На правах рукописи

Амарантов Сергей Владимирович

МОДЕЛИРОВАНИЕ ФОРМЫ БЕЛКОВ ШАПЕРОНИНОВ В РАСТВОРЕ ПО РЕШЕНИЮ ПРЯМОЙ И ОБРАТНОЙ ЗАДАЧИ МАЛОУГЛОВОГО РАССЕЯНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФОРМФАКТОРА ТОРА.

01.04.07-физика конденсированного состояния

АВТОРЕФЕРАТ диссертации на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Москва 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова Российской академии наук (ИК РАН).

Научный руководитель:	Волков Владимир Владимирович, кандидат химических наук, ИК РАН
Официальные оппоненты:	Клечковская Вера Всеволодовна, доктор физико-математических наук, заведующая лабораторией, профессор, ИК РАН
	Ерухимович Игорь Яковлевич, доктор физико-математических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, институт элементо- органических соединений им. А.Н.Несмеянова Российской академии наук

Ведущая организация:

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет

Защита состоится "<u>09</u>" <u>октября</u> 2012 года в<u>13</u> ч. <u>00</u> мин. на заседании диссертационного совета Д 002.114.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте кристаллографии им. А.В. Шубникова Российской академии наук, по адресу: 119333, Москва, Ленинский проспект 59, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИК РАН

Автореферат разослан: "<u>08</u>" августа 2012 года

Ученый секретарь диссертационного совета Д 002.114.01 кандидат физико-математических наук

В. М. Каневский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Определение формы и структурных параметров белковых макромолекул, находящихся в условиях, близких к естественным, представляет собой чрезвычайно важную задачу в исследовании связей структура-свойство таких объектов, так как многие функции белков и их комплексов зависят от их конформации. Метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУР) и тепловых нейтронов в этом случае предоставляет уникальную возможность изучать структуру биологических наночастиц в растворе при размерах, существенно превышающих возможности метода ядерного магнитного резонанса и при этом не требует какой-либо специальной подготовки образцов, которая часто требуется в других методах исследования. С другой стороны, развитые в последнее время методы интерпретации данных малоуглового рассеяния в состоянии эффективно учитывать разнообразную априорную информацию о структуре наночастиц, что может существенно повышать результатов. Особенно надежность получаемых актуальным метод малоуглового рассеяния оказываются в случае изучения новых белковых объектов, когда они имеют большие размеры, а получение монокристаллов затруднительно или невозможно. Однако, задача определения трехмерной формы частиц по одномерным данным рассеяния оказывается плохо обусловленной и преодолеть неустойчивость определения структурных характеристик можно с помощью построения моделей формы, описываемых небольшим числом параметров. Этим определяется высокая актуальность теоретической части работы в данном направлении.

Малоугловое рассеяние – упругое рассеяние электромагнитного излучения или пучка частиц (нейтронов, электронов) на неоднородностях вещества, размеры которых существенно превышают длину волны излучения. С помощью МУР изучают строение биологических молекул в растворе, объёмные дефекты в кристаллических веществах, кластерную структуру жидкостей и аморфных тел, поры в различных пористых материалах, а также можно получить ценную информацию об изменениях ряда параметров структуры при деформации и разрушении. К этим параметрам, в частности относятся размер, форма ориентация и концентрация рассеивающих частиц, распределение частиц по размерам. Значение МУР особенно велико для исследования биологических объектов, например белков, нуклеиновых кислот, вирусов. Метод МУР позволяет изучать структуру нативных биополимеров в физиологических растворах, где образец представляет собой раствор идентичных частиц (монодисперсную систему), а экспериментальная интенсивность рассеяния пропорциональна произведению концентрации растворе частиц В И интенсивности рассеяния одной частицей. Интерпретация экспериментальных данных в этом случае заключается в создании модели низкого разрешения рассеивающей частицы. В данном случае это модель трёхмерной формы частицы в однородном приближении. Несмотря на заметный прогресс в области компьютерного моделирования для обработки данных малоуглового

эксперимента, описание формы тела минимально возможным набором параметров и дальнейшим поиском этих параметров представляет собой довольно сложную задачу. При этом число используемых формфакторов для описания форм частиц ограничивается классическими работами середины прошлого века Гинье (Guinier) и Порода (Porod) [Porod 1948]. Некоторые формфакторы представлены в работе [1]. В связи с этим в данной работе для параметризации задачи рассеяния от белка бактериального шаперанина GroEL [2] и вирусного (фагового) шаперонина продукта гена 146 (рg146), выведены формфакторы моделей частиц виде двойного симметричного В И несимметричного эллиптических торов, как функции их геометрических параметров и модуля вектора рассеяния. Полученные выражения применены для определения по данным МУР параметров формы белковых комплексов шаперонинов, один из которых изучен впервые. Таким образом, актуальность экспериментальной части работы определяется не только решением задачи оптимальной параметризации предполагаемой формы макромолекулы И сопоставлении полученных различными способами структурных моделей, но и исследованием новых белковых объектов.

Основные цели и задачи работы.

Получить в аналитическом виде формфакторы эллиптических одиночного и двойного симметричного и несимметричного тора, как функцию параметров формы и модуля вектора рассеяния.

Провести моделирование формы молекул белков шаперонинов с известной структурой по полученным экспериментальным данным малоуглового рассеяния, с применением полученных выражений для формфакторов и другими известными программами определения формы. Сравнить модели, полученные этими методами между собой.

Получить экспериментальные данные малоуглового рассеяния от растворов белка вирусного шаперонина pg146 и найти параметры модели формы молекулы с помощью полученных аналитических выражений формфакторов и традиционных методов моделирования.

Получить экспериментальные данные рассеяния для растворов белка gp146 в присутствии АТФ и с помощью разработанных подходов определить изменения параметров формы молекулы белка при АТФ-зависимом конформационном переходе.

Научная новизна

Впервые методом малоуглового рентгеновского рассеяния проведен анализ конформаций формы макромолекул в растворе имеющих центрально симметричное отверстие путем определения геометрических параметров модели в виде однородного двойного эллиптического тора. Объектами исследования были макромалекулы вирусных и бактериальных шаперонинов, формы которых можно описать формфаторами одиночного и двойного эллиптических торов. А именно, были определены геометрические параметры следующих макромолекул:

1. Хорошо изученный бактериальный шаперонин GroEL;

2. Малоизученный вирусный (фаговый) шаперонин, кодируемый геном 146 (gene product, gp146) бактериофага EL Pseudomonas aeruginosa [3]; С этой целью одной из подзадач данной работы явилось возможность показать для простейшей двусвязной поверхности вращения — тора устойчивое восстановление формы трёхмерного однородного тела заданного внутри своего объёма единичным потенциалом, по пространственно усреднённой кривой малоуглового рассеяния.

Поскольку все шаперонины являются АТФ-азами, использующими энергию, получаемую при связывании и гидролизе АТФ, то для определения конформационных перестроек малоугловым методом впервые определялись параметры изменения формы шаперонина от состава буфера, как параметрическое описание формы частицы через кривую интенсивности малоуглового рассеяния.

Практическая значимость.

Используя метод малоуглового рентгеновского рассеяния была получена пространственная модель малоизученного вирусного шаперонина gp146. С целью ускорения компьютерной обработки экспериментальных данных для бактериальных и вирусных шаперонинов на основе полученных автором тороидальных формфакторов была написана компьютерная программа, существенно ускоряющая поиск формы белков шаперонинов не прибегая к методу случайного перебора конфигураций частицы. Разработанный подход расширяет банк методов анализа систем содержащих наночастицы, имеющие центрально-симметричное отверстие.

На основе малоугловых экспериментальных данных был обнаружен ATФ – зависимый конформационный переход шаперонина gp146 из закрытого в более функционально активное - открытое состояние.

На защиту выносятся следующие положения.

1. Приближённое аналитическое выражение для малоуглового формфактора тора, с трёмя геометрическими параметрами и соответствующая асимптотика Порода. С целью моделирования формы молекул олигомерных белков – шаперонинов в рамках однородного приближения выведены аналитические выражения для малоугловых формфакторов двойного симметричного и несимметричного эллиптических торов.

2. По экспериментальным данным малоуглового рентгеновского рассеяния от растворов бактериального (GroEL) и вирусного (gp146) шаперонинов сделан сравнительный анализ размеров и формы белков в растворе. Для бактериального GroEL проведено сравнение полученных по данным рассеяния параметров формы с параметрами известной кристаллической структуры.

3. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния был найден АТФ зависимый конформационный переход белка вирусного шаперонина gp146 в растворе. Было показано, что присутствии ATΦ происходит В конформационный переход открытого состояния двойной ИЗ _ несимметричный тор, в закрытое – двойной симметричный тор.

<u>Личный вклад автора.</u> Автором был сделан аналитический вывод приближённого выражения для формфактора тора, получены выражения для

асимптотик Гинье и Порода. Автором были проведёны эксперименты по малоугловому рассеянию рентгеновских лучей на растворах бактериального (GroEL) и вирусного (gp146) шаперонинов. Были проведены эксперименты по исследованию белков на монодисперсность методами динамического светорассеяния и аналитического ультрацентрифугирования. Автором была проведена вся первичная обработка кривых малоуглового рассеяния и расчет моделей по известной методике комплекса программ пакета ATSAS, написаны программы для поиска геометрических параметров структурных моделей с тороидальными формфакторами.

Апробация результатов диссертации

Результаты исследований, включенных в диссертационную работу, докладывались на следующих научных конференциях:

1. VI Международная конференция по применению Рентгеновского, Синхротронного излучений, Нейтронов и Электронов для исследования материалов (РСНЭ-2007), Москва, 12-17ноября, 2007 г..

2. І Всероссийская конференция «Многомасштабное моделирование процессов и структур в нанотехнологиях» (ММПСН–2008) Москва, Московский инженерно-физический институт (государственный университет) 12–14 марта 2008 г.

3. XVIII Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем" г. Казань (Яльчик) 4-9 июля 2011.

4. V Российский симпозиум "Белки и пептиды" г. Петрозаводск, 8-12 августа, 2011.

5. VIII Национальная конференция « Рентгеновское Синхротронное излучение, Нейтроны и Электроны для исследования наносистем и материалов. Нано –Био – Инфо - Когнетивные технологии». РСНЭ – НБИК, 2011, г. Москва.

6. XIX Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем" г. Казань (Яльчик) 25-30 июля 2012.

Публикации По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ из них 6 тезисов докладов конференций и 3 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов и списка литературы. Объём диссертации составляет 103 страницы, включая 38 рисунков, 6 таблиц и более 100 формул.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении излагаются возможные области применения метода малоуглового рассеяния и обосновывается актуальность применения данного метода для исследования белковых растворов, а также указывается необходимость дополнительной информации о структуре частицы при интерпретации малоуглоглового эксперимента. Там же рассматривается актуальность задачи параметризации для описании формы частицы при построении её модели низкого разрешения.

Первая глава представляет собой литературный обзор о макромолекулах шаперонинов их строении и свойствах. Шаперонины, белки теплового шока (hsp60), представляют собой класс молекулярных шаперонов, которые

помогают правильно сворачиваться как новосинтезированным полипептидным цепям, так и денатурированным под воздействием стресса белкам. В отличие от других классов белков-шаперонов, шаперонины незаменимы.

Все белки класса шаперонинов представляют собой массивные комплексы из множества субъединиц, внешне похожие на бочонок. Комплексы имеют внутреннюю полость, способную закрываться и изолировать захваченный субстрат. В качестве субстрата выступают белки, имеющие ненативную структуру, нарушенную, например, при тепловой денатурации. В полости происходит фолдинг белков-субстратов. Для осуществления фолдинга шаперонины используют энергию, выделяющуюся при гидролизе АТР.

Шаперонины делят на две группы. Это разделение связано со специфичностью их строения и с характером вторичной структуры субстрата. Представители первой группы шаперонинов были обнаружены у бактерий, а также внутри пластид и митохондрий. Шаперонины второй группы найдены в эукариотических клетках и в организмах архей.

На сегодняшний день наиболее изученным шаперонином первой группы является GroEL, выделенный из клеток E. coli. GroEL функционирует в паре с другим белком - ко-шаперонином GroES [4]. Одна из основных функций комплекса **GroEL/GroES** заключается связывании развернутых В полипептидных цепей. Таким образом GroEL/GroES защищает пептиды от агрегации и осуществляет их правильное сворачивание внутри полости [5]. Шаперонины группы II, в отличие от представителей первой группы, функционируют без кофакторов. Одной из задач данной работы является изучение вирусного шаперонина gp146. Далее отдельно описывается строение шаперонинов первой и второй группы. Множество экспериментальных работ подтвердили классическую модель шаперонинов I группы см. рис.1a,b [6, 7]. Однако более детальные исследования выявили новые особенности работы комплекса, представив ещё одну модель функционирования, названную Football-cycle из-за сходства формы выявленного комплекса с мячом для регби. Football-cycle Комплексы. соответствующие модели (рис. 1c).были обнаружены при помощи электронного микроскопа. Вместо ко-шаперонина у шаперонинов II группы на апикальных доменах каждой субъединицы находятся петли, или винтовые выступы, закрывающие вход во внутреннюю полость. Вследствие этого шаперонины второй группы способны принимать как открытую, так и закрытую конформацию (рис. 2). Субъединицы шаперонинов группы II подобно представителям группы I состоят из трех доменов: экваториального, промежуточного и апикального. Точно также выполняет АТФ-азную экваториальный домен функцию. Движение апикального домена вызывает конформационные изменения в комплексе. Отсутствие ко-шаперонина обуславливает иной способ ассоциации шаперонина с субстратом по сравнению с шаперонинами группы I. Шаперонины группы I не способны сворачивать эукариотические белки, такие как актин [3], а представители второй группы не взаимодействуют с прокариотическими белками.





Сравнение структурных форм комплексов GroEL, ассоциированных с кополучены шаперонином. Модели методом электронной микроскопии.

Изменения, происходящие с ССТ при добавлении АТР.Происходит изменение конформации доменов, и комплекс из открытой формы переходит В закрытую[8].

Свойства шаперонинов II группы до настоящего времени мало изучены. В присутствии ATP и ионов Mg^{2^+} , Mn^{2^+} и Co^{2^+} конформация этих комплексов менялась с «открытой» на «закрытую». Работу эукариотических комплексов можно рассмотреть на примере человеческого белка ССТ см. рис.2. Комплексы ССТ (и все комплексы группы II) находятся в открытой конформации в отсутствие АТР, и закрываются при добавлении трифосфата.

Вторая глава представляет собой введение в теорию малоуглового рассеяния. упругого рассеяния см. Рис.3 построен на тройке волновых Треугольник векторов k_0, k_1, S для обратного пространства, и для переданного импульса Δp $(p=\hbar\cdot k)$ в прямом пространстве. Схема сканирования при постоянной энергии падающего излучения *E-const* реализуется на монохроматическом источнике, например, рентгеновской трубке.



 $I(s) = \left\langle \frac{d\sigma_{\text{elast}}^{\text{coh}}(s)}{d\Omega} \right\rangle_{\Omega} = I_e \cdot \langle N \rangle \cdot \left\langle \Phi(s,\Omega) \Phi^*(s,\Omega) \right\rangle_{\Omega}$ $\Phi(s) = \frac{1}{V'} \int_{V'} \overline{\rho}_e(r) \exp(i(\vec{s}, \vec{r})) dr$ (2.1) $I_e(\theta) = r_e^2 \cdot \frac{I_0}{I^2} \cdot p(\theta)$ (2.2)

Треугольник упругого рассеяния.

Интенсивность малоуглового рассеяния определяется выражениием (2.1) где $\Phi(s, \theta, \phi)$ - амплитуда рассеянной волны от одной частицы, Ω - телесный угол, с образующей от оси прямого не рассеянного луча. N - число - молекул или наночастиц в «разбавленном растворе» рассеивающих независимо друг от друга, при $|k_1| = |k_0|$ рассеяние упругое. Φ^* - комплексно – сопряжённая амплитуда рассеянной волны от одной частицы, $d\Omega$ - элемент телесного угла, $\bar{\rho}_e$ - средняя рассеивающая плотность частицы. Величина І_е - представляет собой «томсоновское» рассеяние или рассеяние на «свободном электроне» [10]. I₀ $r_e = e^2 / m_o c^2 = 2.818 \cdot 10^{-13} c_M$ интенсивность падающего на образец излучения, классический радиус электрона. L – расстояние образец - детектор. Выражение

7

интенсивности рассеяния через функцию распределения по расстояниям p(r) имеет вид (2.3). В частности для разбавленной системы идентичных невзаимодействующих частиц, например раствора белковых молекул, выражение для интенсивности рассеяния, приходящейся на одну молекулу можно записать в виде [1]:

$$I(s) = \frac{1}{V'} \int_{V'}^{\gamma_0(r)} e^{i(\vec{s},\vec{r})} d\vec{r} = I(s) = \frac{1}{V'} \int_{0}^{2\pi} \int_{0}^{D_{\max}} \int_{0}^{\pi} p(r) e^{isr\cos\theta} \sin\theta d\theta dr d\varphi =$$

$$= \frac{1}{V'} \int_{V'}^{\gamma_0(r)} e^{i(\vec{s},\vec{r})} r^2 dr d\Omega = \frac{1}{V'} \int_{V'}^{\gamma} p(r) e^{i(\vec{s},\vec{r})} dr d\Omega. \qquad = \frac{4\pi}{V'} \int_{0}^{D_{\max}} p(r) \frac{\sin(sr)}{sr} dr.$$

(2.3) (2.4)

Соотношение между интенсивностью рассеяния I(s) и функцией распределения по расстояниям определяет связь между обратным и прямым пространствами, выражаемую через преобразование Фурье для следующих трансформант:

$$sI(s) \xrightarrow{F} p(r),$$

$$p(r) \xrightarrow{F} \frac{2}{\pi} sI(s)$$

$$(2.5) \xrightarrow{V'}{4\pi} \cdot sI(s) = \int_{0}^{\infty} P(r) \frac{\sin(sr)}{r} dr \xrightarrow{F} (2.6)$$

$$\xrightarrow{F} P(r) = \frac{V'}{2\pi^2} \int_{0}^{\infty} I(s) \frac{\sin(sr)}{sr} s^2 ds$$

$$(2.6)$$

Таким образом, соотношение между интенсивностью рассеяния I(s) и функцией p(r) для молекулы, имеющей максимальный размер D_{max} , связаны через интегральное уравнение Фредгольма I рода. Переход из обратного пространства в прямое и вычисление функции распределения по расстояниям внутри частицы p(r) осуществляли с помощью программы косвенного Фурье преобразования. В которой использован метод α – регуляризации Тихонова [11, 12].

$$I(s) = I(0) \left[1 - \frac{(s R_g)^2}{3} \right] \approx I(0) \cdot e^{-\frac{(s R_g)^2}{3}} (2.7) \qquad \qquad R_g^2 = \frac{\int_{\text{max}}^{D_{\text{max}}} \gamma_0(r) r^4 dr}{2 \cdot \int_{0}^{D_{\text{max}}} \gamma_0(r) r^2 dr} = \frac{\int_{0}^{D_{\text{max}}} p(r) r^2 dr}{2 \cdot \int_{0}^{D_{\text{max}}} \gamma_0(r) r^2 dr} = \frac{1}{2 \cdot \int_{0}^{D_{\text{max}}} p(r) r^2 dr} (2.8)$$

Взяв логарифм от левой и правой частей равенства (2.8) получим важное для практики определения радиуса инерции R_g «приближение Гинье» (2.9). В этом случае, график начального участка кривой рассеяния в координатах Гинье:Ln(I) от s^2 - это прямая с тангенсом угла наклона $tg(\pi-\alpha)=R_g^2/3$ откуда, зная из графика α , можно найти электронный радиус инерции R_g частицы. Под прямой задачей понимается расчет интенсивности рассеяния по формуле Дебая от атомной структуры молекулы или шариковой модели молекулы заполняющей её объём. Данный алгоритм реализован в программе CRYSOL [13]

<u>В третьей главе</u> представлен литературный обзор о источниках излучения и первичной обработке экспериментальных данных, как решение задачи редукции к «идеальному прибору». Изучение рассеяния под малыми углами к первичному пучку связано со специфическими экспериментальными трудностями и с применением специальных установок. Диафрагменное

устройство должно обеспечить получение очень тонкого первичного пучка. Такие пучки необходимы для получения минимальных углов рассеяния и уменьшения погрешностей при их измерении. Кроме того, отделить малоугловое рассеяние ОТ первичного возможно лишь при узких коллимирующих щелях. С целью уменьшения паразитного рассеяния в коллимационной системе по Кратки пучок формируется двумя блоками B_1 и B_2 , а также входной щелью Е. Форма проекции первичного пучка на плоскость детектора - ассиметричный треугольник, угол 20₁- определяет минимальный угол расходимости падающего на образец пучка рис.4.



Рис.4.

Схема блок коллиматора по Кратки. Е, В₁, В₂ – блоки формирования первичного пучка, Н- нулевая плоскость, F₁, F₂ – рабочие плоскости блоков облучаемые входящим пучком, S- образец, BS-стопор прямого пучка,

БЗ-стопор прямого пучка

PR – плоскость регистрации,

Р – профиль прямого пучка прошедшего через образец (е).

Если плоскости коллиматора Кратки F_1 и F_2 удалось совместить, то выше плоскости H (измерения проводятся только в этом направлении) паразитное рассеяние будет отсутствовать, так как рассеяние от ребра M и плоскости F_2 проявляются лишь ниже H. Такие коллиматоры Кратки позволяют исследовать неоднородности до 100нм. В данном случае задача редукции к идеальному прибору сводится к введению коллимационной поправки на неточечность пучка.

<u>В четвёртой главе</u> проведено вычисление формфактора тора и его приложение к решению обратной задачи рассеяния шаперонинов.

<u>В разделе 4.1.1</u> приводится расчет Фурье амплитуды для эллиптического тора в цилиндрической системе координат согласно работе [14]:



Усреднив (4.1) по всем ориентациям получим выражение для формфактора:

$$I(s) = \left(\frac{2}{\pi a b c s}\right)^2 \int_0^{\frac{\pi}{2}} \frac{1}{\cos^2 \theta} \left\{ \int_{b-a}^{b+a} \sin\left(s c \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{a^2}} \cos \theta \right) J_0(s \cdot r \sin \theta) r dr \right\}^2 \sin \theta d\theta \quad (4.2)$$

Интенсивность рассеяния от кругового тора получается как частный случай, при c = a. Результаты моделирования для конкретных значений параметров тора по формуле (4.4) (4.2) приведены на рис. 7а (кривая 1).В этой же главе автором получено приближённое выражение Фурье трансформанты тора. Запишем параметрическое уравнение тора

$$\vec{r}: \left\{ (b+a\,r\cos\omega)\cos\varphi \cdot \vec{i}, (b+a\,r\cos\omega)\sin\varphi \cdot \vec{j}, c\,r\sin\omega \cdot \vec{k} \right\},\$$

$$(0 \le r \le 1, \ 0 \le \varphi \le 2\pi, 0 \le \omega \le 2\pi).$$

и вектор рассеяния в уже используемой цилиндрической системе координат. Тогда амплитуда рассеяния согласно выражению (2.1) при $\overline{\rho}_e \equiv 1$ примет вид (4.3):

$$\Phi(s,r,\Omega) = \frac{1}{V'} \int_{V'} e^{i(\vec{s},\vec{r})} dV' = I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s Sin \theta) \times I(s)_{app} = 4$$

Исходя из (4.3) в малоугловой области при ограничениях на параметры тора а, b, c (в единицах длины): $0 \le a \cdot s \le 1$, $0 \le c \cdot s \le 1$, $0 \le a \cdot s \le 1$, и модуля вектора рассеяния s (в единицах обратной длины): приближённое выражение для формфактора тора имеет вид (4.4) [15]. Это «нулевое приближение» можно уточнить, используя первый член в сумме для действительной части в разложении (4.3). Обозначим поправку к (4.4) через Δ тогда:

$$I(s)_{app+\Delta} = 4 \int_{0}^{\frac{\pi}{2}} J_{0}^{2} (b s \sin \theta) \left[J_{0}^{2} \left(\frac{as}{2} \sin \theta \right) \cdot \frac{J_{1}(cs \cos \theta)}{cs \cos \theta} + \Delta \right]^{2} \sin \theta \, d\theta \, ; \quad (4.5)$$

где

$$\Delta = J_1^2 \left(\frac{s a}{2} \sin \theta \right) \cdot \left(\frac{2 \cdot (1 - J_0(sc \cos \theta))}{(sc \cos \theta)^2} - \frac{J_1(sc \cos \theta)}{sc \cos \theta} \right).$$
(4.6)

Для наглядного сравнения точного выражения кривой малоуглового рассеяния рассчитанной по (4.2) с приближенными выражениями (4.4, 4.5) на рис.7а, b они графически представлены для тора с параметрами a=c=13A, b=38A. Из него видно, что на первых 3,5 порядков спада кривой интенсивности от «рассеяния в нулевой угол» все три кривые совпадают друг с другом. Поскольку в эксперименте по рассеянию рентгеновского излучения в разбавленном растворе, например растворе белка, после вычитания рассеяния от раствора максимальное отношение сигнал/шум на кривой МУР обычно не

превышает трёх порядков, то в практических целях достаточно использовать соотношение (4.4, 4.5).

Асимптотики: область Гинье и область Порода.

Для области Гинье разложим приближённое выражение (4.4) в степенной ряд

$$I(s)_{app} = \sum_{k=0}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{(-1)^{k+l+m} \left[(2l)! \right]^2 (2(m+1))!}{(k!)^4 (l!)^6 (m!)^3 ((m+1)!)^2} \times$$

$$\times \frac{(2m)! (k+l)! (k+l+m+1)!}{(2m)! (k+l)! (k+l+m+1)!} (as)^{2l} (bs)^{2k} (cs)^{2m}$$
(4.7 a)

$$\frac{(2m)!(w+l)!(w+l+m+l)!}{(m+1)(m+2)\left(2(k+l+m+1)\right)!2^{2(l+m)-1}}(as)^{2l}(bs)^{2k}(cs)^{2m}$$

и выписывая слагаемые до квадратичных получим приближение Гинье (2.7) *(as)(bs)(cs)*<1: и электронный радиус инерции частицы (2.8) в виде:

$$I(s)_{G} \cong 1 - \frac{s^{2}}{3} \left(\frac{a^{2} + b^{2}}{2} + \frac{c^{2}}{4} \right) \approx \exp\left(-\frac{s^{2} \widetilde{R}_{g}^{2}}{3} \right), \quad \widetilde{R}_{g \, app}^{2} = \frac{a^{2} + b^{2}}{2} + \frac{c^{2}}{4} \quad ;$$
(4.7b)

Для приближения Порода (Porod) при *(sa)(sb)(sc)>>1* также воспользуемся полученным нами приближённым выражением (4.4), и известными асимптотиками для функций Бесселя при больших значениях аргумента



Кривые МУР от кругового тора с параметрами: a=c=13A, b= 38A, полученные через Фурье трансформанту: 1-по точному выражению (4.2); 2 -по приближённому выражению (4.4); 3 - по приближённому выражению, с поправкой Δ см. (4.5); 4 – породовская асимптотика по (4.8).

Кривая I(s) расчет по ф-ле (4.2) с = 38А при а = с = 13 А. Асимптотики Порода:
 для шара I(s) = 1/(D_{max}s)⁴
 для тора см. (4.8)

Это важный для экспериментальной практики результат поскольку, часто не вдаваясь в тонкие особенности кривой рассеяния, по характеру спада можно сказать к какой форме ближе наш рассеивающий объект: глобулярной частице (шар, эллипсоид), сильно вытянутая (стержень) или сплюснутая частица (диск). К тому же если вспомнить Породовские асимптотики от диска $I(s) \sim s^{-2}$ и

цилиндра $I(s) \sim s^{-3}$, то полученная асимптотика для тора не лишена некоторой физической интерпретации.

<u>В разделе 4.3</u> представлено обобщение формфактора тора на формфактор двойного тора. Молекула шаперонина GroEL [16, 17] представлена рис.9а,(см.ниже) вид сбоку и вид сверху. Для использования формфактора тора для моделирования молекулы белка шаперонина GroEL в виде двух торов лежащих друг над друге, обобщим выражения (4.1), (4.2).

$$\begin{split} & \Phi(s,\theta) & (4.9) & I(s) & (4.10) \\ & \frac{1}{\pi abc} \int_{b-a}^{b+a} \left\{ \int_{-z_1}^{z_1} e^{izs_z} dz + \int_{-z_2}^{z_2} e^{izs_z} dz \right\} J_0(rs_{xy}) r dr & \left(\frac{2}{\pi abcs}\right)^2 \int_{0}^{\pi/2} \frac{1}{\cos^2 \theta} \left\{ \int_{b-a}^{b+a} \{\sin(sc(1+\delta)\cos\theta) + \sin(sc(1-\delta)\cos\theta)\} J_0(sr\sin\theta) r dr \}^2 \right\} \sin \theta d\theta \\ & \Gamma \mathcal{A} e^{\left\{ \frac{z_1}{z_2} \right\}} = c \left(1 \pm \delta\right), \quad \delta = \sqrt{1 - \frac{(r-b)^2}{a^2}} & + \sin(sc(1-\delta)\cos\theta) J_0(sr\sin\theta) r dr \}^2 \\ \end{split}$$

Общий вид такого двойного тора представлен на рис.8а. Для сравнения второй моделью этого белка может служить полый цилиндр с внешним $r_{max} = b + a$, внутренним $r_{min} = (b - a)$ радиусами и высотой H=2L=4c и объёма V'= π (r_{max}^2 - r_{min}^2)Н. Таким образом, мы получили формфакторы шаперонина GroEL в двух аппроксимациях: двойным тором и полым цилиндром. На рис.86 кривая 2 рассчитывалась при параметрах a=22A, b=45A, c=36A по формуле (4.10), кривая 3 вычисленная от формфактора полого цилиндра при значениях $r_{max}=67$ A, $r_{min}=22A$, L=146A.



Поверхность двойного эллиптического тора, как модель молекулы GroEL с указанными геометрическими параметрами (a,b,c).



1-кривая рассеяния рассчитана по формуле Дебая программа CRYSOL, от атомной структуры молекулы белка GroEL; 2кривая от двойного тора (4.10) Рис.8а, 3 кривая рассеяние от полого цилиндра.

<u>В разделе 4.6.</u> описывается восстановление формы модели молекулы белка шаперонина GroEL. Решение обратной задачи рассеяния по известной кристаллической структуре на примере макромолекулы шаперонина GroEL представлены на рис.9. На рис.9а представлена известная структура шаперонина GroEL (Protein Data Bank (PDB) с Digital Object Identifier (DOI): 1kpo) который

является олигомерным белком, состоящим из 14 идентичных субъёдиниц (57 кДа каждая), образующих два тороидальных кольца (по 7субъединиц в каждом), лежащих друг на друге. По формуле Дебая, с помощью программы CRYSOL была рассчитана кривая рассеяния представленная на рис.9б и далее из неё, используя программу GNOM [12, 18] была получена функция парных расстояний рис.9в.



Восстановленная пространственная форма шаперона GroEL, как решение обратной задачи рассеяния по кривой рассеяния I(s), рис.96, и функции парных расстояний P(r), рис.9в, представлена на рис.9г.

В пятой главе представлена экспериментальная часть работы.

В параграфе 5.1 описана методика выделения растворов белков шаперонинов. Выделение шаперонина GroEL и ко-шаперонина GroES из клеток E. coli штамма W3110, трансформированных плазмидой pOF39, содержавшей гены, кодирующие GroEL и GroES, проводилось по методике Корралеса и Фершта [19] с описанными ранее модификациями [20]. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм, принимая коэффициент $A_{280}^{0,1\%}$ равным для GroEL – 0,18 [21]. Молекулярную массу GroEL₁₄ считали равной 840 кДа (субъединица 60 кДа).

В лаборатории молекулярной биоинженерии института биоорганической химии был создан плазмидный вектор для экспрессии гена 146 фага EL,

клетках E. coli. Рекомбинантный белок кодирующего шаперонин, В продуцировался клетками E. coli в растворимой форме. Далее по отрабортанной методике проводилась хроматографическая очистка gp146 на Q-сефарозе. Для концентрирования gp146 использовали концентраторы «Amicon» (США) с размером пор 100 и 30 кДа, соответственно. Образцы центрифугировали при 2500 об/мин («Jouan») в течение 20-30 мин. Конечную концентрацию белков спектрофотометрически при определяли 280 HM, используя расчетные коэффициенты экстинкции: 35870 М⁻¹см⁻¹ для gp146.

<u>В параграфе 5.2.</u> проведена проверка растворов белков на монодисперсность. Монодисперсность растворов белков – бактериального шаперонина GroEL и вирусного шаперонина (gp146) – была предварительно проверена методом аналитического ультрацентрифугирования и динамического светорассеяния. Измерения коэффициента седиментации этим методом проводили при помощи аналитической ультрацентрифуги Весkman Spinco E, оснащённой фотоэлектрической сканирующей приставкой. Скорость вращения ротора составляла 56000 об/мин.; оптическую плотность определяли при длине волны источника излучения равной 280 нм. Из рис.10 видно, что кроме исследуемого белка в растворе присутствует небольшое количество примесей.

интенсивность, отн.ед.



Результат эксперимента по скоростному аналитическому ультрацентрифугированию.



светорассеянию

В параграфе 5.3. описывается проведение малоуглового эксперимента на растворах белков.

Кривые малоуглового рассеяния были получены от растворов белков шаперонина GroEL и вирусного шаперонина gp146 – на лабораторной малоугловой установке, методика проведения и обработки результатов эксперимента на «разбавленных» растворах белков описана в работе [22]. Источник излучения – рентгеновская трубка с медным анодом с длиной волны характеристического излучения $\lambda(Cu_{K\alpha}) = 1,54$ Å. Рабочее напряжение U= 50кB, ток I=40мA. Для отсечки β - линии характеристического излучения использовался фильтр (фольга Ni 50мкм). Формирование падающего на образец пучка осуществлялось «коллиматором Кратки (Kratky)» см. рис.12; высота пучка на образце (длина штриха) 5мм; расстояние образец-детектор 267 мм; рассеянное излучение регистрировалось «одномерным» позиционно чувствительным газовым детектором. Схема эксперимента представлена на рис.12.



Схема малоуглового эксперимента, установки при сканировании по углу при постоянной

энергии падающего на образец монохроматического рентгеновского излучения. 1-источник рентгеновского излучения; 2 -фильтр Ni; 3 – формирователь рентгеновского луча "по Кратки";4 – Падающий на образец рентгеновский луч: (10 x 0.1) мм; 5 - образец; 6 - рассеянное излучение;7 - стопор прямого пучка; 8 – линейный позиционно чувствительный детектор. Образец помещался в стеклянный капилляр диаметром 1 мм с облучаемым объёмом *V*~30*мкл*. Для выделения рассеяния от исследуемого белка из полученной кривой рассеяния от белка в растворе вычиталась отдельно снятая кривая рассеяния от буфера. В связи с неточечным размером рентгеновского пучка на образце (штрих 5мм) использовалось введение коллимационной поправки [23]. Коллимационная поправка вводилась специальными программными средствами. Переход к шкале модуля вектора рассеяния и введение коллимационной поправки выполнялось по образцу – "бегенат серебра".



1-Экспериментальные точки МУР от раствора gp146

с концентрацией с= 18 мг/мл в буфере с ADP, 2сглаженная по РМНК кривая 1 с аппроксимацией в нулевой угол рассеяния; 3- Экспериментальные точки МУР от раствора Бычьего сывороточного альбумина (BSA) с = 1 мг/мл; 4-сглаженная по РМНК кривая 3 с аппроксимацией в нулевой угол рассеяния; На вставке представлена кривая 1 в области Гинье (G) в координатах $Ln(I(s^2))$.



Представлен концентрационный эффект в область Гинье для белка gp146:





1-Экспериментальные точки МУР от раствора GroEL с концентрацией с \cong 9 мг/мл, 2-сглаженная по РМНК кривая 1 с аппроксимацией в нулевой угол рассеяния I_{exp}(0); 3 -рассчитанная ,по формуле Дебая, программа CRYSOL, кривая МУР от кристаллической структуры шаперонина GroEL; 4- сглаженная экспериментальные точки MУР от раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA) с = 1 мг/мл, аппроксимацией в нулевой угол рассеяния I_{BSA}(0);





Оценка радиуса инерции для gp146:

$$M_{\rm exp} = \frac{c_{BSA}}{c_{\rm exp}} \cdot M_{BSA} \cdot \frac{I(0)_{\rm exp}}{I(0)_{BSA}} = (830 \div 900)$$

и радиуса эквивалентной сферы которую можно описать вокруг белка:

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

 $sin(s R_{min}) - sr cos(s R_{min}) = 0$ | : $cos(s R_{min})$ трансцендентное yp - e: $tg(s R_{min}) = s$ его корень:

 $s_{\min} R_{\min} = 4.4934$ и зная из графика s_{\min}

найдем минимальный радиус описанной вокруг макромолекулы белка gp146 сферы: $R_{\min} = \frac{4.49}{0.05 A^{-1}} = 90A$



Функция парных расстояний внутри молекулы Рассчитанные из экспериментальной кривых с помощью программа GNOM функция парных расстояний P(r). 1 - gp146: D_{max}=(18,0-18,5)nm,

2-GroEL: D_{max}=(17,5 - 18,0)nm

С целью поиска устойчивого решения для функции парных расстояний p(r), вычисленной с помощью программы GNOM, кривая МУР (см. кривые 1 и 2, рис.15) многократно подвергалась Фурье преобразованию (2.6) с различными значениями параметров регуляризации [24] с целью найти наилучшее решение для p(r). Из p(r)=0 были найдены максимальные размеры молекул, оказалось, что шаперонин gp146 имеет максимальный размер $D_{max}=(18.0-18.5)$ нм, что на ~5 А больше чем шаперонин GroEL, $D_{max}=(17.5-18.0)$ нм. В результате было выявлено, что несмотря на низкую степень гомологии, ниже(21%), между

бактериальным GroEL и фаговым gp146 шаперонинами габаритные размеры передающие внешнюю форму молекулы близки друг к другу [25].

Если сравнить кривые малоуглового рассеяния для шаперонина GroEL в кристалле и в растворе (см. рис.17), то можно заметить существенное отличие, прежде всего в размере молекулы. А именно, уже в области Гинье видно, что как для отдельного белка GroEL, кривые 2 и 4, так и комплекса GroEL/GroES, кривые 1 и 3, кривые, рассчитанные от кристаллической структуры, кривые 1 и 2, идут ниже, чем экспериментальные кривые 3 и 4, снятые от раствора белков. Следовательно, по области Гинье уже сразу можно сказать, что максимальные размеры молекул рассчитанные из кристаллической структуры больше, чем в растворе. Не ограничиваясь качественным анализом в области Гинье см. рис.13б, был проведен расчет функций парных расстояний P(r) см. рис.18, по всему диапазону $(0 < s < 0.2) A^{-1}$ кривых рассеяния представленных на рис.17. В сводной Таблице представлены основные параметры малоуглового эксперимента белков-шаперонинов. Для состояния "раствор" кривые SAXS получены из эксперимента, для состояния "кристалл" кривые SAXS вычислены по формуле Дебая с помощью программы CRYSOL [13].





1 -расчёт от кристаллической структуры комплекса GroEL/GroES взятой из Protein Data Bank (PDB) (1aon.pdb). 2-расчёт от кристаллической структуры GroEL (PDB, 1kpo.pdb); 3- экспериментальная кривая рассеяния от комплекса GroEL/GroES. 4экспериментальная кривая рассеяния от раствора GroEL см.рис.15 (кривая2)

сглаженная по РМНК с аппроксимацией к I(0).



Функции парных расстояний, расчет программой GNOM [18],

1 - от кристалл. структуры комплекса GroEL/GroES (1aon.pdb),

 $D_{max} = (215 \pm 5)$ Å.

2 –от кристалл.структуры

GroEL.(1kpo.pdb) , Dmax=(190-200)Å;

3-от раствора комплекса GroEL-GroES, D_{max} =(180±5)Å,

4 - от раствора шаперонина GroEL Dmax=(170-175)Å;

Следовательно, уже только по области Гинье (см. рис.17) можно сказать, что максимальные размеры молекул рассчитанные из кристаллической структуры больше, чем в растворе. Не ограничиваясь качественным анализом в области Гинье, был проведен расчет функций парных расстояний P(r) для определения максимального размера по кривым рассеяния, см. рис.18

кривых малоуглового рассеяния.			
белок	состояние	_{Rg} , Å	_{Dmax} ,Å
gp146	раствор (c~18mg/ml)	67 ± 2	175 - 185
	кристалл	68 ± 2	190 - 200
GroEL	pacтвор (c~11mg/ml)	62 ± 2	170 - 175
	кристалл	83 ± 3	210 - 220
GroEL/GroES	раствор (с~15mg/ml)	64 ± 2	175 - 185

Таблица Параметры молекул белков, вычисленные из кривых малоуглового рассеяния.

В разделе 5.5.3. был проведен поиск наилучших параметров модели двойного эллиптического тора и полого цилиндра описывающих экспериментальные кривые рассеяния от растворов фагового (gp146) и бактериального (GroEL) шаперонинов. В качестве второй модели для описания формы молекулы в однородном приближении, мы используем модель полого цилиндра. Одним из методов нелинейных наименьших квадратов, Бройдена – Флетчера Гольдфарба – Шанно B-F-G-S [25], алгоритм NL2SOL [26, 27] на языке программирования ΦOPTPAH, была осуществлена подгонка всех экспериментальных кривых рассеяния к аналитическому выражению для формфактора двойного тора (4.10), путём независимого варьирования трёх параметров: образующей (b) и полуосей двух эллипсоидов (a) и (c). Аналогичная процедура была проделана для модели полого цилиндра (5.1)

$$\frac{4}{(r_{\max}^2 - r_{\min}^2)^2} \int_{0}^{\pi/2} \left(\left(r_{\max}^2 D(sr_{\max}, \theta) - r_{\min}^2 D(sr_{\min}, \theta) \right) \cdot \frac{\sin(LsCos\theta)}{Ls\cos\theta} \right)^2 \sin\theta \, d\theta$$

$$2\partial e \quad D(x, \theta) = \frac{J_1(x \cdot \sin\theta)}{x \cdot \sin\theta}$$
(5.1)

и одиночного тора (4.2). В результате были найдены параметры для всех моделей, причем для каждого случая из экспериментальной кривой предварительно вычиталась постоянная фона. Степень близости при варьировании геометрических параметров моделей (r_{min} , r_{max} , H); (a, b, c); (a_i, b, c_i i=1, 2) численно оценивалось величиной R-фактора (R_f):

$$R_{f} \cong \frac{1}{\left\|\widetilde{I}(s)_{\exp}\right\|} \sum_{j=1}^{N} \left[\widetilde{I}(s)_{mod} - \widetilde{I}(s)_{\exp}\right]^{2} (5.2)$$

Поскольку кривая рассеяния имеет высокую скорость спада, для уравнивания вклада всех точек на кривой рассеяния при вычислении R-фактора по формуле $\widetilde{I}(s) = \sqrt[3]{I(s)}$ закону взвешивание кривой рассеяния (5.1) проводилось по Наилучшие, подгоночные по тіп R_{f} кривые OT ЭТИХ моделей К экспериментальным кривым рассеяния от шаперонинов представлены на рис.19-20. Поиск параметров для каждой модели осуществлялся циклически. Из ряда предложенных моделей (одиночный тор, полый цилиндр, двойной тор) оказалось, что форма двойного тора наилучшим образом, по R_f, моделирует форму исследованных шаперонинов в растворе.



В главе 6. представлено определение геометрических параметров при конформационных изменениях вирусного шаперонина в растворе. Моделирование формы молекулы осуществлялось двумя методами: первый – метод пространственной конфигурации аминокислотных остатков, второй – метод поиска геометрических параметров в модели двойного эллиптического тора с независимыми параметрами для каждого тора. В последнем, взяв за основу выражение для амплитуды рассеяния двух симметричных торов (4.10), обобщим это выражение для случая несимметричных торов, имеющих одну образующую – b, но уже независимые для каждого тора полуоси a_1 , c_1 , a_2 , c_2 :

a = 24 A, b = 43 A, c = 30 A;

$$I(s)_{tt} = \left(\frac{2}{\pi a b c s}\right)^{2} \int_{0}^{\pi/2} \frac{1}{\cos^{2} \theta} \left\{ \int_{b-a_{1}}^{b+a_{1}} \left[F_{1}(sc_{1},\delta_{1}(r),\theta) r dr + \int_{b-a_{2}}^{b+a_{2}} F_{2}(sc_{1},\delta_{2}(r),\theta) r dr \right]^{2} \right\} \sin \theta d\theta$$

$$F_{1}(sc_{1},\delta_{1}(r),\theta) = \sin(sc_{1}(1+\delta_{1})\cos\theta) \cdot J_{0}(sr\sin\theta)$$

$$F_{2}(sc_{1},\delta_{2}(r),\theta) = \sin(sc_{2}(1-\delta_{2})\cos\theta) \cdot J_{0}(sr\sin\theta) \qquad \delta_{1,2} = \sqrt{1 - \frac{(r-b)^{2}}{(a_{1,2})^{2}}}.$$
(5.2)

Таким образом, в нашем случае число независимых параметров модели возросло до N = 5 [24]. Следует заметить, что в общем случае число независимых параметров модели не должно быть больше числа шеноновских каналов, определяемых выражением N=2[(s_{max} - s_{min})D_{max}/2 π]+1. В нашем случае, подставляя численные значения: s_{max}=0.200Å s_{min}=0.018Å, D_{max}=190Å получим для максимального числа независимых параметров получим N_{max} = 12, таким

образом условие N < N_{max} выполнено. При моделировании аминокислотными остатками программой GASBOR. Из расчёта функции p(r) для кривых МУР от раствора белка gp146 находящегося в «исходном» буфере и буфере содержащем АТФ можно сделать вывод, что при добавлении в раствор АТФ максимальный размер частицы сохраняется. Более определённые выводы о форме белковых комплексов можно сделать по результатам моделирования пространственной формы макромолекулы.



Рис. 21а,b.

а) экспериментальные кривые малоуглового рассеяния раствора gp146, черная кривая от раствора gp146 в «исходном» буфере: 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl,;
 красная кривая – от раствора gp146 в «исходном» буфере с добавлением 3 mM АТФ; концентрация белка в растворе 10 мг/мл,

b) эти же экспериментальные кривые малоуглового рассеяния раствора gp146 в координатах Порода.



Рис.22. Моделирование белка gp146 в «исходном» буфере (рис.21), с помощью программы GASBOR, вид А в разрезе, В-вид сбоку, С - вид сверху, D - вид снизу.



Рис. 23.

Моделирование конформационного перехода а), б), г), д) моделирование аминокислотными остатками (а.к.о.) программа GASBOR с осью симметрии Р7 и модель макромолекулы в виде двойного эллиптического тора; а), б) gp146 в «исходном» буфере; в) модель – не симметричные торы ф-ла (5.2) рассчитано по кривой рассеяния, представленной на рис.21 г), д) gp146 в буфере с АТФ, е) модель - симметричные торы рассчитано по кривой рассеяния, представленной на рис.21, красная кривая.

Выводы

1.Получено приближённое аналитическое выражение формфактора для рассеяния. эллиптического тора функции модуля вектора Из как приближённого выражения для формфактора тора были выведены приближение Гинье для радиуса инерции частицы и асимптотика Порода показывающая закон спада со степенью -6.

Известное ранее точное выражение формфактора тора впервые обобщено для случая двойного симметричного и несимметричного торов.

21

Разработаны компьютерные программы для расчета кривой МУР при заданных параметрах тора на основе полученных автором выражений.

2. Разработанные автором программы применены для определения параметров структурных моделей молекул ряда шаперонинов. Для шаперонина GroEL по данным малоуглового рассеяния показано, что максимальный размер частицы в растворе на 2-3 нм больше, чем известные по данным рентгеноструктурного анализа.

3. Впервые методом малоуглового рентгеновского рассеяния проведено изучение макромолекулы вирусного шаперонина PG146. Полученные автором экспериментальные результаты подтверждают изменение конформации макромолекулы в зависимости от внешних условий.

Моделирование строения данных макромолекул шаперонинов С использованием полученных в работе теоретических выражений показывает, что в процессе конформационного перехода происходит изменение формы gp146 от симметричной формы, описываемой двойным макромолекулы $=a_1=a_2=(20\pm 1)$ Å; эллиптическим параметрами: $b=(50\pm 2)Å;$ тором с a к несимметричному: $a_1 = (11 \pm 1, 5)$ Å, $a_2 = (30 \pm 2)$ Å, $b = (50 \pm 2)$ Å, $c=c_1=c_2=(34\pm 1)\text{Å},$ $c_1 = (40 \pm 2)$ Å, $c_2 = (30 \pm 1)$ Å

4. Предложенный подход с использованием приближённых аналитических выражений для тороидальных формфакторов позволяет быстро и устойчиво описывать конформационные изменения в макромолекулах шаперонинов, пользуясь при этом небольшим числом структурных параметров.

Цитируемая литература

1.Glatter, Kratky, 1982. Glatter O. and Kratky O. Small angle X-ray scattering. ACADEMIC PRESS INC. (London), 1982.

2. Марченков В.В., Марченко Н.Ю., Марченкова С.Ю., Семисотнов Г.В. Молекулярные шаперонины прокариотических и эукариотических клеток.// Успехи биологической химии, т. 46, 2006, с.279-302.

3. Filchikov M.V., Osmakov D.I. *Pseudomonas Aeruginosa bacteriophage SN: 3Dreconstruction of the capsid and identification of surface proteins by electron microscopy.//* Russian Journal of Bioorganic Chemistry, Vol. 35, No. 6. 2009, pp. 728-733.

4. Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. // Science. 2002. V. 295 P. 1852–58.

5. Mayhew, M., A. C. R. Da Silva, Martin J., Erdjument-Bromage H., Tempst P. and Hartl F. U.. Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. // Nature. 1996. V. 379. P. 420-426.

6. Roseman, A. M., Chen S., White H., Braig, K. and Saibil, H. R. *The chaperonin ATPase cycle: mechanism of allosteric switching and movements of substrate-binding domains in GroEL*. // Cell. 1996. V. 87. P. 241–251.

Marchenkov V. V. and Semisotnov G. V. *GroEL-Assisted Protein Folding: Does It Occur Within the Chaperonin Inner Cavity?* // Int J Mol Sci. 2009. V. 10. P. 2066-2083.
 Banach M., Stapor K. and Roterman I. *Chaperonin Structure – The Large Multi-Subunit Protein Complex.* // Int. J. Mol. Sci. 2009. V. 10. P. 844-861.

9. Booth C. R., Meyer A. S., Cong Y., Topf M., Sali A., Ludtke S. J., Chiu W. and Frydman J. *Mechanism of lid closure in the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT*. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2008. V.15. P. 746-753.

10. Иверонова В.И., Ревкевич Г.П. Теория рассеяния рентгеновских лучей. МГУ, 1972 11. Тихонов, Арсенин, 1986. Тихонов А.Н., Арсенин В.Я. Методы решения

некорректных задач. Учебное пособие для вузов. Изд. 3-е, исправленное.- М.: Гл. ред. Физ.-мат. лит., 1986.- 288с.

12. Svergun D.I., Semenyuk A.V., Feigin L.A., *Small-angle scattering data treatment by the regularization method*. //Acta Crystallogr. 1988. A44, P.244-250.

13. Svergun D., Barberato C. and Koch J. H. *CRYSOL - a program to evalate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates.*// Appl. Cyst. 1995. V.28. P.768 - 773.

14. Takeshi Kawaguchi. Radii of gyration and scattering functions of a torus and its derivatives.// J. Apple. Cyst. 2001. V.34, P.580 - 584.

15. Амарантов С.В. Восстановление формы наночастицы по решению прямой и обратной задач малоуглового рассеяния для единичного потенциала ограниченного в объёме тора.// ЖЭТФ, 2009, т.135, вып.4, с. 721-737.

16. Braig K., Otwinowski Z., Hegde R., Boisvert D. C., Joachimiak A., Horwich A.L. and Sigler, P.B. *The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 A.* // Nature. 1994. V. 371. P. 578–586.

17. Braig, K., Adams, P.D., and Brunger, A.T. Conformational variability in the refined structure of the chaperonin GroEL at 2.8 Å resolution. //Nat. Sruct. Biol., 1995. 2, 1083-1094.

18. Svergun D.I., *Determination of the regularization parameter in indirect transform methods using perceptual criteria*. J. Appl. Crystallogr. 1992.V.25. P.495 – 503.

19. Corrales F.J., Fersht A.R. *Kinetic significance of GroEL14.(GroES7)2 complexes in molecular chaperone activity.//* Fold. Des. 1996. 1, 265-273.

20. Naletova I.N., Muronetz V.I., Schmalhausen E.V. Unfolded, oxidized, and thermoinactivated forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase interact with the chaperonin GroEL in different ways.//Biochim. Biophys. Acta (2006) 1764, 831-838.

21. Walters C., Errington N., Rowe A.J., Harding S.E. *Hydrolysable ATP is a requirement for the correct interaction of molecular chaperonins cpn60 and cpn10.*// Biochem. J. 2002. 364:849-855.

22. Волков В.В., Лапук В.А., Штыкова Э.В., Дембо К.А., Соколова А.В., Амарантов С.В., и др. Особенности структуры Fab –фрагментов имуноглобулина IgM-RF в растворе.// Кристаллография.- 2008.- Том53, №3, с.499-506.

23. Фёдоров Б.А., Фейгин Л.А., Дембо А.Т. Учёт коллимационной поправки при рассеянии рентгеновских лучей под малыми углами. Случай «бесконечно» высокой щели.//Кристаллография, 1966, т.11, №2, с.159-163.

24. Амарантов С.В., Налётова И.Н., Курочкина Л.П., Моделирование формы шаперонинов по кривым малоуглового рентгеновского рассеяния с использованием формфактора тора.// ЖЭТФ, 2011, т.140, вып.2(8), с.368-386

25. Гилл и др. 1985. Гилл Ф., Мюррей У., Райт М. Практическая оптимизация. М.: Мир, 1985.

26. Dennis J.E., Gay D.M., Welsch R. E. *An Adaptive Nonlinear Least-Squares Algorithm* // ACM Transactions on Matematical Software, 1981, V.7, N3, p.348 -368.

27. Dennis J.E., Gay D.M., Welsch R. E. *ALGORITM 573, NL2SOL – An Adaptive Nonlinear Least – Squares Algorithm [E4]//* ACM Transactions on Matematical Software, 1981, V.7, N3, p.369 – 383.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Волков В.В., Лапук В.А., Штыкова Э.В., Дембо К.А., Соколова А.В., Амарантов С.В., и др. Особенности структуры Fab –фрагментов имуноглобулина IgM-RF в растворе. // Кристаллография, 2008, Том53, №3, с.499-506.

2.Амарантов С.В. Восстановление формы наночастицы по решению прямой и обратной задач малоуглового рассеяния для единичного потенциала ограниченного в объёме тора.// ЖЭТФ, 2009, т.135, вып.4, с. 721-737.

3. Амарантов С.В., Налётова И.Н., Курочкина Л.П., Моделирование формы шаперонинов по кривым малоуглового рентгеновского рассеяния с использованием формфактора тора.// ЖЭТФ, 2011, т.140, вып.2(8), с.368-386

4. Амарантов С.В., Волков В.В. Аналитический расчет интенсивности малоуглового рассеяния и расчет функции Паттерсона для единичного потенциала, заданного на торе // VI Международная конференция по применению Рентгеновского, Синхротронного излучений, Нейтронов и Электронов для исследования материалов (РСНЭ-2007), Москва, 12-17ноября, 2007 г.Сб.тезисов, С.400.

5. Амарантов С.В., Волков В.В. Восстановление формы наночастицы по решению обратной задачи малоуглового рассеяния для единичного потенциала ограниченного вобъёме тора.// І Всероссийская конференция «Многомасштабное моделирование процессов и структур в нанотехнологиях» (ММПСН–2008) Москва, Московский инженерно-физический институт (государственный университет) 12–14 марта2008 г. Сборник тезисов докладов с.22.

6. Амарантов С.В., Налётова И.Н., Муронец В.И., Курочкина Л.П. Моделирование формы белков-шаперонинов по кривым малоуглового рентгеновского рассеяния.// XVIII Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем" г. Казань (Яльчик) 4-9 июля 2011, Сб. тезисов с.7.

7. Курочкина Л. П., Семенюк П. И., Орлов В.Н., Амарантов С.В., Сыкилинда Н.Н.// Вирусные шапероны: структура, свойства и механизм функционирования. // V Российский симпозиум "Белки и пептиды" г. Петрозаводск, 8-12 августа, 2011. Сборник тезисов с.119.

8. Амарантов С.В., Налётова И.Н., Курочкина Л.П. Исследование методом малоуглового рентгеновского рассеяния белков – шаперонинов в различных конформациях. VIII Национальная конференция // ~ Рентгеновское Электроны Синхротронное Нейтроны и излучение, для исследования наносистем и материалов. Нано –Био – Инфо - Когнетивные технологии». РСНЭ – НБИК, 2011, г. Москва. Сб. тезисов с.425.

9. Амарантов С.В., Налётова И.Н., Волков В.В.// Приближение формы белков – шаперонинов по кривым малоуглового рассеяния однородным тором.// XIX Всероссийская конференция "Структура и динамика молекулярных систем" г. Казань (Яльчик) 25-30 июля 2012. Сб. тезисов с.7.