

Оригинальная статья

УДК 548.312+57.088

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>**Применение контролируемой дивергенции пучка на лабораторном дифрактометре для улучшения пространственного разрешения рефлексов на примере кристаллов белка Era из *Staphylococcus aureus*****Д.Р. Исламов¹, А.Д. Биктимиров¹, Э.А. Клочкова¹, К.С. Усачев^{1,2}✉**¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия²Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский Институт», г. Москва, Россия✉k.usachev@kpfi.ru**Аннотация**

Получение пространственных структур с высоким разрешением с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) до сих пор сопряжено со значительными трудностями при использовании лабораторных монокристалльных дифрактометров, оснащенных современными конфокальными многослойными оптиками, которые характеризуются высокой светимостью и малым диаметром рентгеновского пучка (≤ 100 мкм). С увеличением размеров элементарной ячейки расстояние между отражениями на дифракционной картине сокращается, что приводит к их наложению и перекрытию. Для минимизации перекрытия и выделения отражений в виде отдельных пиков традиционно увеличивают расстояние от кристалла до детектора. Однако такой подход не всегда приводит к успешному разделению из-за расхождения рентгеновского пучка. Одной из возможностей решения этой проблемы является оптимизация параметров расходимости пучка в оптическом устройстве источника рентгеновского излучения. На примере кристалла белка Era из *Staphylococcus aureus* с большими параметрами элементарной ячейки ($a = b = 78.1(1)$ Å и $c = 244.9(2)$ Å) показано успешное применение оптимизации выбора параметра расходимости рентгеновского пучка для сбора данных РСА с высоким разрешением.

Ключевые слова: белковая кристаллография, РСА, дифракция рентгеновских лучей, ГТФаза Era.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 21-74-20034).

Для цитирования: Исламов Д.Р., Биктимиров А.Д., Клочкова Э.А., Усачев К.С. Применение контролируемой дивергенции пучка на лабораторном дифрактометре для улучшения пространственного разрешения рефлексов на примере кристаллов белка Era из *Staphylococcus aureus* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2025. Т. 167, кн. 2. С. 268–275. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>.

Original article

<https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>

Controlled beam divergence on a laboratory diffractometer to improve spatial resolution of reflections for Era protein crystals from *Staphylococcus aureus*

D.R. Islamov¹, A.D. Biktimirov¹, E.A. Klochkova¹, K.S. Usachev^{1,2} ✉

¹Kazan Federal University, Kazan, Russia

²National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

✉ k.usachev@kpfu.ru

Abstract

Obtaining spatial structures with high resolution by the XRD method is still associated with significant difficulties for laboratory single-crystal diffractometers incorporating modern confocal multilayer optics with high intensity and small X-ray beam diameter ($\leq 100 \mu\text{m}$). As the unit cell size increases, the distance between reflections in the diffraction pattern decreases, which leads to their overlapping. To minimize the overlap and separate reflections as distinct peaks, the distance from the crystal to the detector is traditionally increased. However, this approach is not always successful due to the divergence of the X-ray beam. A potential alternative solution is to optimize the beam divergence parameters in the optical device of the X-ray source. Using an Era protein crystal from *Staphylococcus aureus* with large unit cell parameters ($a = b = 78.1(1) \text{ \AA}$ and $c = 244.9(2) \text{ \AA}$), a successful optimization of the X-ray beam divergence parameter selection for high-resolution XRD data acquisition was demonstrated.

Keywords: protein crystallography, XRD, X-ray diffraction, GTPase Era

Acknowledgments. This study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-74-20034).

For citation: Islamov D.R., Biktimirov A.D., Klochkova E.A., Usachev K.S. Controlled beam divergence on a laboratory diffractometer to improve spatial resolution of reflexes for Era protein crystals from *Staphylococcus aureus*. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2025, vol. 167, no. 2, pp. 268–275. <https://doi.org/10.26907/2542-064X.2025.2.268-275>. (In Russian)

Введение

Рентгеноструктурный анализ (РСА) является одним из самых эффективных методов исследования кристаллических материалов, особенно в области биомолекулярной кристаллографии. Он предоставляет информацию о точной атомной структуре белков, что имеет ключевое значение для понимания их функций, взаимодействий и роли в биологических системах. Однако анализ кристаллов белков с большими параметрами элементарной ячейки представляет особую проблему [1] вследствие наложения рефлексов,

которое может значительно затруднять интерпретацию данных и снижать качество получаемой информации.

Наложение рефлексов возникает при перекрывании близко расположенных дифракционных отражений, соответствующих различным кристаллическим плоскостям, что ведет к искажению измеряемых дифракционных интенсивностей. Это наиболее актуально для кристаллов белков с большими параметрами элементарной ячейки, которые, как правило, обладают более сложной трехмерной структурой и менее предсказуемыми конформациями, что приводит к недостаточному разрешению рефлексов, а также сложностям при определении электронной плотности и, соответственно, атомных координат [2].

Настоящая работа направлена на решение проблемы наложения рефлексов в РСА кристаллов белков с большими размерами элементарной ячейки на примере кристаллов белка Era из *Staphylococcus aureus*.

Белок Era является гуанозинтрифосфатсвязывающей гидролазой и участвует в сборке и обеспечении стабильности рибосом за счет взаимодействия с рибосомными белками L17, S2 и S10 [3], 16S рРНК и 30S субъединицей [4]. Делеция гена *era* приводит к значительному снижению скорости роста клеток, сопровождающемуся исчезновением полисом, накоплением предшественников 16S rRNA и свободных 30S и 50S рибосомных субъединиц [5]. *In vitro* эксперименты показали, что в присутствии Era увеличивается скорость связывания белков S9, S11, S5, и S12, а также S7, S10, S13, S14, S19 с 3'-концевым домом 16S rRNA [6], однако точный механизм действия данного белка до сих пор остается неизвестным. В настоящее время отсутствуют данные о строении и взаимодействии Era с рибосомой патогенной бактерии *Staphylococcus aureus* [7–9], что диктует необходимость структурных исследований данного белка методом РСА.

1. Материалы и методы

1.1. Объект исследования, условия роста кристаллов. Образец белка Era из *S. aureus* получали согласно описанной ранее методике [10]. Концентрацию белка доводили до 30 мг/мл в 50 мМ Tris-HCl буферном растворе с pH 8.0, содержащем 0.8 М NaCl. К объему белка Era, предназначенному для кристаллизационного эксперимента, добавляли нерасщепляемый аналог гуанозинтрифосфата (GppCp, Jena Bioscience, Германия) до достижения конечной концентрации 10 мМ. Поиск кристаллизационных условий проведен с использованием наборов JBScreen JCSG++ 1–4 (Jena Bioscience, Германия) методом диффузии водяных паров в модификации «висячая капля» при 22 °C в 24-луночных планшетах (Hampton Research, США). Кристаллизационные капли наносили на покровное стекло путем смешивания 1 : 1 по объему (1.25 мкл) раствора с белком Era + GppCp и раствора осадителя из резервуара, и монтировали над резервуаром, содержащим 250 мкл раствора с компонентами, обеспечивающими кристаллизацию (25 % (масс./об.) ПЭГ 3350, 228 мМ цитрат калия, pH 8.3). В результате были обнаружены монокристаллы белка Era.

1.2. Рентгеноструктурный анализ. Сбор данных дифракции рентгеновского излучения проводили на монокристалльном дифрактометре XtaLab Synergy S (Rigaku, Япония) с источником рентгеновского излучения PhotonJet-S [$\lambda(\text{CuK}_\alpha) = 1.54184 \text{ \AA}$] и детектором HyPix-6000HE с размером пикселя 100 мкм. Сбор, редактирование данных и уточнение параметров элементарных ячеек проводили с использованием пакета программы CrysAlisPro (Agilent Technologies Ltd, Великобритания) [11].

2. Результаты и их обсуждение

Полученные кристаллы белка Era визуализированы с использованием поляризационного микроскопа. Для последующих экспериментов выбран ограниченный прозрачный кристалл, не имеющий видимых дефектов и трещин, а также свободный от наростов и налипших мелких кристаллов (рис. 1).



Рис. 1. Полученные кристаллы белка Era. Овалом отмечен кристалл, использованный в дальнейших экспериментах

Fig. 1. Era protein crystals. The crystal used in subsequent experiments is marked by an ellipse

Выбранный монокристалл белка Era с размерами $125\text{ мкм} \times 130\text{ мкм} \times 160\text{ мкм}$ был помещен под рентгеновский луч лабораторного монокристалльного дифрактометра XtaLAB SynergyS, оснащенного медным анодом с длиной волны $1.54184\text{ \AA}$, и в результате предварительного эксперимента была получена дифракционная картина (рис. 2).

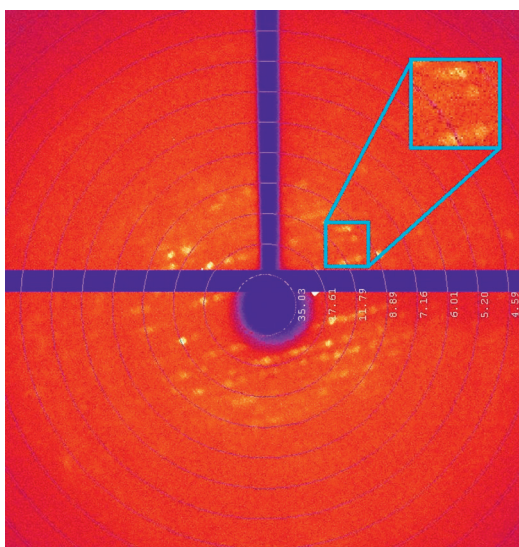


Рис. 2. Дифракционная картина кристалла белка Era

Fig. 2. Diffraction pattern of the Era protein crystal

Анализ дифракционной картины (рис. 2) показывает, что один из параметров элементарной решетки значительно превышает два других. Более того, высокое значение этого параметра приводит к наложению отражений друг на друга. Это, в свою очередь, осложняет точное измерение интенсивностей отдельных отражений, что является необходимым условием для получения карты электронной плотности.

Следует отметить, что в увеличенной области рис. 2 размеры пикселей детектора значительно меньше размеров отражений. Более того, каждое отражение формирует конус с расходимостью. В результате этого увеличение расстояния между образцом и детектором не способствует разделению пиков. Для уменьшения расходимости конуса отражений использована контролируемая дивергенция рентгеновского пучка.

Дивергенция рентгеновского пучка представляет собой угол, под которым рентгеновские лучи расходятся от источника. Уменьшение зазора на источнике рентгеновского излучения повышает параллельность излучения, которое доходит до образца, но при этом снижает интенсивность излучения. Поэтому необходимо определить оптимальный параметр дивергенции рентгеновского пучка для кристалла белка Era. Для этого была проведена серия измерений из семи изображений при различных величинах зазора и одинаковой ориентации кристалла (рис. 3).

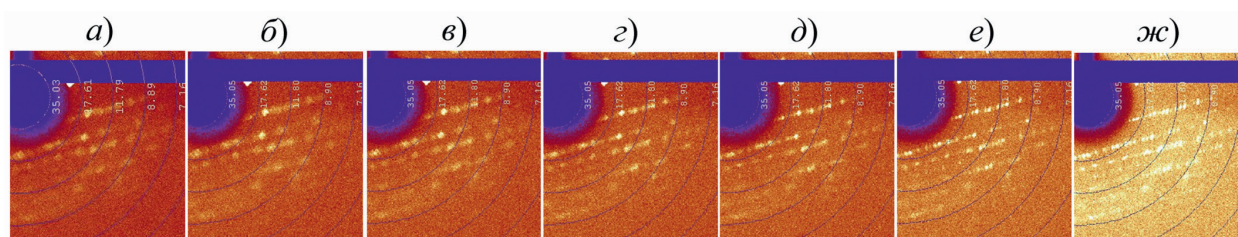


Рис. 3. Дифракционная картина кристалла белка Era при различных значениях дивергенции: а) 10 мрад; б) 8.6 мрад; в) 7.1 мрад; г) 5.3 мрад; д) 4.1 мрад; е) 2.3 мрад; ж) 1.0 мрад

Fig. 3. Diffraction pattern of the Era protein crystal at different divergence values: а) 10 mrad; б) 8.6 mrad; в) 7.1 mrad; г) 5.3 mrad; д) 4.1 mrad; е) 2.3 mrad; ж) 1.0 mrad

Из рис. 3 следует, что уменьшение дивергенции рентгеновского пучка способствует разделению отдельных отражений. Однако снижение дивергенции также приводит к уменьшению интенсивности рентгеновского излучения, что приходится компенсировать увеличением времени экспозиции. Таким образом, параметр дивергенции необходимо подбирать с учетом особенностей конкретного кристалла. В случае кристаллов белка Era оптимальное значение дивергенции для достижения разделения отражений составляет 2.3 мрад.

Корректный выбор экспериментальных параметров позволил получить полный набор дифракционных данных, автоиндексация которых привела к определению примитивной тетрагональной ячейки с параметрами $a = b = 78.1(1) \text{ \AA}$ и $c = 244.9(2) \text{ \AA}$. Следует отметить, что согласно опубликованным результатам РСА [12], белок Era из *E. coli* кристаллизуется в виде димера. Однако полученные нами параметры элементарной ячейки свидетельствуют о том, что в исследуемых кристаллах расположен мономер белка Era в независимой части элементарной ячейки.

Заключение

Проведенное исследование подчеркивает важность оптимизации параметров расходимости рентгеновского пучка для успешного решения задач белковой кристаллографии, особенно при регистрации данных на лабораторных монокристалльных дифрактометрах.

Показано, что правильный выбор параметров расходимости может существенно улучшить качество получаемых дифракционных данных, позволяя эффективно минимизировать наложение отражений и обеспечить их четкое разделение. На примере кристалла белка Era (*Staphylococcus aureus*) с большими параметрами элементарной ячейки подтверждена целесообразность применяемой методологии. Полученные результаты могут стать основой для дальнейших исследований и оптимизации технологий получения кристаллических структур биомолекул с большими параметрами элементарной ячейки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflicts of Interest. The authors declare no conflicts of interest.

Литература

1. Meulenbroek E.M., Pannu N.S. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Cockayne syndrome protein A in complex with DNA damage-binding protein 1 // *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.* 2012. V. F68. Pt. 1. P. 45–48. <https://doi.org/10.1107/S1744309111045842>.
2. Timofeev V., Samygina V. Protein crystallography: Achievements and challenges // *Crystals*. 2023. V. 13, No 1. Art. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>.
3. Goyal A., Muthu K., Panneerselvam M., Pole A.K., Ramadas K. Molecular dynamics simulation of the *Staphylococcus aureus* YsxC protein: Molecular insights into ribosome assembly and allosteric inhibition of the protein // *J. Mol. Model.* 2011. V. 17, No 12. P. 3129–3149. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-0998-3>.
4. Sayed A., Matsuyama S., Inouye M. Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 264, No 1. P. 51–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1471>.
5. Inoue K., Alsina J., Chen J.Q., Inouye M. Suppression of defective ribosome assembly in a *rbfA* deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli* // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 48, No 4. P. 1005–1016. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03475.x>.
6. Bunner A.E., Nord S., Wikström P.M., Williamson J.R. The effect of ribosome assembly cofactors on *in vitro* 30S subunit reconstitution // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 398, No 1. P. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.036>.
7. Stijn Blot R.N., Vandewoude K., Colardyn F. *Staphylococcus aureus* infections // *N. Engl. J. Med.* 1998. V. 339, No 27. P. 2025–2026. <https://doi.org/10.1056/nejm199812313392716>.
8. Jeljaszewicz J., Mlynarczyk G., Mlynarczyk A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2000. V. 16, No 4. P. 473–478. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00289-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00289-2).
9. Fierobe L., Decré D., Müller C., Lucet J.-C., Marmuse J.-P., Mantz J., Desmonts J.-M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a causative agent of postoperative intra-abdominal infection: Relation to nasal colonization // *Clin. Infect. Dis.* 1999. V. 29, No 5. P. 1231–1238. <https://doi.org/10.1086/313454>.
10. Ключкова Э.А., Исламов Д.Р., Биктимиров А.Д., Рогачев А.В., Валидов Ш.З., Бикмуллин А.Г., Симакин А.В., Петерс Г.С., Юсупов М.М., Усачев К.С. Выделение, очистка и кристаллизация ГТФазы Era из золотистого стафилококка // *Кристаллография*. 2023. Т. 68, № 2. С. 276–280. <https://doi.org/10.31857/S0023476123010137>.
11. Agilent. CrysAlis PRO. Agilent Technologies Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England. 2014.
12. Chen X., Court D.L., Ji X. Crystal structure of ERA: A GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif // *PNAS*. 1999. V. 96, No 15. P. 8396–8401. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8396>.

References

1. Meulenbroek E., Pannu N. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Cockayne syndrome protein A in complex with DNA damage-binding protein 1. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Commun.*, 2012, vol. F68, pt. 1, pp. 45–48. <https://doi.org/10.1107/S1744309111045842>.
2. Timofeev V., Samygina V. Protein crystallography: Achievements and challenges. *Crystals*, 2023, vol. 13, no. 1, art. 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>.
3. Goyal A., Muthu K., Panneerselvam M., Pole A.K., Ramadas K. Molecular dynamics simulation of the *Staphylococcus aureus* YsxC protein: Molecular insights into ribosome assembly and allosteric inhibition of the protein. *J. Mol. Model.*, 2011, vol. 17, no. 12, pp. 3129–3149. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-0998-3>.
4. Sayed A., Matsuyama S., Inouye M. Era, an essential *Escherichia coli* small G-protein, binds to the 30S ribosomal subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 264, no. 1 pp. 51–54. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1471>.
5. Inoue K., Alsina J., Chen J.Q., Inouye M. Suppression of defective ribosome assembly in a *rbfA* deletion mutant by overexpression of Era, an essential GTPase in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 2003, vol. 48, no. 4, pp. 1005–1016. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03475.x>.
6. Bunner A.E., Nord S., Wikström P.M., Williamson J.R. The effect of ribosome assembly cofactors on *in vitro* 30S subunit reconstitution. *J. Mol. Biol.*, 2010, vol. 398, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.02.036>.
7. Stijn Blot R.N., Vandewoude K., Colardyn F. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.*, 1998, vol. 339, no. 27, pp. 2025–2026. <https://doi.org/10.1056/nejm199812313392716>.
8. Jeljaszewicz J., Mlynarczyk G., Mlynarczyk A. Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, vol. 16, no. 4, pp. 473–478. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00289-2](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00289-2).
9. Fierobe L., Decré D., Müller C., Lucet J.-C., Marmuse J.-P., Mantz J., Desmonts J.-M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a causative agent of postoperative intra-abdominal infection: Relation to nasal colonization. *Clin. Infect. Dis.*, 1999, vol. 29, no. 5, pp. 1231–1238. <https://doi.org/10.1086/313454>.
10. Klochkova E.A., Islamov D.R., Biktimirov A.D., Rogachev A.V., Validov Sh.Z., Bikmullin A.G., Simakin A.V., Peters G.S., Yusupov M.M., Usachev K.S. Extraction, purification, and crystallization of GTPase Era from *Staphylococcus aureus*. *Crystallogr. Rep.*, 2023, vol. 68, no. 2, pp. 288–292. <https://doi.org/10.1134/S1063774523010133>.
11. Agilent. CrysAlis PRO. Agilent Technologies Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England. 2014.
12. Chen X., Court D.L., Ji X. Crystal structure of ERA: A GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif. *PNAS*, 1999, vol. 96, no. 15, pp. 8396–8401. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8396>.

Информация об авторах

Даут Ринатович Исламов, кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: daut1989@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5988-1012>

Артем Дмитриевич Биктимиров, лаборант-исследователь, НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: biktimirov.artiom@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3600-4839>

Эвелина Андреевна Клочкова, старший научный сотрудник НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет

E-mail: evelina.klochkova@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Константин Сергеевич Усачев, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, НИЛ Структурная биология, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет; заместитель руководителя центра Интегративной структурной биологии, Курчатовский комплекс НБИКС-природоподобных технологий, Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский Институт»

E-mail: k.usachev@kpfu.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Author Information

Daut R. Islamov, Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: daut1989@mail.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5988-1012>

Artem D. Biktimirov, Laboratory Research Assistant, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: biktimirov.artiom@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3600-4839>

Evelina A. Klochkova, Senior Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

E-mail: evelina.klochkova@gmail.com

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0513-576X>

Konstantin S. Usachev, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Leading Researcher, Laboratory of Structural Biology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University; Deputy Head of Center for Integrative Structural Biology, Kurchatov Complex of NBICS Nature-Like Technologies, National Research Center “Kurchatov Institute”

E-mail: k.usachev@kpfu.ru

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6331-7764>

Поступила в редакцию 05.11.2024

Принята к публикации 27.11.2024

Received November 5, 2024

Accepted November 27, 2024