

Аномальное температурное поведение гиперзвуковых акустических фононов в кристалле лизоцима

А. В. Сванидзе, С. Г. Лушников¹⁾, С. Коджима^{*2)}

Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, 194021 С.-Петербург, Россия

** Institute of Materials Science, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8573, Japan*

Поступила в редакцию 12 октября 2006 г.

Исследуется поведение акустических фононов в кристаллах лизоцима тетрагональной сингонии с помощью мандельштам-бриллюэновского рассеяния света в интервале температур от 298 до 330 К. В окрестности 307 К были обнаружены аномалии в температурных зависимостях скорости и интегральной интенсивности квазипоперечного фона, а также интегральной интенсивности квазипродольного фона. Полученные результаты обсуждаются в рамках современных представлений о динамике белков. Наблюдаемые аномалии в поведении гиперзвуковых акустических фононов свидетельствуют о структурном фазовом переходе, происходящем в кристалле лизоцима при 307 К.

PACS: 63.20.–e, 77.80.Bh, 78.35.+c, 87.14.Ee, 87.15.He

Структура и динамика биополимеров активно исследуются в последнее десятилетие. Многочисленные исследования показали, что изменения в структуре и динамике белков, ДНК и полисахаридов могут приводить к изменению их активности и функций. Так, например, замена одного аминокислотного остатка Glu на Val в 6 положении в β -цепи гемоглобина является причиной серповидно-клеточной анемии, а блокирование движений отдельных функциональных групп в молекуле белка может значительно изменить кинетику каталитических реакций, протекающих с участием данного фермента [1]. Таким образом, исследования фазовых превращений в белках тесно связаны с вопросом об их активности и механизмах функционирования. Фазовые превращения в биополимерах активно исследуются с помощью оптической и нейтронной спектроскопии, которая дает информацию о динамических процессах на частотах от 1 до 1000 ГГц. Именно в этом диапазоне частот появляются такие возбуждения, как бозонный пик, релаксационная мода и другие, играющие ключевую роль в динамике фазовых превращений в биополимерах (см., например, [2–5]). Мандельштам-бриллюэновское рассеяние света оказалось удобным и информативным методом исследования низкочастотной области колебательного спектра и изучения механизмов фазовых превращений в биополимерах. Это убедительно показано при исследовании перестройки ДНК из А-формы в В-форму [6], фазовых

превращениях в полидисахаридах [7] или при индуцированном обезвоживанием фазовом переходе в лизоциме [8].

Возможность существования структурного фазового перехода в кристаллах лизоцима при изменении температуры обсуждается достаточно давно. В работах по рентгеноструктурным исследованиям кристаллов лизоцима [9, 10] было показано, что кристаллы, выращенные при температуре 310 К, имеют орторомбическую симметрию ($P2_12_12_1$, $a = 56.3$, $b = 73.8$, $c = 30.4$), которая переходит в тетрагональную ($P4_32_12$) при охлаждении. Позднее в исследованиях оптических свойств тетрагональных кристаллов лизоцима было найдено аномальное поведение двулучепреломления в окрестности 306.5 К [11]. В работе других авторов по оптическим исследованиям этих же кристаллов обнаружено аномальное поведение двулучепреломления и изменения текстуры кристалла в окрестности 283 К [12]. Эти аномалии интерпретировались авторами как сегнетоэластический фазовый переход первого рода. Но данная работа не находит подтверждения в многочисленных рентгеноструктурных исследованиях структуры кристаллов лизоцима, которые проводились как при комнатной, так и при низких температурах. Эти противоречивые литературные данные побудили нас исследовать динамику кристаллической решетки тетрагональных кристаллов лизоцима с помощью рассеяния света Мандельштам-Бриллюэна (МБР). Надо отметить, что МБР света является бесконтактным методом изучения упругих свойств, что особенно важно в случае исследования белковых кристаллов, которые

¹⁾e-mail: sergey.lushnikov@mail.ioffe.ru

²⁾Seiji Kojima.

являются крайне чувствительными к любым внешним воздействиям. В настоящей работе мы приводим результаты экспериментальных исследований поведения гиперзвуковых акустических фононов в тетрагональных кристаллах лизоцима при изменении температуры от 297 до 330 К.

Тетрагональные кристаллы лизоцима, выделенного из куриного яичного белка (Hen Egg White Lysozyme, lyophilized powder, Fluka), выращивались методом диффузии паров в висячей капле при температуре 20 °С. Детали роста кристаллов приведены в работе [13]. Все выращенные кристаллы имели хорошо развитые {110} и {101} грани. Для проведения опытов выбирались монокристаллы с габитусом “пластинки” с размерами примерно $0.4 \times 0.4 \times 0.1$ мм. Результаты морфологических исследований и рентгеноструктурного анализа на установке MAR 345 на длине волны $\lambda = 1.5417$ Å (Институт кристаллографии РАН им. А.В. Шубникова) показали, что выращенные кристаллы лизоцима относятся к пр. гр. $P4_32_12$ и имеют параметры элементарной ячейки $a = b = 79.535$ Å и $c = 38.118$ Å [13].

Исследование поведения акустических фононов в кристаллах лизоцима проводилось с помощью МБР света. В качестве источника света использовался ниодимовый лазер с длиной волны $\lambda = 532.15$ нм и мощностью на образце не более 40 мВт. Использование микроскопа (Olympus BH-2), вмонтированного в экспериментальную установку, позволило исследовать образцы малого размера. Образец помещался в нагревательную систему (Lincom system, THMS600), которая располагалась на предметном столике микроскопа. Рассеянный свет собирался и анализировался с помощью 6-проходного интерферометра Фабри–Перо (тандем системы Sandercock [14]). В экспериментах применялась 180° геометрия рассеяния света. Расстояние между пластинами интерферометра было 7.5 мм, что соответствует свободному спектральному интервалу 20 ГГц. Время записи одного спектра в экспериментах составляло 300 с.

МБР света в кристалле лизоцима изучалось в диапазоне температур от 297 до 330 К и кристалл выдерживали 15 мин при каждой температуре перед регистрацией спектра. В экспериментах на кристаллах лизоцима использовались две схемы: в первой исследовался кристалл, находящийся в капле маточного раствора, в которой он был выращен, и луч лазера фокусировался непосредственно в кристалле; во втором случае кристалл был вынут из капли и помещен в стеклянный капилляр, концы которого зашивались. В капилляр вводили каплю маточного раствора, что позволяло создать вокруг изучаемого

кристалла оптимальную влажность и, таким образом, избежать высыхания кристалла. В обоих случаях кристаллы были расположены в нагревательном элементе так, чтобы анализировать рассеяние света, падающего перпендикулярно плоскости (110) кристалла лизоцима. В связи с тем, что в первом случае кристаллы лизоцима находятся в маточном растворе, мы исследовали также бриллюэновское рассеяние света непосредственно в среде, окружающей кристалл, то есть в маточном растворе.

На рис.1 представлены спектры МБР света: i) в кристалле лизоцима, находящемся в маточном рас-

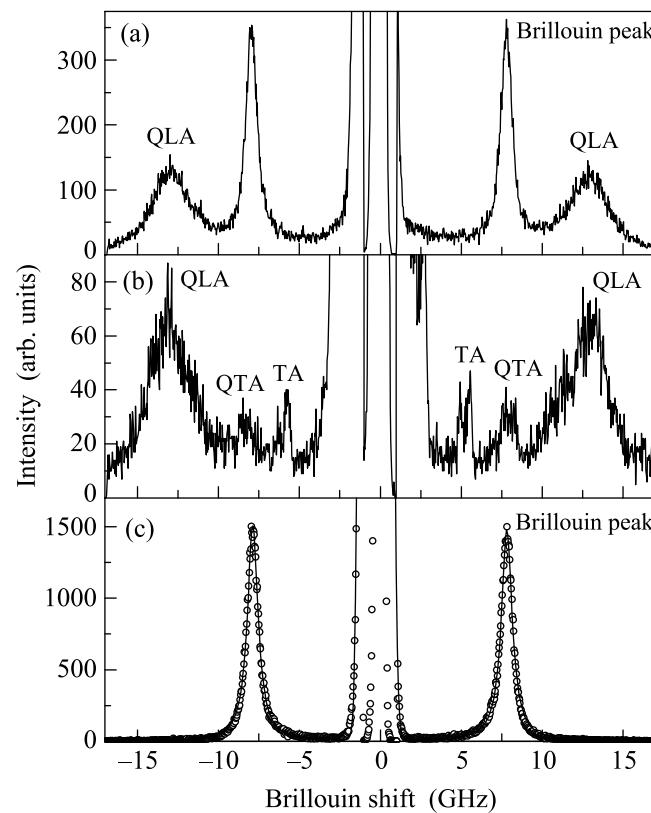


Рис.1. Экспериментальные спектры мандельштам–бриллюэновского рассеяния света, полученные при $T = 298$ К: (а) в кристалле лизоцима, находящемся в маточном растворе, в котором он вырос, (б) в кристалле лизоцима, вынутого из маточного раствора и помещенного в капилляр и (с) в растворе лизоцима. На рис.(с) кружками показаны экспериментальные данные, результаты расчетов представлены линией

творе, в котором он вырос (рис.1а), ii) в кристалле лизоцима, вынутого из маточного раствора и помещенного в капилляр (рис.1б) и iii) в растворе лизоцима (рис.1с), при $T = 298$ К. Как видно из рисунков, спектры этих кристаллов сильно отличаются друг от друга. В МБР спектре кристалла, находящегося в

маточном растворе (рис.1а), можно выделить пик упругого рассеяния и два дублета, располагающихся по обе стороны от несмещенной линии. Сопоставление спектров рассеяния света для кристаллов лизоцима в капле (рис.1а) и в растворе (рис.1с) показало, что первый дуплет с частотой $\Delta\nu \approx 12.85$ ГГц является квазипротодольным фоном, распространяющимся в кристалле в направлении \perp (110), а второй, с $\Delta\nu \approx 7.86$ ГГц – дублет, который появляется вследствие адиабатических флуктуаций плотности раствора (частота этого возбуждения совпадает с частотой дублета в спектре рассеяния света в маточном растворе, где был выращен кристалл (сравни рис.1а и 1с)).

Для того чтобы избавиться от вклада компоненты Мандельштам–Бриллюэна, обусловленной рассеянием в маточном растворе, мы исследовали кристалл лизоцима, вынутый из маточного раствора и помещенный в стеклянный капилляр (рис.1б). Угол падения света на поверхность кристалла приблизительно на 8° отклонялся от нормали к поверхности. В спектре рассеяния света в кристалле, находящемся в капилляре, можно выделить пик упругого рассеяния света и три дублета, которые соответствуют поперечному фону ТА с частотой $\Delta\nu_{\text{ТА}} \approx 5.44$ ГГц, квазипоперечному фону QTA, поведение которого определяется упругими константами $f(C_{11}, C_{12}, C_{66}, C_{16})$, с $\Delta\nu_{\text{QTA}} \approx 8.16$ ГГц и квазипротодольному фону QLA (см. рис.1б) с частотой $\Delta\nu_{\text{QLA}} \approx 12.89$ ГГц [15]. Пик упругого рассеяния в экспериментальных спектрах описывался с помощью функции Гаусса, акустические фононы – функцией Лоренца (пример расчетов приведен на рис.1с). Положение максимумов компонент МБР света ($\Delta\nu$) и их полуширина ($\delta\nu$) определяют значение скорости V и затухания Γ гиперзвукового акустического фона согласно выражениям:

$$\pm \frac{\Delta\nu}{\lambda} = 2n \frac{V}{c} \sin \frac{\theta}{2}, \quad (1)$$

$$\delta\nu = GV/2, \quad (2)$$

где n – показатель преломления, c – скорость света и θ – угол рассеяния. Значение показателя преломления при комнатной температуре определялось в работе [16] и равно 1.56 ± 0.01 (температуру зависимостью показателя преломления кристалла лизоцима мы пренебрегли в силу ее малости). Значение скорости распространения квазипротодольной упругой волны в направлении, перпендикулярном (110), при комнатной температуре, полученное в наших экспериментах, хорошо согласуется с данными работы [8]. Согласно флуктуационно-диссипативной те-

ореме, спектральная функция $S(\omega)$ пропорциональна мнимой части фононной восприимчивости:

$$S(\omega) \approx (kT/\hbar\omega)\text{Im}(\chi), \quad (3)$$

где k – постоянная Больцмана, а T – температура в кельвинах. Таким образом, интегральная интенсивность фононных дублетов в спектрах МБР пропорциональна фононной восприимчивости, которую мы рассчитывали как площадь под лоренцианом, описывающим соответствующий дублет. Коррекция на фактор Бозе–Эйнштейна в наших расчетах не проводилась.

Рассмотрим температурную эволюцию спектров МБР света при нагревании кристалла лизоцима, находящегося в капилляре (рис.2). Хорошо видно, что

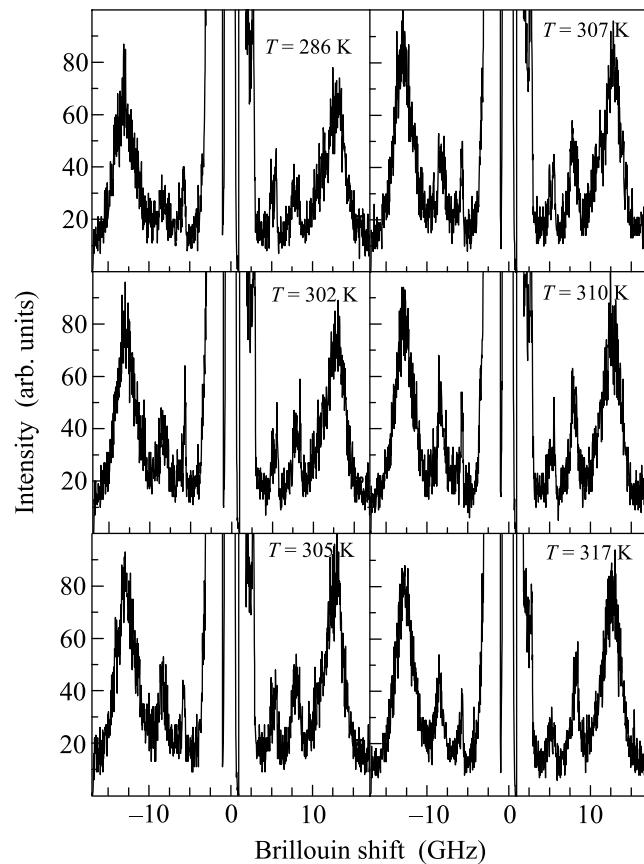


Рис.2. Эволюция спектров МБР при повышении температуры

положение и интенсивность пиков в спектрах при изменении температуры меняются. Расчеты позволили построить температурные зависимости скорости и интегральной интенсивности для QLA и QTA фононов (рис.3 и 4). Проследить поведение ТА фона при изменении температуры оказалось достаточно сложно – слишком велика погрешность расчетов

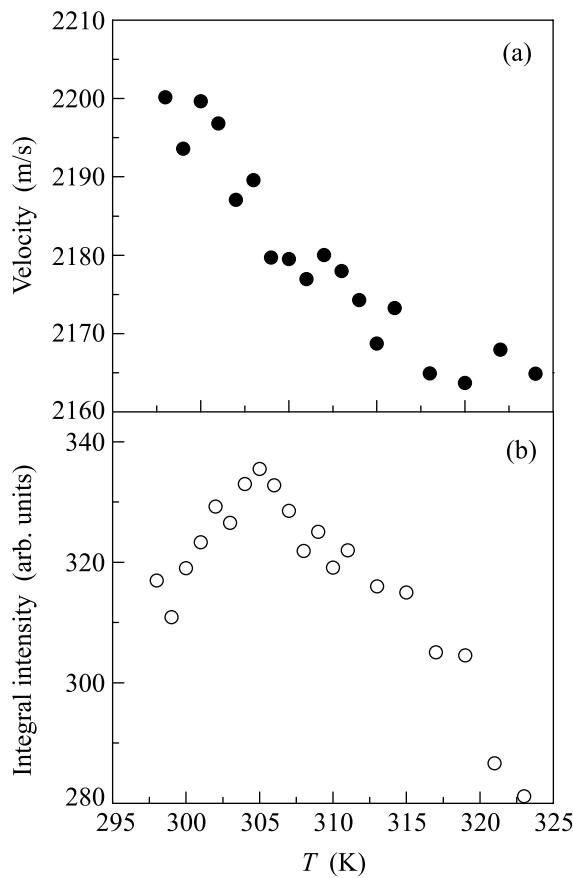


Рис.3. Температурные зависимости скорости (а) и интегральной интенсивности (б) квазипротодольного акустического фонона

из-за слабой интенсивности сигнала и вклада от упругого рассеяния света. Хорошо видно, что при нагревании кристалла скорость распространения квазипротодольной упругой волны уменьшается (рис.3а). При этом не наблюдается никаких выраженных аномалий в данной зависимости. О подобном поведении скорости ультразвука для квазипротодольной упругой волны в данном направлении при повышении температур от 278 до 293 К сообщалось в работе [17]. Иначе ведет себя интегральная интенсивность этой компоненты МБР: в диапазоне температур от 297 до 306 К она слабо растет, а начиная с 306 К и до 325 К, уменьшается на 17% (рис.2б). Таким образом, в окрестности 306 К наблюдается аномалия в температурной зависимости интегральной интенсивности QLA фонона. Чтобы уточнить, насколько данное поведение скорости QLA фонона является характерным именно для кристалла лизоцима, мы исследовали температурную эволюцию МБР света в растворе лизоцима. Детально результаты экспериментов будут описаны отдельно [18], здесь же можно сказать, что в

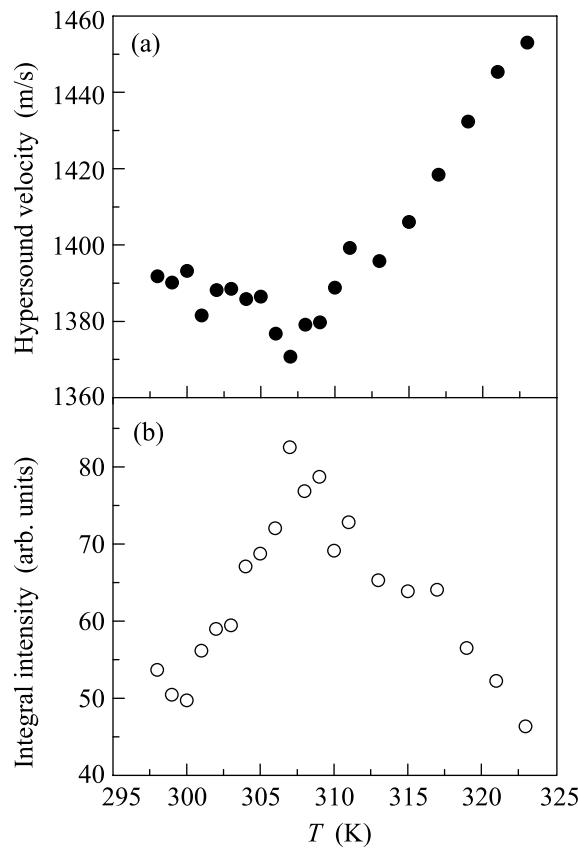


Рис.4. Температурные зависимости скорости (а) и интегральной интенсивности (б) квазипротодольного акустического фонона

данном интервале температур аномалий в поведении МБР света в растворе лизоцима не обнаружено.

Температурное поведение скорости QTA фонона разительным образом отличается от поведения скорости QLA фонона (сравни рис.3а и 4а). Скорость QTA фонона при повышении температуры от 297 до 307 К медленно уменьшается и достигает минимума при 307 К. При дальнейшем нагревании кристалла от 307 до 322 К наблюдается существенное увеличение скорости от 1371 до 1432 км/с, то есть скорость выросла на 6% (рис.4а). Температурная зависимость интегральной интенсивности соответствующей компоненты имеет аномалию в той же области температур, при этом ее интегральная интенсивность меняется в два раза (рис.4б). Анализ температурного поведения полуширины компонент МБР света, которая связана с затуханием гиперзвука (уравнение (2)), не выявил никаких аномалий в окрестности 307 К. Такое поведение затухания гиперзвука вызывает некоторое недоумение, поскольку в окрестности структурного фазового перехода (в большинстве случаев) аномальному поведению скорости должно соот-

ветствовать аномальное поведение затухания. Возможно, это объясняется тем, что в кристаллах лизоцима сильна связь между фононной подсистемой и релаксационными процессами, обусловленными присутствием молекул воды в структуре кристалла. Релаксационные процессы проявляются в спектрах рассеяния света как квазиупругое рассеяние. Пример связи релаксационной компоненты и фононной подсистемы показан в работе [7] при исследовании МБР света в полидисахаридах. Проведение расчетов в рамках связанных мод, то есть в случае сильной связи между фононной подсистемой и релаксационной компонентой, в настоящем случае затруднительно из-за слабой интенсивности релаксационной компоненты в спектрах рассеяния. Но, по-видимому, именно эволюция релаксационной компоненты отражается, с одной стороны, в поведении интегральной интенсивности и маскирует изменение полуширины компонент МБР света, с другой.

Аномальное поведение скорости и интегральной интенсивности квазипродольного и квазипоперечного акустических фононов в кристалле лизоцима в окрестности 307 К характерно для структурных фазовых переходов в кристаллах. Подобные "скачкообразные" увеличения скорости акустических фононов наблюдались при фазовых переходах, в несобственных сегнетоэлектрических или сегнетоэластических фазовых переходах [19]. На основании настоящих исследований затруднительно обсуждать характер и механизм фазового перехода – это предмет детальных исследований в будущем, гораздо важнее надежно установить факт существования фазового перехода в кристаллах лизоцима. И здесь дополнительным аргументом в пользу структурного фазового перехода является поведение оптических свойств тетрагонального лизоцима при повышении температуры. В статье [11], посвященной изучению оптической активности кристаллов лизоцима, двойного лучепреломления и т.д., показана температурная зависимость разности фаз Δ между двумя эллиптически-поляризованными компонентами, на которые расщепляется плоскополяризованная волна, падая на плоскопараллельную кристаллическую пластинку. На температурной зависимости Δ наблюдался скачок при температуре 306.5 К, который авторами работы связывался с денатурацией образца. Однако наблюдаемая аномалия в температурной зависимости Δ скорее свидетельствует о существовании структурного фазового перехода I рода, поскольку тепловая денатурация лизоцима проходит при 333 К [20], что существенно выше обсуждаемой температуры. Сопоставляя данные, полученные в

настоящих экспериментах по МБР света, с результатами оптических исследований [11] можно предположить, что в окрестности 307 К в тетрагональном кристалле лизоцима действительно реализуется структурный фазовый переход I рода. Этот фазовый переход может быть связан с перестройкой внутримолекулярной структуры, которая наблюдалась при исследовании раствора лизоцима с помощью малоуглового рассеяния рентгена при повышении температуры [21]. В таком случае изменения структуры белка играют роль "спускового механизма" в динамике фазового перехода в кристалле лизоцима.

Необходимы дальнейшие исследования структуры и динамики решетки кристаллов лизоцима и в первую очередь с помощью рентгеноструктурного анализа.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 05-02-17678, программой ООФА РАН и Ведущей научной школой НШ-5169.2006, а также фондом JSPC, Япония.

1. Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл, *Биохимия человека*, том 1, М.: Мир, 1993.
2. T. Weidlich and S. M. Lindsay, *J. Phys. Chem.* **92**, 6479 (1988).
3. W. Doster, S. Cusack, and W. Petry, *Nature (London)* **337**, 754 (1989).
4. G. Caliskan, D. Mechtani, J. H. Roh et al., *J. Chem. Phys.* **121**, 1978 (2004).
5. Stefano Ciliberti, Paolo De Los Rios, and Francesco Piazza, *Phys. Rev. Lett.* **96**, 198103 (2006).
6. S. M. Lindsay, S. A. Lee, J. W. Powell et.al., *Biopolymers* **27**, 1015 (1988); T. Weidlich, S. M. Lindsay, and A. Rupprecht, *Phys. Rev. Lett.* **61**, 1674 (1988).
7. S. A. Lee, M. R. Flowers, W. F. Oliver et al., *Phys. Rev. E* **47**, 677 (1993).
8. S. Speziale, F. Jiang, C. L. Caylor et al., *Biophys. J.* **85**, 3202 (2003).
9. P. Jolles and J. Berthou, *FEBS Lett.* **23**, 21 (1972).
10. J. Berthou and P. Jolles, *Biochim. et Biophys. Acta* **336**, 222 (1974).
11. J. Kobayashi, T. Asahi, M. Sakurai et al., *Acta Cryst. A* **54**, 581 (1998).
12. I. Teslyuk, Yu. Nastishin, and R. Vlokh, *Ukr. J. Phys. Opt.* **5**, 118 (2005).
13. А. В. Сванидзе, С. Г. Лушников, Л. А. Шувалов, *Кристаллография* **50**, 850 (2005).
14. S. M. Lindsay, M. W. Anderson, and J. R. Sandercock, *Rev. Sci. Instrum.* **52**, 1478 (1982).
15. R. Vacher and L. Boyer, *Phys. Rev. B* **6**, 639 (1972).
16. B. Cervelle, F. Cesbron, and J. Berthou, *Acta Crystallogr. A* **30**, 645 (1974).

17. M. Tachibana, K. Kojima, R. Ikuyma et al., *Chem. Phys. Lett.* **332**, 259 (2000); **354**, 360 (2002).
18. A. V. Svanidze, S. G. Lushnikov, and Seiji Kojima, не опубликовано.
19. W. Rehwald, *Adv. Phys.* **22**, 721 (1973).
20. W. Pfeil and P. L. Privalov, *Biophys. Chem.* **4**, 23 (1976).
21. M. Hirai, S. Arai, and H. Iwase, *Thermochimica Acta* **344**, 95 (2000); M. Hirai, S. Arai, and H. Iwase, *J. Phys. Chem. B* **103**, 549 (1999).