

Исследование комплексов из больших и малых белков теплового шока в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния

Амарантов С.В. ФНИЦ «Кристаллография и Фотоника» ИК РАН

Белки семейства Hsp60 (БТШ60)

Решаемые в работе задачи:

- 1. Формфактор тора и его применение в решении обратной задачи - восстановление формы частицы по кривой малоуглового рассеяния.**
- 2. Исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния конформации белков шаперонинов, имеющих центрально-симметричное отверстие, в растворе, и моделирование их формы и конформационных переходов с применением полученных формфакторов.**

Известная структура молекул некоторых шаперонинов

Шаперонины делятся на две группы: к **группе I** относятся GroEL (*Escherichia coli*) и т.н. **бактериальные шаперонины** найденные в бактериях, митохондриях и хлоропластах, к **группе II** **вирусные шаперонины** архей и эукариот.

Обе группы шаперонинов функционируют за счёт энергии гидролиза АТФ.

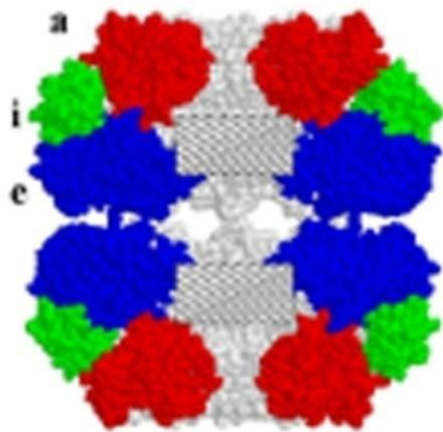
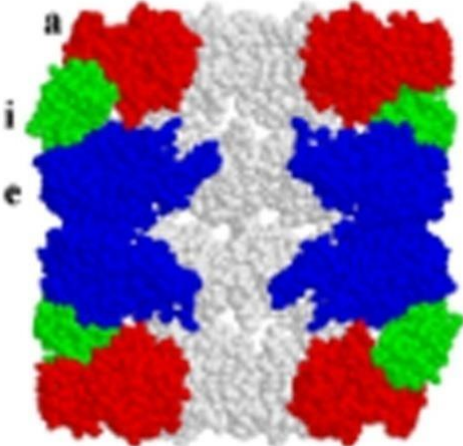
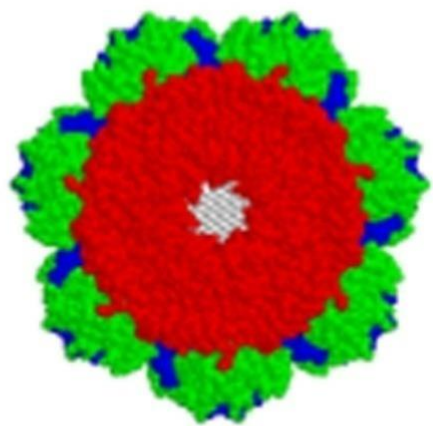
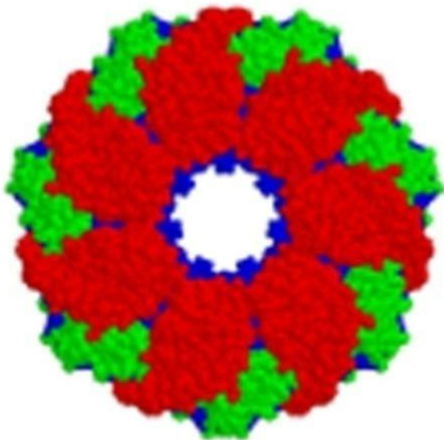
GroEL состоит из 14 идентичных субъединиц (57 кДа), формирующих два уложенных стопкой кольца

Комплекс GroEL-GroEs

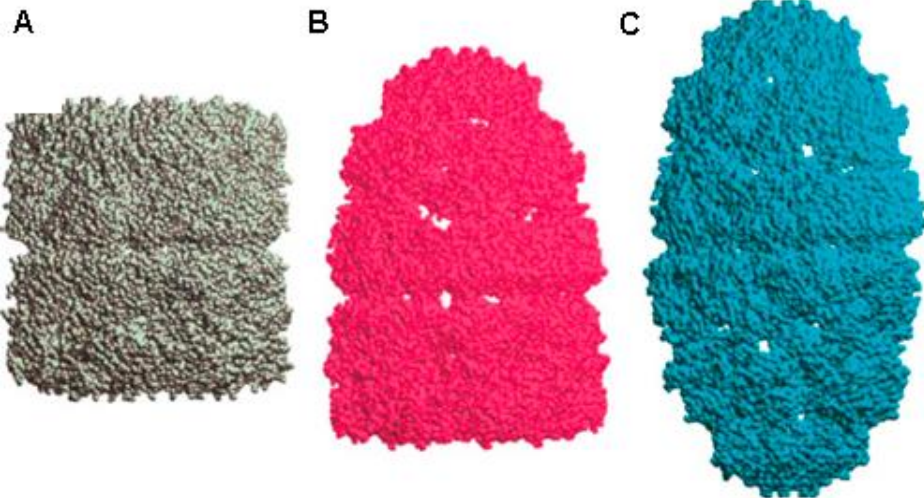
GroEL/GroES защищает пептиды от агрегации и осуществляет их правильное сворачивание внутри полости [Weissman, et al., 1995]

Кристалл

Раствор

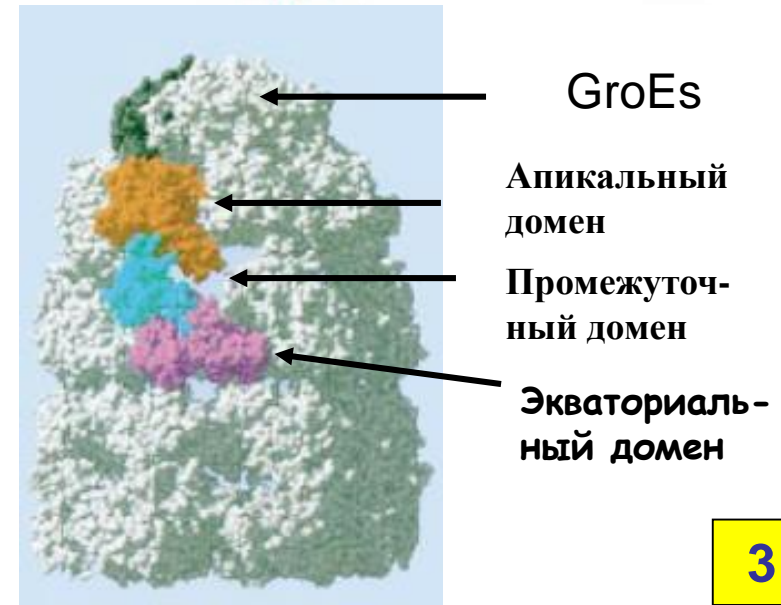
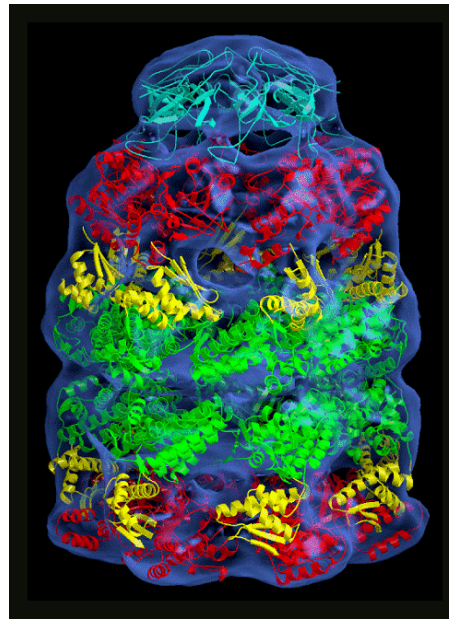
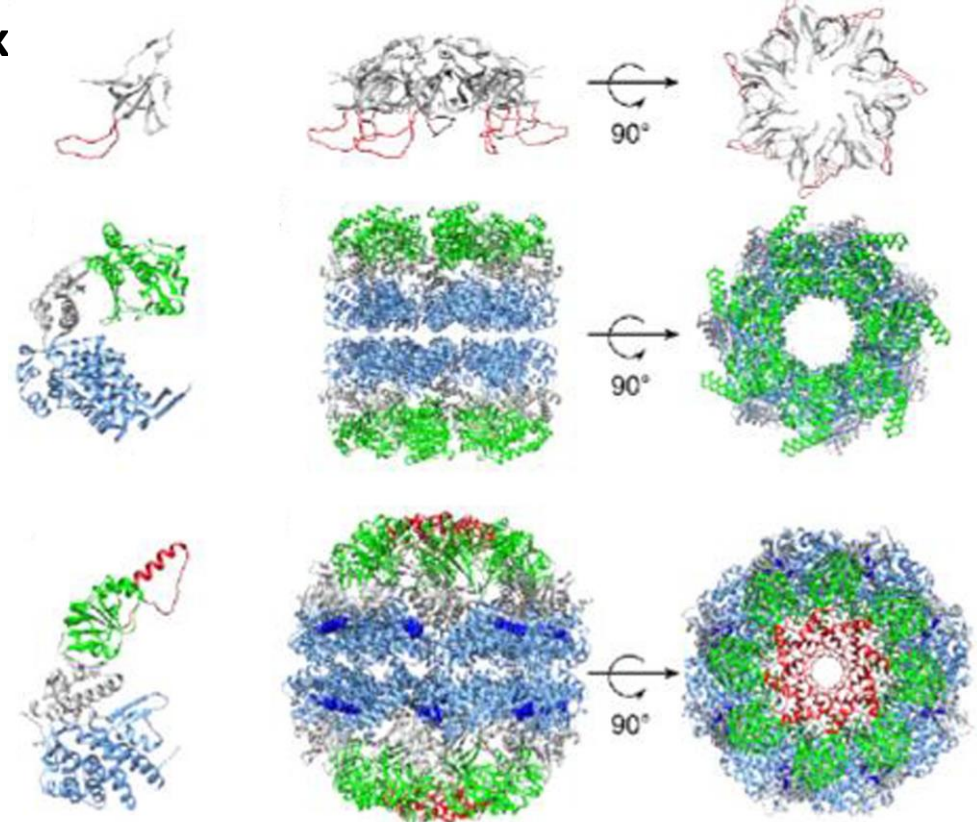


Три возможные варианта структурных форм комплексов GroEL, ассоциированных с ко-шаперонином.



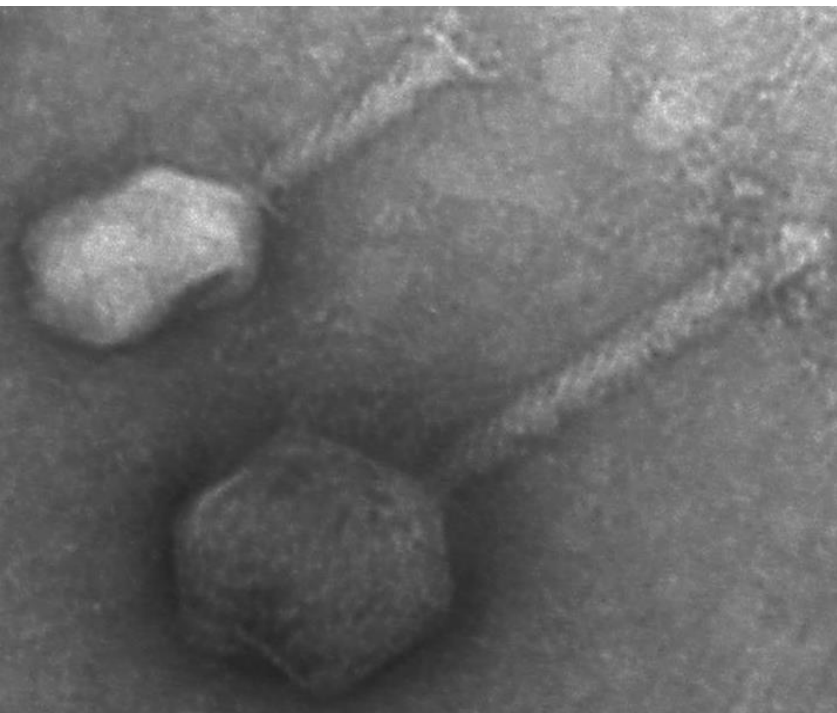
Модели получены методом электронной микроскопии.

- A. GroEL без ко-шаперонина.
- B. GroEL, ассоциированный с GroES.
- C. GroEL, связавшийся с двумя ко-шаперонинами.

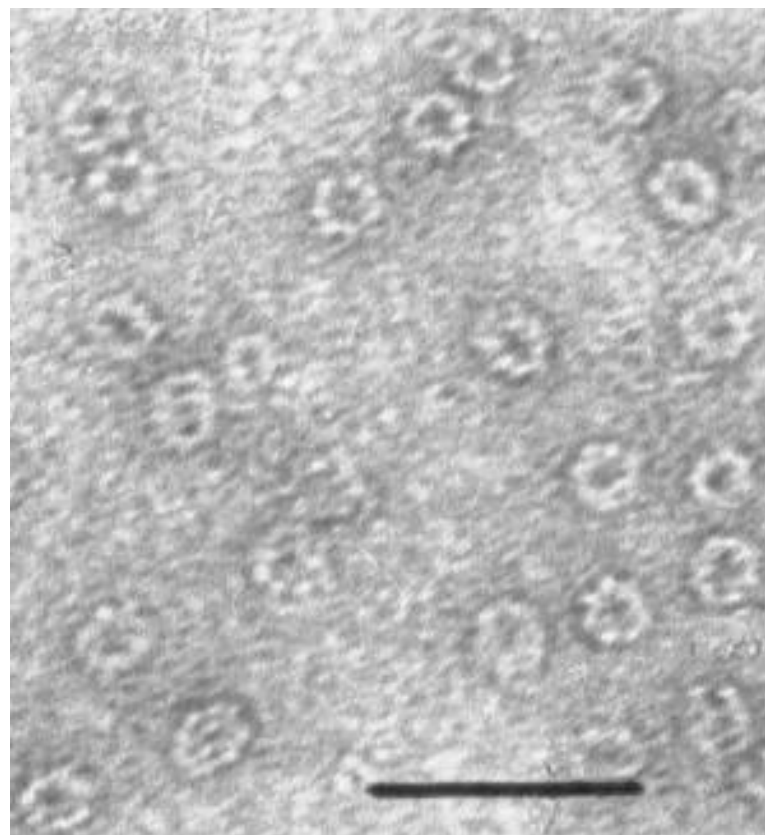


При анализе генома бактериофага EL *Pseudomonas aeruginosa* впервые был обнаружен ген, кодирующий свой собственный шаперонин.

Объекты исследования: вирусный шаперонин gp146 своего бактериофага phiEL
 Если бактериальные шаперонины практически одинаковы по длине полипептидной цепи (GroEL *E. coli* – 548 а.о.) и имеют высокую степень гомологии (около 80%) а.о. то **Степень гомологии бактериального GroEL с вирусным PG146 (558 а.о.) фага EL существенно ниже (21%).** Но гомология на уровне а.о. не обязательна для белков, выполняющих схожие функции. Механизм функционирования фагового шаперонина не выяснен.



Электронная микро-фотография
 Бактериофагов phiEL и T4
 Хвост phiEL 225 нм, T4 120 нм
 Капсид phiEL 123 нм, T4 85 нм



Электронная микроскопия рекомбинантного gp146.
 Видны комплексы, лежащие на «торце» и на «боку». Также видна центральная полость. Бар, 50 нм. [Hertveld et al, 2005].

Исследуемые объекты:

**Известный бактериальный шаперонин GroEL и
в комплексе GroEL/ES(кристалл, раствор);**

**И мало изученный вирусный шаперонин *gp146*
бактериофага *phiEL Pseudomonas aeruginosa* (раствор).**

Экспериментальная часть работы

Проверка раствора белка на монодисперсность методом аналитического ультрацентрифугирования и динамическим светорассеянием.

Малоугловой эксперимент.

Проверка раствора белка на монодисперсность: Аналитическое ультрацентрифугирование. Скоростная седиментация.

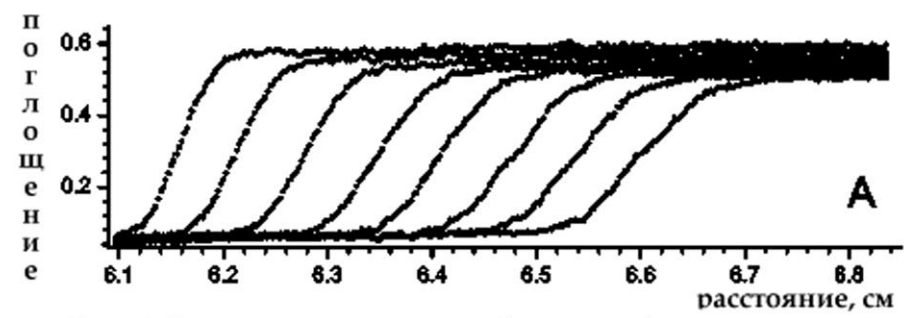
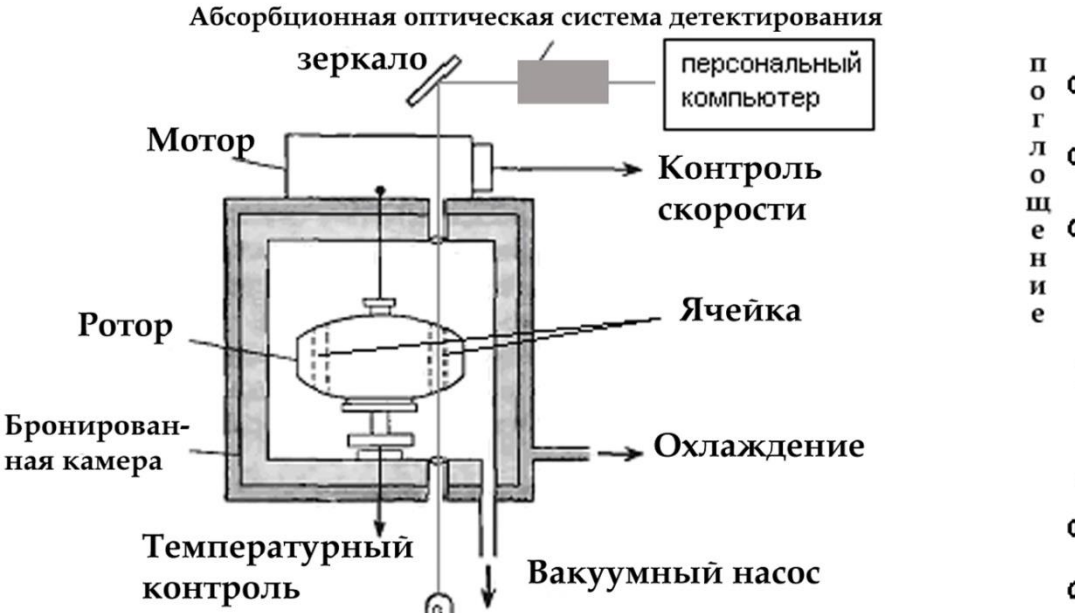


Рис. А Седиментационные профили как функции времени

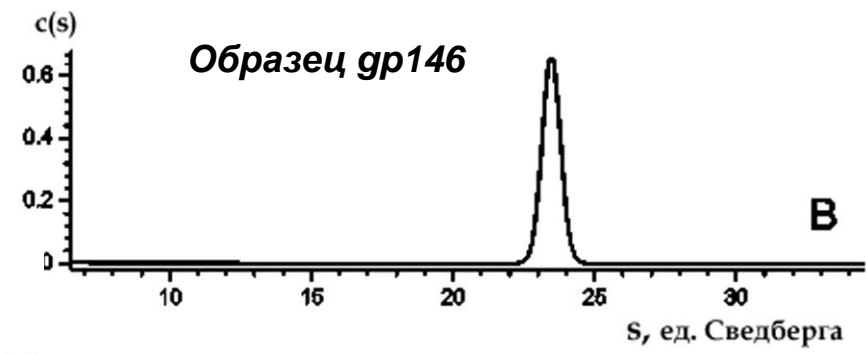
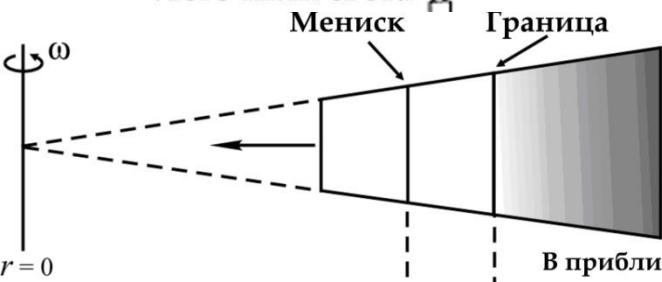
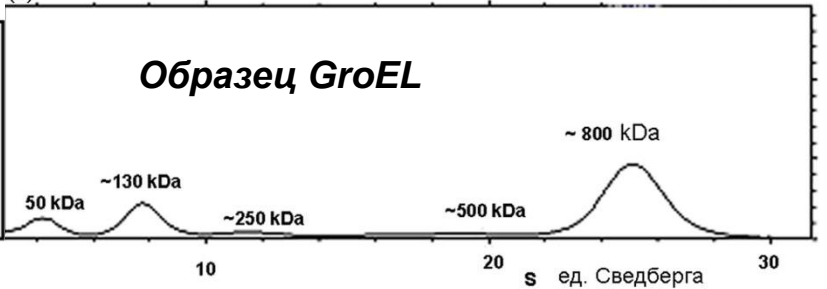
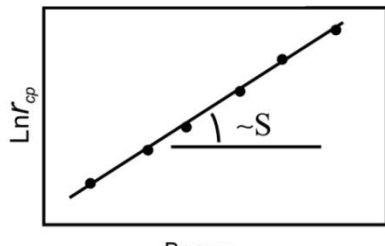
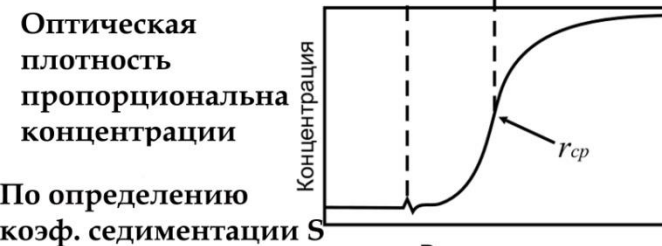


Рис. В График распределения концентрации белка (c) от коэф. седиментации s



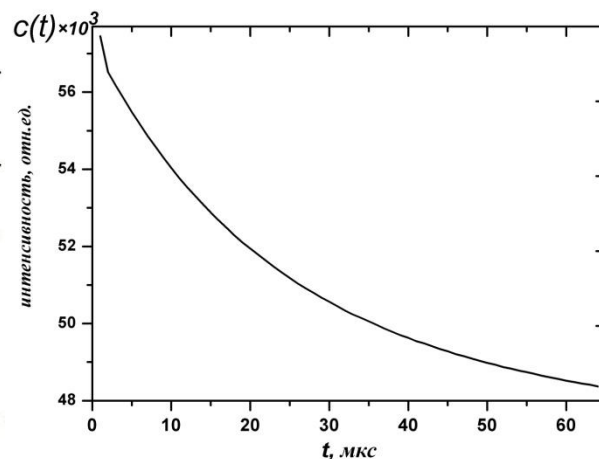
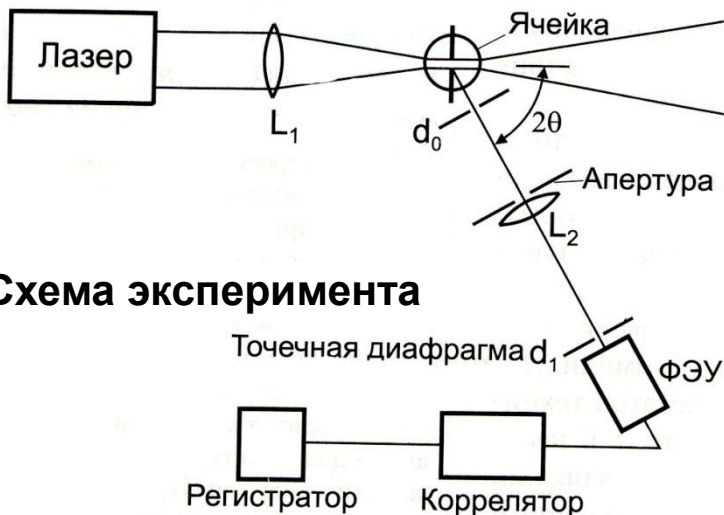
$\langle \rangle$ – среднее значение
 $u = dr/dt \equiv \langle S \rangle \omega_0^2 r$
 $Ln \left(\frac{r(t)}{r(t_0)} \right) = \langle S \rangle \omega_0^2 (t - t_0)$

В приближении стационарной диффузии (s)



$u = dr/dt \equiv S a$ Размерность [S] - t время, единица 1S=10⁻¹³ сек = 1 сведберг
 где a - центростремительное ускорение
 Svedberg

Динамическое светорассеяние от раствора gr146.



$$\langle I(t_0) \times I(t_0 + t) \rangle = \frac{1}{t_0} \int_0^{t_0} I(t) I(t + t_0) dt$$

Динамическая автокорреляционная функция: $c(t) =$

$$= \frac{\langle I(t_0) \times I(t_0 + t) \rangle}{I(t_\infty)^2} =$$

$$= B + A e^{-2q^2 D t} \quad \text{где}$$

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

$A, B - \text{const.}$

n -показатель преломления раствора,

θ - угол рассеяния,

λ -длина волны излучения, коэффициент поступательной диффузии определяется

уравнением Эйнштейна – Стокса:

$$D = kT / 3\pi\eta d \quad \text{где, } d - \text{диаметр частицы}$$

Средневзвешенное объемное

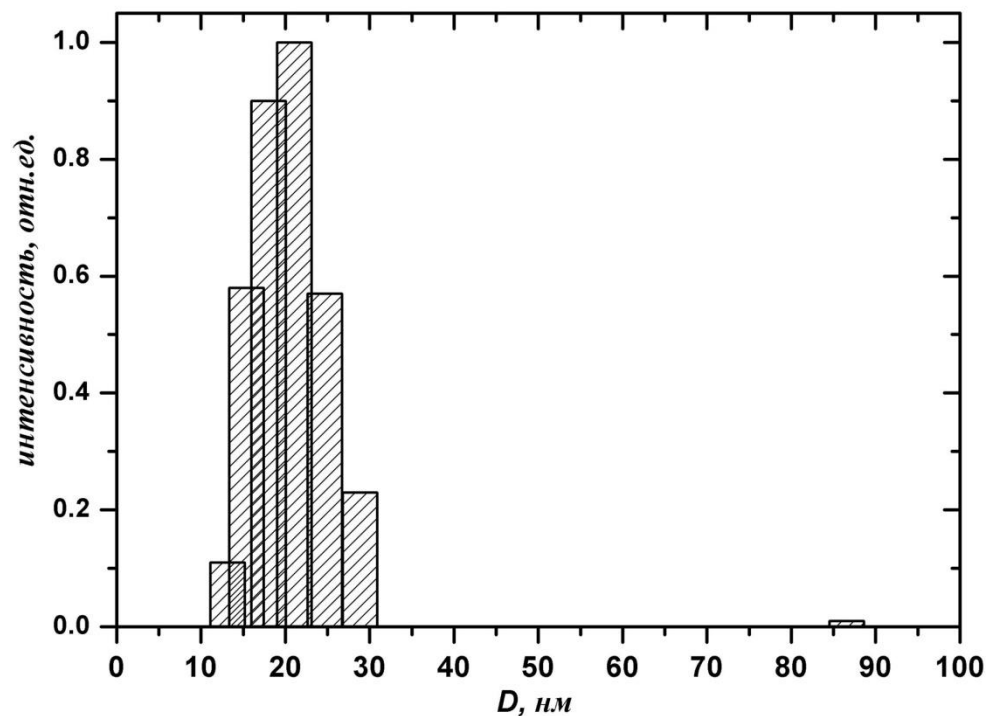
распределение частиц по размеру.

Средний размер частицы $D_h = 20 \text{ нм}$

Гидродинамический радиус $R_h = 10 \text{ нм}$

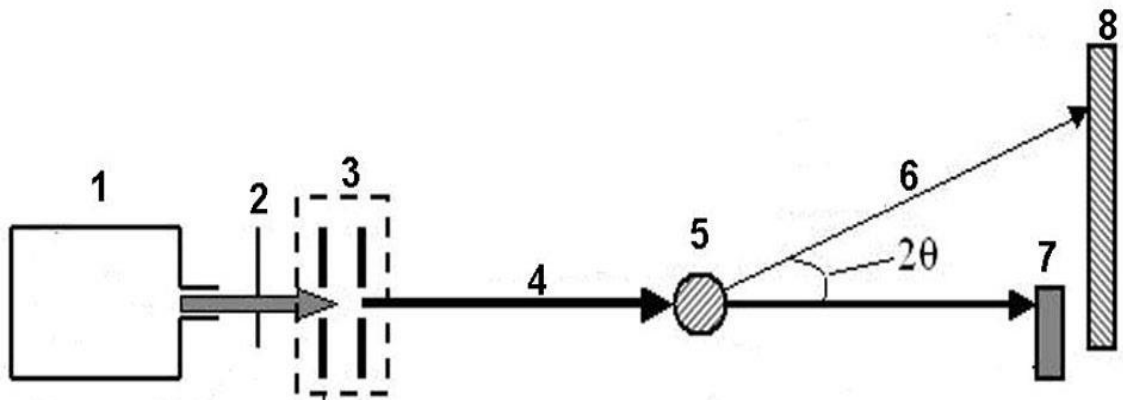
$\lambda = 632.8 \text{ нм}$, Температура $T = 23 \text{ C}$

ширина канала 3.9 мкс ; Скорость счета 200 кгЦ

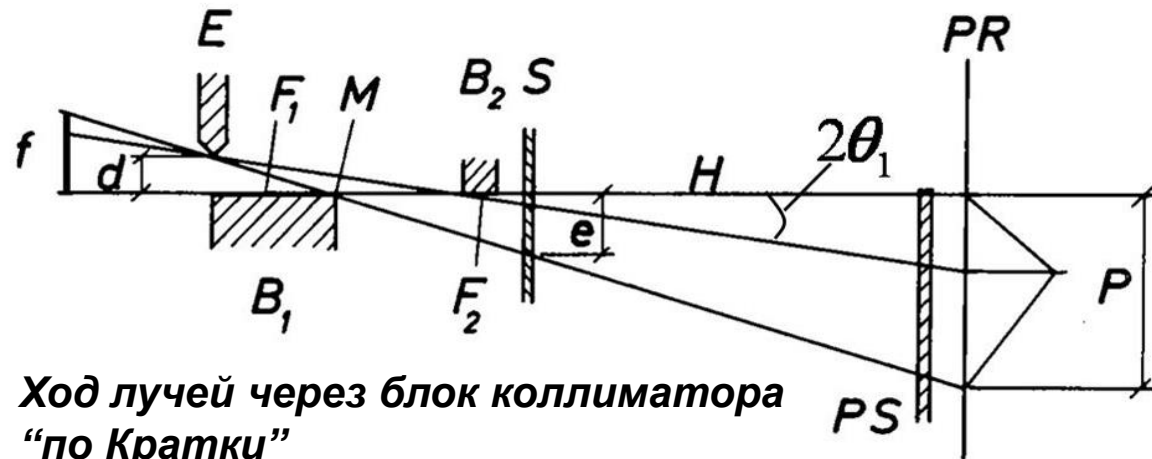


Малоугловой эксперимент

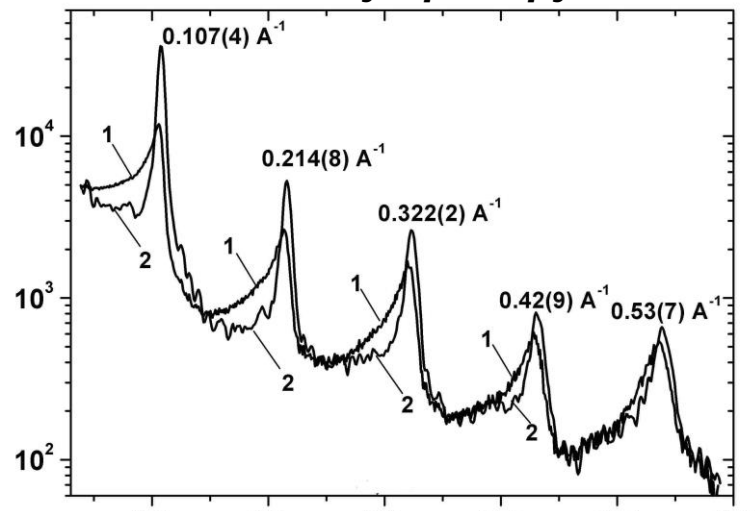
Схема малоуглового эксперимента, установка HECUS, при сканировании по углу при постоянной энергии падающего на образец монохроматического



- 1-источник рентгеновского излучения;
- 2 -фильтр Ni;
- 3 – формирователь луча “по Кратки”;
- 4 – Падающий на образец луч: (12 x 0.1) мм;
- 5 - образец;
- 6 - рассеянное излучение;
- 7 - стопор прямого пучка;



Операция редукии к Идеальному прибору



Ход лучей через блок коллиматора “по Кратки”

E, B1, B2– блоки формирования первичного пучка, H- нулевая плоскость, F1 , F2 – рабочие плоскости блоков облучаемые входящим пучком, S- образец (sample), PS-стопор прямого пучка (beam stop), PR – плоскость регистрации (plane of registration), P – профиль прямого пучка прошедшего через образец (e) .

Экспериментальные кривые рассеяния, полученные на лабораторной установке малоуглового рассеяния HECUS

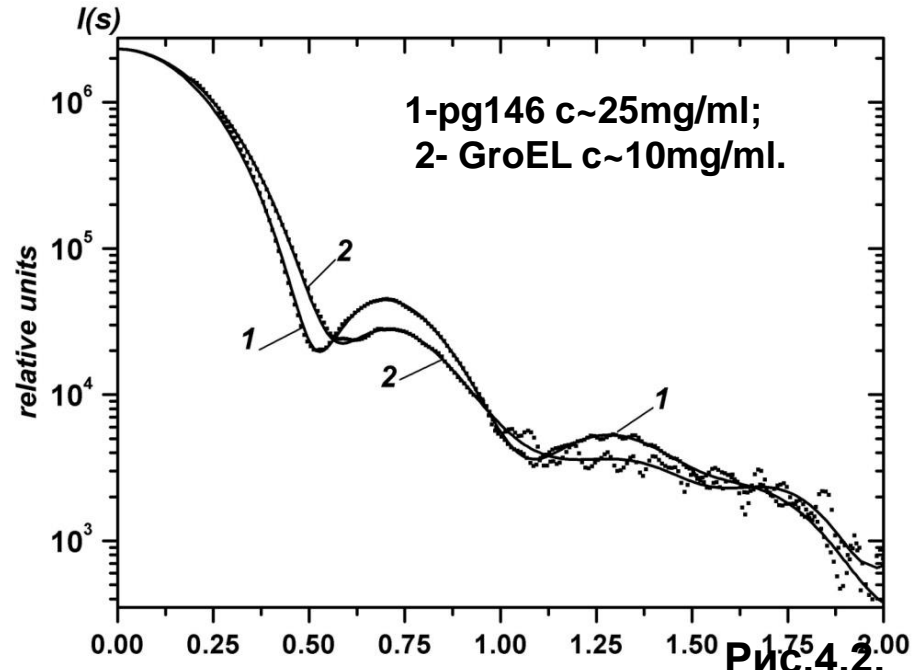
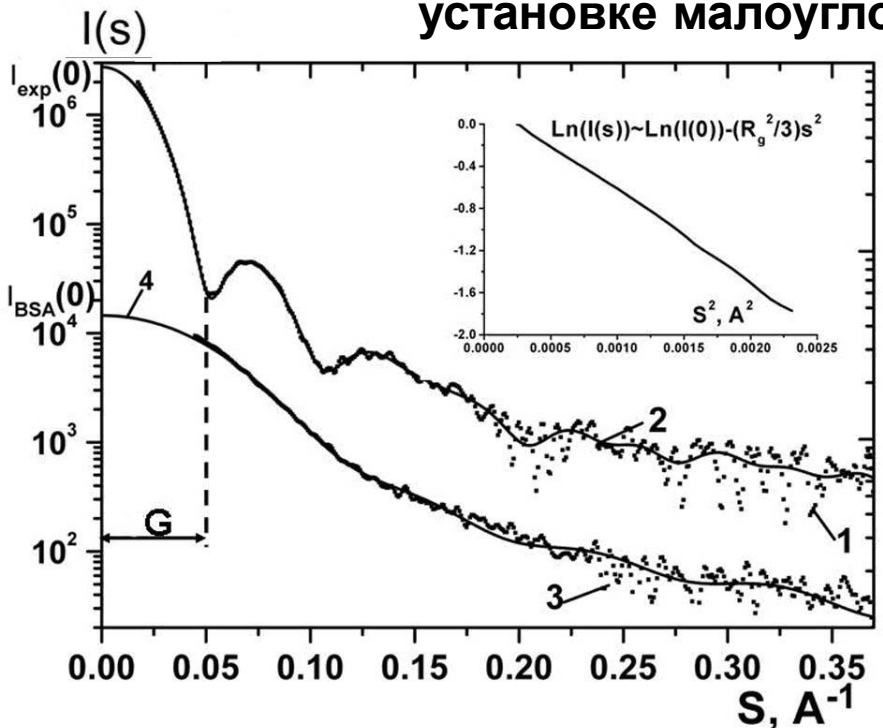


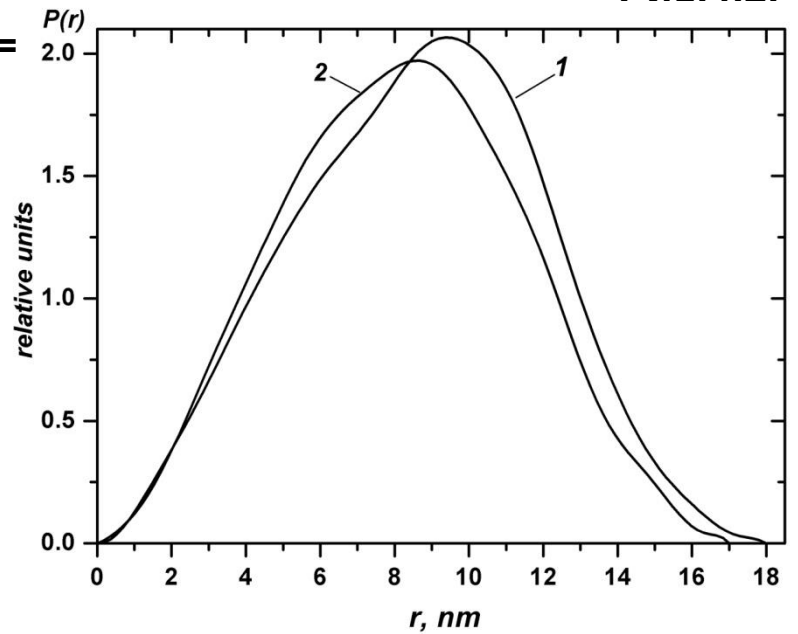
Рис. 4.2.

- 1-Экспериментальные точки МУР от раствора gp146 с $C = 18$ мг/мл в буфере с ADP, 2-сглаженная по РМНК;
- 2-кривая 1 с аппроксимацией в нулевой угол рассеяния;
- 3- Эксперимент от раствора BSA, $C = 1$ мг/мл;
- 4-сглаженная по РМНК кривая 3.

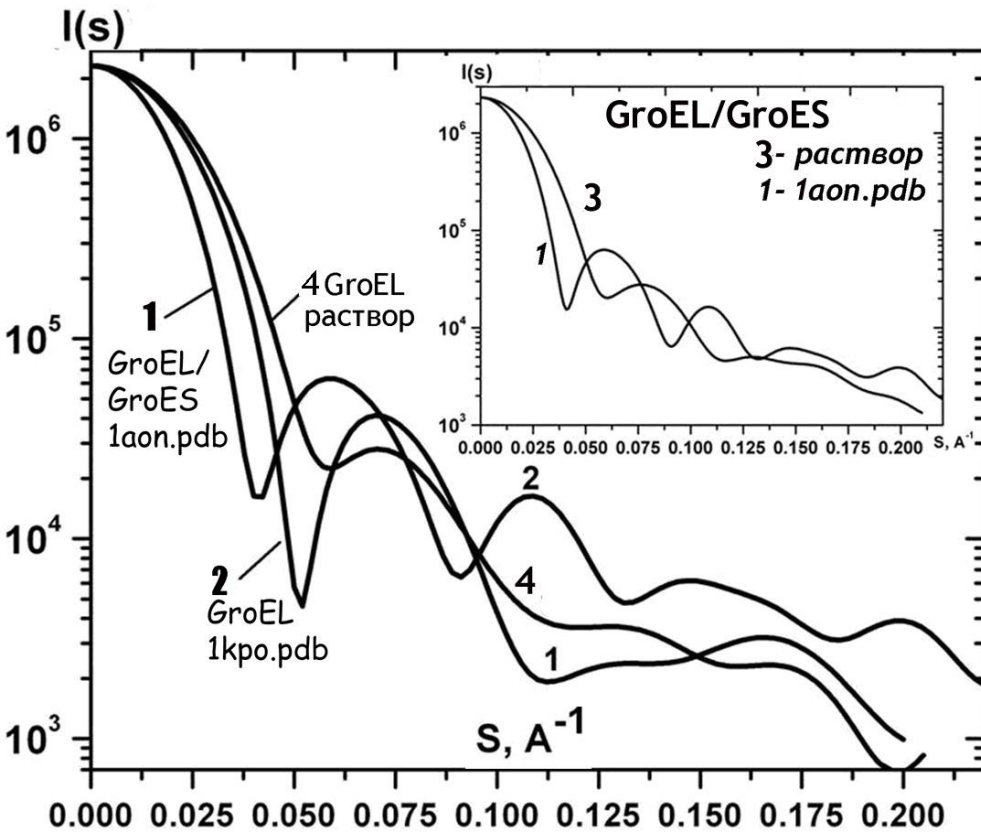
На вставке представлена кривая 1 в области Гинье (G)

$$M_{\text{exp}} = \frac{C_{BSA}}{C_{\text{exp}}} \cdot M_{BSA} \cdot \frac{I(0)_{\text{exp}}}{I(0)_{BSA}} = (830 \div 900) \text{ кДа}$$

Функция парных расстояний $P(r)$ внутри молекулы рассчитанная из экспериментальных кривых 1 - gp146; 2 – GroEL

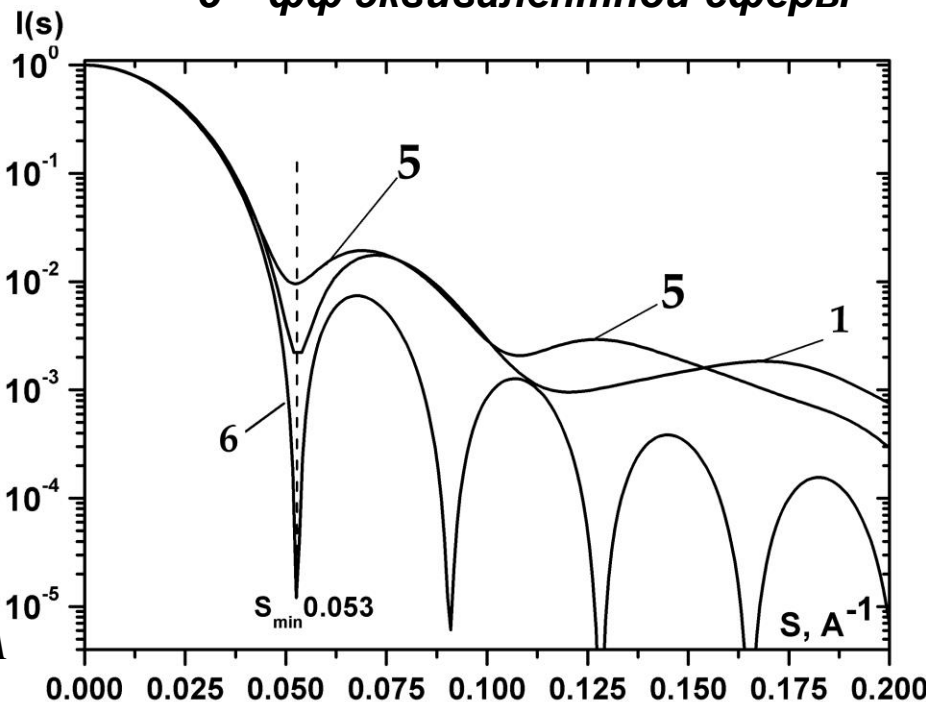


Сравнение радиусов инерции и максимальных размеров шаперонинов GroEL и комплекса GroEL/GroES с величинами, рассчитанными по известным структурам



белок	N	состояние	$R_g, \text{нм}$	$D_{max}, \text{нм}$
<i>gp146</i>	5	раствор	$6,7 \pm 0,2$	18,0 – 18,5
GroEL	1	кристалл	$6,8 \pm 0,2$	18,0 – 18,5
	3	раствор	$6,2 \pm 0,2$	17,0 – 17,5
GroEL/ GroES	2	кристалл	$8,3 \pm 0,3$	21,0 – 22,0
	4	раствор	$6,4 \pm 0,2$	17,5 – 18,5

6 – фф эквивалентной сферы



$$6 \rightarrow I(s) = \left(3 \frac{\sin(s R_{\min}) - sr \cos(s R_{\min})}{(s R_{\min})^3} \right)^2 = 0$$

$$\sin(s R_{\min}) - sr \cos(s R_{\min}) = 0 \mid : \cos(s R_{\min})$$

трансцендентное ур – е: $\text{tg}(s R_{\min}) = sr$

его корень $s_{\min} R_{\min} = 4.4934 \Rightarrow R_{\min} = \frac{4.5}{0.053 \text{A}^{-1}} = 85 \text{A}$

Поиск формы шаперонинов в растворе методом МУРР

Пусть из эксперимента получена кривая $I_{exp}(s)$

1 путь решения, через вычисление функции парных расстояний $P(r)$ используя РМНК.

Вычисление Max размера частицы из $P(D_{max})=0$.

Прямое моделирование в прямом пространстве, с размером области D_{max} .

Модифицированный метод случайного перебора Конфигураций – метод Метрополиса
Имитации отжига

Обычный путь - число параметров велико, форма более детализирована, но решение может быть неустойчиво

2 путь решения, через Выбор геометрической формы частицы и её параметрическое описание (a, b, c) .

Теоретическое вычисление Фурье $F(s)$ амплитуды и Интенсивности рассеяния Как функции $I(s, a, b, c)$.

Численный поиск параметров Модели (a, b, c) методом минимизации BFGS
 $\text{Min}(I(s, a_0, b_0, c_0) - I_{exp}(s))$

Предлагаемый подход устойчив, Модель описывается минимальным числом независимых параметров

Поиск функции парных расстояний по данным рассеяния: алгоритм регуляризованных наименьших квадратов (РМНК).

В методе регуляризации Тихонова ставятся два условия:

$$\begin{array}{l}
 \text{-минимизация невязки} \\
 \text{-минимизация нормы решения}
 \end{array}
 \left. \begin{array}{l}
 \|Ay - f\|_2^2 = \min_y \\
 \|y\|_2^2 = \min_y
 \end{array} \right\} \begin{array}{l}
 \text{Пространство Соболева} \\
 W_2^1[0, D_{\max}] \text{ с нормой} \\
 \|y\| = \left\{ \int_0^{D_{\max}} y^2(x) dx + \int_0^{D_{\max}} y'^2(x) dx \right\}^{1/2}
 \end{array}$$

вводится условие минимизации сглаживающего функционала:

$$\|Ay - f\|_2^2 + \alpha \|y\|_2^2 = \min_y \Phi[y, f];$$

$$\left\{ \begin{array}{l}
 \Phi_\alpha[p(r), I(s)] = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \frac{1}{\sigma_i^2} \left[I(s_i) - \int_0^{D_{\max}} p(r) \frac{\sin(s_i r)}{s_i r} dr \right]^2 + \alpha \int_0^{D_{\max}} \left[\frac{d p(r)}{d r} \right]^2 dr \\
 p(0) = 0, \quad p'(0) = 0, \quad p(D_{\max}) = 0, \quad p'(D_{\max}) = 0
 \end{array} \right.$$

Если α мало, то решение неустойчиво при $\alpha \rightarrow 0$ метод регуляризации Тихонова

переходит в (МНК) с минимальной невязкой $\|Ay - f\|_2^2 = \min$ и крайне неустойчивым

решением. С увеличением α , решение становится глаже и устойчивей, т.е.

Уменьшается норма решения $\|y\|_2^2$ но увеличивается невязка. Задача состоит в

оптимальном сочетании достаточной гладкости при допустимой невязке.

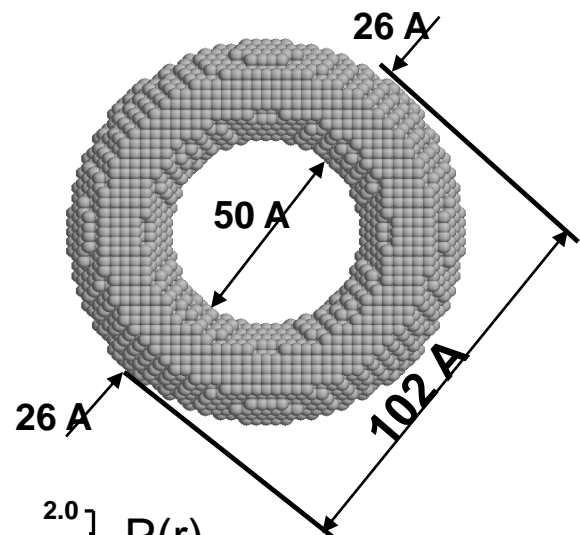
Решение обратной задачи рассеяния от шариковой модели.

Смоделированный из шариков

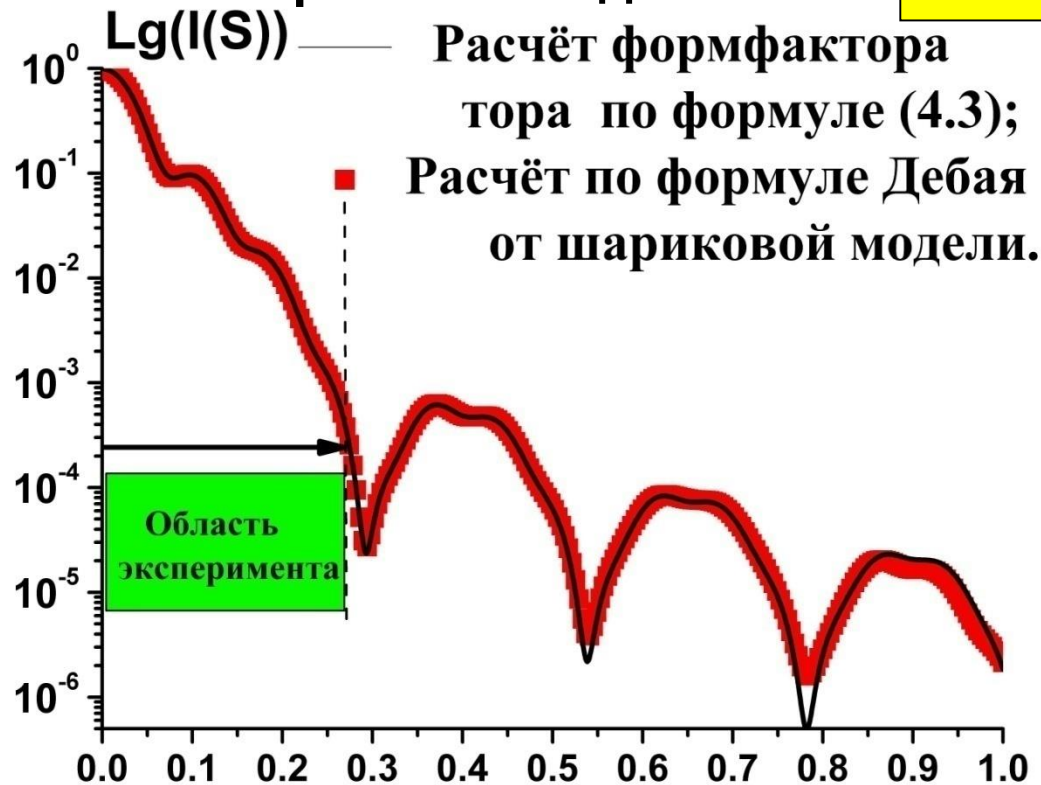
$$\text{тор: } (x-a)^2 + y^2 = r^2$$

При $a = 38 \text{ \AA}$, $(0 \leq r \leq 13) \text{ \AA}$

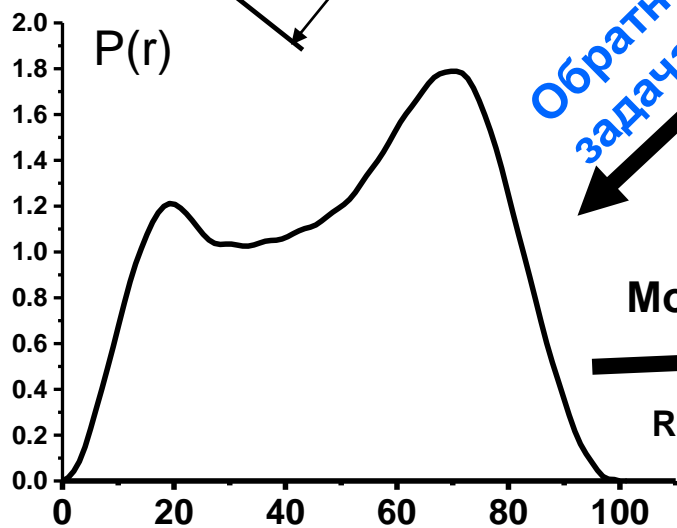
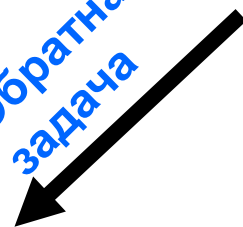
9212 шариков



Прямая
задача.



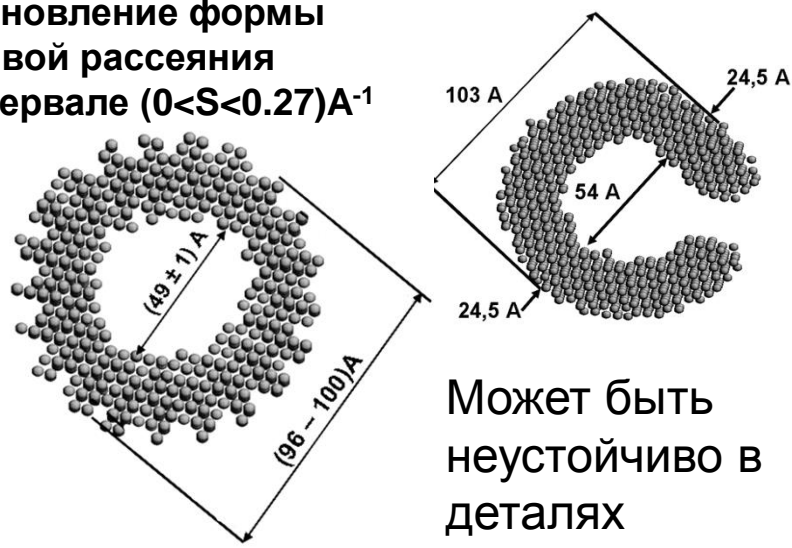
Обратная
задача



Моделирование



Восстановление формы
по кривой рассеяния
на интервале $(0 < S < 0.27) \text{ \AA}^{-1}$

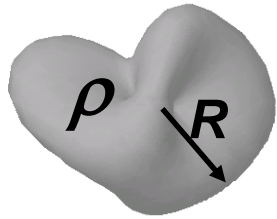


Может быть
неустойчиво в
деталях

Отметим, что параметризация формы шаперонинов через сферические гармоники не в состоянии передать особенности их структуры (отверстие)

Однородная частица

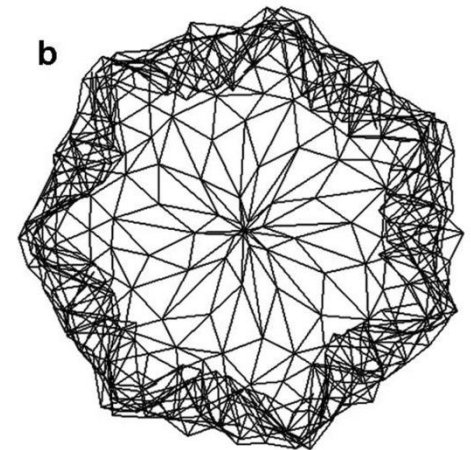
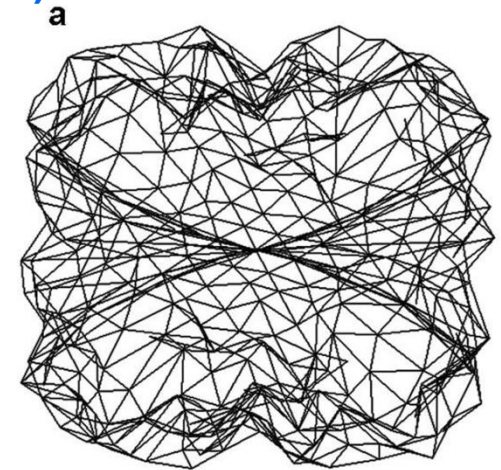
$$F(\omega) \cong F_L(\omega) = \sum_{l=0}^L \sum_{m=-l}^l f_{lm} \cdot Y_{lm}(\omega)$$



$$= f_{00} A_{00}(s) + f_{11} A_{11}(s) + \dots$$

$F(\omega)$ функция
Формы
поверхности

$$+ f_{20} A_{20}(s) + f_{22} A_{22}(s) + \dots$$



Пространственное разрешение $\delta = \pi R / (L + 1)$

R – радиус эквивалентной сферы.

Число параметров модели f_{lm} $2(L+1)$.

Можно ввести симметрию оставив соответствующие гармоники в сумме

Модель поверхности, шаперонина GroEL
Вычислена из экспериментальной кривой рассеяния (см, кривая 2 предыдущий слайд), как суперпозиция $L = 15$ сферических гармоник: а – сбоку; б – вид А (сбоку).

Параметрическое описание формы частицы, с параметрами a,b,c.

Пусть задан единичный потенциал в области

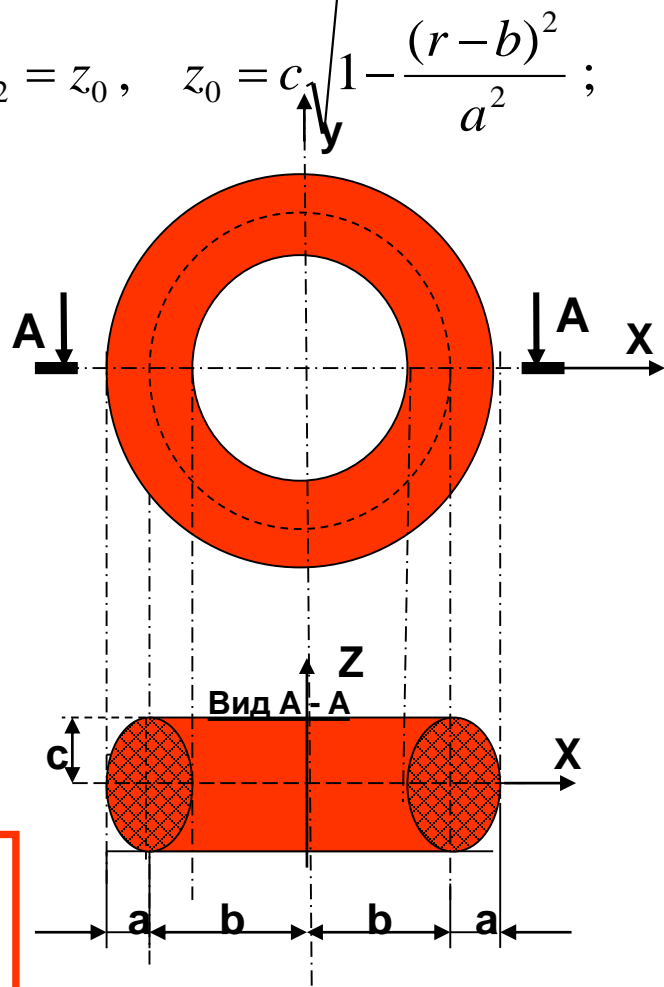
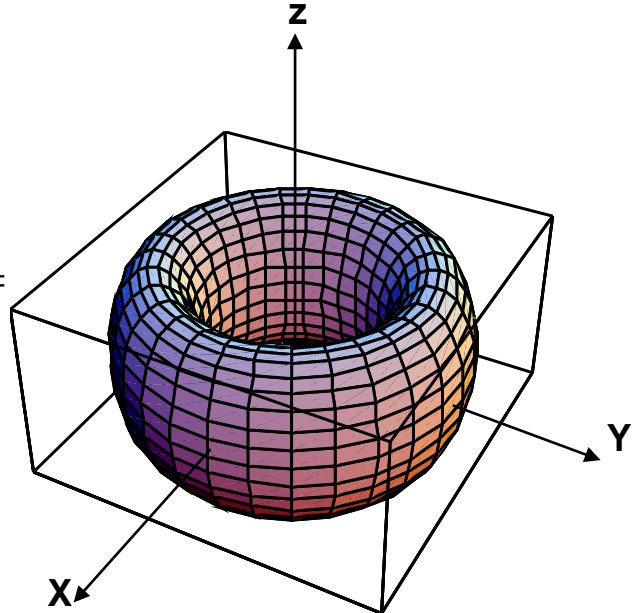
$$U(r) : \begin{cases} 1 & \vec{r} \notin V' \\ 0 & \vec{r} \in V' \end{cases}$$

$$LnI(s) \cong 1 - \frac{R_g^2 s^2}{3}$$

Радиус инерции, приближение Гинье.

$$V' \in \frac{(r-b)^2}{a^2} + \frac{z^2}{c^2} \leq 1; \quad b-a \leq r \leq b+a; \quad z_1 = -z_0, \quad z_2 = z_0, \quad z_0 = c \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{a^2}};$$

$$R_g^2 = \frac{\int_{V'} (r^2 + z^2) \rho_e(r, z) dV}{\int_{V'} \rho_e(r, z) dV} = \frac{3a^2 + c^2}{4} + b^2;$$

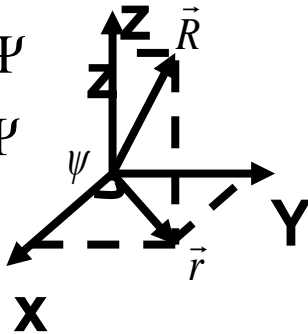


$$LnI(s) = 1 - \frac{R_g^2 s^2}{3} = 1 - \left(\frac{3a^2 + c^2}{4} + b^2 \right) \frac{s^2}{3} \quad (2.1);$$

Известное точное выражения форм-фактора тора.

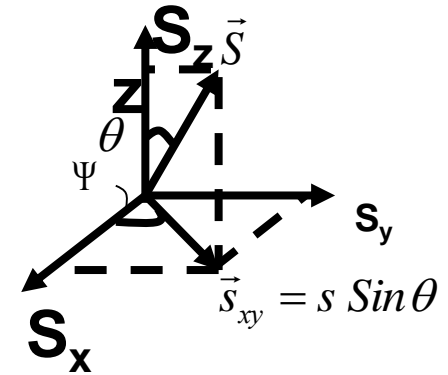
используем цилиндрические координаты.

В прямом пространстве:

$$\vec{s}: \begin{cases} s_x = s_{xy} \cos \Psi \\ s_y = s_{xy} \sin \Psi \\ s_z = s_z \end{cases}$$


В обратном пространстве:

$$\vec{R}: \begin{cases} x = r \cos \psi \\ y = r \sin \psi \\ z = z \end{cases}$$



$$\vec{s}_{xy} = s \sin \theta$$

Фурье амплитуда рассеяния для эллиптического тора:

$$F(r, \alpha, z) = \frac{1}{V'} \iiint_{V'} e^{i(rs_{xy} \cos \alpha + z s_z)} r dr d\alpha dz = \frac{2\pi}{2\pi^2 abc} \int_{b-a}^{b+a} \int_{z_1}^{z_2} e^{iz s_z} J_0(rs_{xy}) dz r dr = \frac{1}{\pi abc} \int_{b-a}^{b+a} \left\{ \int_{-z_0}^{z_0} e^{iz s_z} dz \right\} J_0(rs_{xy}) r dr =$$

$$= \frac{1}{\pi abc} \int_{b-a}^{b+a} \left\{ \frac{2}{s_z} \sin(s_z z_0) \right\} J_0(rs_{xy}) r dr = \frac{1}{\pi abc} \cdot \frac{2}{s \cos \theta} \int_{b-a}^{b+a} \sin \left(s \cdot c \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{a^2}} \cdot \cos \theta \right) J_0(rs \sin \theta) r dr \quad (2.2);$$

Точное выражение для форм-фактора эллиптического тора:

$$\langle \Phi(sa, sb) \rangle_{\theta} = \int_{-\frac{\pi}{2}}^{\frac{\pi}{2}} |F(r, \alpha, z)|^2 \sin \theta d\theta;$$

$$\langle \Phi(sa, sb) \rangle_{\theta} = \left(\frac{2}{\pi abc s} \right)^2 \int_0^{\frac{\pi}{2}} \frac{1}{\cos^2 \theta} \left\{ \int_{b-a}^{b+a} \sin \left(s \cdot c \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{a^2}} \cos \theta \right) J_0(s \cdot r \sin \theta) r dr \right\}^2 \sin \theta d\theta$$

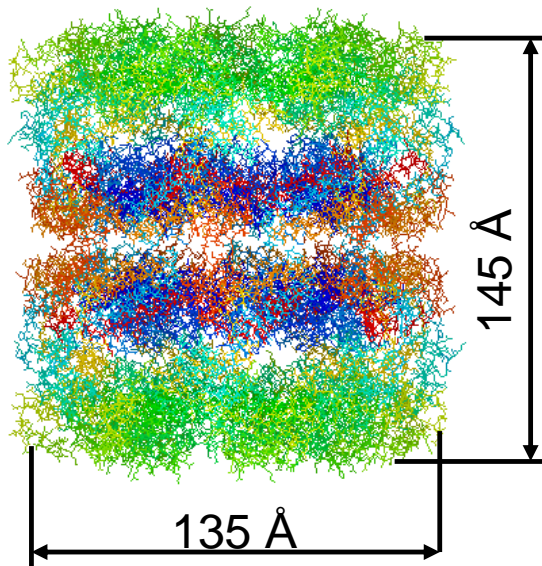
Takeshi Kawaguchi J. Apple. Cyst.
(2001).34, 580 - 584

Точное выражение имеет следующие недостатки:

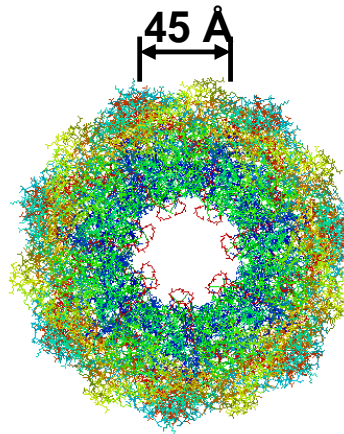
1. Использование этого выражения требует много машинного времени
2. из него затруднительно вычислить приближение Гинье и закон Порода.

Использование форм-фактора тора для решение прямой и обратной задач рассеяния для шаперона GroEL

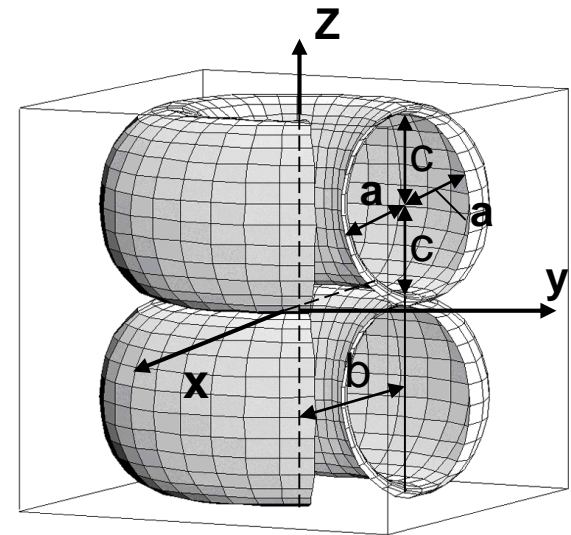
Вид сбоку



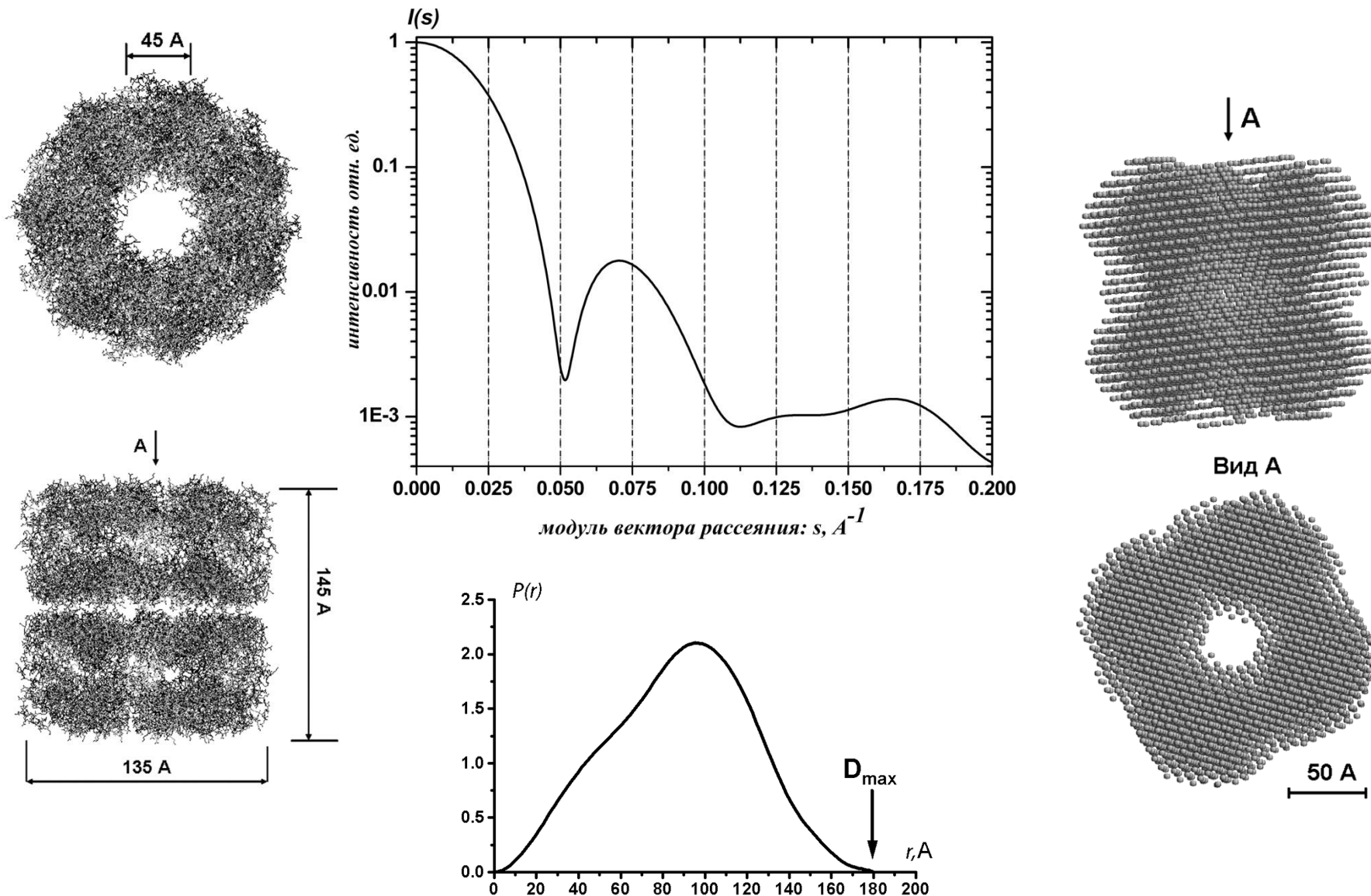
Вид сверху



Модель GroEL



Шариковая модель, восстановление формы частицы, на примере GroEL как решение обратной задачи рассеяния.



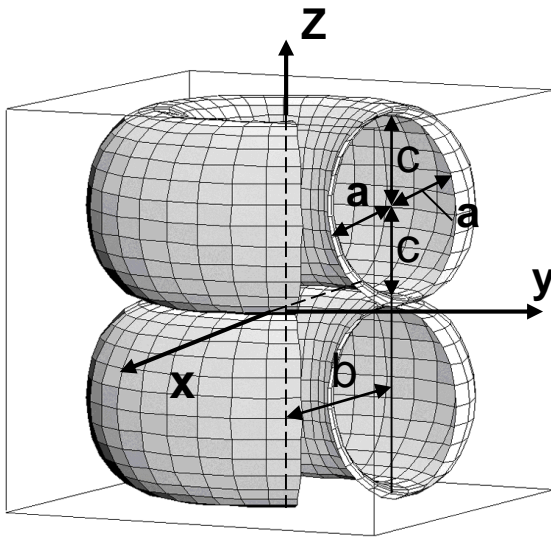
Вывод форм-фактора шаперона как **сдвоенного эллиптического тора** из форм-фактора одиночного тора

Фурье амплитуда:

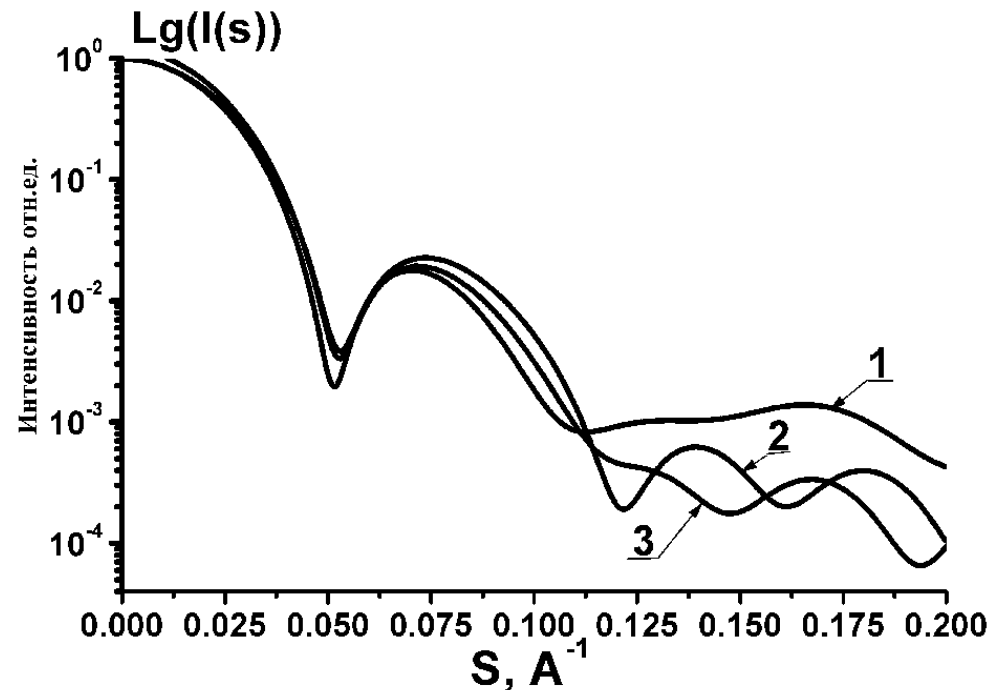
$$\Phi(s, \theta) = \frac{1}{\pi abc} \int_{b-a}^{b+a} \left\{ \int_{-z_1}^{z_1} e^{izs_z} dz + \int_{-z_2}^{z_2} e^{izs_z} dz \right\} J_0(rs_{xy}) r dr \quad \text{где} \quad \begin{cases} z_1 \\ z_2 \end{cases} = c(1 \pm \delta), \quad \delta = \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{a^2}}$$

$$I(s) = \int_0^{\pi/2} |\Phi(sa, sb, \theta)|^2 \sin \theta d\theta;$$

Модель GroEL

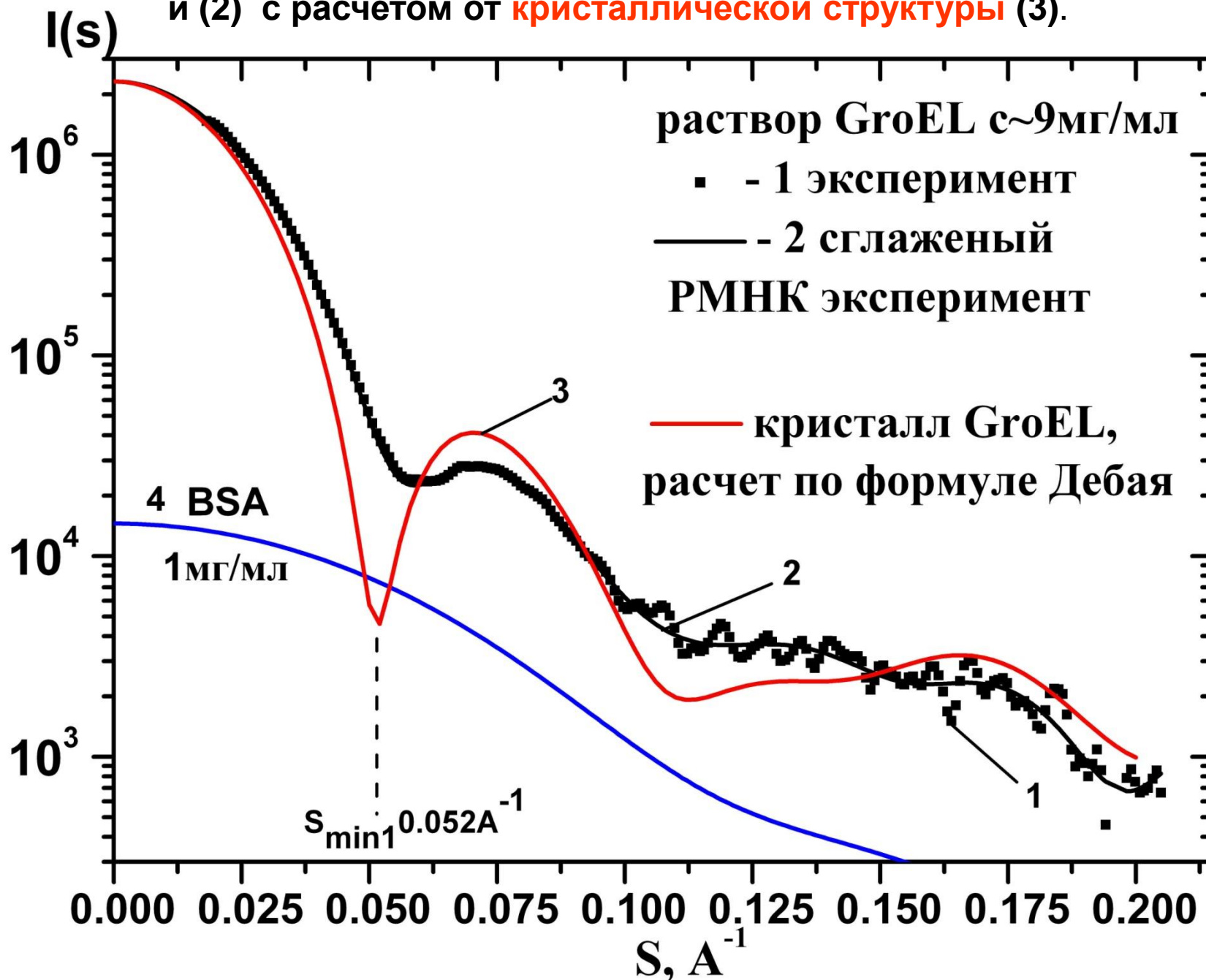


$$I(s) = \left(\frac{2}{\pi abc s} \right)^2 \int_0^{\pi/2} \frac{1}{\cos^2 \theta} \left[\int_{b-a}^{b+a} \left\{ \sin(sc(1+\delta)\cos\theta) + \sin(sc(1-\delta)\cos\theta) \right\} J_0(sr \sin \theta) r dr \right]^2 \sin \theta d\theta \quad (3.1).$$

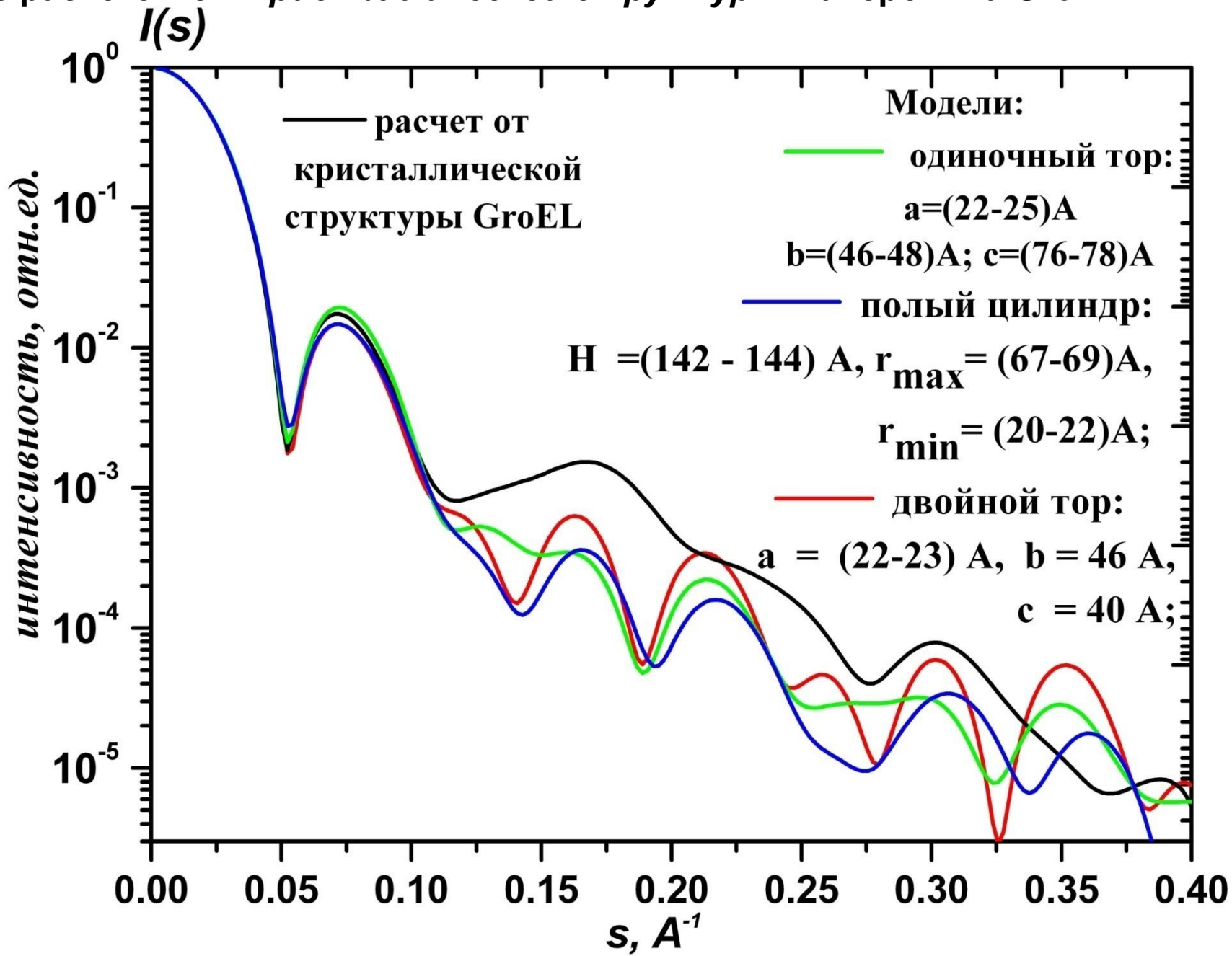


- 1-кривая МУР по формуле Дебая см.(3.6), от атомной структуры молекулы белка GroEL;
 2- кривая от двойного тора (3.1),
 3- рассеяние от фф полого цилиндра, см. формула (2.6).

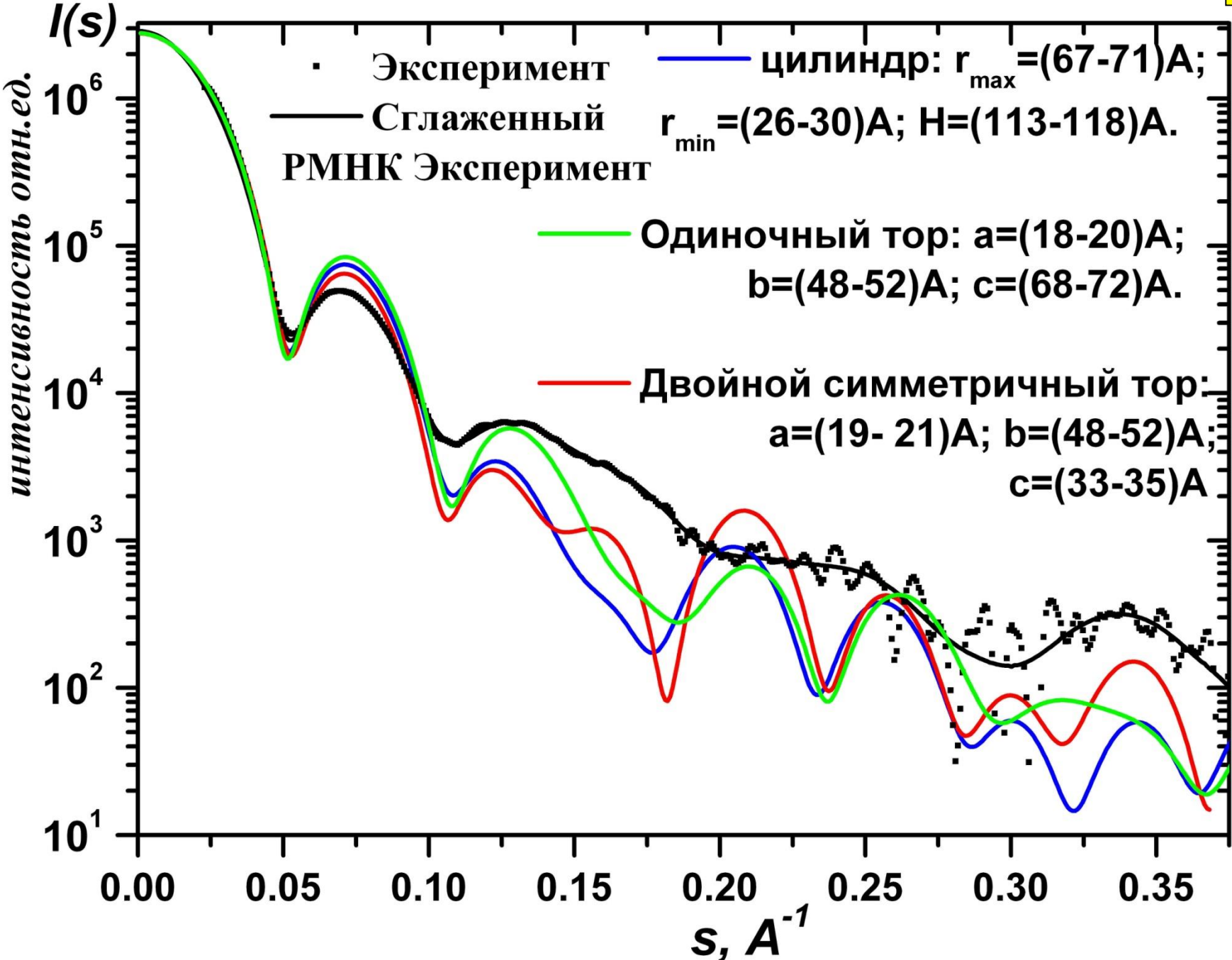
Сравнение экспериментальной кривой МУР от GroEL в растворе (1)
и (2) с расчетом от **кристаллической структуры** (3).

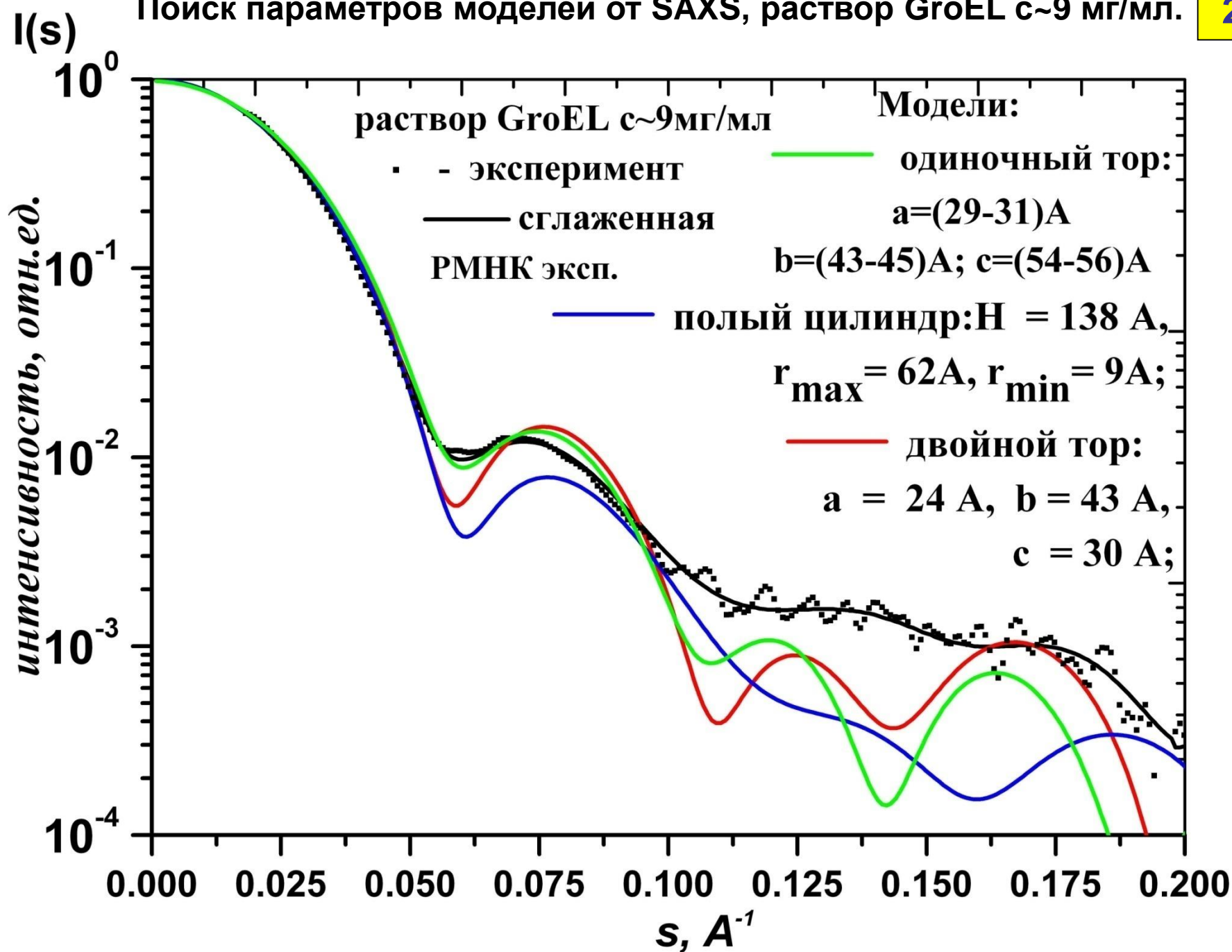


Сравнение параметров модели по кривой малоуглового рассеяния, с расчетом от кристаллической структуры шаперонина GroEL.



Поиск параметров моделей от SAXS раствор гр 146 с~25 мг/мл.



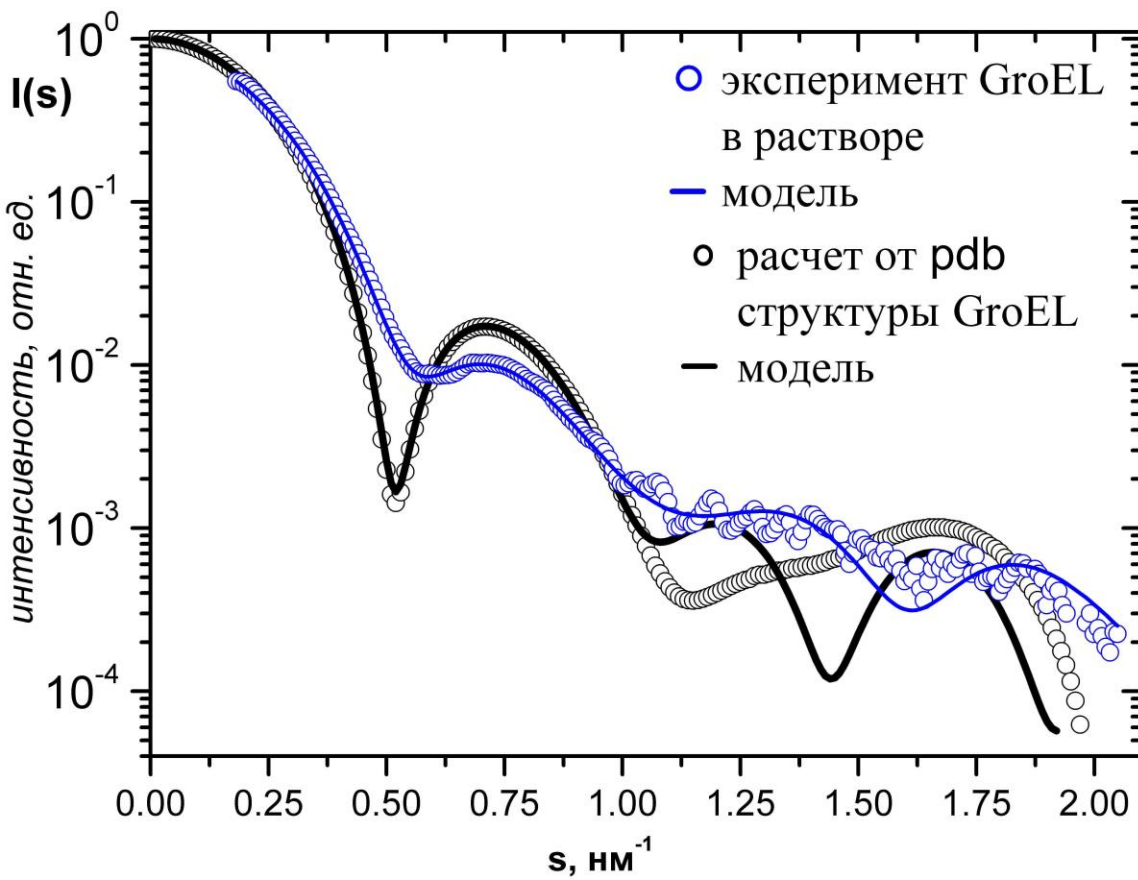


Численный поиск параметров $p_i, i=(1, \dots, n)$
 модели одним из методов минимизации (BFGS) $\min(I(s, a, b, c, \dots) - I_{\text{exp}}(s))$ в случае дробной размерности $2.5 < D < 3$

$$I_{\text{mod}}(s) = \langle \Phi(s, \Omega) \rangle_{\Omega} = \frac{N}{V'} \left\langle \left[\int_{V'} \rho_e(r) \exp i(s, r) dV' \right]^2 \right\rangle_{\Omega}$$

$$d\rho_b(r) = \frac{2^{3-D} \Gamma(3/2)}{\Gamma(D/2)} \cdot |\rho|^{D-3} dV$$

$$I(s)_{\text{mod}} = \left(\frac{2}{\pi a b c s} \right)^2 \int_0^{\pi/2} \frac{1}{\cos^2 \theta} \left[\int_{b-a}^{b+a} (\sin(sc(1+\delta)\cos\theta) - \sin(sc(1-\delta)\cos\theta)) J_0(sr \sin\theta) r^{D-2} dr \right]^2 \sin\theta d\theta$$



$$\delta = \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{a^2}}$$

**Геометрические
 параметры
 моделей
 макромолекулы
 GroEL:**

$$a = 2.7 \text{ нм}$$

$$b = 5.6 \text{ нм}$$

$$c = 2.9 \text{ нм}$$

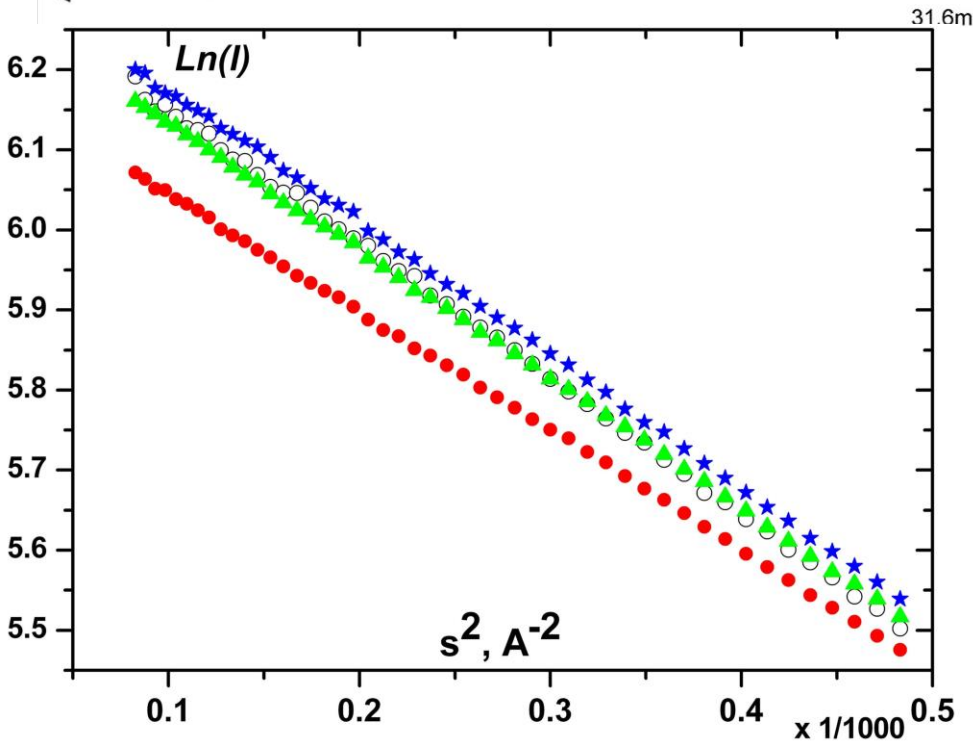
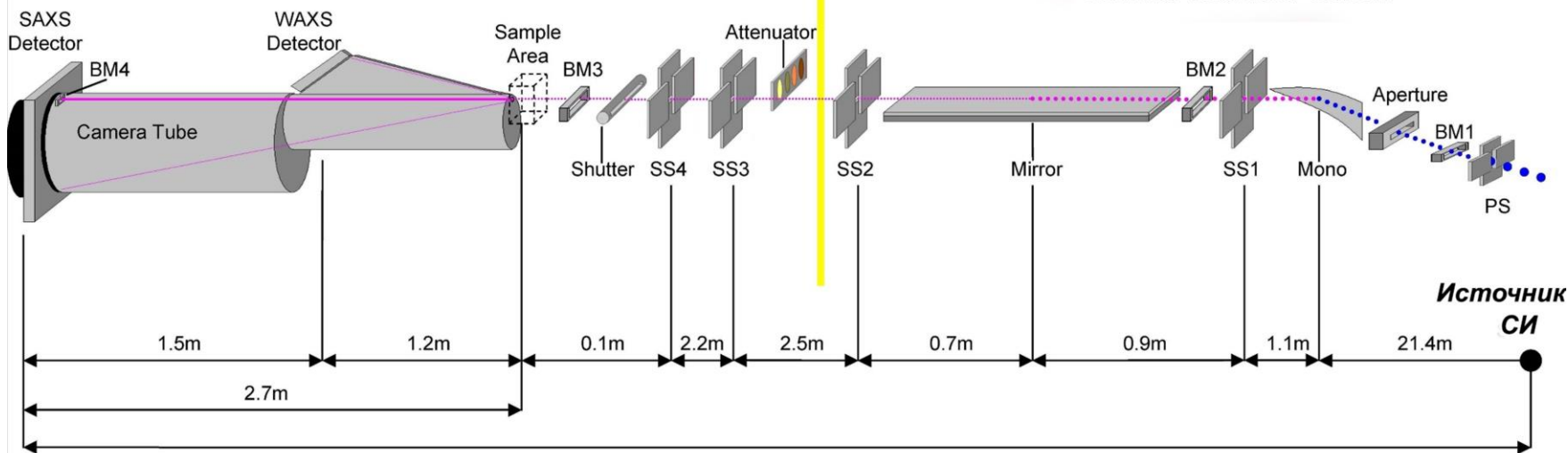
$$a = 2.3 \text{ нм}$$

$$b = 4.5 \text{ нм}$$

$$c = 4.1 \text{ нм}$$

SAXS эксперимент на СИ накопителя DORIS г. Гамбург, Станция X33

Экспериментальный блок



Концентрационная зависимость в области Гинье для растворов белка gr146

- ★ - 1,4 mg/ml - $R_g=76,9\text{A}$ (100%)
- - 3,8 mg/ml - 76,8A;
- ▲ - 8,8 mg/ml - 76,3A;
- - 17,6 mg/ml - 75,3A (97,9%).

Поиск различных конформаций вирусного шаперонина gp146 в растворе.

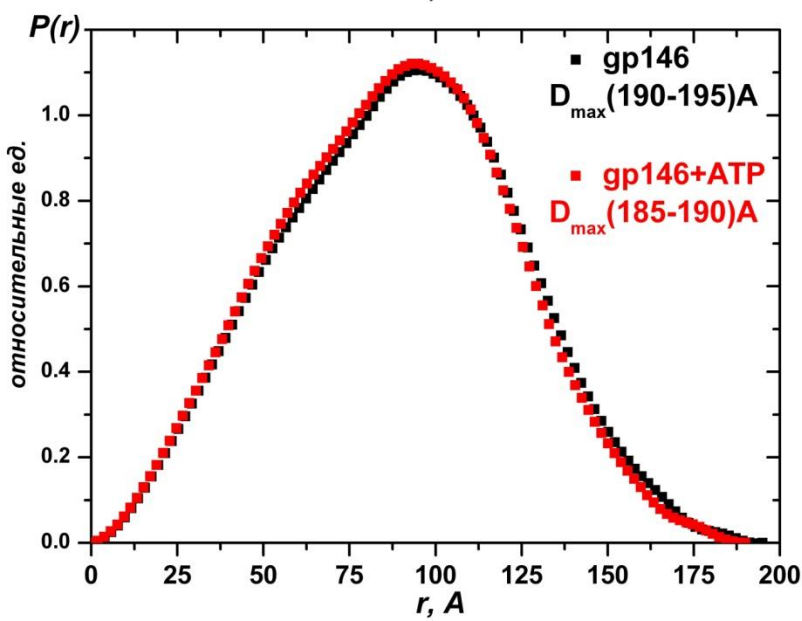
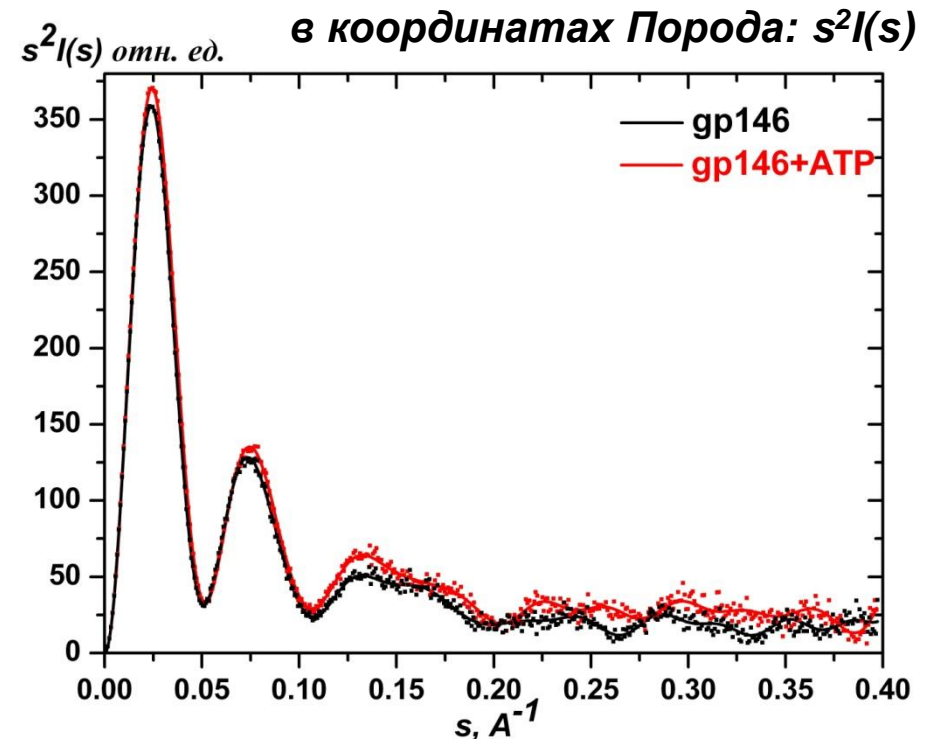
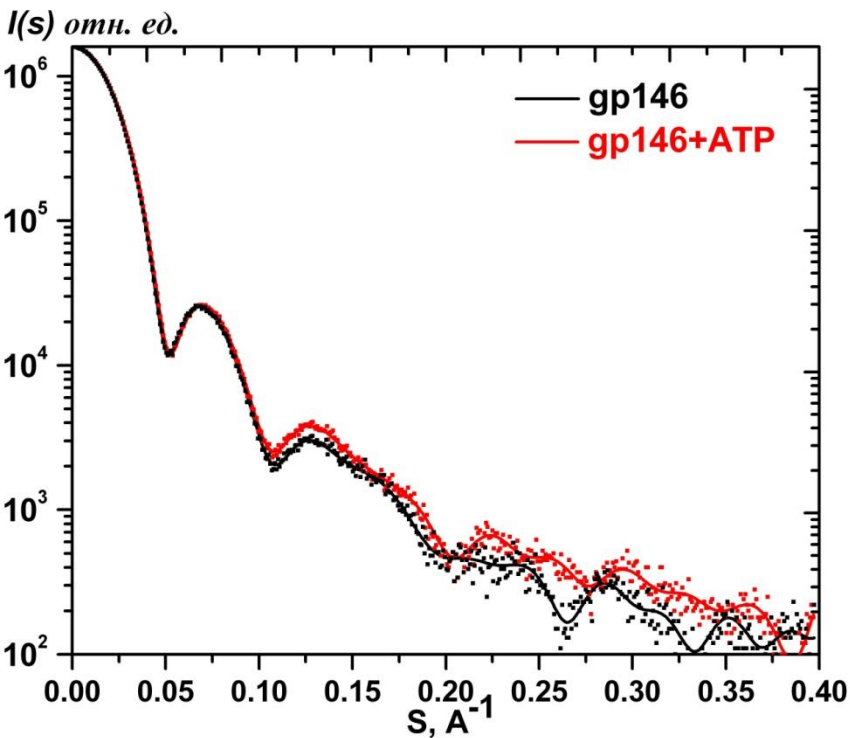


Рис.5.1

экспериментальные кривые малоуглового
рассеяния раствора gp146

черная – от раствора gp146 в «ИСХОДНОМ»
буфере: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl,;

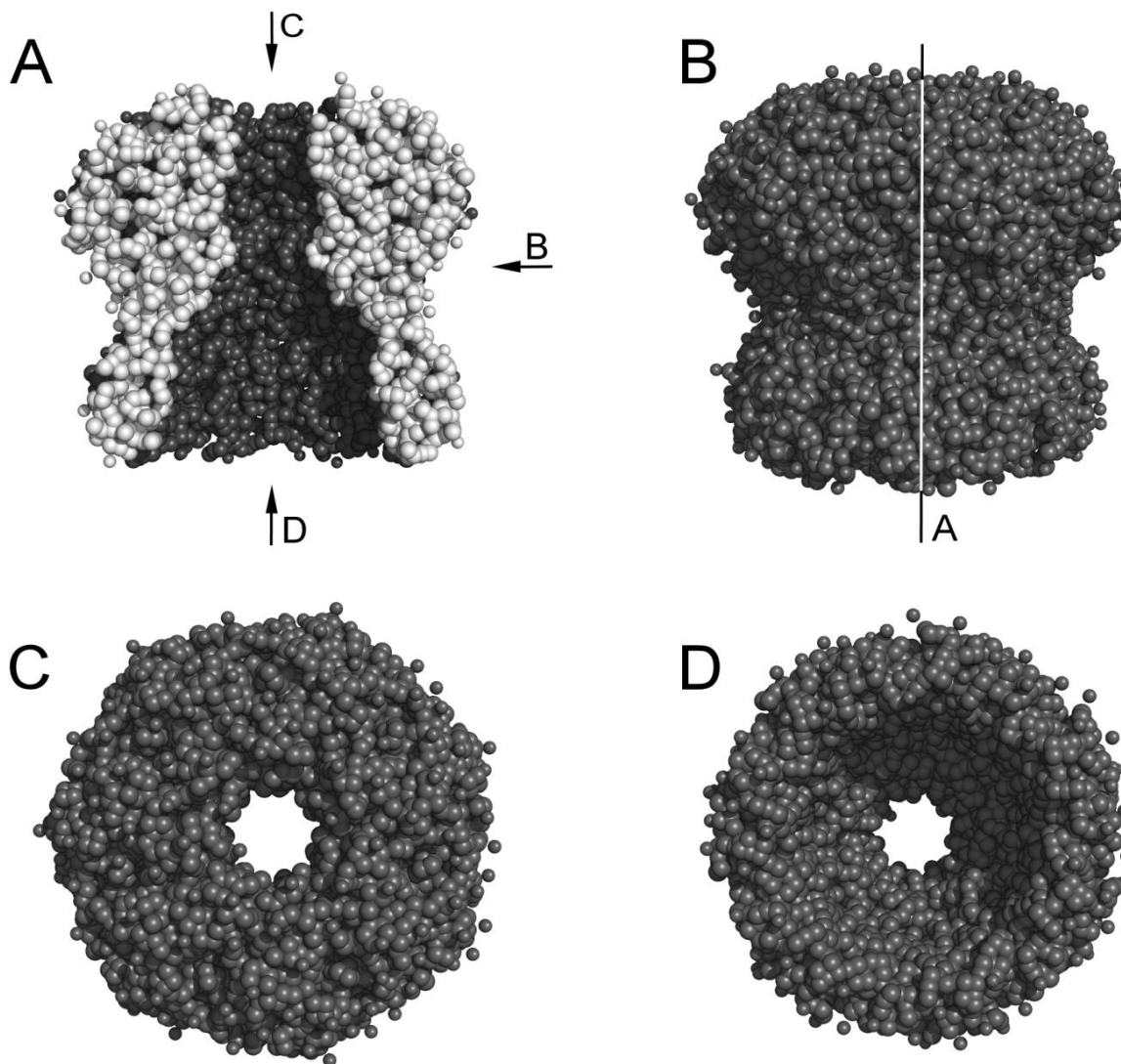
красная – от раствора gp146 в «ИСХОДНОМ»
буфере с добавлением 3 mM **АТР**;

концентрация белка в растворе ~ 25 mg/ml,.

P(r) функции парных расстояний ,

рассчитанная РМНК

Моделирование аминокислотными остатками белка
gp146 в «исходном» буфере вид А “частично открытая форма» в разрезе,
В-вид сбоку, С - вид сверху, D - вид снизу.



Обобщение ранее полученных Формфакторов на случай форм-фактора двойного эллиптического несимметричного тора - 5 параметров модели.

$$I(s)_{tt} = \left(\frac{2}{\pi a b c s} \right)^2 \int_0^{\pi/2} \frac{1}{\cos^2 \theta} \left\{ \int_{b-a_1}^{b+a_1} \left[F_1(sc_1, \delta_1(r), \theta) r dr + \right. \right. \\ \left. \left. + \int_{b-a_2}^{b+a_2} F_2(sc_1, \delta_2(r), \theta) r dr \right] \sin \theta d\theta; \quad F_1(sc_1, \delta_1(r), \theta) = \sin(sc_1(1 + \delta_1)\cos \theta) \cdot J_0(sr \sin \theta) \right. \\ \left. F_2(sc_1, \delta_2(r), \theta) = \sin(sc_2(1 - \delta_2)\cos \theta) \cdot J_0(sr \sin \theta) \right.$$

$$\delta_{1,2} = \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{(a_{1,2})^2}};$$

gr146, модель –
несимметричные торы

$$b = 50A$$

$$c_1 = 40A$$

$$a_1 = 11A$$

$$a_2 = c_2 = 30A$$

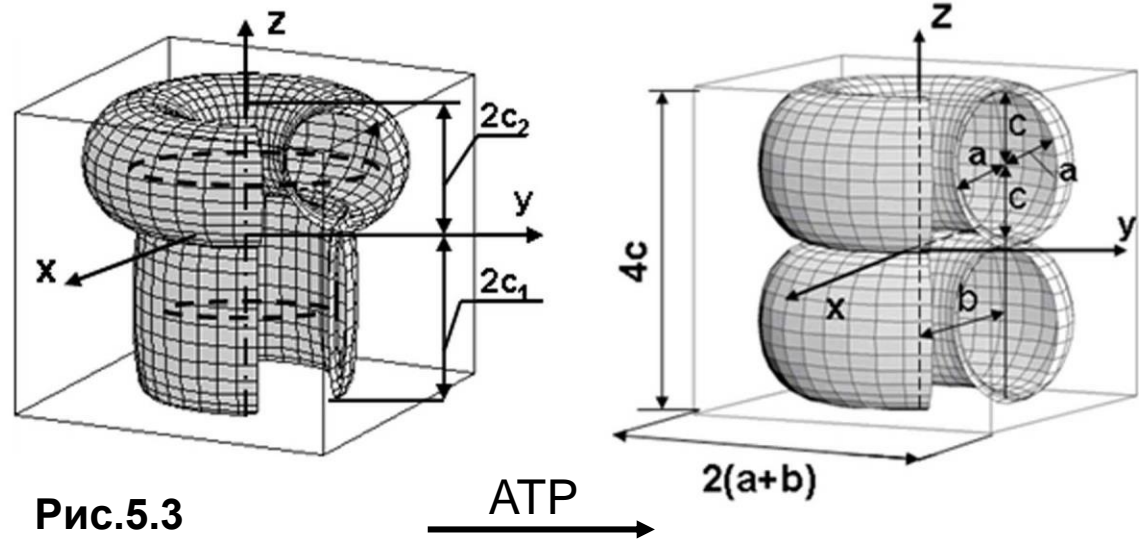
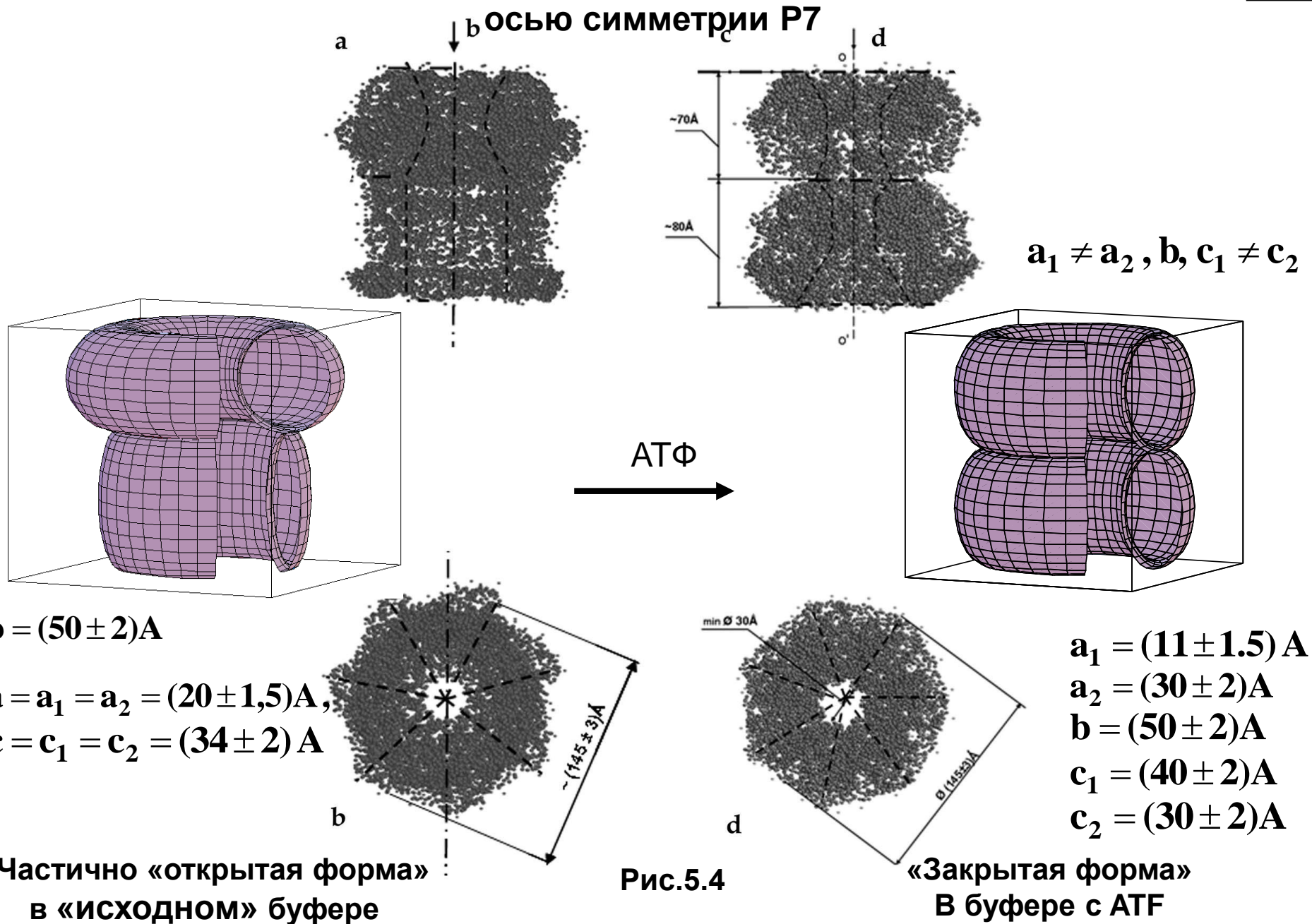


Рис.5.3

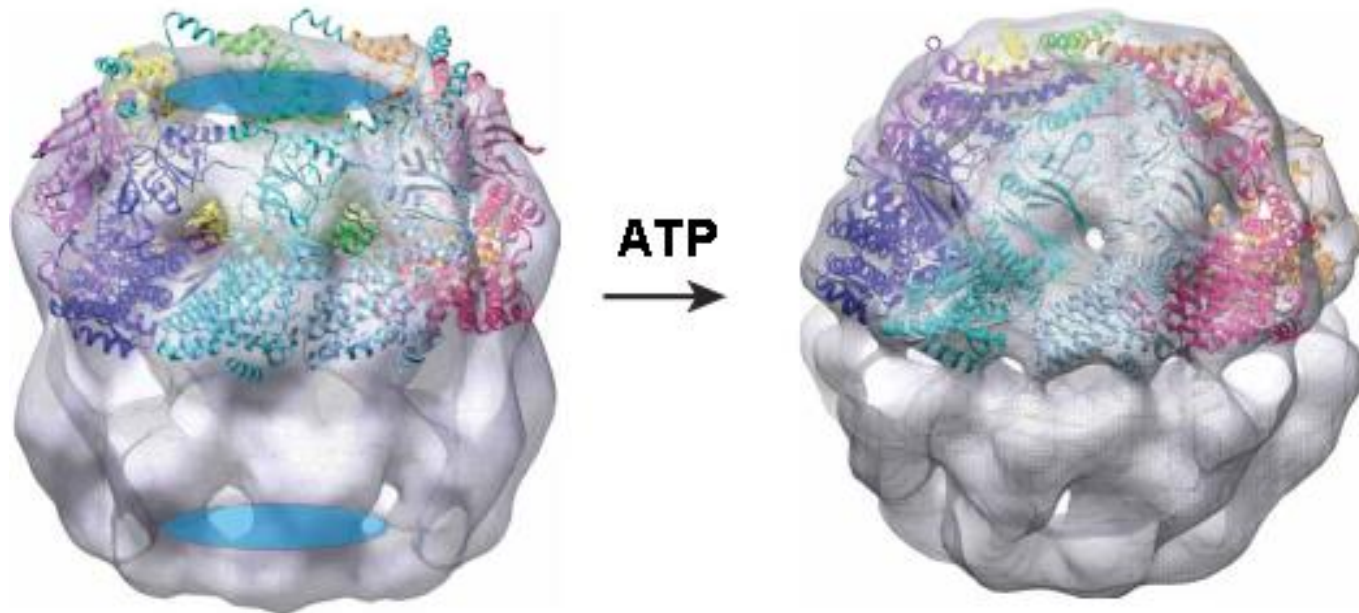
«исходный» буфер
открытое состояние

«исходный» + АТР
закрытое состояние

Моделирование шаперонина gr146 аминокислотными остатками с осью симметрии P7



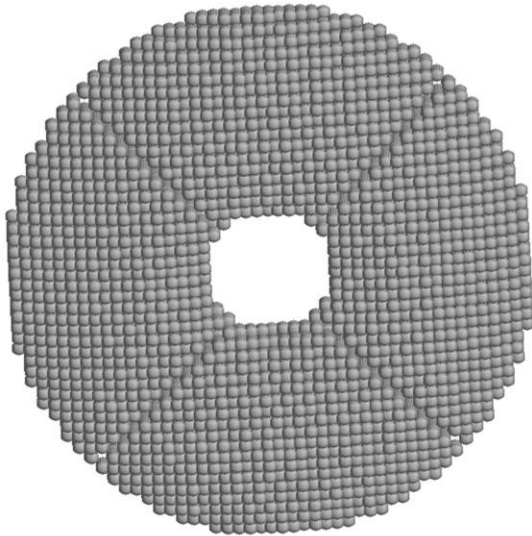
Шаперонины группы II не имеют ко-шаперонина, но апикальные домены несут выступы, способные принять конформацию, при которой внутренняя полость будет закрыта



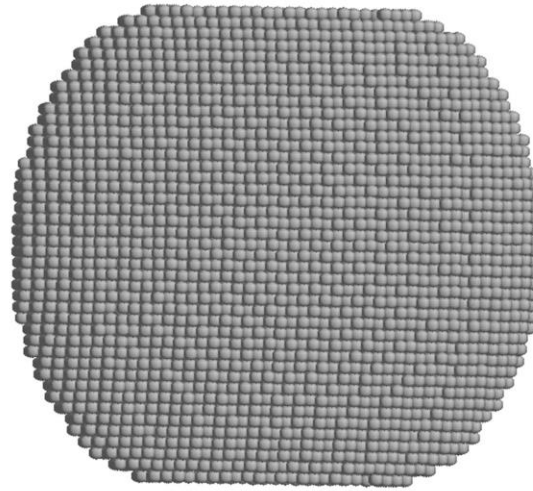
Изменения, происходящие с ССТ при добавлении АТР. Происходит изменение положения и конформации доменов, и комплекс из открытой формы переходит в закрытую [Banach et al, 2009].

Модель закрытой конформации

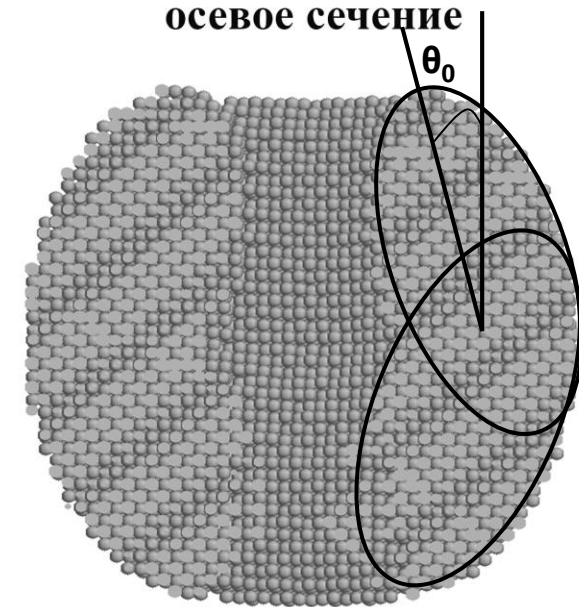
Вид сверху



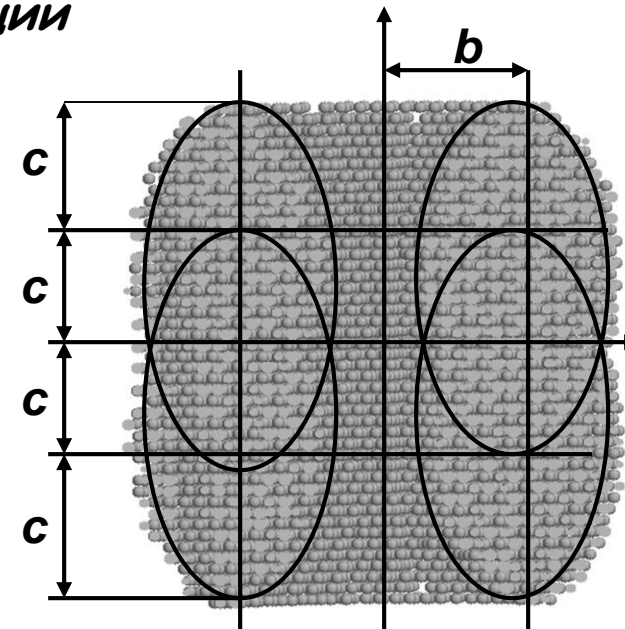
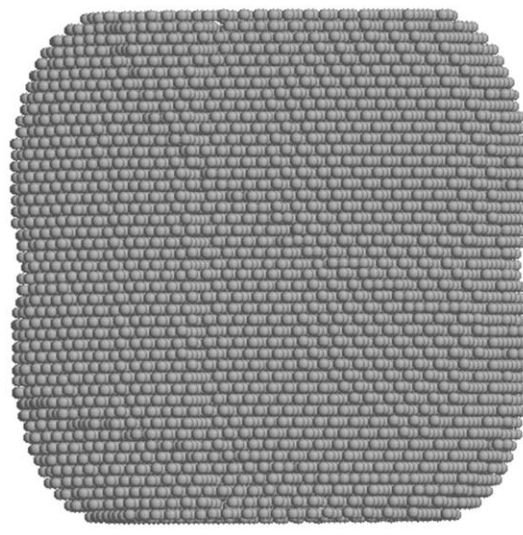
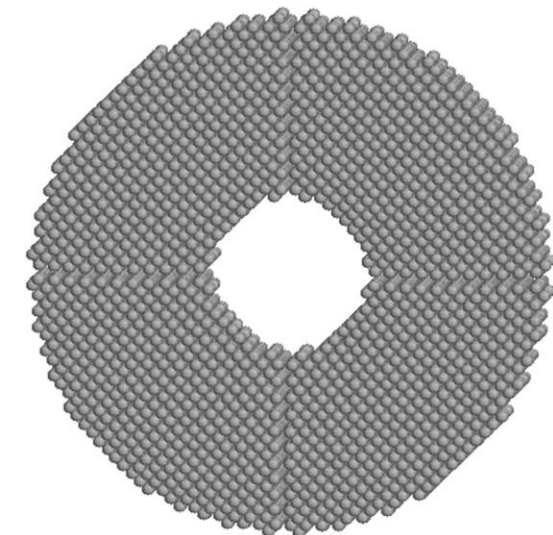
Вид сбоку

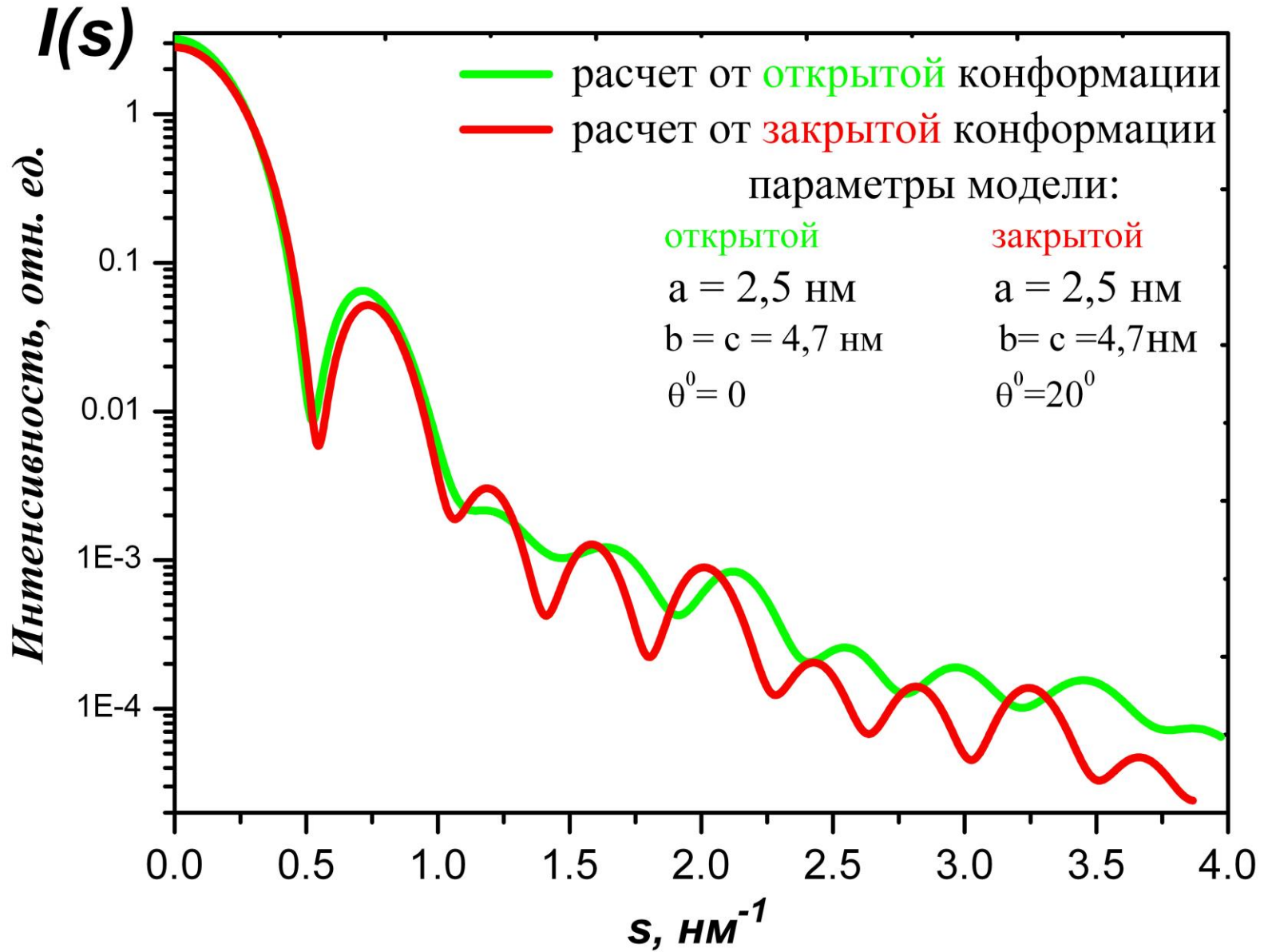


осевое сечение

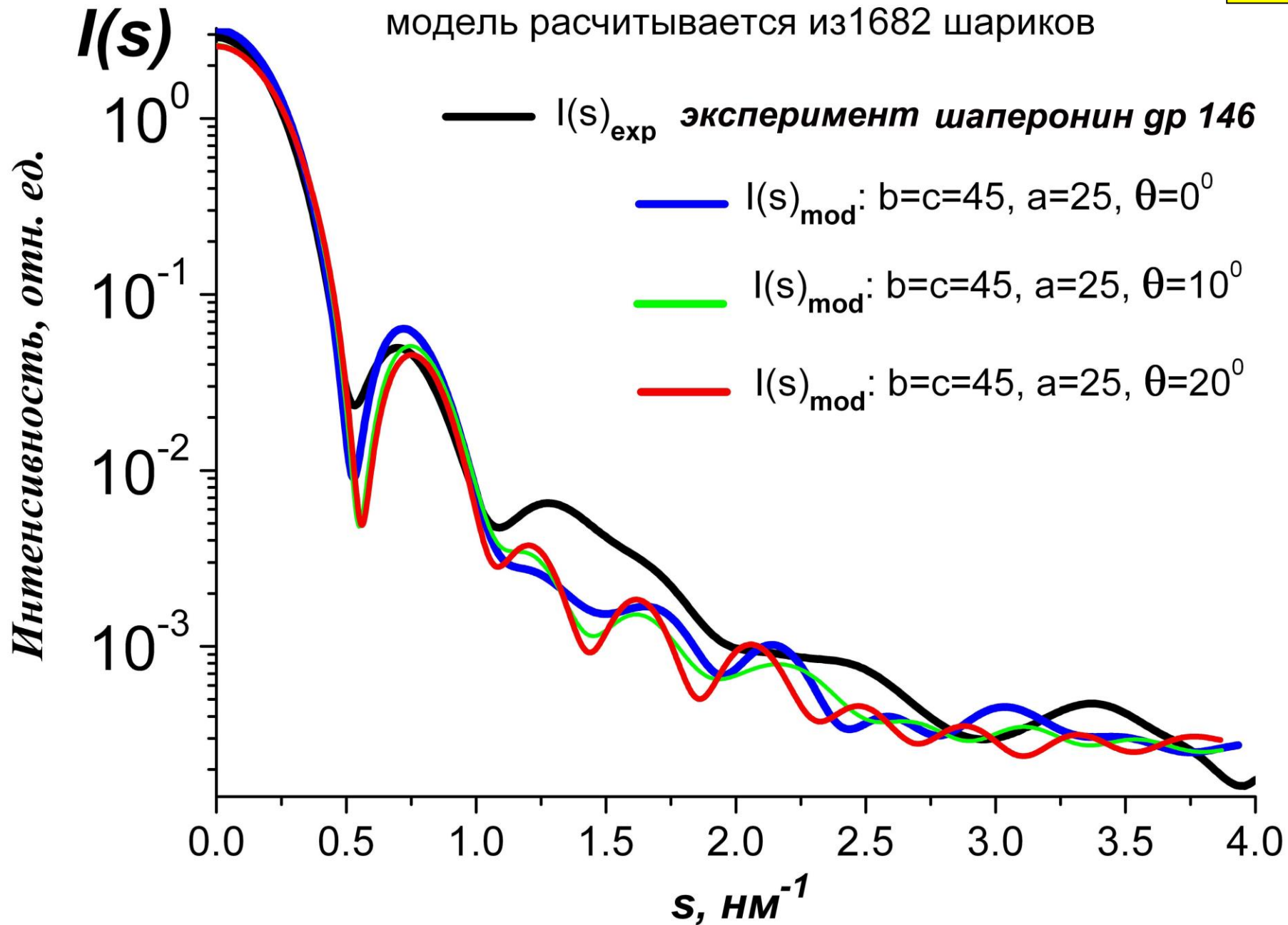


Модель открытой конформации





Ручная подгонка параметров модели.
модель рассчитывается из 1682 шариков



Малые белки теплового шока

α -Кристаллины (HspB4, HspB5)

Некоторые свойства малых белков теплового шока Человека

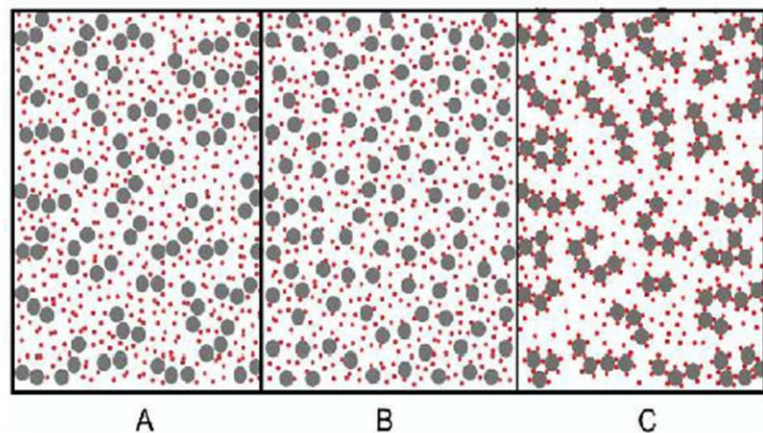
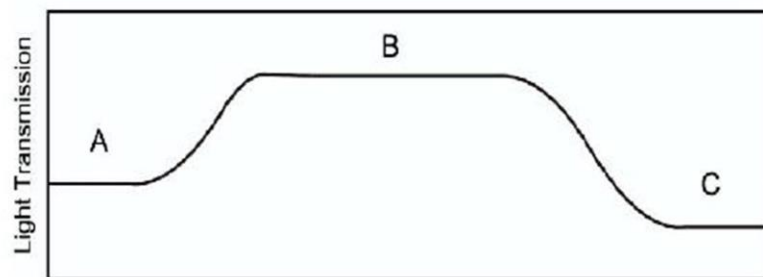
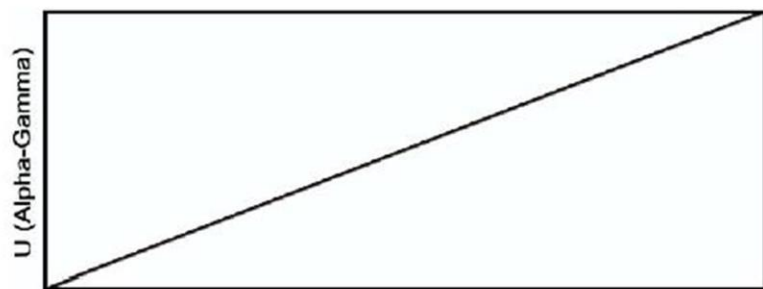
Kappe et al., Cell Stress & Chaperone, 8, 53-61, 2003

Vos et al., Biochemistry, 47, 7001, 2008

Название	Количество остатков	Мол. масса	pI	Хромосома
HspB1 (Hsp25/27)	205	22.8	6.4	7q11.2
HspB2 (МКВР)	182	20.2	4.8	11q22-q23
HspB3	150	17.0	5.9	5q11.2
HspB4 (α A-кристаллин)	173	19.9	6.2	21q22.3
HspB5 (α B-кристаллин)	175	20.2	7.4	11q22.3-q23.1
HspB6 (Hsp20)	157	16.8	6.4	19q13.1
HspB7 (cvHsp)	170	18.6	6.5	1p36.23-p34.3
HspB8 (Hsp22, H11)	196	21.5	4.7	12
HspB9	159	17.5	9.0	17q21
HspB10 (ODF1)	250	28.4		8q22

Зависимость прозрачности хрусталика от взаимодействия α - и γ -кристаллинов

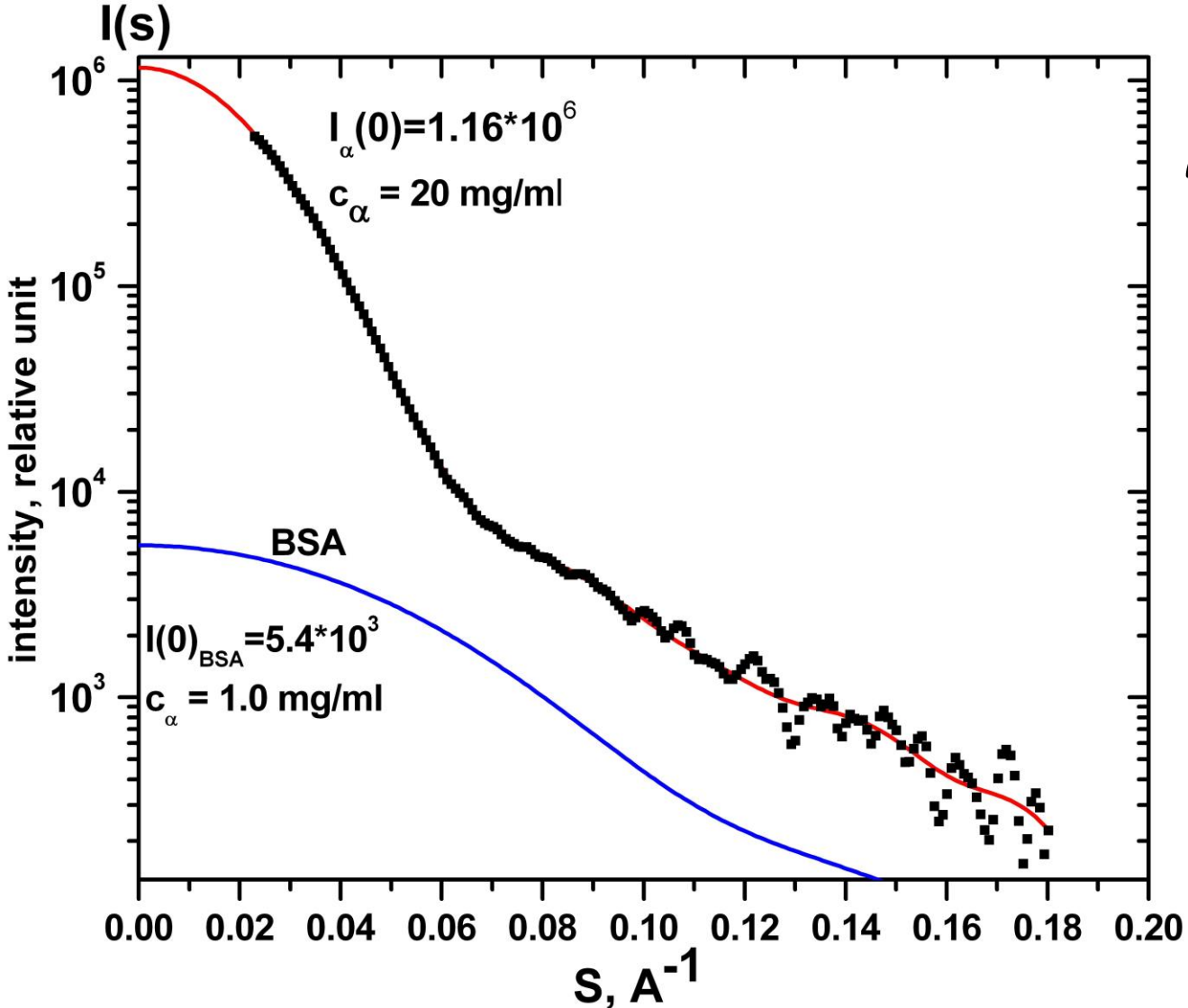
Takemoto, Sorensen, Exp. Eye Res. 2008



На верхнем рисунке схематически показано прочность взаимодействия α - и γ -кристаллинов (увеличение прочности взаимодействия слева направо).

На среднем рисунке схематично показано изменение прозрачности хрусталика

На нижнем рисунке показано взаимодействие α - и γ -кристаллинов. При слабом взаимодействии (A) возможно образование крупных олигомеров α -кристаллинов; при среднем по прочности взаимодействии (B) кристаллины равномерно располагаются в хрусталике; при очень прочном взаимодействии (C) образуются агрегаты α - и γ -кристаллинов.



$$M_{\text{exp}} = \frac{c_{\text{BSA}}}{c_{\text{exp}}} \cdot M_{\text{BSA}} \cdot \frac{I(0)_{\text{exp}}}{I(0)_{\text{BSA}}}$$

$$c_{\text{BSA}} = 1 \text{ мг/мл}$$

$$c_{\text{exp}} = (20 \pm 0.4) \text{ мг/мл}$$

$$M_{\text{BSA}} \approx 66 \text{ кДа}$$

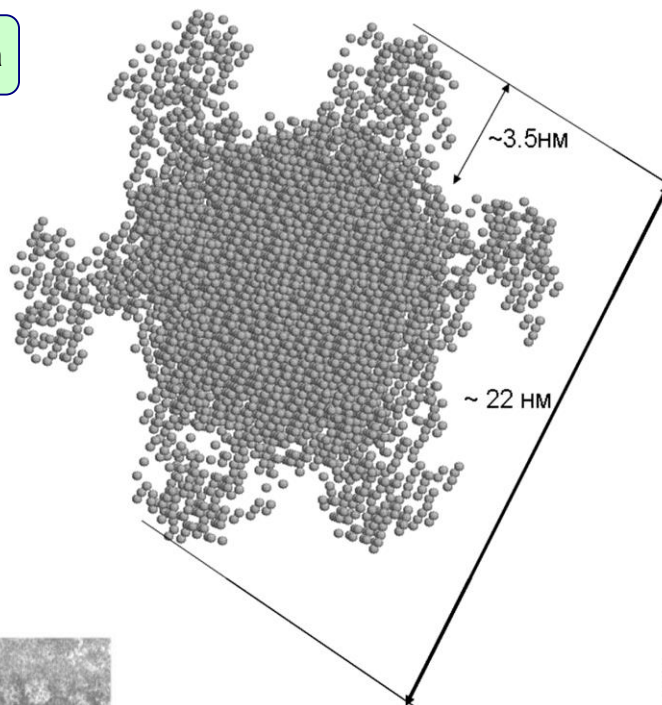
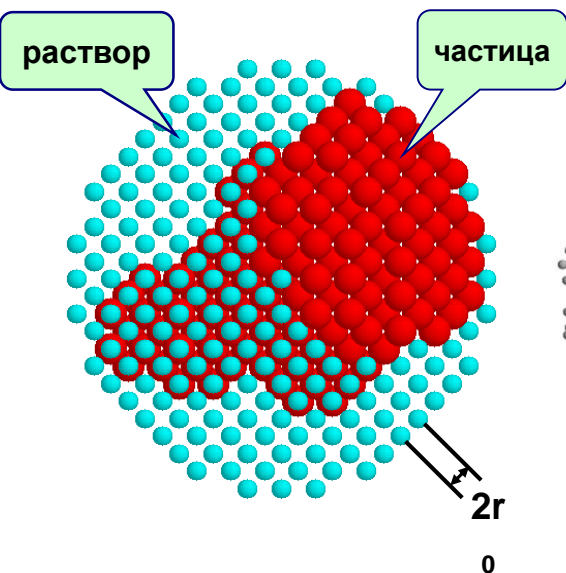
$$M_{\text{exp}} = (760 \div 780) \text{ кДа}$$

Зависимость интенсивности рассеяния $I(s)$ от модуля вектора рассеяния: для раствора α -crystallin с концентр. $c=20\text{мг/мл}$, $t=20^{\circ}\text{C}$.

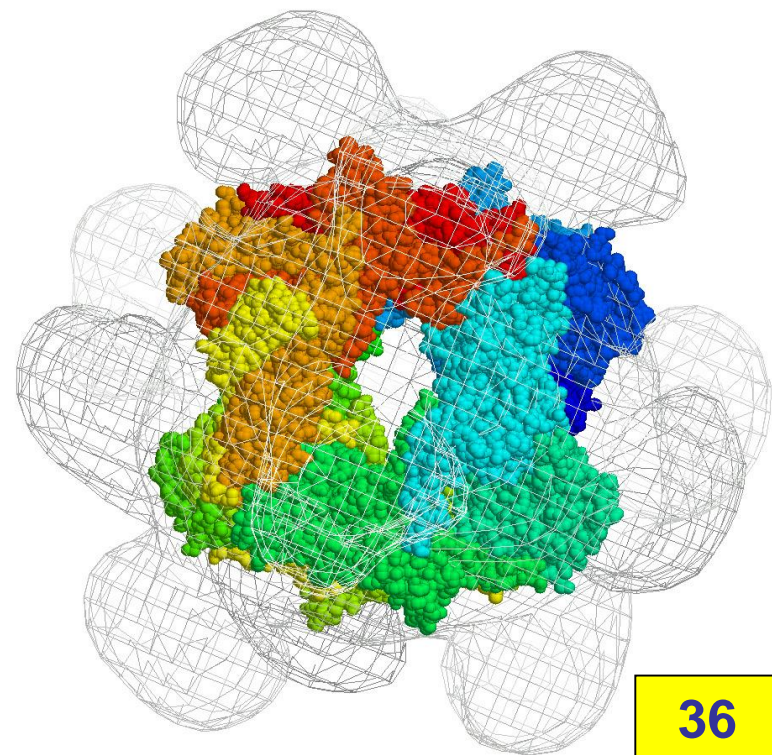
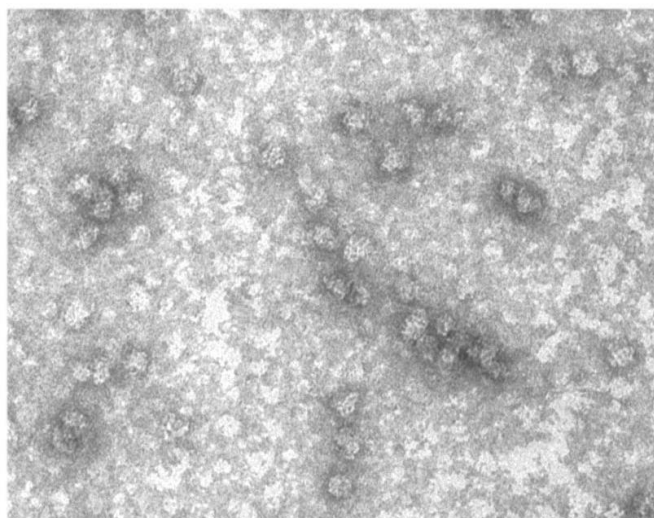
■ - "экспериментальные точки"

— сглаженная экспериментальная кривая с аппроксимацией к "нулевому углу рассеяния" $I(0)$

Прямое моделирование в прямом пространстве с размером области D_{\max} на основе модифицированного метода случайного перебора с единичным элементом структуры: «шарик - атом».

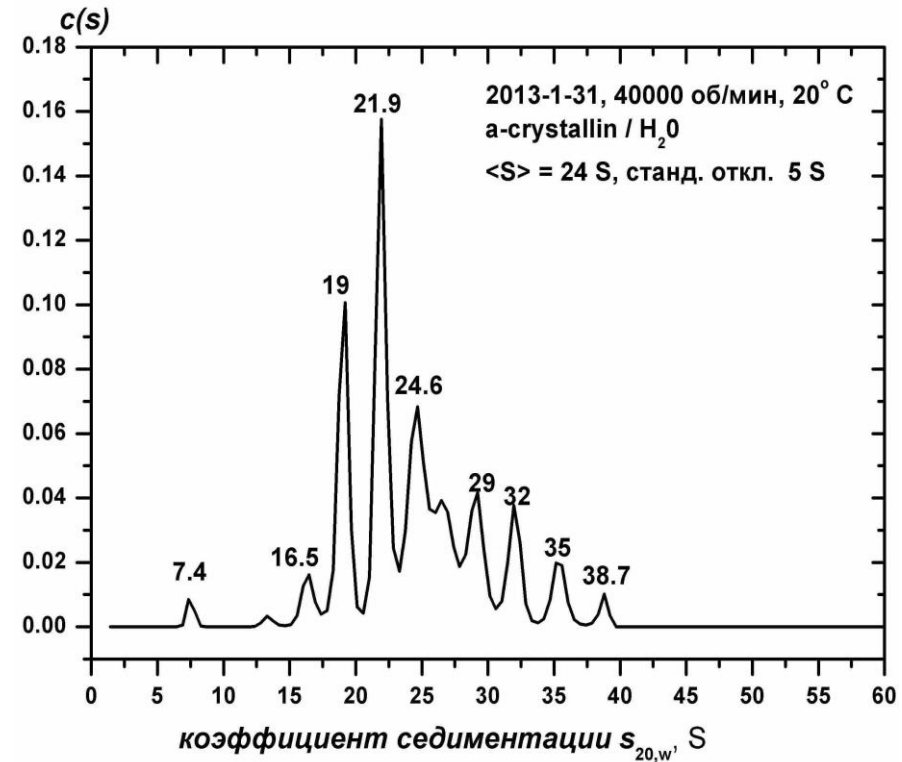
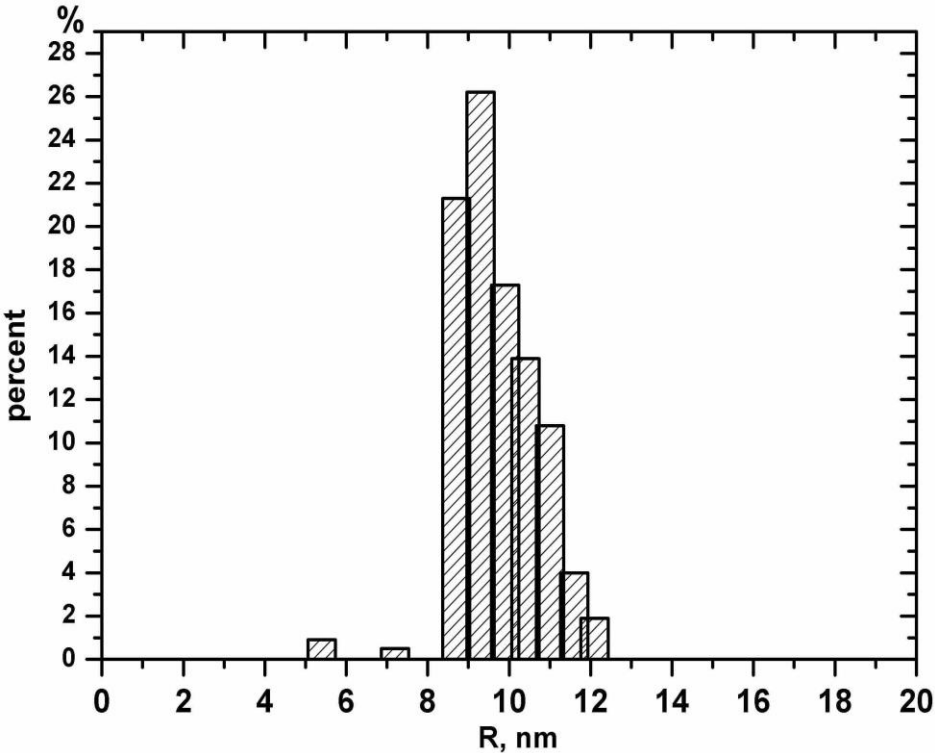


Модель белка α -crystallin в растворе составлена из однотипных шариков - атомов диаметром 5.6 \AA в количестве 13536.



Определение гидродинамического радиуса методом динамического светорассеяния

Результаты аналитического ультра-центрифугирования

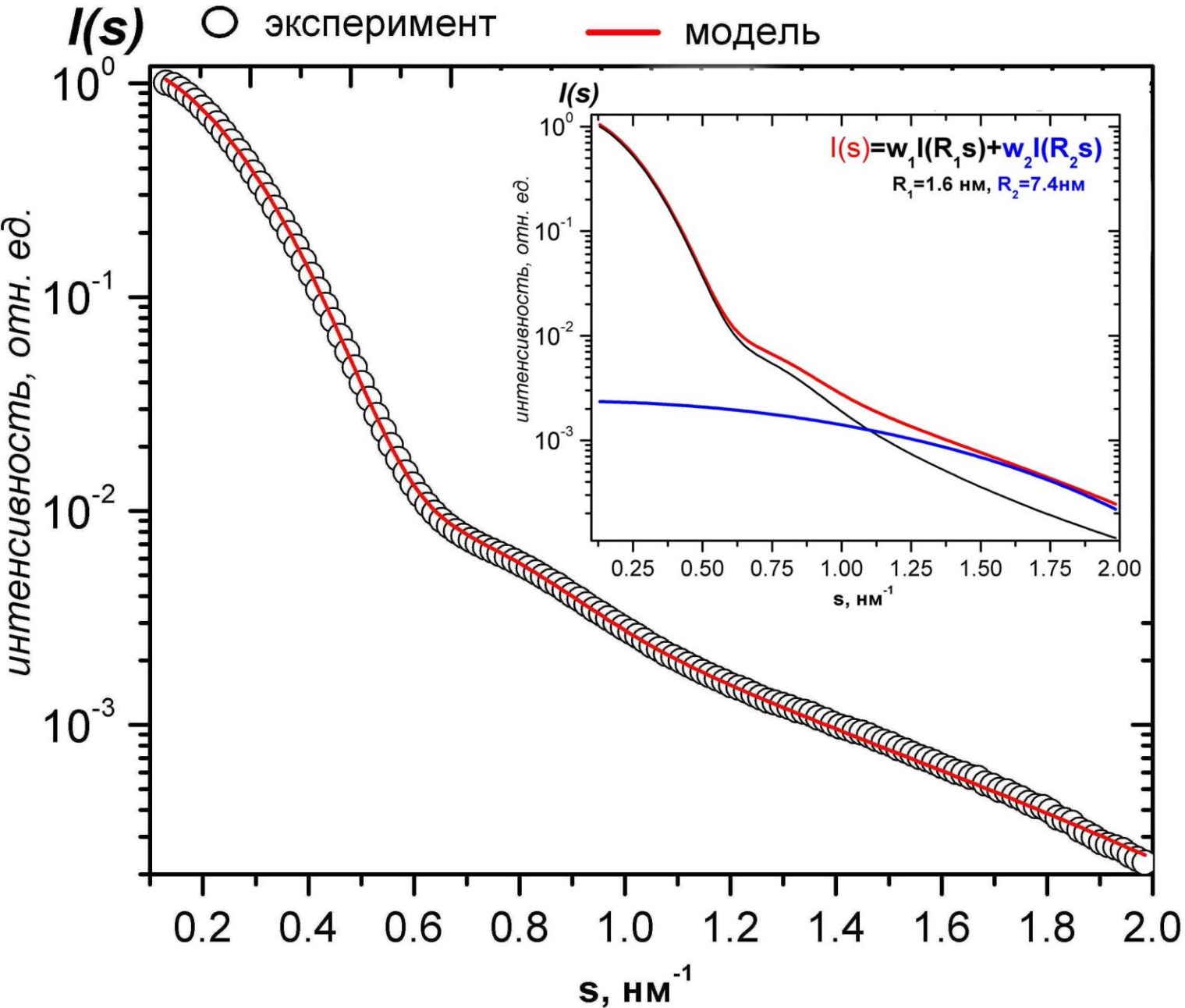


Моделирование фракции 2 по Формфактору трёхосного эллипсоида

$$k(x, y) = \sqrt{\left(a^2 \cos^2 \left(\frac{\pi}{2} x \right) + b^2 \sin^2 \left(\frac{\pi}{2} x \right) \right) (1 - y^2) + c^2 y^2}$$

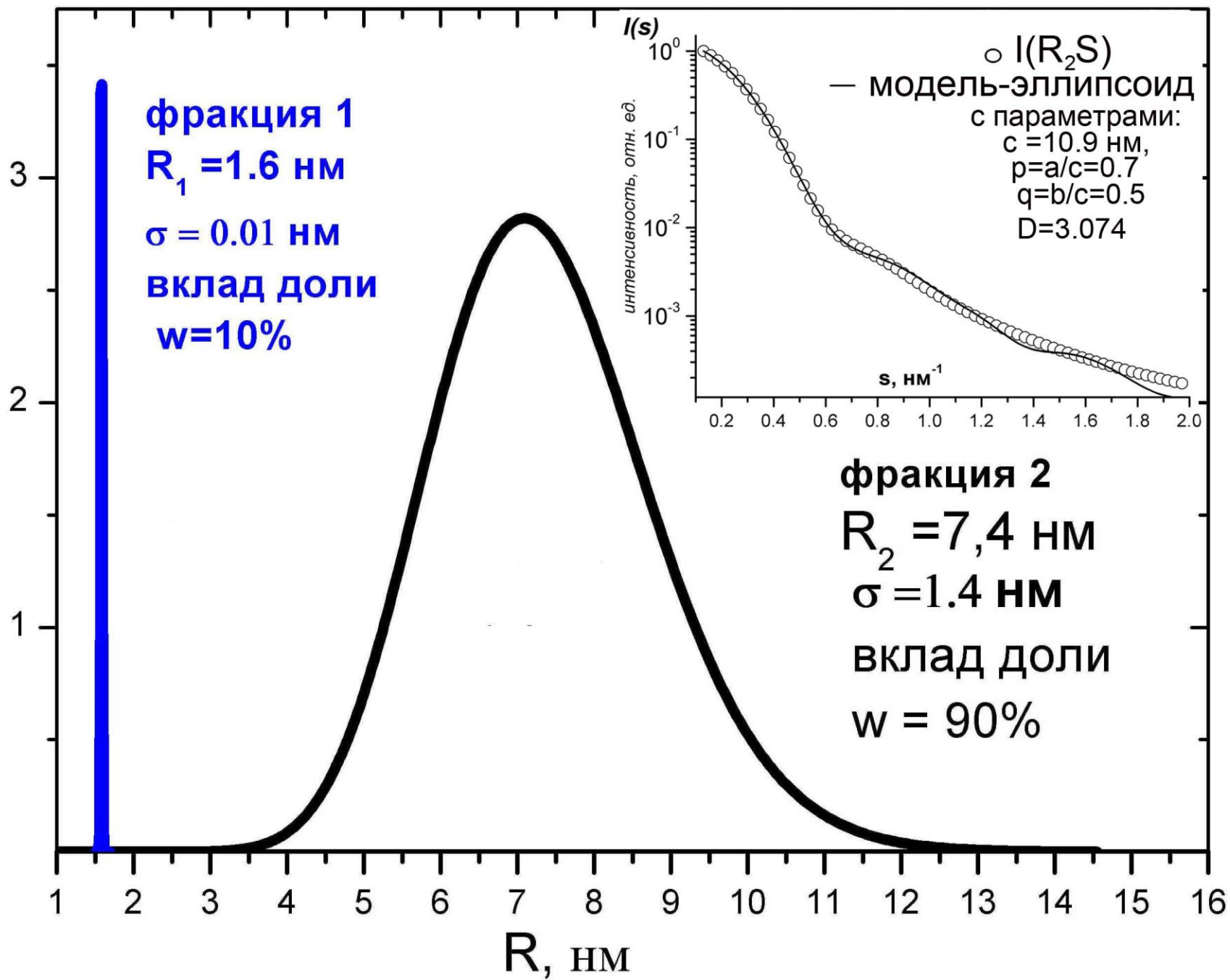
$$I_{\text{mod}}(s) = 9 \int_0^1 \int_0^1 \left[\frac{\sin(sk(x, y)) - (sk(x, y)) \cos(sk(x, y))}{(sk(x, y))^3} \right]^2 dx dy = 9 \int_0^1 \int_0^1 \left[\frac{j_1(sk(x, y))}{sk(x, y)} \right]^2 dx dy$$

Белок α -кристаллин, разложение экспериментальной кривой рассеяния на две составляющие фракции



$D_V(R)$

объемное распредел. частиц по радиусам



Спасибо за внимание.