is shown how to use small-angle scattering to address biological problems. The use of small-angle scattering is suggested for applications as a tool to control the quality of the assembly of proteins and protein complexes and to test the identity of the structural organization of biological objects in the native state and in prepared samples before measurements by X-ray diffraction or cryo-electron microscopy. This work demonstrates the possibilities of the small-angle neutron scattering spectrometer YuMO based on the IBR-2 pulsed reactor (Laboratory of neutron physics, Joint Institute for Nuclear Research, Dubna, Russia) to solve a whole array of problems, with an eye toward applying these in biophysics, structural biology, and biotechnology. This review presents and discusses the main findings of the studies of various biological systems obtained by using the setup small-angle scattering of neutrons YuMO. The possibilities of development of structural biology methods with the help of small-angle scattering, including protein crystallization, are shown.

Keywords: small-angle scattering, biophysics, structural biology, membrane proteins