

Том 42, Номер 6

ISSN 0207-401X

Июнь 2023



ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА



www.sciencejournals.ru

Журнал публикует статьи по следующей тематике:
элементарные физико-химические процессы • строение химических соединений, квантовая химия, спектроскопия • реакционная способность, кинетика химических реакций, катализ • влияние внешних факторов на физико-химические превращения • физико-химические процессы на поверхности • ударные волны • горение и взрыв • физические методы исследования химических реакций • химическая физика биологических процессов • динамика транспортных процессов • электрические и магнитные свойства материалов • химическая физика полимерных материалов • химия атмосферы и экология • химическая физика наноматериалов



СОДЕРЖАНИЕ

Том 42, номер 6, 2023

К 100-летию со дня рождения академика В.И. Гольданского

Крупянский Ю.Ф., Генералова А.А., Коваленко В.В., Лойко Н.Г., Терешкин Э.В., Моисеенко А.В., Терешкина К.Б., Соколова О.С., Попов А.Н.	
Конденсация ДНК в бактериях	3
Аветисов В.А., Астахов А.М., Валов А.Ф., Маркина А.А., Муратов А.Д., Петровский В.С., Фролкина М.А.	
Арки Эйлера и пружины Дуффинга размером в несколько нанометров	21
Шайтан К.В.	
Почему белок сворачивается в уникальную 3D-структуру? И не только это...	40
Горохов В.В., Нокс П.П., Корватовский Б.Н., Сейфуллина Н.Х., Горячев С.Н., Гришанова Н.П., Пашенко В.З., Рубин А.Б.	
Температурная зависимость нелинейного характера динамики дезактивации возбужденных состояний триптофана в различных средах	63
Черепанов Д.А., Милановский Г.Е., Айбуш А.В., Надточенко В.А.	
Дипольный момент перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла <i>a</i> в растворителях с различным индексом рефракции	77
Черепанов Д.А., Милановский Г.Е., Надточенко В.А., Семёнов А.Ю.	
Энергетический барьер фотоиндуцированного разделения зарядов в реакционных центрах фотосистем 1 и 2	88

===== К 100-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ АКАДЕМИКА В.И. ГОЛЬДАНСКОГО =====

УДК 573.7; 577.3; 577.1; 577.15

КОНДЕНСАЦИЯ ДНК В БАКТЕРИЯХ

© 2023 г. Ю. Ф. Крупянский^{1*}, А. А. Генералова¹, В. В. Коваленко¹, Н. Г. Лойко^{1, 2},
Э. В. Терешкин¹, А. В. Моисеенко^{1, 3}, К. Б. Терешкина¹, О. С. Соколова³, А. Н. Попов⁴

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук,
Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук,
Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴European Synchrotron Radiation Facility, 71, avenue des Martyrs, CS 40220, 38043 Grenoble Cedex 9, France

*E-mail: yufk@chph.ras.ru

Поступила в редакцию 11.01.2023;

после доработки 18.01.2023;

принята в печать 20.01.2023

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) организована в нуклеоиде активно растущей клетки иерархически — с тремя уровнями компактизации ДНК. Нижний уровень (малый масштаб ≥ 1 Кбайт пар оснований) обеспечивается взаимодействием со связанными с ДНК белками. Активно растущие клетки поддерживают динамический, далекий от равновесия порядок благодаря метаболизму. При переходе клеток в покоящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать, и клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК. Проведено изучение структуры ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток, образующихся при стрессе голодания, с помощью методов дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Экспериментальные результаты позволили визуализировать структуры нижнего иерархического уровня компактизации ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток. Впервые проведенная серия дифракционных экспериментов свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации ДНК во всех изученных бактериях. Метод ПЭМ позволил извлечь тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*). Обнаружены внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомоподобные структуры ДНК. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась впервые, она является результатом множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг связывающего ДНК белка голодающих клеток (Dps) и его ассоциатов. Обнаруженные нами различные типы конденсированного состояния ДНК в изучаемых покоящихся клетках *E. coli* (гетерогенность конденсации ДНК) дают дополнительные аргументы в пользу концепции, рассматривающей микробную популяцию как многоклеточный организм. Проведено изучение изменений в архитектуре ДНК под влиянием химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина (4-ГР). Рост концентрации 4-ГР индуцирует переход части клеток популяции в анабиотическое покоящееся состояние, а затем — и в мумифицированное состояние. Проведенные исследования структуры ДНК в анабиотическом и мумифицированном состояниях показывают спектроскопическую идентичность структуры ДНК в покоящемся анабиотическом состоянии и в покоящемся состоянии, образующемся при стрессе голодания. Исследования структуры ДНК в мумифицированном состоянии показывают сильное отличие последней от структуры ДНК в анабиотическом состоянии.

Ключевые слова: дезоксирибонуклеиновая кислота, бактерия *Escherichia coli*, стресс голодания, внутриклеточные структуры — нанокристаллическая, жидкокристаллическая, свернутая нуклеосомоподобная, аутоиндуктор анабиоза, 4-гексилрезорцин, анабиотическое и мумифицированное состояние.

DOI: 10.31857/S0207401X23060067, EDN: UILPBU

ВВЕДЕНИЕ

В 1974–1975 гг. В.И. Гольданский, 100-летию со дня рождения которого посвящена данная статья, организовал в Отделе строения вещества ИХФ АН СССР семинары по динамическим и

функциональным свойствам белков, на которых выступали проф. Г.И. Лихтенштейн из Черногловки и чл.-корр. академии наук (ныне — академик) А.Б. Рубин из МГУ. Оба доклада произвели большое впечатление. В.И. Гольданский выступил после докладов и заявил, что в Отделе строе-

ния вещества ИХФ надо начинать заниматься биологическими системами. Начиная с этого времени как минимум четверть широчайших научных интересов Виталия Иосифовича была связана с работами по динамике белков. Для многих, включая одного из авторов данной статьи (Ю.Ф. Крупянский), началась эпоха изучения динамики белка — чрезвычайно нужного и перспективного направления исследований. Его зарубежные коллеги в это время думали так же. Работы по динамике белков стали основной темой зарождающегося сотрудничества с Институтом проф. Р. Мессбауэра в Мюнхене и с группой из Иллинойского университета, возглавляемой членом Национальной академии наук США Г. Фрауэнфельдером (подробнее см.: Крупянский Ю.Ф. // Вестн. РАН. 2023. Т. 93. № 6.). Нобелевский лауреат Р. Мессбауэр и Г. Фрауэнфельдер пришли к пониманию перспективности изучения биологических систем, работая еще в области ядерной физики, так же как и В.И. Гольданский. К 1975 году у Виталия Иосифовича установилось тесное сотрудничество с Институтом Е-15 Мюнхенского технического университета, где велись лучшие работы по применению эффекта Мессбауэра. С этого года начали проводиться традиционные двусторонние семинары СССР — ФРГ в области мессбауэровской спектроскопии. Научный уровень этих семинаров был чрезвычайно высоким: съезжались лучшие ученые не только из этих двух стран, но и гости из США и других развитых стран. Наши работы по динамике белков сразу привлекли внимание высокой научной общественности, сначала ученых, занимающихся эффектом Мессбауэра, а затем и биофизиков. Все это привело к тому, что в 1991 году в Черногловке состоялся семинар СССР — США, который назывался “Белки и стекла”. Название выбрано было специально, чтобы показать, что в результате самоорганизации белки могут оказываться в локальных (а не глобальном) минимумах энергии. Как в то время, так и частично сейчас это абсолютно не очевидно. Сопредседателями семинара были Г. Фрауэнфельдер и В.И. Гольданский. Семинар стал большим событием в отечественной биофизике и химической физике биологических систем. Фрауэнфельдер привез с собой выдающуюся команду из США — многих лучших на то время американских биофизиков. С нашей стороны присутствовал весь цвет Советской биофизики что, в конце концов, для нее плохо кончилось, так как более половины участников этого семинара из СССР вскоре оказались надолго в США или других странах. Наступила перестройка и тяжелые для отечественной науки времена.

Один из авторов данной статьи (Ю.Ф. Крупянский) далее исследовал возможность изучения структурно-динамических свойств биологических систем с помощью фемтосекундных рент-

геновских лазеров на свободных электронах (XFEL), а затем перешел к изучению конденсации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) в бактериальных клетках. Этой темой наша группа из Отдела строения вещества занимается с 2016 г. В настоящей работе изложены основные результаты, полученные группой за это время.

Бактериальная геномная ДНК, взаимодействуя со связанными с ДНК белками (NAP — nucleoid-associated proteins), располагается в конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде клетки. Пять десятилетий интенсивных исследований показали [1, 2], что ДНК организована в нуклеоиде активно растущей клетки *Escherichia coli* (*E. coli*) иерархически — с тремя уровнями компактизации [2, 3].

Изменения параметров окружающей среды воспринимаются микроорганизмами как стресс. В ответ на стрессовые воздействия клетки бактерии *E. coli* [4, 5] включают наследственные стратегии адаптации, основанные на структурных, биохимических и генетических перестройках, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в неблагоприятных условиях. Все стратегии направлены на защиту генетического материала клетки (ДНК) [5].

В активно растущих клетках, как и в других живых системах благодаря метаболизму поддерживается динамический, далекий от равновесия порядок [6]. По мере перехода клеток в покоящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать и клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК (плотную упаковку ДНК, наноразмерную кристаллизацию ДНК с белками и т.д.).

В данной работе приведены результаты экспериментальных исследований структурной организации ДНК в покоящихся клетках бактерии *E. coli* с помощью методов дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Приведены результаты молекулярно-динамического моделирования взаимодействия ДНК с NAP.

В разд. I обсуждается структура конденсированной ДНК в активно растущей клетке. В разд. II приведены результаты экспериментальных исследований структурной организации ДНК в покоящихся клетках при воздействии на культуру бактерий стресса голодания. Обсуждаются изменения в структуре конденсированной ДНК при переходе от активно растущих к покоящимся клеткам.

При действии на культуру клеток химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина (4-ГР) клетки переходят сначала в анабиотическое покоящееся состояние (практически

полное отсутствие метаболизма), а при дальнейшем увеличении концентрации 4-ГР — в мумифицированное состояние (полное отсутствие метаболизма при сохранении формы). В разд. III рассматриваются результаты экспериментальных исследований структурной организации ДНК для анабиотических и мумифицированных клеток.

В разд. IV проведено обсуждение полученных результатов и делаются основные выводы, которые следуют из анализа оригинальных экспериментальных результатов и литературных данных. В разд. V приведены перспективы исследований. Обсуждаются последние литературные методические успехи в наноуровневых визуализации и томографии клеток с помощью синхротронного излучения и электронной микроскопии, которые позволят в обозримом будущем определять архитектуру нуклеоида с высоким разрешением как в активно растущих, так и в покоящихся бактериях.

I. КОНДЕНСАЦИЯ ДНК В АКТИВНО РАСТУЩЕЙ КЛЕТКЕ

I. 1. Конденсация ДНК

Дезоксирибонуклеиновая кислота — длинный, сильно заряженный гетерополимер. В разбавленном растворе ДНК бактерии *E. coli* образует стохастический клубок объемом около 500 мкм^3 [2, 7, 8]. Бактерия *E. coli* — широко распространенная грамотрицательная бактерия, являющаяся одним из важнейших инструментов биологической науки [9]. В этом смысле она представляет собой аналог атома водорода для микробиологии. Бактериальная геномная ДНК и ассоциированные с ней белки (NAP) расположены в клетке в сильно конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде [2]. Объем нуклеоида *E. coli*, где располагается ДНК в клетке, не превышает 1 мкм^3 . Для размещения в нуклеоиде ДНК должна быть сильно компактизованной [8]. Кроме того, конденсированная в нуклеоиде ДНК должна быть функциональной, способной осуществлять такие процессы, как репликация, рекомбинация, сегрегация и транскрипция. Структура бактериального нуклеоида с высоким разрешением еще не определена. Исследования, начавшиеся в 1971 г., показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру и что конденсация ДНК имеет некоторое сходство с самоорганизацией (фолдингом) белка [8, 10–12]. Новые методы молекулярной биологии, сокращенно называемые 3С (chromosome conformation capture) и Hi-C (high-throughput technique to capture chromatin conformation) [13–15], применяемые для изучения структурной организации ДНК в клетке, позволили выделить три уровня структурной организации компактной бактериальной ДНК [2]. Низший уровень (малый масштаб $\sim 1 \text{ Кбайт}$ пар

оснований (п.о.)) обеспечивается взаимодействием ДНК с белками, связывающими ДНК. На промежуточном уровне (средний масштаб $\sim 10 \text{ Кбайт}$ п.о.) ДНК образует сверхспиральные петли. На самом высоком уровне (мега масштаб $\sim 10^6$ п.о.) ДНК образует шесть пространственно организованных макродоменов с четкой территориальной организацией, на которые разделен бактериальный нуклеоид.

I. 2. Фрактальная (складчатая) глобула

Согласно изложенному в работе [16], коллапс длинного полимера из-за топологических ограничений происходит с образованием складок все увеличивающихся размеров. Авторы работы [17] продемонстрировали, что этот процесс должен приводить к образованию долгоживущего промежуточного состояния, которое они назвали складчатой глобулой (впоследствии ее стали называть фрактальной). Было предположено, что такая глобула характеризуется иерархией складок, образуя самоподобную структуру [17]. Экспериментальное исследование свойств пространственной организации хроматина в ядре клетки человека с использованием методов 3С и Hi-C привлекло внимание к фрактальной глобуле как к структурной модели хроматина на мегамишштабе $\sim 10 \text{ Мбайт}$ [18].

Фрактальная глобула обладает несколькими важными свойствами, которые делают ее привлекательным способом организации хроматина. Перечислим два таких свойства.

1. У фрактальной глобулы нет узлов. Динамика раскрытия хроматина в незаузленной конформации фрактальной глобулы очень сильно отличается от динамики раскрытия ДНК в чрезвычайно запутанной конформации равновесной глобулы [19]. В силу того, что она практически не заузлена, любая область фрактальной глобулы может легко и быстро разворачиваться, становясь доступной для транскрипционных и других белковых механизмов клетки.

2. Фрактальная глобула имеет поразительную территориальную организацию цепочки, которая сильно контрастирует с перемешанной организацией цепочки, наблюдаемой в равновесной глобуле. Хромосомные контакты в клетках человека были охарактеризованы с помощью метода Hi-C. Сравнение с экспериментом показывает, что фрактальная глобула на качественном уровне описывает свойства хромосомы человека на мегамишштабах (3-м уровне структурной организации ДНК). Эти два свойства фрактальной глобулы позволили предложить ее в качестве модели сворачивания ДНК внутри клетки на мегамишштабе.

После “триумфального шествия” модели фрактальной глобулы как крупномасштабной упаковки ДНК в хроматине в 2011–2014 гг. стали

появляться экспериментальные данные, ставящие под сомнение это утверждение. Выяснилось, что эксперименты по малоугловому рассеянию нейтронов (МУРН) способны подтвердить или опровергнуть справедливость той или иной модели, построенной для описания крупномасштабной структуры хроматина. [20]. Интенсивность рассеяния нейтронов на ядрах эритроцитов описывается степенной функцией. Эксперименты по МУРН на хроматине определяют показатель степени равным трем или близким к нему [20], что противоречит модели складчатой (фрактальной) глобулы и фактически отрицает ее как лучшую модель для описания крупномасштабной структуры хроматина в ядре клетки. Для складчатой глобулы показатель степени должен бы быть равен четырем.

Отметим еще одно очень важное свойство фрактальной глобулы. В этой модели структура конденсированной ДНК не отвечает глобальному минимуму энергии энергетического ландшафта сворачивания ДНК. Структура конденсированной ДНК соответствует долгоживущему промежуточному, частично равновесному состоянию, поэтому можно ожидать, что ДНК в различных клетках бактериальной колонии может конденсироваться различно. Структура ДНК в каждой клетке может отличаться от структуры ДНК в соседних клетках. Ансамбль клеток оказывается гетерогенным. Этот факт согласуется с известным в микробиологии утверждением, что для бактериальной многоклеточной системы характерна физиологическая и морфологическая гетерогенность входящих в нее клеток [4]. (О гетерогенности упаковки ДНК в различных клетках подробнее см. данные, приведенные в конце разд. II).

Поразительная территориальная организация и возможность любой области глобулы быстро и легко разворачиваться делает модели, устроенные по типу модели фрактальной глобулы, одними из самых привлекательных моделей крупномасштабной упаковки ДНК в клетке, к тому же качественно совпадающей со многими (но не со всеми) экспериментальными исследованиями.

II. СТРУКТУРА КОНДЕНСИРОВАННОЙ ДНК ПРИ СТРЕССЕ ГОЛОДАНИЯ

II. 1. Бактериальный рост

Бактериальный рост — это деление клетки бактерии на две дочерние клетки. Дочерние клетки генетически идентичны исходной клетке. Динамику роста бактериальной популяции подразделяют на четыре фазы [21]. Первая фаза роста называется лаг-фазой, далее следует экспоненциальная фаза, во время которой происходит быстрый экспоненциальный рост популяции. В ходе экспоненциальной фазы питательные веще-

ства потребляются с максимальной скоростью до тех пор, пока одно из необходимых соединений не закончится и не начнет подавлять рост. Третья фаза роста называется стационарной, она начинается при нехватке питательных веществ для быстрого роста. Скорость метаболизма падает, клетки начинают расщеплять белки, не являющиеся строго необходимыми. В этой фазе клетки начинают испытывать стресс голодания. В ответ на стресс голодания клетки микроорганизмов включают наследственные стратегии адаптации, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях. Эти стратегии направлены на защиту генетического материала клетки (ДНК) [5]. Если стресс голодания сохраняется, то происходит либо образование покоящихся форм, характеризующихся практически полным отсутствием метаболизма (обмена с внешней средой), либо гибель клеток. Большинство клеток (до 99.98%) в голодающих долгое время популяциях гибнут. Остальные клетки (0.02%) развиваются в покоящиеся формы [4, 22].

II. 2. Смена модели упорядочения. Образование покоящихся клеток

В классическом труде “Что такое жизнь с точки зрения физики?” Э. Шредингер [23] пишет, что жизнь представляет собой непрерывную борьбу против стремления к состоянию термодинамического равновесия с максимальной энтропией, что тождественно равно смерти. Живые системы поддерживают упорядоченное, далекое от равновесия состояние, питаясь химическими соединениями. Метаболизм (обмен с внешней средой) — источник динамического порядка. Если прекращается метаболизм, то термодинамического равновесия избежать нельзя.

По мере перехода клеток в покоящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать. Клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК (плотную упаковку ДНК, наноуровневую кристаллизацию ДНК с белками и т.д.). Эти адаптационные механизмы нужны для выживания клеток. При наступлении благоприятных условий выжившие клетки снова перейдут к нормальной жизни.

При стрессе голодания поддержание упорядоченности динамическим способом становится невозможным (клеточные процессы становятся неэффективными, метаболизм почти отсутствует); бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (ДНК) — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [6]. Выжившие с помо-

щью физических механизмов защиты ДНК клетки становятся покоящимися.

Для покоящихся клеток можно ожидать совершенно новых структур (новой архитектуры ДНК) по сравнению с растущими клетками. Экспериментальному изучению структурной организации конденсированной ДНК в покоящихся клетках (стресс голодания) посвящены следующие разделы.

II. 3. ИССЛЕДУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

II. 3.1. Бактериальные штаммы, генетически модифицированные штаммы, реагенты

В наших экспериментах использовались следующие бактериальные штаммы *E. coli*: 1 – K-12 MG 1655, дикий штамм; 2 – K-12 MG1655 Δ dps, мутант Dps-ноль; 3 – Top10, дикий штамм; 4 – Top10/pBAD-DPS, мутант с оверэкспрессией белка Dps (Dps – DNA-binding protein from starved cells, связывающий ДНК белок из голодающих клеток); 5 – BL21-Gold(DE3)/pET-DPS, мутант с оверэкспрессией белка Dps. Штаммы бактерий 1 и 2 получены в Институте биофизики клетки ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических наук РАН”, Россия. Штаммы бактерий 3–5 были предоставлены проф. В.Н. Лазаревым из Лаборатории генной инженерии ФНИКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия (подробнее о бактериальных штаммах см. оригинальные публикации [22, 24, 25]).

Все реагенты приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури) или VWR (Солон, Огайо, США), если не указано иное (подробнее см. оригинальные публикации [22, 24]). Процедура получения генетически модифицированных штаммов бактерии *E. coli* подробно описана в работах [24, 25]. Процесс накопления рекомбинантного белка DPS подробно описан в работе [25].

II. 3.2. Приготовление покоящихся клеток *E. coli* для различных штаммов

K-12 MG1655. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл модифицированной среды M9.

Top10, K-12 MG1655 Δ dps. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды LB.

Top10/pBAD-DPS. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл среды LB или модифицированной среды M9, дополненной ампициллином с концентрацией 150 мкг/мл.

BL21-Gold(DE3)/pET-DPS. Бактерии выращивали в течение 24 ч при 28°C и встряхивании (140 об/мин) в колбах объемом 250 мл, содержащих 50 мл модифицированной среды M9, дополненной 150 мкг/мл ампициллина с пониженным содержанием аммонийного азота. Клетки всех штаммов выдерживались при температуре 21°C.

II. 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

II. 4.1. Дифракции синхротронного излучения

Рентгеноструктурный анализ (РСА) – самый дорогой и трудоемкий экспериментальный метод, применяемый в химической физике биологических систем. В качестве источника излучения в рентгеновском диапазоне часто применяют синхротронное излучение, особенно для изучения малых кристаллов (с размерами от мкм до нм) и неупорядоченных объектов, таких как вирусы и клетки. Для визуализации структуры неупорядоченных биологических объектов используются последние достижения в биологии, химии, физике и математике.

В проведенных экспериментах на станции ID23-1 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция) пучок рентгеновского излучения имел длину волны $\lambda = 1.6799 \text{ \AA}$, ширину апертуры – 10 мкм; время экспозиции для каждой дифракционной картины составляло 5 с, плоский детектор PILATUS 6M располагался на расстоянии 95 см за образцом по ходу пучка. Измерения проводили при температуре 100 К.

Схема эксперимента аналогична схеме двумерной порошковой дифракции с плоским детектором. Образец представляет собой ансамбль клеток бактерий. Перед использованием препараты наносили на специальную криопетлю. Для простоты будем полагать, что под действием стресса в клетках бактерий происходит кристаллизация конденсированной ДНК, размеры нанокристаллов находятся в пределах 200–400 нм [6]. Нанокристаллы нуклеоида вместе с клетками бактерий располагаются под произвольными углами к падающему пучку. Рассеянное излучение собирается на плоском детекторе. Случайная ориентированность кристаллитов в образце приводит к образованию гладких дифракционных колец вокруг оси, образованной падающим пучком, в отличие от дискретных точек, наблюдаемых при рассеянии на монокристалле. Угол между осью, образованной падающим пучком и дифракционным кольцом, называется углом рассеяния и обозначается как 2θ . Вектор рассеяния $\mathbf{q}$ определяется следующим образом:

$$\mathbf{q} = 4\pi \sin \theta / \lambda. \quad (1)$$

Соответственно, “период кристаллической структуры” или разрешение, отвечающее данному углу рассеяния, вычисляется как

$$d = \frac{\lambda}{2 \sin \theta}. \quad (2)$$

Наличие в образце периодических структур с периодом d приводит в эксперименте к повышенной интенсивности рассеяния, соответствующей данному периоду кристаллической структуры. Таким образом, исследование картин рассеяния на бактериальных клетках, позволит определить характерные пространственные периоды упорядоченных структур, возникающих в исследуемой системе.

II. 4.2. Просвечивающая электронная микроскопия

Ультратонкие срезы исследовали в просвечивающих электронных микроскопах JEM1011 и JEM-2100 фирмы Jeol (Japan) при ускоряющих напряжениях 80 и 200 кВ, соответственно, и увеличении 13000–21000 $\times$. Изображения регистрировали ПЗС-камерами (ПЗС – прибор с зарядовой связью) Ultrascan 1000XP и ES500W (Gatan, USA). Томограммы получали из полутолстых (300–400 нм) срезов с помощью программного обеспечения Jeol Tomography (Jeol, Japan). Угол наклона гониометра колеблется от -60° до $+60^\circ$ (с постоянным шагом в 1°). Серия изображений была совмещена с помощью Gatan Digital Micrograph (Gatan, USA), а затем восстановлена с помощью алгоритма обратной проекции в IMOD4.9. Трехмерные субтомограммы визуализировали в пакете UCSF Chimera. (Подробнее см. в [24].)

II. 4.3. Аналитическая электронная микроскопия

В этом методе использовали аналитический просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100 (Jeol, Japan), оснащенный детектором светлого поля (STEM) для сканирующей просвечивающей электронной микроскопии (Jeol, Japan), детектором темного поля (HAADF) с большим углом наклона (Gatan, USA), кремниевым дрейфовым детектором X-Max площадью 80 мм² (Oxford Instruments, Great Britan) и энергетическим фильтром GIF Quantum ER (Gatan, USA). Сбор спектров энергодисперсионного рентгеновского излучения (EDX) и элементный анализ проводили в программе INCA (Oxford Instruments, Great Britan). (Подробнее см. в [24].)

II. 5. Структурный ответ на стресс. Экспериментальные результаты

Одним из механизмов структурного ответа на стресс голодания является внутриклеточная кристаллизация ДНК со связывающим ДНК белком Dps с образованием нанокристаллов. Кристаллизация ДНК обеспечивает физическую защиту ДНК (благодаря плотной упаковке ДНК с белком в нанокристалле) от повреждений и потенциальную способность возобновления метаболической активности бактериальных клеток в свежей среде.

Другие виды структурного ответа на стресс голодания изложены ниже в разд. II. 6.4.

II. 5.1. Дифракция синхротронного излучения

Эксперименты по измерению рассеяния синхротронного излучения на образцах, содержащих клетки бактерий *E. coli* штамма BL21-Gold (DE3), трансформированного плазмидой pET-Dps и подвергнутого индукции повышенной экспрессии белка Dps [26, 27], показывают наличие дифракционных картин вида, изображенного на вставке рис. 1.

С целью детального анализа этих данных построены зависимости интенсивности рассеяния от угла рассеяния 2θ с помощью усреднения дифракционных 2D-картин по азимутальному углу. Обнаружены зоны повышенной интенсивности с периодами кристаллической структуры, равными приблизительно 90 и 45 Å, в отличие от контрольных образцов клеток, где областей повышенной интенсивности замечено не было (подробнее см. [26, 27]). Первый, широкий пик лежит в области $d = 90\text{--}93$ Å. Диаметр Dps додекамера равен ≈ 90 Å, поэтому этот пик может соответствовать расстоянию между слоями Dps. Второй пик при $d = 45$ Å может соответствовать второму порядку дифракции кристалла Dps–Dps или расстояниям между цепочками ДНК–ДНК в плотно упакованном ансамбле ДНК [27].

Приведенные на рис. 1 результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего, нанокристаллической) в нуклеоиде бактерий с указанными выше периодами.

II. 5.2. Просвечивающая электронная микроскопия

На рис. 2а показан срез томограммы клетки с нанокристаллической структурой. На вставке рис. 2а представлен результат фурье-анализа нанокристаллической области клетки, очерченной белой каймой. Результат фурье-анализа свидетельствует о наличии нанокристалла в этой области клетки [22]. Отфильтрованный кристалл ДНК–Dps изображен на рис. 2б. На вставке к этому рисунку изображен профиль интенсивности электронной плотности вдоль белой линии основного изображения. Черным цветом выделены плотности, видимо, соответствующие межслойным цепям ДНК [22]. Авторами работы [28] выдвинута гипотеза о том, что ДНК локализована между гексагонально упакованными слоями Dps в кристалле. Это означает, что характерное расстояние между цепочками ДНК–ДНК будет около 90 Å, а не 45 Å, как предполагалось в разд. II. 5.1. Вопрос о точной локализации и форме укладки ДНК в нанокристаллах в комплексе с Dps остается открытым. В электронно-микроскопических

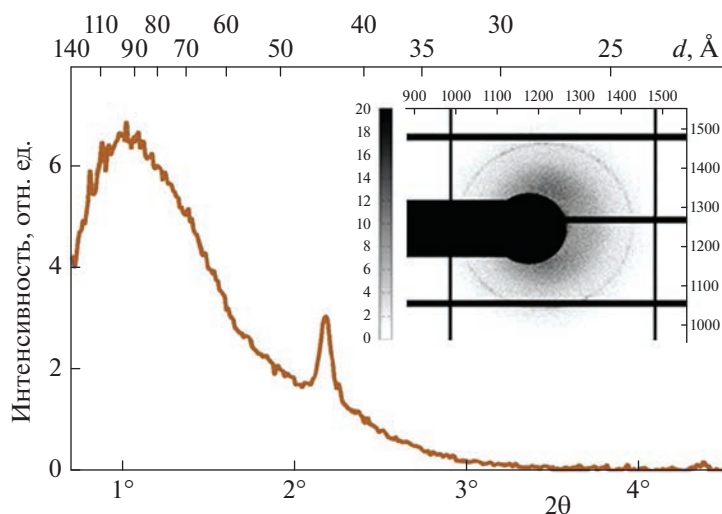


Рис. 1. Зависимость интенсивности рассеяния от угла 2θ для образца штамма BL21-Gold(DE3) голодающих бактерий *E. coli*. На вставке изображена дифракционная картина для этого образца.

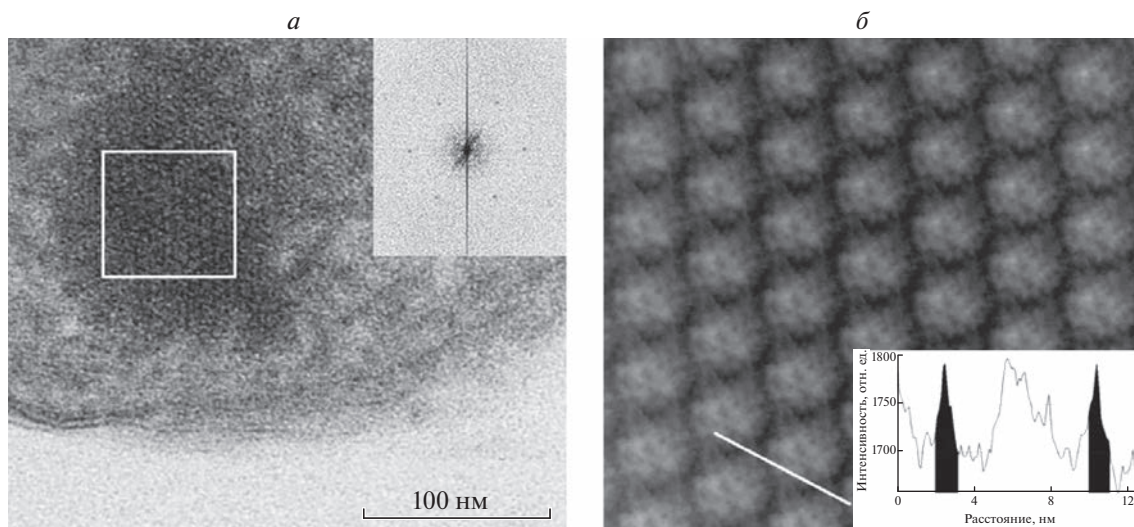


Рис. 2. *a* — Томограммы клетки (на вставке представлен результат фурье анализа нанокристаллической области клетки, очерченной белой каймой); *б* — отфильтрованный кристалл ДНК–Dps.

исследованиях ДНК напрямую не видна, поэтому предполагаемая конформация ДНК в нанокристаллах является гипотетической, к тому же она не подтверждается данными по дифракции (см. разд. II.5.1.).

II. 5.3. Конденсация ДНК *in vitro*. Модельные системы

Экспериментальные данные, полученные с помощью методов дифракции синхротронного излучения и ПЭМ, не полностью согласованы

друг с другом и не дают ответа на вопрос о конформации ДНК в нанокристаллических областях клетки. Для того чтобы найти ответ на этот вопрос, было решено действовать следующим образом. Мы предположили, что комплексы ДНК–Dps легко образуют кристаллы *in vitro* и что конформация ДНК в этих кристаллах идентична конформации ДНК во внутриклеточных кристаллах. Для изучения конформации ДНК в кристаллах *in vitro* были выбраны две методики: рентгеновская кристаллография, в которой в качестве

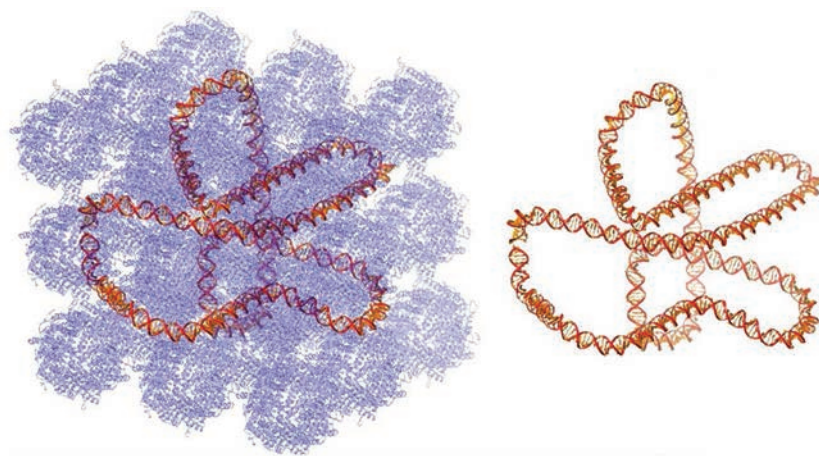


Рис. 3. 3D-кристаллы белка Dps бактерии *E. coli*. Участок 3D-кристалла Dps с изогнутой нитью ДНК внутри каналов — слева; конформация ДНК внутри кристалла — справа.

источника используется синхротронное излучение [29], и электронная микроскопия [30].

Кратко опишем результаты, полученные методом макромолекулярной кристаллографии. Несмотря на малость размеров монокристаллов, низкую симметрию, относительно большие параметры решетки и слабые рефлексы, программные комплексы Mesh & Collect и ccCluster позволили определить структуру белка Dps [29] (оказалось, что ДНК, видимо, не образует упорядоченные структуры в комплексе ДНК–Dps, и поэтому не видна (подробно см. ниже)). Структура депонирована в Protein Data Bank как 6QVX [29].

Для электронно-микроскопических исследований *in vitro* были выращены тонкие монокристаллические комплексы из небольшой ДНК (длиной 165 п.о.) с белком Dps. Были изучены проекционные структуры кристаллов Dps–Dps и Dps–ДНК [30]. Электронно-микроскопические исследования позволяют увидеть следы ДНК в тонких (2D) кристаллах ДНК–Dps. Чтобы объяснить противоречие с данными рентгеновской дифракции на массивных кристаллах, мы предположили, что тонкие 2D-кристаллы ДНК–Dps имеют увеличенную по сравнению с массивным кристаллом постоянную решетки, поэтому в тонких кристаллах есть пространство для ДНК.

Было проведено молекулярно-динамическое моделирование, с помощью которого изучались многослойные кристаллы белка Dps [30–33] и конденсация ДНК в трехмерных (3D) кристаллах. В многослойных 3D-кристаллах белка Dps за счет шарообразной формы его молекул формируются многочисленные каналы. Предположительно, в эти каналы может укладываться ДНК. Скорее всего, кристалл ДНК–Dps образуется постепенно, поэтому ДНК внутри кристалла располагает-

ся нелинейно, изгибаясь и проходя через каналы различных направлений. Для проверки этой гипотезы была построена модель участка геномной ДНК бактерии *E. coli* (513 п.о., ген *dps*). На основании проведенных молекулярно-динамических расчетов показано, что кристаллы белка Dps остаются стабильными в присутствии ДНК (рис. 3).

Образование изгибов ДНК внутри кристаллов ДНК–Dps не нарушает структуру ДНК. Это означает, что ДНК в кристаллах Dps может располагаться неупорядоченно, а не только так, как предложено в работ [28].

Таким образом, изучение кристаллов *in vitro* не оправдало ожиданий. Четкого ответа о конформации ДНК в монокристаллах ДНК–Dps получить не удалось. Остаются лишь гипотетические, к тому же несамосогласованные модели. Данные РСА и ПЭМ пока дают противоречивые, на первый взгляд, результаты. Возможно, что ДНК в кристаллах Dps располагается неупорядоченно.

II. 5.4. Альтернативные виды конденсации ДНК в покоящихся клетках

Рассмотрим другие конденсированные состояния ДНК в клетке в дополнение к внутриклеточной кристаллизации ДНК с Dps. Нами обнаружены в покоящихся клетках бактерии *E. coli* три типа новых (по сравнению с растущими клетками) конденсированных структур ДНК–Dps. Это *нанокристаллические* структуры ДНК (см. разд. II.5.1. и II.5.2.), *жидкокристаллические* структуры ДНК и *свернутые нуклеосомоподобные* структуры ДНК (см. рис. 4а, б и в соответственно).

Энергодисперсионная спектроскопия (EDS) использовалась для обнаружения и позиционирования нужных элементов в выбранных обла-

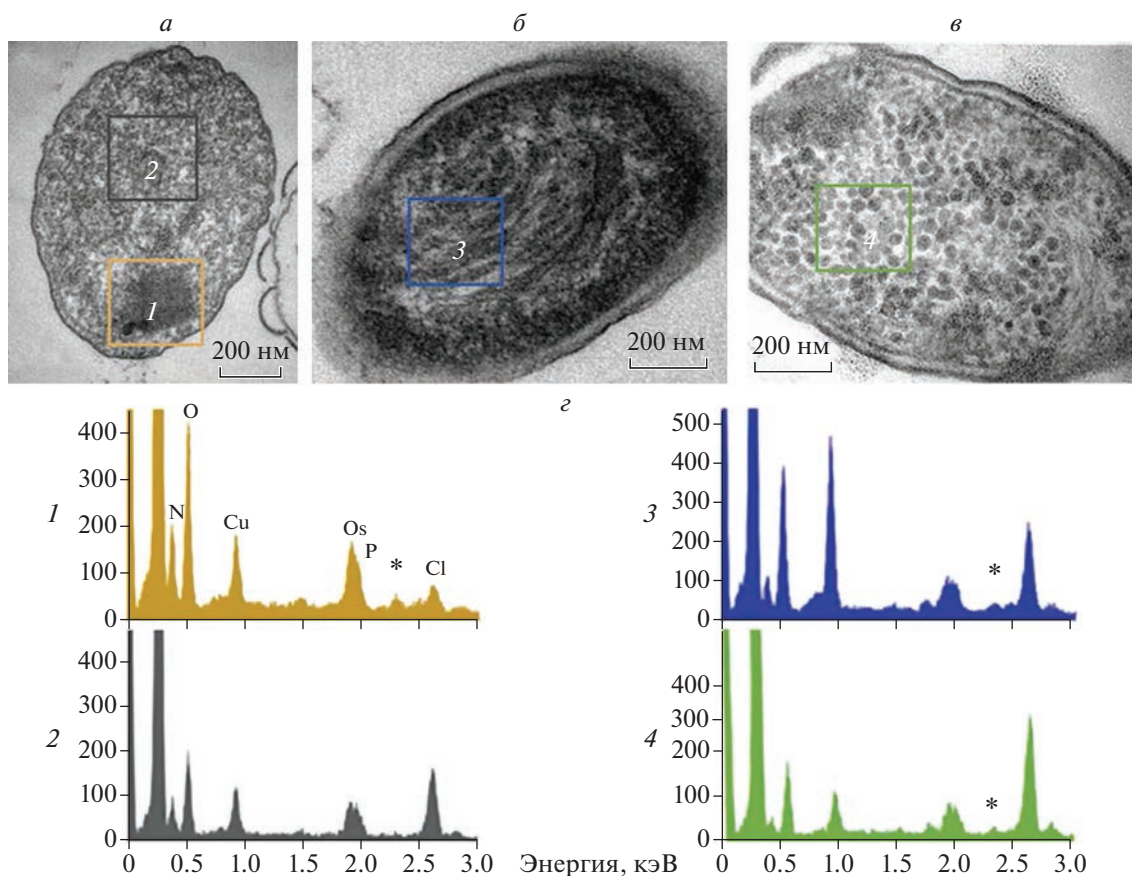


Рис. 4. Три типа конденсированных структур ДНК—Dps, обнаруженных в покоящихся клетках *E. coli*, голодающих в течение 7 мес: *а* — нанокристаллический; *б* — жидкокристаллический, *в* — свернутый нуклеосомоподобный тип; *г* — спектры ЭДС из выбранных областей (отмеченных цветными рамками на рис. *а–в*). Звездочкой отмечены положения пика S.

стях клетки. Например, пик K_{α} (2.307 кэВ) серы отражает существование связывающего ДНК белка Dps (каждый белок Dps содержит 48 метионинов), а пик K_{α} (2.013 кэВ) соответствует фосфору в ДНК. Одновременное присутствие обоих пиков на спектрах структуры показывают образование комплекса ДНК—Dps.

Репрезентативные EDS-спектры представлены на рис. 4г. Относительный атомный состав различных областей образцов пропорционален интенсивности пиков EDS.

Примечательно, что жидкокристаллические структуры (рис. 5) были обнаружены в покоящихся бактериальных клетках *E. coli* [22] во всех их популяциях: как с геном *dps*, так и без него (Dps-null), т.е. в отсутствие белка Dps в клетке.

В некоторых клетках структура конденсированной ДНК напоминает холестерический жидкий кристалл [22]. Плотная упаковка ДНК в жидкокристаллической фазе снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нукле-

азы [6]. Отметим, что жидкокристаллический тип конденсации ДНК — это единственный случай (кроме тороидов ДНК), когда легко напрямую увидеть молекулы ДНК в конденсированной структуре.

Особый интерес представляет третий тип упорядоченной структуры, обнаруженный впервые в работе [22] в покоящихся клетках *E. coli*: свернутая нуклеосомоподобная структура (см. рис. 6). Во всех изученных популяциях (кроме мутанта Dps-null), как с избыточной продукцией Dps, так и без нее, цитоплазма от 5 до 25% клеток наполнена множеством сферических структур (рис. 4в, рис. 6) со средним диаметром, равным 30 нм. Томографические исследования (рис. 6) продемонстрировали, что эти структуры не являются тороидами, описанными ранее [6, 34, 35], но представляют собой почти сферические образования. По аналогии с укладкой ДНК в эукариотах данный тип конденсации ДНК был назван нами “свернутой нуклеосомоподобной” структурой [22].

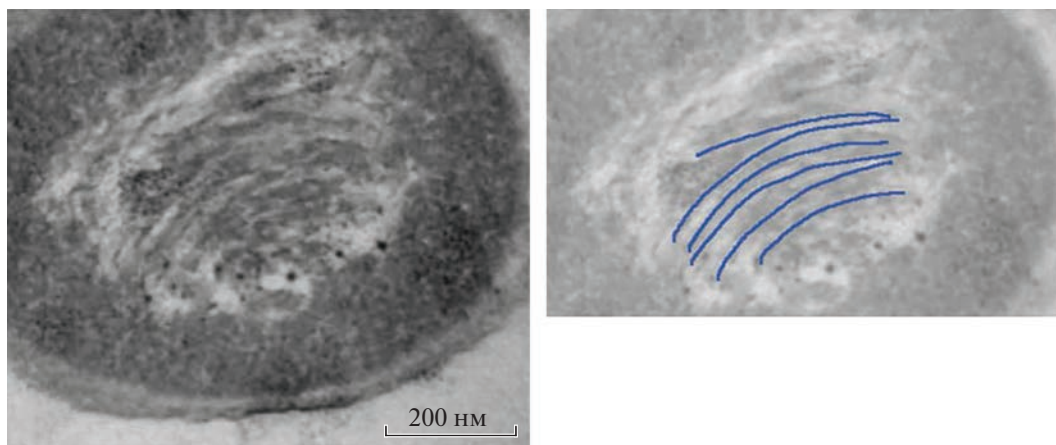


Рис. 5. Жидкокристаллический ансамбль ДНК–Dps в покоящейся клетке *E. Coli*, штамма Top10/pBAD-DPS. На правом рисунке изображена схема расположения ДНК в клетке.

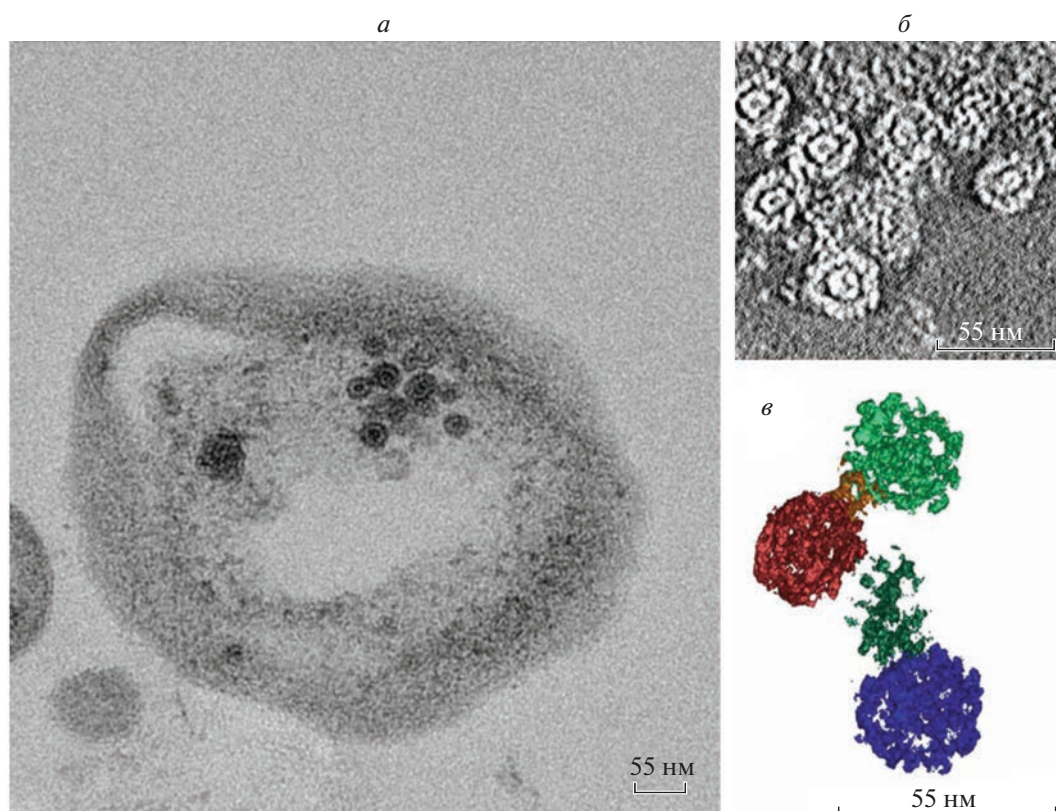


Рис. 6. Морфология свернутой нуклеосомоподобной структуры ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli*: *a* — изображение клетки; *б* — срез томограммы, выявляющий сферические ассоциаты Dps; *в* — 3D-модель сферических ассоциатов.

Элементный анализ показывает (рис. 4), что в спектре сферических агрегатов действительно присутствуют пики серы и фосфора, указывающие на присутствие ассоциатов ДНК–Dps [22]. В бактериальных клетках сферические образования молекул Dps (см. рис. 7) могут действовать анало-

гично гистонам, на которые наматывается ДНК (гистоноподобное поведение).

Макромолекулы ДНК могут также проходить сквозь сферические образования бусинок Dps, образуя “бусинки на нитке” (рис. 7). Для противодействия внешним стрессовым факторам эти

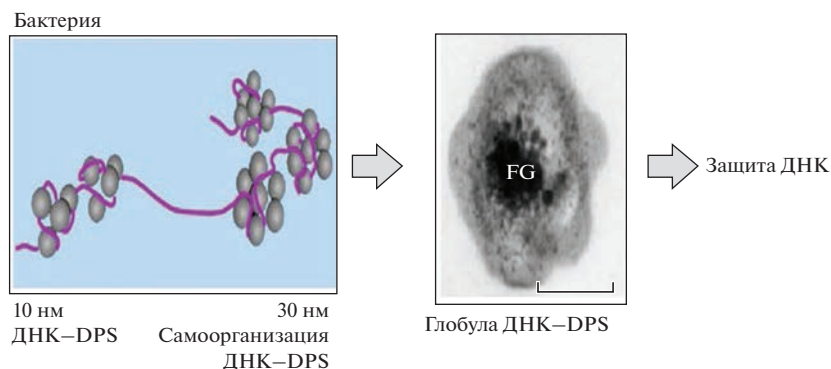


Рис. 7. Схематическое образование свернутой нуклеосомоподобной структуры.

образования должны располагаться на бактериальной ДНК достаточно плотно. Кроме того, как и в случае эукариотических клеток, где нуклеосомы сворачиваются, чтобы образовать фибриллы, которые, складываясь дальше, образуют хроматин хромосомы, бусинки на нити могут, путем множественного складывания образовывать компактную структуру, похожую на складчатую глобулу. Схематическое изображение образования свернутой нуклеосомоподобной структуры можно увидеть на рис. 7. Внешние молекулы Dps могут налипать на глобулу и дополнительно защищать ДНК [22, 36].

II. 5.5. О гетерогенности конденсации ДНК в покоящихся клетках *E. coli*

Существует давнее противоречие между представлениями о бактериальной многоклеточной системе как о совокупности одинаковых одноклеточных бактерий, идентичных друг другу и не взаимодействующих друг с другом, и о бактериальной культуре, рассматривающей микробную популяцию как многоклеточный организм. В последнем случае все клетки неидентичны друг другу, для них характерна физиологическая и морфологическая гетерогенность. Клетки взаимодействуют друг с другом в пределах организма. (Подробнее см. в работах [4, 37, 38].) Обнаруженные нами различные типы конденсированного состояния ДНК (см. табл. 1 в работе [11].) в изучаемых покоящихся клетках *E. coli* (или гетерогенность конденсации ДНК) дают дополнительные аргументы в пользу концепции, рассматривающей микробную популяцию как многоклеточный организм. Кроме того, данное наблюдение говорит в пользу вывода о том, что структура конденсированной ДНК соответствует долгоживущему промежуточному, частично (не полностью) равновесному состоянию. Данное наблюдение также свидетельствует в пользу того, что конденсация

ДНК происходит в клетке по механизму, близкому к механизму образования складчатой (фрактальной) глобулы.

Таким образом, мы ожидали обнаружить новые структуры конденсированной ДНК в покоящихся клетках при стрессе голодания по сравнению с активно растущими клетками. Новые структуры конденсированной ДНК были действительно обнаружены. Это *нанокристаллическая, жидкокристаллическая и свернутая нуклеосомоподобная* структура конденсированной ДНК в покоящихся клетках *E. coli*.

III. ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОГО АНАЛОГА АУТОИНДУКТОРА АНАБИОЗА 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНА НА СТРУКТУРУ КОНДЕНСИРОВАННОЙ ДНК

В этом разделе будем рассматривать структуру конденсированной ДНК в клетках под действием другого, отличного от голодания, вида стресса — действия химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина (4-ГР). В ряде работ показано, что введение 4-ГР в концентрации до 10^{-4} М в культуру растущих клеток приводит к остановке деления последних и преждевременному их переводу в стационарную фазу [4]. Дальнейшее повышение концентрации 4-ГР в клеточной культуре инициирует переход клеток в покоящееся анабиотическое (практически полное отсутствие метаболизма) состояние, напоминающее покоящееся состояние клеток при стрессе голодания. Под анабиозом будем понимать приостановку жизнедеятельности клетки с последующим ее восстановлением при благоприятных условиях [4].

При дальнейшем повышении концентрации вносимого в клеточную суспензию 4-ГР число жизнеспособных клеток резко падает. При концентрациях выше 10^{-3} М действие 4-ГР вызывает полную

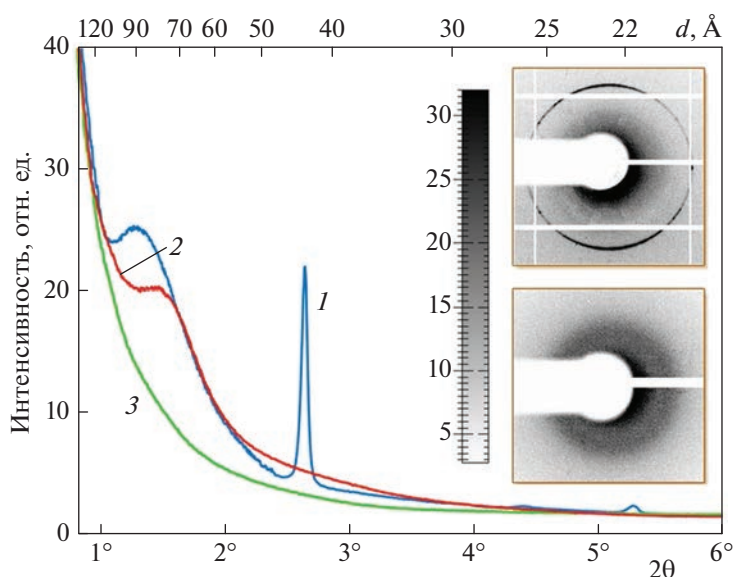


Рис. 8. Зависимость интенсивности рассеяния от угла 2θ для клеток *E. coli* штамма BL21Gold (DE3). В стационарной фазе роста добавлялся 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М — анабиотическое состояние клетки (кривая 1, синяя) и в концентрации 10^{-3} М — мумифицированное состояние (кривая 2, красная). Кривая 3 (зеленая) — фаза активного роста. На вставках изображены дифракционные картины для анабиотического (вверху) и мумифицированного (внизу) состояний клеток.

потерю жизнеспособности клеток бактерий. Однако эти нежизнеспособные клетки сохраняют внешнюю форму в течение периода наблюдения около трех лет в условиях, благоприятствующих автолизу. Данные клетки были названы мумифицированными клетками, или микромумиями [39].

Оказалось, что действие 4-ГР видонеспецифично, зависит от концентрации, физиологического состояния клеток и других факторов окружающей среды [4, 39].

III. 1. Приготовление анабиотических покоящихся клеток и микромумий

Клетки *E. coli* штаммов Top10/pBAD-DPS и BL21-Gold(DE3)/pET-DPS выращивали, как описано выше [25], до стационарной фазы роста. Для получения анабиотических клеток в стационарной фазе через 7.5 ч после начала культивирования в клетки вносили спиртовой раствор 4-ГР до конечной концентрации 10^{-4} М (концентрация этилового спирта составила 1%). В аналогичных условиях получали мумифицированные клетки, но при внесении спиртового раствора 4-ГР до конечной концентрации 10^{-3} М. Клетки инкубировали в статическом режиме при температуре 23°C в течение 1–3 сут, и готовили затем образцы для их изучения методами дифракции синхротронного излучения или электронно-микроскопических исследований.

III. 2. Исследование структурного ответа на действие 4-гексилрезорцина методом дифракции синхротронного излучения

III. 2.1. Изучение структуры анабиотических и мумифицированных клеток *E. coli*

На рис. 8 приведены кривые рассеяния синхротронного излучения для клеток, подверженных действию 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М (кривая 1, синяя) и 10^{-3} М (кривая 2, красная).

Кривая рассеяния, полученная от растущей популяции клеток, в нашем случае бралась как реперная (контрольная) кривая, относительно которой рассматривались все наблюдаемые дифракционные эффекты, изображена на этом и ниже на рис. 9 зеленым цветом (кривые 3).

Интенсивность рассеяния от клеток *E. coli* в стационарной фазе роста, находящихся под воздействием 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М (кривая 1 на рис. 8), по форме идентична кривой, полученной от клеток при стрессе голодания. На кривой видны пики, соответствующие разрешению в 44 и 22 Å, и широкий пик с максимумом интенсивности при разрешении 90 Å. Такое совпадение кривых наводит на мысль об идентичности структуры конденсированной ДНК внутри анабиотической и покоящейся (стресс голодания) клетки, и на то, что в образовании защитных кристаллических структур участвуют одни и те же белки.

При увеличении концентрации 4-ГР до 10^{-3} М воздействие на клетки оказывается существенно отличным от ранее наблюдаемых. Такая концен-

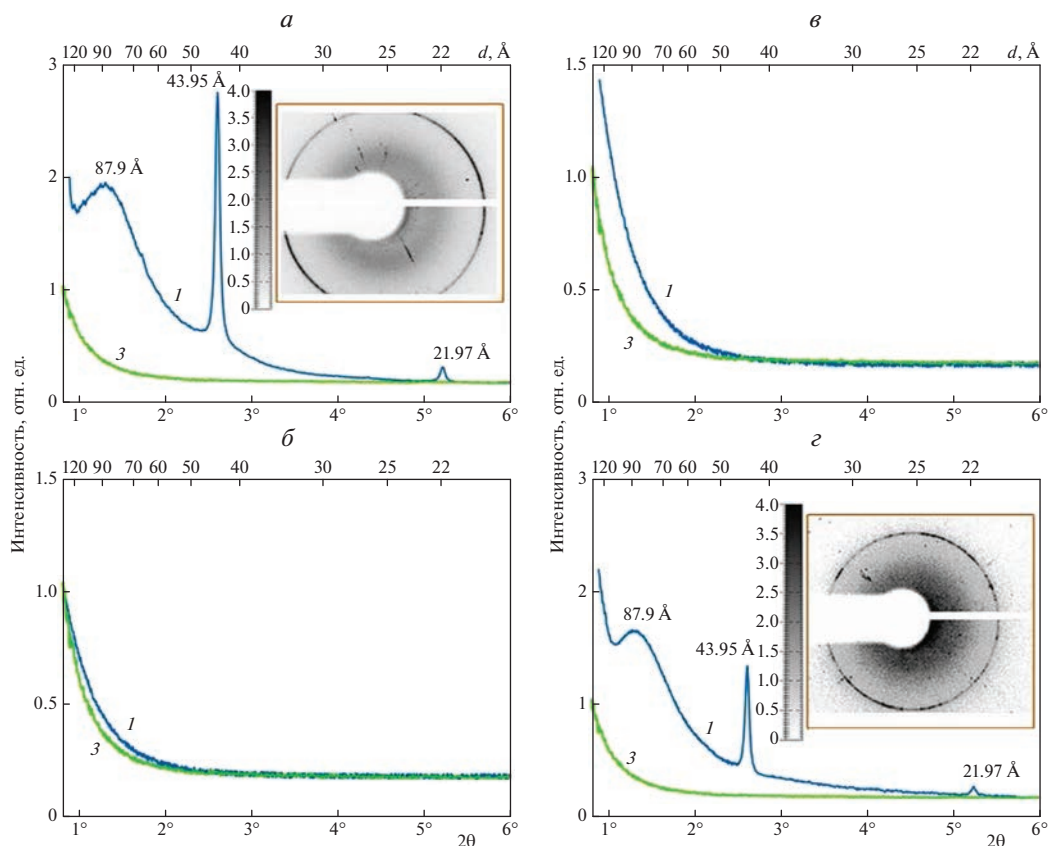


Рис. 9. Динамика активации и прорастания анабиотических форм клеток *E. coli*, полученных под действием 4-ГР: *a* — кривая 3 (зеленая) — растущие клетки, кривая 1 (синяя) — клетки под действием 4-ГР в концентрации 10^{-4} М (стационарная фаза роста); *б* — выдержка в течение 1.5 ч в питательной среде, *в* — 14 ч в питательной среде, *г* — 96 ч в питательной среде (стресс голодания); подробнее см. в тексте.

трация 4-ГР приводит к образованию из клетки микромумии [39]. Кривая рассеяния от таких клеток (кривая 2 на рис. 8) имеет небольшой широкий пик с максимумом интенсивности, соответствующим разрешению в 77 Å. Пик, соответствующих нанокристаллическим структурам, обнаруженным для анабиотического покоящегося состояния, на кривых рассеяния от мумифицированных клеток *E. coli* под воздействием 4-ГР при его концентрации 10^{-3} М не наблюдается.

III. 2.2. Изучение динамики активации и прорастания анабиотических форм *E. coli*

На рис. 9*a* изображены кривые рассеяния от клеток *E. coli* штамма BL21-Gold, подверженных стрессу воздействия 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М, и контрольной популяции того же штамма, находящейся в экспоненциальной стадии роста. Кривая рассеяния от клеток, подвергнутых стрессу воздействия 4-ГР, содержит острые брэгговские пики при разрешении 44 и 22 Å, кратные друг другу, и размытый широкий пик с максимумом интенсивности, соответствующий межплоскостному

расстоянию в 88 Å. Для контрольной популяции наблюдается плавный монотонный спад интенсивности рассеяния при увеличении угла 2θ .

Следующий шаг эксперимента заключался в помещении анабиотических клеток *E. coli* в питательную среду. Рисунок 9*б* демонстрирует почти точное совпадения кривых рассеяния от контрольной популяции и от анабиотических клеток, помещенных в питательную среду и культивируемых в ней на протяжении 1.5 ч.

Далее проросшие клетки были выдержаны в течение 14 ч, и на рис. 9*в* уже начинает проявляться разница между кривыми рассеяния от контрольной популяции и от проросшей колонии. Сравнение кривых рассеяния от контрольной популяции и от проросшей колонии из анабиотических клеток возрастом 96 ч приведены на рис. 9*г*.

По прошествии 96 ч с момента помещения анабиотических клеток в питательную среду вновь появляются кристаллические образования, пики интенсивности рассеяния которых по положению оказываются идентичны пикам, полученным от клеток, соответствующих стрессу воздей-

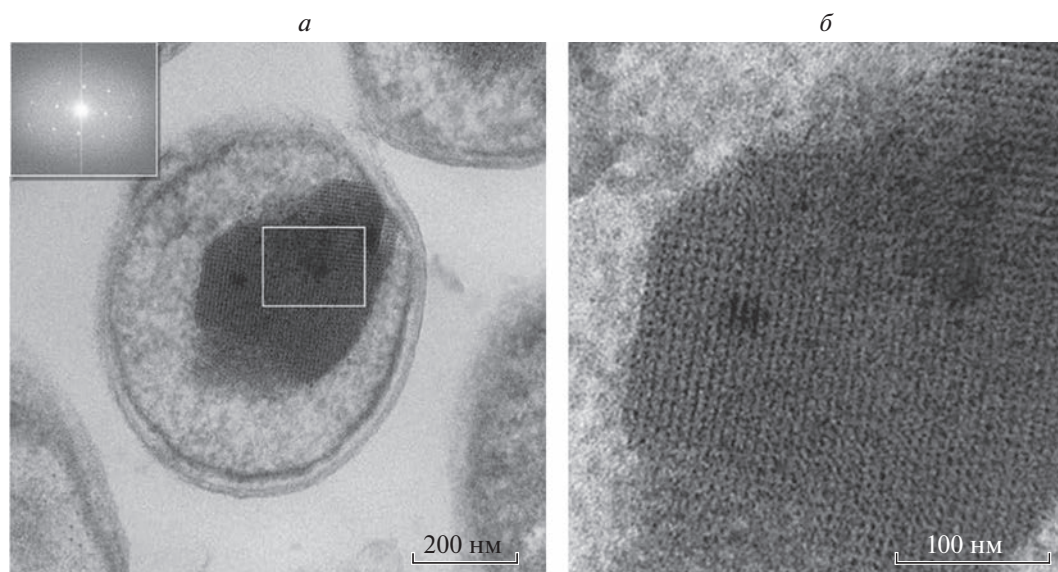


Рис. 10. Морфология нанокристаллов ДНК–Dps в клетках *E. coli* под действием 4-ГР. Штамм *E. coli* Top10/pBAD-DPS, растущий на среде LB со сверхэкспрессией Dps в фазе линейного роста, находящийся под действием 4-ГР в концентрации 10^{-4} М на стационарной фазе роста. На вставке – фурье-преобразование от области с кристаллом. Справа – увеличенное изображение.

ствия 4-ГР в концентрации 10^{-4} М. Этот факт позволяет сделать вывод о том, что с точки зрения дифракционного эксперимента покоееся анабиотическое состояние и покоееся состояние, образующееся при стрессе голодания, идентичны по структуре.

Обратимость структурных изменений, происходящих внутри клетки под действием стресса воздействия 4-ГР в концентрации 10^{-4} М указывают на то, что кристаллические образования, брэгговские пики которых мы наблюдаем на разрешении 88, 44 и 22 Å, участвуют в защите клеточного нуклеоида и сохраняют его в состоянии, пригодном для последующей регенерации.

III. 3. Исследование структурного ответа на действие 4-гексилрезорцина методом просвечивающей электронной микроскопии

На рис. 10 представлены данные, полученные методом ПЭМ, для клетки *E. coli* после внесения в культуру 4-ГР в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М. Слева на вставке приведены данные фурье-преобразования для области с предполагаемым нанокристаллом, которые действительно показывают наличие нанокристаллического образования в выделенной области.

На рис. 11 представлены аналогичные рис. 10 данные, но после внесения в культуру 4-ГР в концентрации 10^{-3} М) соответствующей состоянию микромумии.

Данные ПЭМ не позволяют визуализировать какое-либо упорядоченное состояние в микромумиях. Этот результат находится в согласии с данными по дифракции синхротронного излучения (см. рис. 8).

Таким образом, оригинальные экспериментальные исследования позволяют сделать вывод о том, что:

- 1) 4-ГР является инициатором перехода клетки в анабиотическое и мумифицированное состояние;
- 2) покоееся анабиотическое состояние по структуре сильно напоминает покоееся состояние, полученное в результате голодания;
- 3) мумифицированное состояние (полное отсутствие метаболизма, но при сохранении формы клетки) сильно отличается по структуре от анабиотического. В мумифицированном состоянии не наблюдаются внутриклеточные нанокристаллические структуры, характерные для анабиотического покоееся состояния;
- 4) требуются дальнейшие исследования обнаруженных эффектов как с помощью дифракции синхротронного излучения, так и с помощью ПЭМ для визуализации наличия упорядоченных структур в анабиотических покоеющихся клетках и отсутствия этих структур в мумифицированном состоянии клеток.

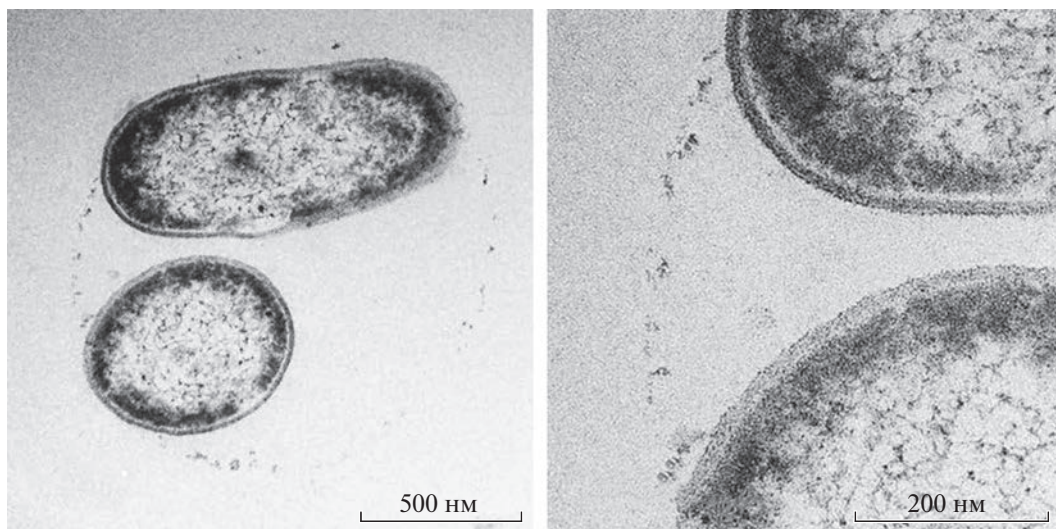


Рис. 11. Штамм *E. coli* Top10/pBAD-DPS, растущий на среде LB без сверхэкспрессии Dps в фазе линейного роста, находящийся под действием 4-ГР в концентрации 10^{-3} М на стационарной фазе роста.

IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

В обзоре представлены результаты литературных и оригинальных экспериментальных исследований, полученных авторами в 2016–2022 гг., по структурной организации ДНК в активно растущих, покоящихся (стресс голодания), в анабиотических покоящихся и мумифицированных клетках *Escherichia coli* с помощью методов дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии. Приведены результаты молекулярно-динамического моделирования взаимодействия ДНК с NAP.

В разд. I обсуждаются современные представления об архитектуре конденсированной ДНК в активно растущей клетке, полученные методами молекулярной биологии ЗС и Ni-S. Данные методы позволили выделить три уровня структурной организации компактной бактериальной ДНК [2]. На низшем уровне (малом масштабе ~ 1 Кбайт п.о.) компактизация обеспечивается за счет взаимодействия ДНК со связывающими ДНК белками. На промежуточном уровне (среднем масштабе ~ 10 Кбайт п.о.) ДНК образует сверхспиральные петли. На самом высоком уровне (мега масштабе $\sim 10^6$ п.о.) ДНК образует шесть пространственно-организованных макродоменов с четкой территориальной организацией, на которые разделен бактериальный нуклеоид. Экспериментальные исследования свойств пространственной организации конденсированной ДНК в активно растущей клетке привлекли внимание к фрактальной глобуле как к структурной модели хроматина на крупном масштабе ~ 10 Мбайт [18]. Фрактальная глобула практически не заузлена, любая область фрактальной глобулы может легко

и быстро разворачиваться, становясь доступной для транскрипционных и других белковых механизмов клетки. Фрактальная глобула имеет поразительную территориальную организацию цепочки, которая сильно контрастирует с перемешанной организацией цепочки, наблюдаемой в равновесной глобуле. Модель фрактальной глобулы не согласуется со всеми имеющимися к настоящему времени экспериментальными данными: например, нет согласия с данными по малоугловому рассеянию нейтронов [20]. Однако поразительная территориальная организация и возможность любой области глобулы быстро и легко разворачиваться делает фрактальную глобулу одной из самых привлекательных моделей крупномасштабной упаковки ДНК в клетке.

Отметим еще одно важное свойство моделей на основе модели фрактальной глобулы. В этой модели структура конденсированной ДНК соответствует долгоживущему промежуточному, т.е. частично, а не глобально равновесному энергетическому состоянию, поэтому можно ожидать, что ДНК в различных клетках бактериальной колонии может конденсироваться по-разному, т.е. можно говорить о гетерогенности упаковки ДНК в различных клетках. Как показано в разд. II, гетерогенность упаковки действительно наблюдается при изучении новых структур конденсированной ДНК в покоящихся клетках при стрессе голодания.

В экспоненциальной фазе роста происходят бурный рост бактерии и потребление питательных веществ. Далее бактерии переходят в стационарную фазу роста, в которой клетки начинают испытывать стресс голодания. Если стресс голодания сохраняется, то происходит образование покоящихся форм. По мере перехода клеток в по-

коящееся состояние (практически полное отсутствие метаболизма) обычные биохимические способы защиты ДНК перестают работать. Клетки, адаптируясь к новым условиям, вынуждены использовать физические механизмы защиты ДНК (плотную упаковку ДНК, наноуровневую кристаллизацию ДНК с белками и т.д.). Для покоящихся клеток можно было ожидать появления совершенно новых структур (новой архитектуры ДНК) по сравнению с растущими клетками.

В разд. II описаны эксперименты и их результаты по обнаружению новых структур конденсированной ДНК в покоящихся клетках при стрессе голодания, которые были действительно обнаружены. Это *нанокристаллическая, жидкокристаллическая и свернутая нуклеосомоподобная* структуры конденсированной ДНК. Обнаружение указанных различных структур в ансамбле клеток подтверждает гетерогенность упаковки конденсированной ДНК в различных клетках популяции. По-видимому, из этих наблюдений, а также из анализа данных, изложенных в публикациях [10–12], можно сделать важный вывод, что природа очень часто использует лишь частично, а не глобально, равновесные энергетические состояния. Что из этого вывода следует? У белков в результате самоорганизации появляется пространственная структура (конформация, или 3D-упаковка). При более тщательном рассмотрении этой пространственной структуры оказывается, что она слегка размыта, имеются локальные минимумы энергии или конформационные подсостояния (подробнее см. в [10]).

В случае ДНК оказывается, что в результате самоорганизации упаковка конденсированной ДНК в различных клетках популяции неодинакова, гетерогенна. Если бы ДНК в результате самоорганизации оказывалась бы в равновесном состоянии (глобальном минимуме энергии) [19], то никакой гетерогенной упаковки конденсированной ДНК в различных клетках не было бы. Молекула ДНК была бы упакована во всех клетках одинаково. Для окончательного ответа на поставленные вопросы и предварительные выводы нужны дальнейшие экспериментальные исследования как сворачивания белка, так и конденсации ДНК.

В разд. III описывается действие на культуру клеток химического аналога аутоиндуктора анабиоза 4-гексилрезорцина. Оригинальные экспериментальные исследования позволяют сделать вывод о том, что 4-ГР является инициатором перехода клетки в анабиотическое и мумифицированное состояния. Покоящееся анабиотическое состояние по структуре сильно напоминает покоящееся состояние, полученное в результате голодания. Мумифицированное состояние (полное отсутствие метаболизма, но при сохранении фор-

мы) сильно отличается по структуре от анабиотического.

В мумифицированном состоянии не наблюдаются внутриклеточные упорядоченные (в том числе нанокристаллические) структуры, характерные для анабиотического покоящегося состояния. По-видимому, это результат того, что мумифицированное состояние существенно ближе к состоянию термодинамического равновесия с максимальной энтропией (неупорядоченностью), чем анабиотическое покоящееся состояние. Заметим, что экспериментальные исследования как анабиотического покоящегося состояния, так и мумифицированного состояния только начинаются. Так, в анабиотическом покоящемся состоянии обнаружен только один вид упорядоченных структур в отличие от покоящегося состояния, возникающего как ответ на стресс голодания. В мумифицированном состоянии упорядоченных состояний пока не обнаружено. Возможно, это связано с недостаточным количеством экспериментальных данных, а не с увеличением энтропии (неупорядоченности) в образце.

Изменения в окружающей среде влияют на структуру конденсированной ДНК. Эти изменения, скорее всего, не затрагивают иерархию структуры ДНК в нуклеоиде. Методом ПЭМ изучалась структура ДНК, находящаяся в тонких 2D-срезах. Этого недостаточно, чтобы описать объемную 3D-структуру нуклеоида. Поэтому методом ПЭМ, использованным в работе, можно визуализировать лишь структуры, принадлежащие нижнему (первому) иерархическому уровню компактизации ДНК. Конформация ДНК не визуализируется используемыми в статье методами ни в одной из конденсированных структур, кроме жидкокристаллической. Поэтому к настоящему времени можно предложить самые простые модели упорядоченной конденсации ДНК в нуклеоиде покоящихся и мумифицированных клеток, что и сделано в настоящей статье.

V. ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

С помощью рентгеноструктурного анализа определена структура многих молекул, в том числе макромолекул белков и ДНК. Все молекулы, которые образуют сравнительно большие кристаллы, исследованы и их структура определена. Однако для макромолекул, образующих малые кристаллы размерами в несколько микрон, определение структуры уже представляет трудную задачу. Сейчас на первое место выходят исследования структур некристаллических объектов: вирусов и клеток. Последние достижения в методике визуализации дают надежду, что путь к 3D-визуализации конденсированной ДНК *in vivo* с высоким разрешением будет найден и пройден в обозримое время. Методы визуализации и томографии на на-

ноуровне, используемые на синхротроне ESRF-EBS (Гренобль, Франция), позволяют количественно оценивать 3D-структуру и элементный состав образцов в их естественном состоянии [40]. С помощью метода наноразрешенной флуоресцентной спектроскопии и томографии можно изучать 3D-распределение фосфора, а следовательно, и ДНК по всей клетке [41]. К сожалению, пространственное разрешение этого метода в настоящий момент не превышает 20 нм. Развитие метода визуализации на наноразрешении ведет к созданию рентгеновского микроскопа. Пока это картина будущего, но исследователи в данной области уже сейчас вместо термина “рентгеновская дифракция” употребляют термин “рентгеновская микроскопия”. Быстро развиваются методы электронной микроскопии. В работе [42] для визуализации хроматина *in situ* был использован улучшенный метод обнаружения ДНК с помощью флуоресцентного красителя. Метод получил название томография ChromEM, или ChromEMT. Этот метод позволил определить структуру и трехмерную организацию нитей хроматина.

Интерпретация приведенных в работе данных требует дополнения и углубления в ходе дальнейших исследований, которые будут продолжены как с помощью дифракционных экспериментов на синхротроне, малоуглового рентгеновского рассеяния, так и посредством просвечивающей электронной микроскопии.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ESRF за предоставленную возможность проведения экспериментов. Аналитическая электронная микроскопия и двухосная томография были выполнены в Центре пользователей “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова. Расчеты проводили на высокопроизводительной вычислительной системе МВС-10П в Межведомственном суперкомпьютерном центре РАН.

Авторы благодарят за финансовую поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.

Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки России (тема № 122040400089-6 и № 122040800164-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stonington O.G., Pettijohn D.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1971. V. 68. № 1. P. 6
2. Verma S.C., Qian Z., Adhya S.L. // PLoS. Genet. 2019. V. 15. № 12. e1008456
3. Trun N., Marko J. // Amer. Soc Microbiol. News. 1998. V. 64. № 5. P. 276.
4. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина, 2005.
5. Ткаченко А.Г. Молекулярные механизмы стрессовых ответов у микроорганизмов. Екатеринбург: Уро РАН, 2012.
6. Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2002. V. 3. P. 50.
7. Grosberg A.Y., Khokhlov A.R. Statistical physics of macromolecules. N.Y.: AIP, 1994.
8. Bloomfield V.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1996. V. 6. P. 334.
9. Циммер К. Микрокосм. *E. coli* и новая наука о жизни. Пер. с англ. М.: ООО “Альпина нон-фикшн”, 2013.
10. Крунянский Ю.Ф., Гольданский В.И. // УФН. 2002. Т. 172. № 11. С. 1247.
11. Крунянский Ю.Ф. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 3. С. 60; <https://doi.org/10.31857/S0207401X21030079>
12. Шайтан К.В. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 6. С. 40.
13. Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. // Capturing Chromosome Conform. Sci. 2002. V. 295. P. 1306; <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
14. Simonis M., Klous P., Splinter E. et al. // Nat. Genet. 2006. V. 38. P. 1348; <https://doi.org/10.1038/ng1896>
15. Dostie J., Richmond T.A., Arnaout R.A. et al. // Genome Res. 2006. V. 16. P. 1299; <https://doi.org/10.1101/gr.5571506>
16. Gennes P.G.D. Scaling concepts in polymer physics. Ithaca: Cornell University Press, 1979.
17. Grosberg A.Y., Nechaev S.K., Shakhnovich E.I. // J. Phys. 1988. V. 49. P. 2095.
18. Lieberman-Aiden E., Van Berkum N.L., Williams L. et al. // Science. 2009. V. 326. P. 289.
19. Mirny L.A. // Chromosome Res. 2011. V. 19. P. 37.
20. Яшина Е.Г., Григорьев С.В. // ЖЭТФ. 2019. Т. 156. Вып. 3. С. 540.
21. Zwietering M.H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van't Riet K. // Appl. Environ. Microbiol. 1990. V. 56. № 6. P. 1875.
22. Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A. et al. // PLOS One. 2020. V. 15. № 10; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
23. Шрёдингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики? М.: РИМИС, 2009.
24. Moiseenko A., Loiko N., Sokolova O.S., Krupyanskiy Y.F. // Methods in Molecular Biology. 2022. V. 2516. P. 143; https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2413-5_9
25. Синицын Д.О., Лойко Н.Г., Гуларян С.К. и др. // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 9. С. 59.
26. Крунянский Ю.Ф., Лойко Н.Г., Синицын Д.О. и др. // Кристаллография. 2018. Т. 63. № 4. С. 572.
27. Reich Z., Wachtel E., Minsky A. // Science. 1994. V. 264. № 5164. P. 1460.
28. Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J. et al. // Mol. Microbiol. 2004. V. 51. P. 395.
29. Kovalenko V., Popov A., Santoni G. et al. // Acta Cryst. 2020. V. F76. P. 568.
30. Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2019. V. 517. № 3. P. 463.

31. *Tereshkin E., Tereshkina K., Loiko N. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2019. V. 37. P. 2600.
32. *Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Коваленко В.В. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 10. С. 48.
33. *Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Krupyanskii Y.F.* // J. Physics: Conf. Ser. 2021. V. 2056. № 1. P. 012016.
34. *Blinov V.N., Golo V.L., Krupyanskii Y.* // Nanostuctures. Math. Phys. Model. 2015. V. 12. P. 5.
35. *Vasilevskaya V.V., Khokhlov A.R., Kidoaki S., Yoshikawa K.* // Biopolymers. 1997. V. 41. P. 51.
36. *Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A. et al.* // bioRxiv. 2020. P. 2020.03.27.011494;
<https://doi.org/10.1101/2020.03.27.011494>
37. *Shapiro J.A.* // Scientific American. 1988. V. 258. № 6. P. 82.
38. *Shapiro J.A., Dworkin M.* // Quarterly Rev. Biol. 1998. V. 73. № 3. P. 352.
39. *Сузина Н.Е., Мулюкин А.Л., Лойко Н.Г. и др.* // Микробиология. 2001. Т. 70. № 5. С. 776.
40. *Procopio A., Malucelli E., Pacureanu A. et al.* // ACS Central Science. 2019. V. 5. P. 1449.
41. *Santos S., Yang Y., Rosa M. et al.* // Scientific Reports. 2019. V. 9. P. 17217.
42. *Ou H.D., Phan S., Deerinck T.J. et al.* // Science. 2017. V. 357. № 6349. eaag0025;
<https://doi.org/10.1126/science.aag0025>

АРКИ ЭЙЛЕРА И ПРУЖИНЫ ДУФФИНГА РАЗМЕРОМ В НЕСКОЛЬКО НАНОМЕТРОВ

© 2023 г. В. А. Аветисов^{1, 2*}, А. М. Астахов¹, А. Ф. Валов¹, А. А. Маркина¹, А. Д. Муратов^{1, 2},
В. С. Петровский^{1, 2}, М. А. Фролкина^{1, 2}

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук,
Москва, Россия

²Центр проектирования молекулярных машин, Москва, Россия

*E-mail: avetisov@chph.ras.ru

Поступила в редакцию 11.01.2023;

после доработки 18.01.2023;

принята в печать 20.01.2023

Методами полноатомного компьютерного моделирования изучена молекулярная динамика стержнеобразных олигомеров *N*-изопропилметакриламида и спиралеобразных олигомеров пиридинфурана размером в несколько нанометров. Приведены примеры олигомеров, динамика которых при сжатии и растяжении аналогична динамике классических бистабильных конструкций типа арок Эйлера и осцилляторов ДUFFИНГА. Определены критические значения силовых нагрузок, при которых происходит бифуркация динамических состояний олигомеров и динамика олигомеров становится бистабильной. Показано, что в области бистабильности олигомеры могут переходить в режим спонтанных вибраций, активированных тепловыми флуктуациями окружающей среды при комнатной температуре. Для режима спонтанных вибраций продемонстрирован эффект стохастического резонанса. Обсуждается возможность использования бистабильных олигомеров для детектирования единичных органических молекул в растворах.

Ключевые слова: олигомеры, молекулярные машины, бистабильность, стохастический резонанс, компьютерное моделирование.

DOI: 10.31857/S0207401X2306002X, **EDN:** UGTCJZ

1. ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные структуры нанометрового размера, динамика которых аналогична динамике бистабильных систем, привлекают к себе большое внимание во многих нанотехнологических разработках последнего десятилетия. На их основе конструируются переключатели, триггеры и логические элементы [1–5], сенсоры наноразмера [6, 7] и различные молекулярные машины [8–11]. Бистабильные наноструктуры представляют интерес и для термодинамики молекулярных машин, активно развивающейся в последнее десятилетие [12–18]. Конструирование молекулярных машин предельно малых размеров имеет отношение и к такой фундаментальной проблеме, как возникновение жизни, центральным и пока не разрешенным вопросом которой остается вопрос о переходе от “стохастической химии” добиологической эры к “алгоритмической химии” живой природы, реализуемой биологическими молекулярными машинами [19–22]. Общеизвестно, что вероятность “самосборки” столь сложных и столь специфичных макромолекулярных структур, ка-

кими являются биологические молекулярные машины, исчезающе мала, и вопросы о том, могли ли “первичные” молекулярные машины быть много проще и что они могли собой представлять, являются исходными для любого сценария возникновения жизни.

В данной статье мы описываем примеры бистабильных олигомерных структур размером всего в несколько нанометров, динамика которых аналогична динамике арок Эйлера [23, 24] и осцилляторов ДUFFИНГА [25, 26] — классических примеров нелинейно-упругих механических конструкций с критической динамикой и бистабильностью. В простейшем виде, арку Эйлера можно представлять как два жестких стержня, соединенных шарниром с таким образом встроенной в него упругой пружины, чтобы в ненагруженном состоянии арка была выпрямленной, но могла упруго изгибаться при сжатии ее концов. Оказывается, что такая конструкция при сжатии будет вести себя критическим образом, а именно, арка будет изгибаться (условно, вверх или вниз) толь-

ко при сверхкритическом сжатии $F > F_c$, где F_c — некоторая критическая сила сжатия.

Для теоретической демонстрации смены динамических стационарных состояний (фазового портрета) арки Эйлера обычно используют уравнение Ньютона в сильно демпфированном приближении ($d^2x/dt^2 = 0$) вида

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{dU(x)}{dx}, \quad (1)$$

$$U(x) = [F_c(\gamma) - F]x^2 + bx^4, \quad b > 0,$$

где x — отклонение от (равновесного) угла между стержнями арки в отсутствие сжимающих усилий F , γ — коэффициент упругости пружины шарнира. Вид потенциала $U(x)$ для арки Эйлера может быть получен из рассмотрения ее конструкции (см, например, [23]). Из уравнений (1) видно, что при $F < F_c$ потенциал $U(x)$ имеет один экстремум (минимум) в точке $x = 0$. Соответственно, при докритических сжатиях выпрямленное состояние арки является единственным и устойчивым стационарным состоянием конструкции. При сверхкритическом сжатии ($F > F_c$) потенциал арки имеет три экстремума, один из которых ($x = 0$) является максимумом, и, следовательно, вытянутое состояние арки при этих условиях неустойчиво, а два других экстремума: $x_{\pm} = \pm[(F - F_c)/2b]^{1/2}$, являются минимумами, и соответствующие им изогнутые “вверх” и “вниз” состояния арки стационарны и устойчивы. Таким образом, динамика арки Эйлера под нагрузкой характеризуется критической точкой $F = F_c$, в которой происходит смена фазового портрета с бифуркацией стационарных состояний, и в условиях сверхкритического сжатия арка Эйлера становится бистабильной динамической системой.

Осциллятор Дуффинга [25] относится к этому же типу нелинейных динамических систем. Его можно представить, например, как движение в вязкой среде груза единичной массы, закрепленного на конце упругой пружины, энергия растяжения которой задается потенциалом четвертой степени, таким же, как и потенциал арки Эйлера:

$$\frac{d^2x}{dt^2} = -k \frac{dx}{dt} - \frac{dU(x)}{dx}, \quad (2)$$

$$U(x) = \frac{a}{2}x^2 + \frac{b}{4}x^4, \quad b > 0.$$

Здесь x — растяжение пружины и k — коэффициент демпфирования колебаний пружины. Если коэффициент (линейной) упругости пружины, a , при малых растяжениях положителен, то потенциал $U(x)$ имеет единственный экстремум (минимум), которому соответствует единственная точка нулевого напряжения пружины: $x = 0$.

В этом, типичном для практики случае пружина будет испытывать затухающие колебания с известными для нелинейных осцилляторов эффектами анизохронности и ангармоничности. Наиболее интересен, однако, случай, когда $a < 0$, что формально соответствует отрицательному коэффициенту упругости пружины при малых растяжениях, и положительному коэффициенту упругости, b , при больших растяжениях. В этом неординарном случае потенциал $U(x)$ имеет три экстремума, два из которых ($x_{\pm} = \pm(-a/2b)^{1/2}$) соответствуют минимумам, определяющим два бассейна притяжения динамических траекторий такого осциллятора, а точка $x = 0$ соответствует вершине барьера бистабильности, разделяющего притягивающие бассейны. Понятно, что сильно демпфированная динамика осциллятора Дуффинга аналогична динамике арки Эйлера. Дело, однако, в том, что в отличие от арки Эйлера, которую достаточно просто сконструировать, сделать пружину с отрицательным коэффициентом упругости при малых растяжениях и положительным коэффициентом упругости при больших растяжениях — задача нетривиальная. Имеющиеся в механике примеры осцилляторов Дуффинга в действительности представляют собой достаточно сложные конструкции, составленные из обычных пружин.

Вместе с тем конструкции арок Эйлера и осцилляторов Дуффинга нанометрового размера могут радикально отличаться от конструкций механических бистабильных систем, прежде всего, из-за нелинейности межмолекулярных взаимодействий, вклад которых в потенциал наносистем может оказаться не только существенным, но и определяющим ее динамику. Ниже мы покажем примеры именно таких наносистем, а именно пружины стержней и пружин нанометровых размеров, которые демонстрируют бистабильную динамику арок Эйлера и осцилляторов Дуффинга.

Бистабильность арок Эйлера и осцилляторов Дуффинга является, конечно, базовой детерминистической характеристикой их динамики, но наиболее интересные эффекты при использовании этих конструкций, как и вообще бистабильных систем, наблюдаются при приложении к ним случайных возмущений. Теоретической моделью в этом случае является уравнение Ланжевена, описывающее движение частицы в двухъямном потенциале при действии на частицу случайной силы:

$$\frac{d^2x}{dt^2} = -k \frac{dx}{dt} - (ax + bx^3) + 2\epsilon f(t), \quad a < 0, \quad b > 0, \quad (3)$$

где $f(t)$ — δ -коррелированная случайная сила с нулевым средним и амплитудой 2ϵ , $U(x)$ — двухъямный потенциал системы. В случаях, когда

средняя энергия случайных возмущений ($\sim \epsilon^2$) сопоставима с барьером бистабильности, разделяющим два бассейна притяжения динамических траекторий (два локальных минимума потенциала $U(x)$), случайные возмущения могут активировать спонтанные скачкообразные переходы между двумя аттракторами бистабильной системы. Для арок Эйлера и осцилляторов ДUFFинга такие переходы будут проявляться как спонтанные вибрации конструкций с широким распределением частот вокруг некоторой средней частоты, определяемой, например, соотношением Крамерса [27].

В режиме спонтанных вибраций возможно еще одно интересное явление, названное в пионерской работе [28] стохастическим резонансом и похожее в некотором отношении на классический резонанс колебательных систем. Как и при классическом резонансе, при стохастическом резонансе возникает сильный отклик спонтанно вибрирующей бистабильной системы на действие слабой осциллирующей внешней силы, слегка “покачивающей” двухъямный потенциал. Оказывается, что если частота внешней осциллирующей силы близка к средней частоте спонтанных вибраций, то бистабильная система начинает вибрировать с частотой внешней осциллирующей силы. Рассматривая слабую осциллирующую силу как “входной сигнал”, а индуцированные шумом скачкообразные переходы между состояниями бистабильной системы как “выходной сигнал”, часто говорят, что стохастический резонанс — это тот парадоксальный случай, когда сигнал усиливается шумом [29].

Хотя в пионерских работах [28, 30] использовалась концепция стохастического резонанса в качестве гипотетического механизма, способного объяснить впечатляющую регулярность ледниковых периодов на Земле, они вызвали лавину публикаций о стохастическом резонансе в системах макроскопического, глобального и даже космического масштаба [31, 32]. К настоящему времени накопилось довольно много экспериментальных наблюдений спонтанных вибраций и стохастического резонанса в системах малых размеров, например в нанотрубках [33–35], графеновых листах [36], ДНК-шпильках [37] и белках [38]. В этой связи следует заметить, что для систем даже микронного размера барьер бистабильности столь высок ($\gg k_B T$), что спонтанные вибрации наблюдаются лишь при возмущениях, несопоставимо более сильных, чем тепловые флуктуации среды.

В системах субмикронного размера барьеры бистабильности ниже и спонтанные переходы между состояниями, активированные тепловыми флуктуациями окружающей среды, наблюдаться уже могут. Однако такие события все еще столь

редки, что частоты спонтанных вибраций на порядки меньше 1 Гц, и такие бистабильные структуры могут быть использованы только в узком сегменте функциональных устройств. Подобные ограничения резко ослабевают с переходом на нанометровые масштабы. Барьеры бистабильности систем размером в несколько нанометров могут быть вполне сопоставимы с энергией тепловых флуктуаций ($\sim k_B T$) при стандартных условиях, а характерные частоты спонтанных вибраций и стохастического резонанса могут достигать сотен МГц. Здесь, однако, нужны примеры. В данной статье мы приводим несколько таких примеров, обнаруженных нами в результате компьютерного скрининга олигомерных структур методами молекулярной динамики [39–41]. Мы показываем, что в динамическом отношении эти олигомеры являются полными аналогами арок Эйлера и осцилляторов ДUFFинга и имеют барьеры бистабильности, сопоставимые с энергией тепловых флуктуаций окружающей среды при комнатной температуре.

В разд. 2 изложены данные по молекулярной динамике короткого (размером в несколько нанометров) стержнеобразного олигомера термочувствительного полимера *N*-изопропилметакриламида длиной 30 мономерных звеньев (олиго-NIPMA-30) в воде и показано, что при продольном сжатии, стремящемся согнуть олигомер, он ведет себя так же, как арка Эйлера: как только сила, сгибающая олигомер, достигает некоторого критического значения, у олиго-NIPMA-30 появляется второе динамическое состояние, он становится бистабильным, и вблизи критического сжатия самопроизвольно возникают спонтанные вибрации со средней частотой ~ 100 МГц. Данные по бистабильности и спонтанным вибрациям олиго-NIPMA-30 дополнены данными по стохастическому резонансу этой структуры. В этом же разделе мы обсуждаем возможность использования спонтанных вибраций и стохастического резонанса олиго-NIPMA-30 для детектирования единичных органических молекул в водных растворах. Мы показываем, что олиго-NIPMA-30 может обратимо входить в режимы спонтанных вибраций и стохастического резонанса и выходить из этих режимов в ответ на присоединение к олигомеру единичных органических молекул.

В разд. 3 мы приводим примеры двух бистабильных пружин, тоже размером в несколько нанометров, образованных короткими пиридинфурановыми (PF) олигомерами (олиго-PF) спиралеобразной формы. Мы показываем, что при растяжении олиго-PF-нанопружины становятся бистабильными и их динамика оказывается аналогичной динамике осцилляторов ДUFFинга. Так же, как и у олиго-NIPMA-30-наноарки Эйлера, спонтанные вибрации олиго-PF-нанопружин

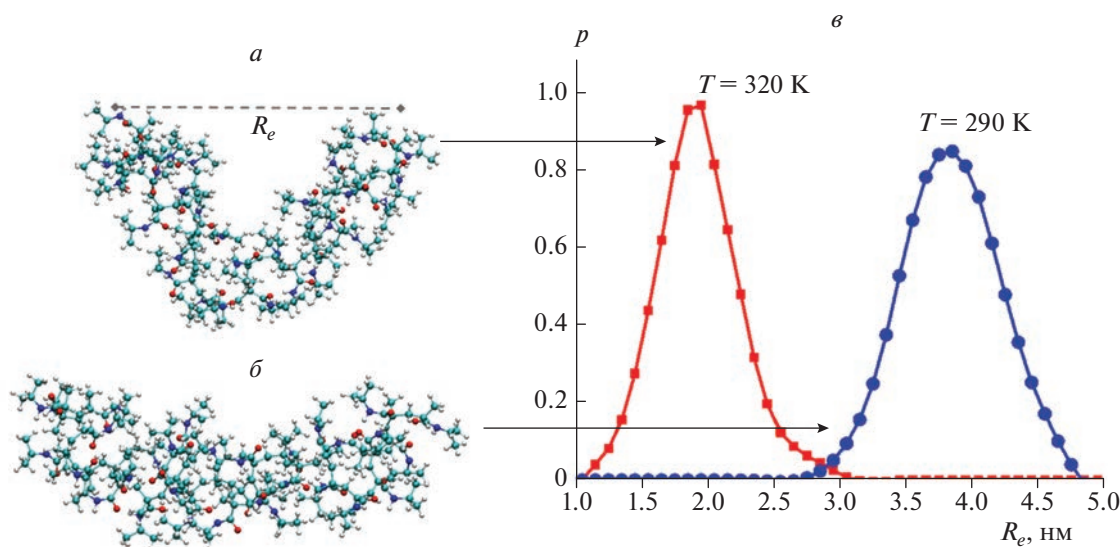


Рис. 1. Два конформационных состояния термочувствительного олиго-NIPMA-30 в атомистическом представлении: *a* и *б* — “открытое” (вытянутое) и “закрытое” (согнутое) состояния олигомера при температурах 290 и 320 К, соответственно; *в* — распределения $p(R_e)$ расстояний R_e между концами олигомера при этих температурах.

Дуффинга активированы тепловыми флуктуациями и имеют среднюю частоту ~ 100 МГц. Режим стохастического резонанса олиго-PF-нанопружин дополняет картину бистабильной динамики этих олигомеров.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Олигомеры *N*-изопропилметакриламида

Поли-(*N*-изопропилметакриламид) — хорошо известный термочувствительный полимер с нижней критической температурой растворимости (LCST) в воде, равной 310 К [42–44]. Ниже LCST он находится в клубковой фазе, а выше — в глобулярной. Термочувствительность полимера обусловлена тем, что его основная цепь и изопропильные боковые группы гидрофобны, а амидные боковые группы гидрофильны. Разнонаправленность взаимодействий этих групп с водой приводит к тому, что ниже LCST преимущество имеют гидрофильные группы и клубковое состояние оказывается энергетически более выгодным, а выше LCST преимущество имеют уже гидрофобные группы и выгодным оказывается глобулярное состояние.

Наличие LCST-перехода между клубковым и глобулярным состояниями полимера NIPMA позволило предположить, что если короткие стержнеобразные олигомеры NIPMA длиной в несколько куновских длин все еще будут сохранять термочувствительность, т.е. ниже и выше некоторой температуры будут иметь два хорошо различимых конформационных состояния, то они, возможно, будут бистабильны и при сило-

вом растяжении или сжатии, как это происходит с аркой Эйлера. С этой целью мы провели предварительные исследования конформационной динамики различных по длине и стереорегулярности олигомеров NIPMA при температурах ниже и выше LCST и установили, что стержнеобразный олигомер NIPMA длиной в 30 звеньев в синдиотактической конфигурации (олиго-NIPMA-30) имеет исходно требуемые свойства. В целом, он выглядит как арка Эйлера и имеет два хорошо различимых конформационных состояния — “открытое” (при 290 К) и “закрытое” (при 320 К). Распределения расстояний между концами олигомера в открытом и закрытом состояниях при температурах 290 и 320 К, соответственно, показаны на рис. 1.

Для исследования динамики олиго-NIPMA-30 при действии на него силовых нагрузок, можно использовать два варианта постановки эксперимента: взять олигомер в открытом состоянии и сжимать его концы, пытаясь согнуть, либо, наоборот, взять олигомер в закрытом состоянии и растягивать его, пытаясь разогнуть. Бистабильность олиго-NIPMA-30 возникает в обоих случаях и примерно при одинаковых критических нагрузках, поэтому в этой статье мы приводим данные только для случая, когда олиго-NIPMA-30 изначально брался в открытом состоянии при температуре 290 К и затем подвергался сжатию.

Пиридин-фурановые олигомеры

Пиридинфурановый сополимер тоже является хорошо известным проводящим полимером, со-

стоящим из 5- и 6-членных гетероциклических колец (рис. 2а) [45]. Пиридинфурановые олигомеры, даже достаточно короткие, принимают спиралеобразную форму, которая стабилизирована π -взаимодействиями ароматических групп соседних витков спирали (стекингowymi парами) [46]. Предполагая, что стекингвое взаимодействие, будучи нелинейным, может привести к нелинейной упругости PF-пружины при ее растяжении, и отталкиваясь от квантовомеханических расчетов межвиткового расстояния для PF-спиралей в окружающей воде при различных конфигурациях гетероатомов пиридинфурановых групп [46], мы остановились на *цис*-конфигурации олиго-PF с равновесным межвитковым расстоянием, равным 0.35 нм (рис. 2б). Как и в случае с олигомерами NIPMA, предварительный скрининг таких PF-олигомеров позволил нам подобрать подходящие размеры пружин и масштабы их растяжений. В результате мы остановились на двух спиралеобразных олигомерах: олиго-PF-5 и олиго-PF-7 размером в несколько нанометров, имевших длину 5 и 7 пиридин-фурановых мономерных блоков и один срединный виток, способный образовать с концами олигомерной нанопружины стекингую пару.

Методы вычислений

Все вычисления были выполнены в полном атомном представлении олигомеров и окружающей воды с использованием изотермического канонического NVT-ансамбля с сохранением числа частиц и объема системы и термостатированием по стандартному алгоритму [47]. Вычисление динамических траекторий системы проводилось с использованием пакета моделирования Gromacs 2019 [48] и параметров силового поля OPLS-AA [49] как для олигомеров, так и для модели воды SPC/E. Параметры леннард-джонсоновских межатомных потенциалов были взяты из OPLS-AA, а для межмолекулярных потенциалов использовались 1–4-взаимодействия с соответствующими правилами комбинирования и поправочным коэффициентом 0.5. Дальнодействующие электростатические взаимодействия были введены с использованием метода сглаженных частиц.

Молекулярная динамика олиго-NIPMA-30 и окружающей воды моделировалась в объеме $7 \times 7 \times 7$ нм³ с шагом по времени в 1 фс. Моделирование проводилось при температуре 290 К, т.е. значительно ниже нижней критической температуры растворимости поли-*N*-изопропилметакриламида, равной 310 К [42–44, 50]. Поскольку при температуре 290 К олиго-NIPMA-30 находился в открытом (выпрямленном) состоянии, к концам олигомера прикладывались силы, сжимающие его концы, и искались такие ее значения, при которых олигомер становился бистабильным и

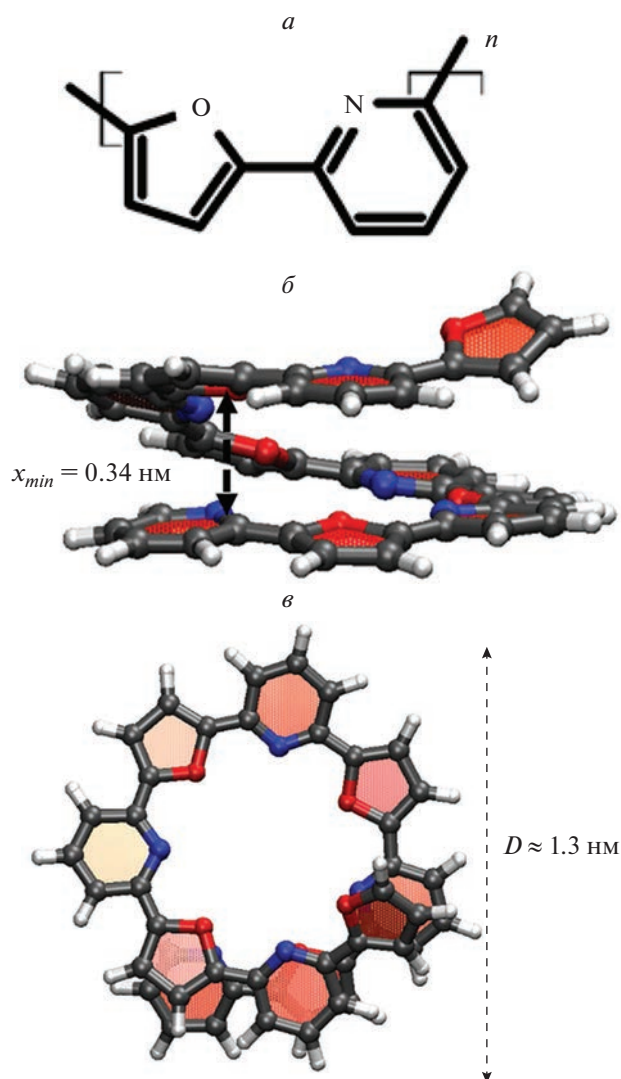


Рис. 2. Пиридинфурановая олиго-PF-5-пружина: а – структура пиридин-фуранового мономерного блока в *цис*-конфигурации; вид на нанопружину олиго-PF-5 сбоку (б) и сверху (в) в атомистическом представлении.

скачкообразно переходил в закрытое (согнутое) состояние. Тонкая настройка сжимающей силы (с точностью ~ 1 пН) в области бистабильности позволила получить симметричные спонтанные вибрации, при которых средние времена жизни олигомера в открытом и закрытом состояниях были примерно одинаковыми. В каждом из интересующих нас случаев, вычислялись три динамические траектории длиной 300–350 нс, а статистика переходов определялась по суммарной траектории, эффективная длина которой составляла ~ 1 мкс и имела около $\sim 10^3$ переходов между состояниями олигомера. Частотные характеристики спонтанных вибраций и стохастического резонанса определялись по эффективной траектории

методом фурье-преобразования соответствующих корреляционных функций.

Молекулярная динамика спиралеобразных пиридинфурановых олигомеров и окружающей воды моделировалась при температуре 280 К в объеме $7 \times 7 \times 7$ нм³ с шагом в 2 фс. Для термостатирования использовался термостат масштабирования скоростей [51]. Так же как и в случае с олиго-NIPMA-30, динамические траектории длиной 300–350 нс вычислялись три траектории, которые суммарно имели 10^3 переходов при спонтанных вибрациях олиго-PF-наноупружин.

В экспериментах с олиго-PF-5 один конец наноупружин фиксировался, а другой растягивался силой F . Состояние пружины контролировалось по расстоянию R_e между концами пружины. Бистабильность олиго-PF-5 определялась в отношении двух состояний, в которых расстояние между концами пружины флуктуировало вокруг достаточно хорошо разнесенных средних значений $R_e \approx 1.10$ и 1.45 нм. Ниже эти состояния мы называем “сжатым” и “напряженно-растянутым” соответственно.

Бистабильность олиго-PF-7-пружины достигалась иным способом. В этом случае управляющим параметром было расстояние D между концами пружины, которое устанавливалось путем их фиксации в соответствующих позициях. В этих экспериментах оба зафиксированных конца олиго-PF-7 могли притягивать серединный виток благодаря стекинговому взаимодействию и бистабильная динамика наноупружин выглядела как скачкообразные перемещения серединного витка к левому или правому концу пружины. Соответственно, динамика олиго-PF-7 характеризовалась изменением во времени расстояния r между витком пружины и одним из ее концов (для определенности, левым), а бистабильность определялась в отношении двух, хорошо разнесенных при $D \approx 1.0$ –1.3 нм положений витка у левого ($r \approx 0.4$ –0.5 нм) и правого ($r \approx 0.6$ –0.9) концов пружины соответственно.

Статистика переходов между состояниями олигомерных наноарок и наноупружин определялась непосредственно из молекулярно-динамических траекторий $R_e(t)$ и $p(t)$. Частотные характеристики спонтанных вибраций и стохастического резонанса наноарок и наноупружин определялись методом фурье-преобразования корреляционных функций соответствующих молекулярно-динамических траекторий.

3. ОЛИГОМЕРЫ N-ИЗОПРОПИЛМЕТАКРИЛАМИДА КАК АРКИ ЭЙЛЕРА

Предполагая, что продольное сжатие олиго-NIPMA-30 может привести к конформационному переходу из открытого состояния в закрытое, т.е. к изгибу олигомера, как только сжимающая сила превысит некоторое критическое значение F_c , мы взяли олиго-NIPMA-30, уравновешенный с одним зафиксированным концом в открытом состоянии при 290 К, и приложили к другому концу силу, действующую в направлении зафиксированного конца. Полученные в этих экспериментах данные приведены на рис. 3.

На рис. 3а схематически показано, как приложена сила, сжимающая олиго-NIPMA-30. На рис. 3б приведен фазовый портрет динамических состояний олиго-NIPMA-30 с бифуркацией, демонстрирующий тот факт, что при силе сжатия $F_c \approx 320$ пН динамика олиго-NIPMA-30 меняется критическим образом. Ниже критического сжатия, т.е. $F < F_c$, открытое (выпрямленное) состояние олигомера является единственным и устойчивым, однако, как только сила сжатия достигает критического значения F_c , возникает дополнительная ветвь закрытых (изогнутых) состояний олиго-NIPMA-30. Вблизи критической точки справа, т.е. в области сверхкритического сжатия, динамика бистабильна. В этой области наблюдаются спонтанные вибрации олиго-NIPMA-30 между открытым и закрытым состояниями. Заметим, что тепловые флуктуации окружающей среды являются тут единственным источником случайных возмущений бистабильной динамики олиго-NIPMA-30.

Фазовый портрет динамических состояний олиго-NIPMA-30, показанный на рис. 3б, построен по распределениям $p(R_e)$, описывающим статистику посещений открытого и закрытого состояний олигомера при различных значениях сжимающей силы F . Достаточно далеко от точки бифуркации F_c динамика олиго-NIPMA-30 характеризуется мономодальными распределениями $p(R_e)$, отвечающими открытому состоянию при докритическом сжатии и закрытому состоянию при сверхкритическом сжатии. Область бистабильности возникает вблизи критической точки при сверхкритическом сжатии. В этой области распределение $p(R_e)$ имеет бимодальную форму, т.е. олиго-NIPMA-30 спонтанно вибрирует между открытым и закрытым состояниями с временными интервалами между скачкообразными переходами ~ 1 –10 нс, что на 3–4 порядка больше характерного времени флуктуаций динамической траектории.

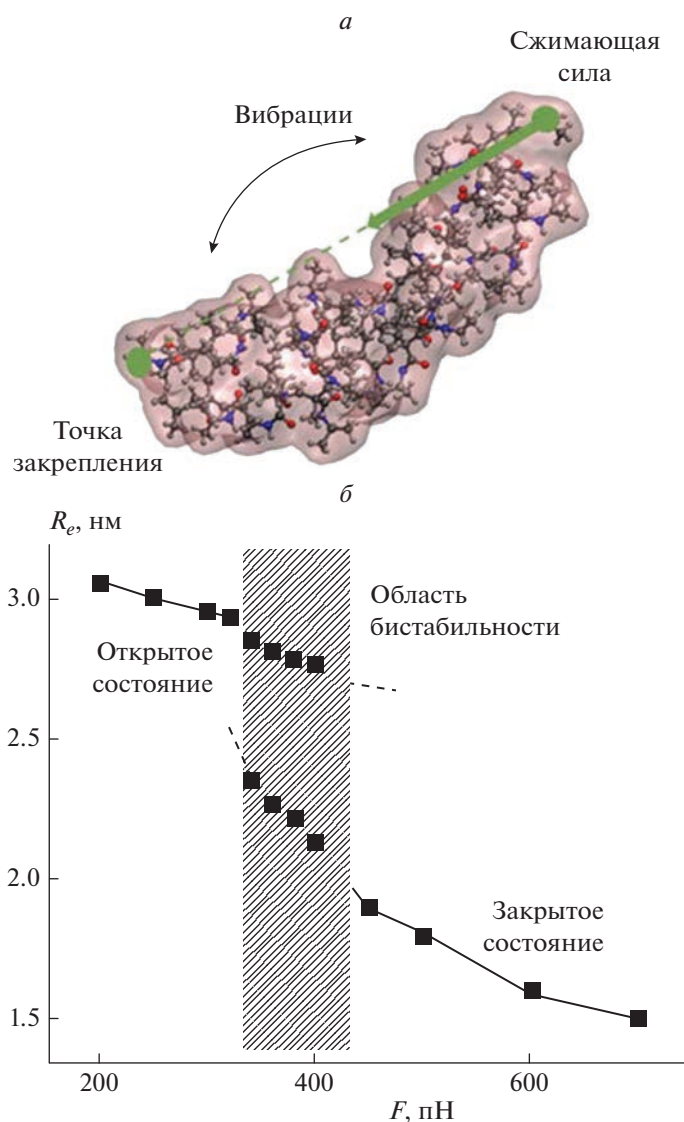


Рис. 3. Динамика олиго-NIPMA-30 при продольном сжатии: *a* – схематическое представление эксперимента; *б* – фазовая диаграмма динамических состояний (R_e) олиго-NIPMA-30 при различных значениях сжимающей силы F ; область спонтанных вибраций заштрихована.

При прохождении области бистабильности – из области докритического в область сверхкритического сжатия распределение $p(R_e)$ последовательно трансформируется от мономодального, отвечающего открытому состоянию олигомера, к мономодальному, отвечающему закрытому его состоянию, проходя при этом относительно узкую область симметричных спонтанных вибраций, при которых времена жизни олигомера в открытом и закрытом состояниях примерно одинаковы. Для олиго-NIPMA-30 в окружающей нанопружину воде симметричные спонтанные вибрации наблюдались при сжимающей силе $F_{sym} \approx 375$ пН и среднее время жизни олигомера в каждом состоянии при таких вибрациях состав-

ляло $\tau \sim 5$ нс. Рассматривая это время как характерное время активационного перехода через барьер бистабильности ΔE при температуре T и предполагая, что характерное время межмолекулярных столкновений в наших системах лежит (по порядку величины) в интервале $\sim 10^{-12} - 10^{-10}$ с, мы оценили барьер бистабильности олиго-NIPMA-30 в окружающей воде как $\Delta E \sim 10k_B T$.

Далее, введя олиго-NIPMA-30 в режим симметричных спонтанных вибраций, мы стимулировали стохастический резонанс, дополнительно прикладывая к олигомеру осциллирующую силу, направленную вдоль сжимающей силы F . Осциллирующая сила создавалась переменным элект-

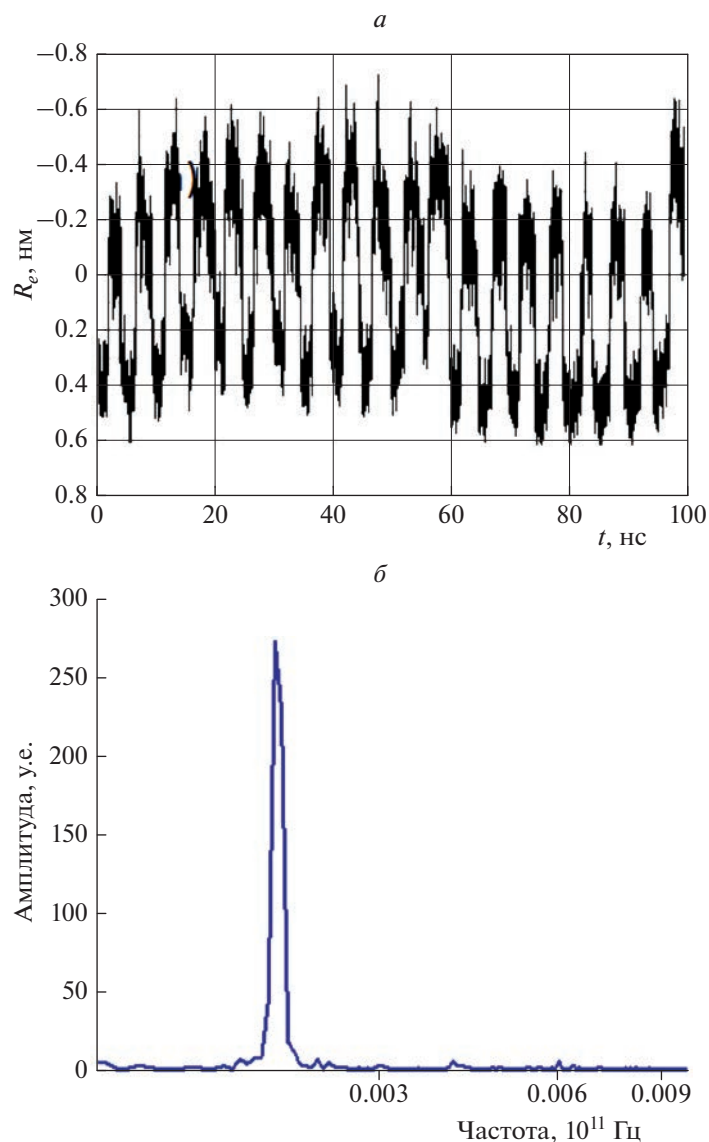


Рис. 4. Вибрации олиго-NIPMA-30 в режиме стохастического резонанса: *a* – типичная траектория $R_e(t)$ резонансных вибраций; *б* – частотный спектр вибраций олигомера в режиме стохастического резонанса.

трическим полем частоты ν и амплитуды E_0 , действующим на единичный заряд, помещенный на вибрирующий конец олигомера вместе с компенсирующим зарядом на зафиксированном конце олигомера. Наибольший резонансный эффект (рис. 4б) наблюдался нами при частоте переменного электрического поля $\nu \sim 100$ МГц и амплитуде $E_0 \approx 0.2$ В/нм.

Следует отметить тот примечательный факт, что при частоте $\nu \sim 100$ МГц период колебаний поля, генерирующего резонансный отклик олиго-NIPMA-30 в режиме симметричных спонтанных вибраций, совпадает с двойным средним временем жизни ($\sim 2\tau$) олигомера в каждом из

состояний, что полностью соответствует условию стохастического резонанса [28, 29, 32].

4. ОЛИГОМЕРЫ NIPMA-30 КАК ДЕТЕКТОРЫ ЕДИНИЧНЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ

Эта серия компьютерных экспериментов была поставлена с целью выяснения вопроса о том, чувствительны или нет спонтанные вибрации и стохастический резонанс олиго-NIPMA-30 к присоединению к нему органических молекул. Постановка такого вопроса была мотивирована, во-первых, тем, что вблизи точки бифуркации бистабильные системы вообще чувствительны к слабым воздействиям [52, 53], но помимо этого, размеры олиго-NIPMA-30 и многих органиче-

ских молекул вполне соизмеримы, и для режимов спонтанных вибраций и стохастического резонанса олиго-NIPMA-30, как показано выше, требуется тонкая настройка управляющих параметров.

В этих экспериментах мы вводили олиго-NIPMA-30 в режим симметричных спонтанных вибраций и изучали, как меняется динамика олигомера при нагружении его единичной органической молекулы. Данные для случая, когда олиго-NIPMA-30 нагружался молекулой красителя АТТО390 приведены на рис. 5.

Эксперименты подтвердили наши ожидания. Данные, приведенные на рис. 5, показывают, что если олиго-NIPMA-30 находится в режиме спонтанных вибраций, то нагружение его единичной органической молекулой выводит олигомер из этого режима, а для возвращения в этот режим уже нагруженного олигомера нужна определенная подстройка параметров, управляющих областью бистабильности. В частности, как видно из рис. 5в, присоединение единичной молекулы красителя АТТО390 сдвигает область бистабильности олиго-NIPMA-30 на ≈ 15 пН: $cF_{sym} \approx 375$ пН до $F_{sym} \approx 390$ пН. Величина сдвига области бистабильности, как показали эксперименты, зависит от сродства органических молекул к олиго-NIPMA-30 и их массы.

Поскольку спонтанные вибрации олиго-NIPMA-30 оказались чувствительны к нагружению олигомера единичными органическими молекулами, естественно было посмотреть на детектирующие свойства олигомера в условиях стохастического резонанса. В этих экспериментах олиго-NIPMA-30 сначала вводили в режим стохастического резонанса переменным электрическим полем с частотой ~ 100 МГц и амплитудой ~ 0.2 В/нм, а затем исследовали молекулярную динамику олигомера, нагруженного молекулярным грузом. Результаты экспериментов показаны на рис. 6.

Хорошо видны два эффекта. В том случае, когда олиго-NIPMA-30 не нагружен и находится в режиме спонтанных вибраций, присоединение к нему единичной органической молекулы (в данном случае — триптофана) выводит его из этого режима (ср. кривые 1 на рис. 6а и 6б). В показанном на рис. 6 случае олиго-NIPMA-30 перестает вибрировать. Если же олиго-NIPMA-30 исходно находится в режиме стохастического резонанса, нагружение его органической молекулой выводит олигомер из этого режима, но вибрации, уже нерегулярные, могут сохраняться (кривые 2 на рис. 6а и 6б).

Мы сочли интересным посмотреть, можно ли для детектирования использовать изменение амплитуды сигнала стохастического резонанса. Поскольку, как было показано выше, нагружение олиго-NIPMA-30 органическими молекулами сдвигает область бистабильности в сторону больших сжи-

мающих сил, мы немного увеличили эту силу до значений $F \approx 390$ пН, перешли в режим стохастического резонанса и нагрузили олигомер уже в этих условиях. Изменение амплитуды резонансного сигнала при нагружении олиго-NIPMA-30 молекулой триптофана показано на рис. 7. Видно, что присоединение органической молекулы к олиго-NIPMA-30 заметно уменьшает амплитуду резонансного сигнала.

Суммируя результаты компьютерных экспериментов этого подраздела, можно заключить, что нагружение бистабильных олигомеров единичными органическими молекулами может сдвигать и точку бифуркации, и область бистабильной динамики олигомера. Величина такого сдвига зависит, в частности, от сродства детектируемой молекулы к олиго-NIPMA-30 и массы детектируемой молекулы. Нагружение олиго-NIPMA-30 может ухудшать сигнал стохастического резонанса, или переводить режим стохастического резонанса в режим спонтанных вибраций, или вообще выводить олигомер из режима спонтанных вибраций. Поэтому само детектирование единичных молекул бистабильными олигомерами, в принципе, может быть основано на измерениях частотного спектра вибраций олигомера.

Селективную способность таких детекторов оценить пока трудно. Следует, однако, заметить, что мы не создавали на молекуле олиго-NIPMA-30 специфических сайтов селективного связывания с детектируемыми молекулами. Неселективного связывания органических молекул с олигомером было достаточно для того, чтобы выяснить, можно или нет, хотя бы в принципе, использовать бистабильные олигомеры нанометрового размера для детектирования единичных органических молекул. Теперь, после получения вполне обнадеживающих результатов, вопрос о бистабильных олигомерных детекторах со специфическими сайтами селективного связывания становится несомненно актуальным.

5. ПИРИДИН-ФУРАНОВЫЕ ОЛИГОМЕРЫ КАК ПРУЖИНЫ ДУФФИНГА

Как уже отмечалось в разд. 2, в результате предварительного скрининга PF-нанопружин различной длины мы остановились на двух спиралеобразных олигомерах: олиго-PF-5 и олиго-PF-7 размером в несколько нанометров, имевших один срединный виток, способный образовать с концами нанопружин стекинговую пару.

При исследованиях динамики олиго-PF-5-пружин в окружающей их воде, пружину с одним зафиксированным концом уравнивали при температуре 280 К (это состояние ниже называется “сжатым”) и затем растягивали силой F , направленной вдоль оси пружины. Состояние пружины

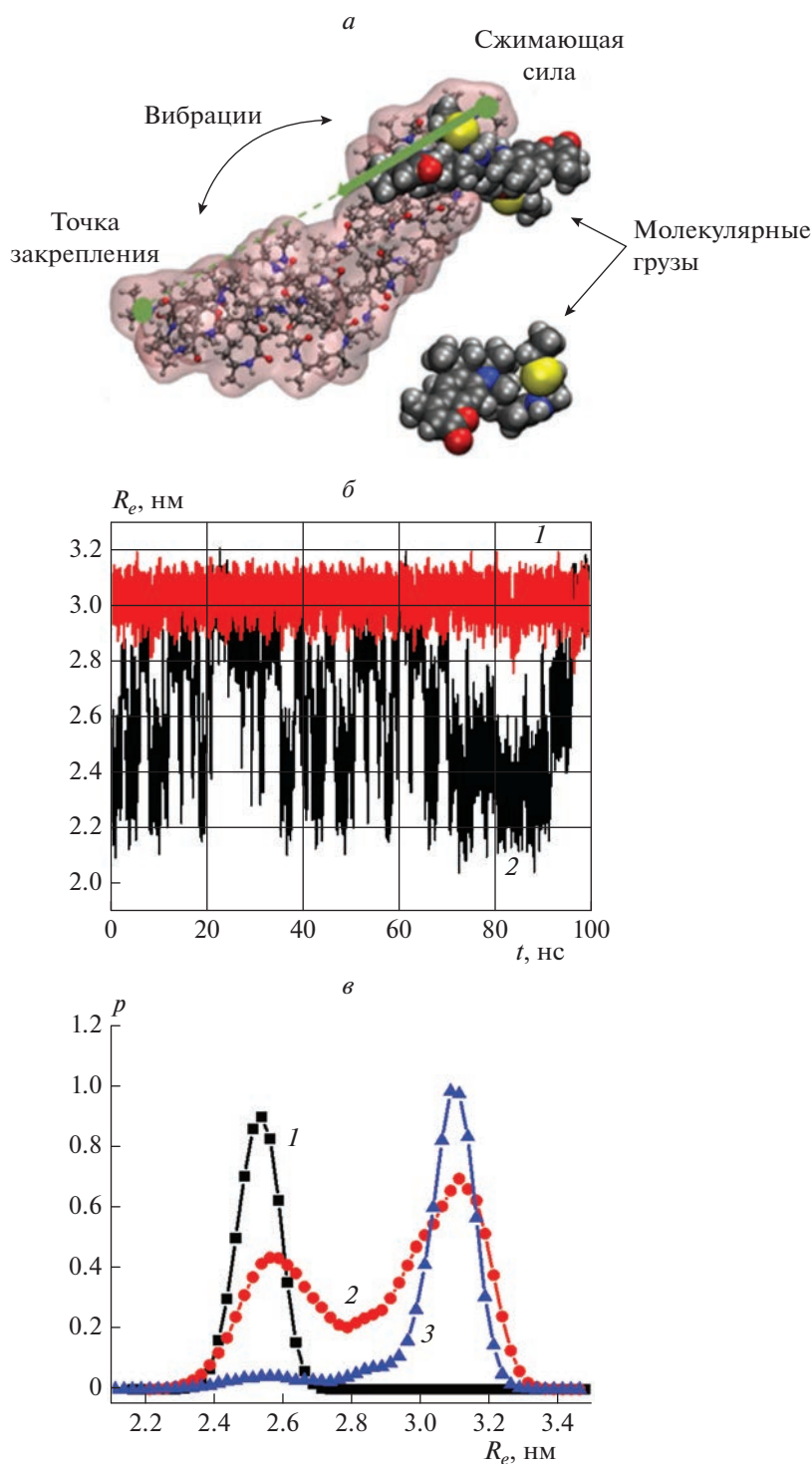


Рис. 5. Детектирование органических молекул в режиме спонтанных вибраций олиго-NIPMA-30: *a* — схема компьютерного эксперимента; *б* — динамика олиго-NIPMA-30, ненагруженной органической молекулой (траектория 1) и нагруженной органической молекулой (траектория 2); *в* — смещение области бистабильности при нагружении олиго-NIPMA-30 единичной органической молекулой: $p(R_e)$ — распределение плотности вероятности состояний R_e ; $F = 380$ (1), 390 (2) и 400 пН (3).

жины контролировалось по расстоянию R_e между ее концами. Схема эксперимента показана на рис. 8*a*. Оказалось, что при растяжении олиго-

PF-5-пружина ведет себя критическим образом. При малых растягивающих силах (малых растяжениях) расстояние между концами нанопружи-

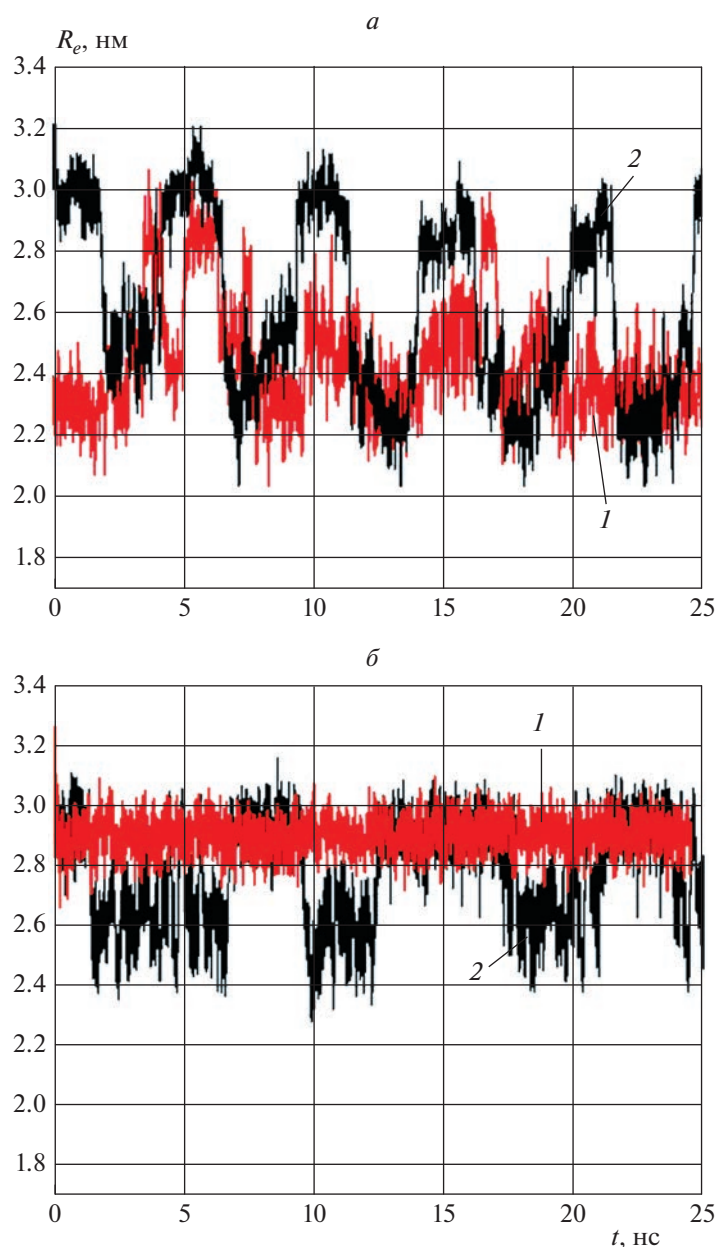


Рис. 6. Детектирование органических молекул в режиме стохастического резонанса олиго-NIPMA-30: *а* – динамика спонтанных вибраций (траектория 1) и стохастического резонанса (траектория 2) ненагруженного олиго-NIPMA-30; *б* – динамика олиго-NIPMA-30, нагруженного молекулой триптофана (номера траекторий соответствуют случаю *а*).

ны линейно растет с увеличением приложенной силы F , как и у обычных механических пружин, однако как только растягивающая сила F достигает некоторого критического значения F_c , у олиго-PF-5-пружины появляется еще одно динамическое состояние (ниже оно называется “напряженно-растянутым”) и возникает бистабильность. Фазовый портрет динамических состояний пружины при ее растяжении приведен на рис. 8б.

На рис. 8в показана типичная траектория симметричных спонтанных вибраций олиго-PF-5

при растягивающей силе $F_{sym} \approx 280 \text{ пН}$. На рис. 8г показано изменение распределения плотности вероятности обнаружить пружину в состоянии со значением R_e при удалении от критической точки $F_c \approx 220 \text{ пН}$ в область бистабильности. Заметим, что вид этих распределений соответствует виду потенциала пружины $U(x)$: бимодальное распределение $p(R_e)$ отвечает двухъямному потенциалу $U(x)$. Таким образом, рис. 8г показывает, что при удалении от критической точки F_c в область би-

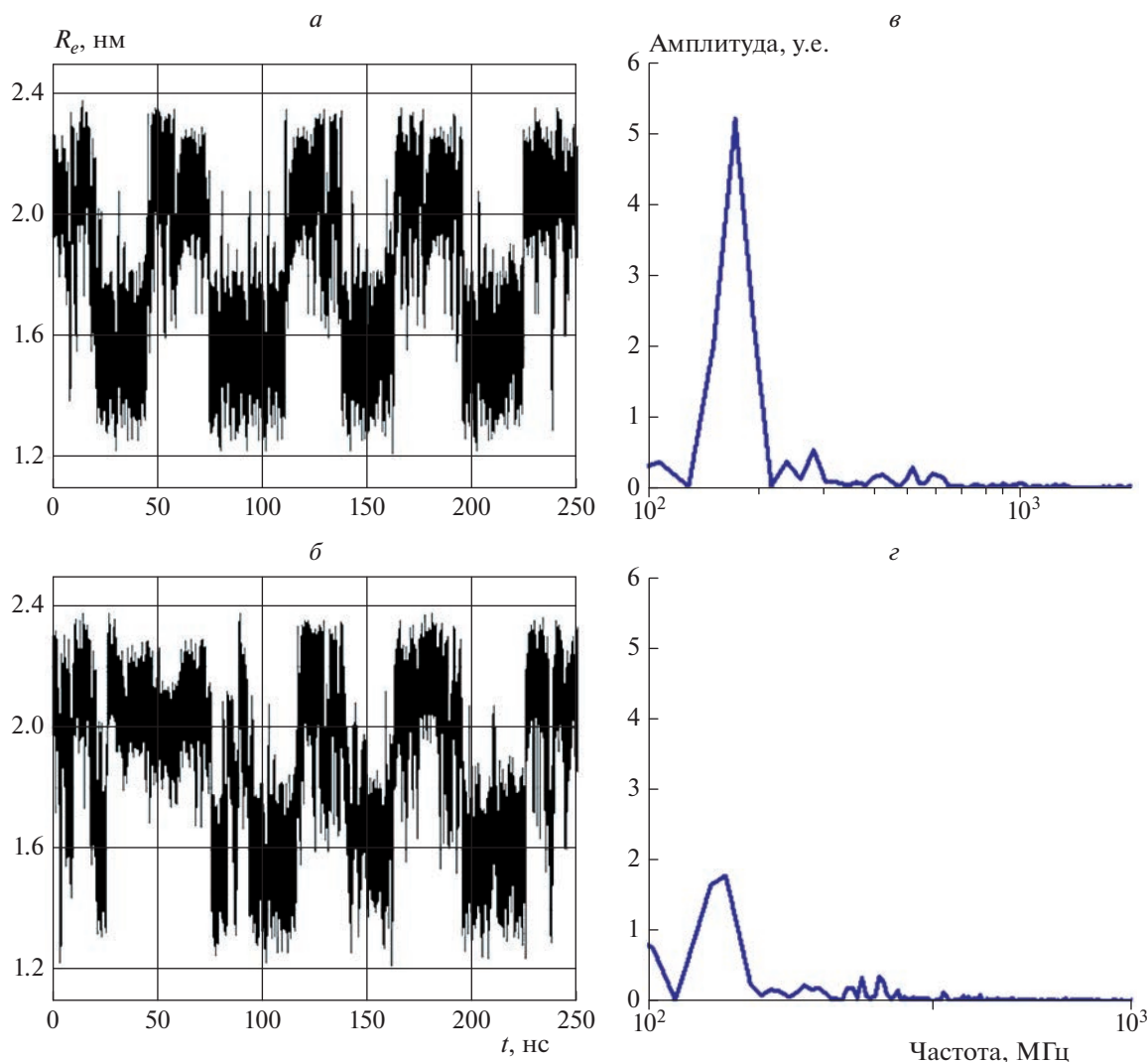


Рис. 7. Изменение сигнала стохастического резонанса олиго-NIPMA-30 при нагружении его органической молекулой (триптофаном): *a* и *б* – вибрации ненагруженного и нагруженного олигомера, соответственно; *в* и *г* – сигнал стохастического резонанса ненагруженного и нагруженного олигомера, соответственно.

стабильности вид потенциала $U(x)$ меняется от потенциала с одним минимумом, соответствующим сжатому состоянию, к потенциалу тоже с одним минимумом, но соответствующим напряженно-растянутому состоянию. По ходу этой трансформации система проходит область бистабильности с характерным для бистабильности двухъямным потенциалом.

Эта картина полностью соответствует фазовому портрету “катастрофы сборки” сильно демпфированного осциллятора Дуффинга. Заметим, что сжатое и напряженно-растянутое состояния олиго-PF-5-пружины достаточно хорошо дистанцированы друг от друга. Средние расстояния R_e в этих состояниях различаются на равновесную длину стекингвой пары пирдинфурановых спиралей, а именно на ≈ 0.35 нм. Это означает что

в напряженно-растянутом состоянии расстояние между витком и зафиксированным концом пружины вдвое больше равновесного стекингвого расстояния, а следовательно, вклад стекингвого взаимодействия в потенциал нанопружины пренебрежимо мал и упругие свойства пружины в этом состоянии определяются в основном жесткостью полимерной цепи.

Таким образом, у олиго-PF-5-нанопружин имеется критический порог по растяжению, такой что при превышении этого порога нанопружина становится бистабильной и может спонтанно вибрировать между сжатым и напряженно-растянутым состояниями. В начале области бистабильности пружина находится в основном в сжатом состоянии, лишь изредка посещая напряженно-растянутое состояние, а на конце области

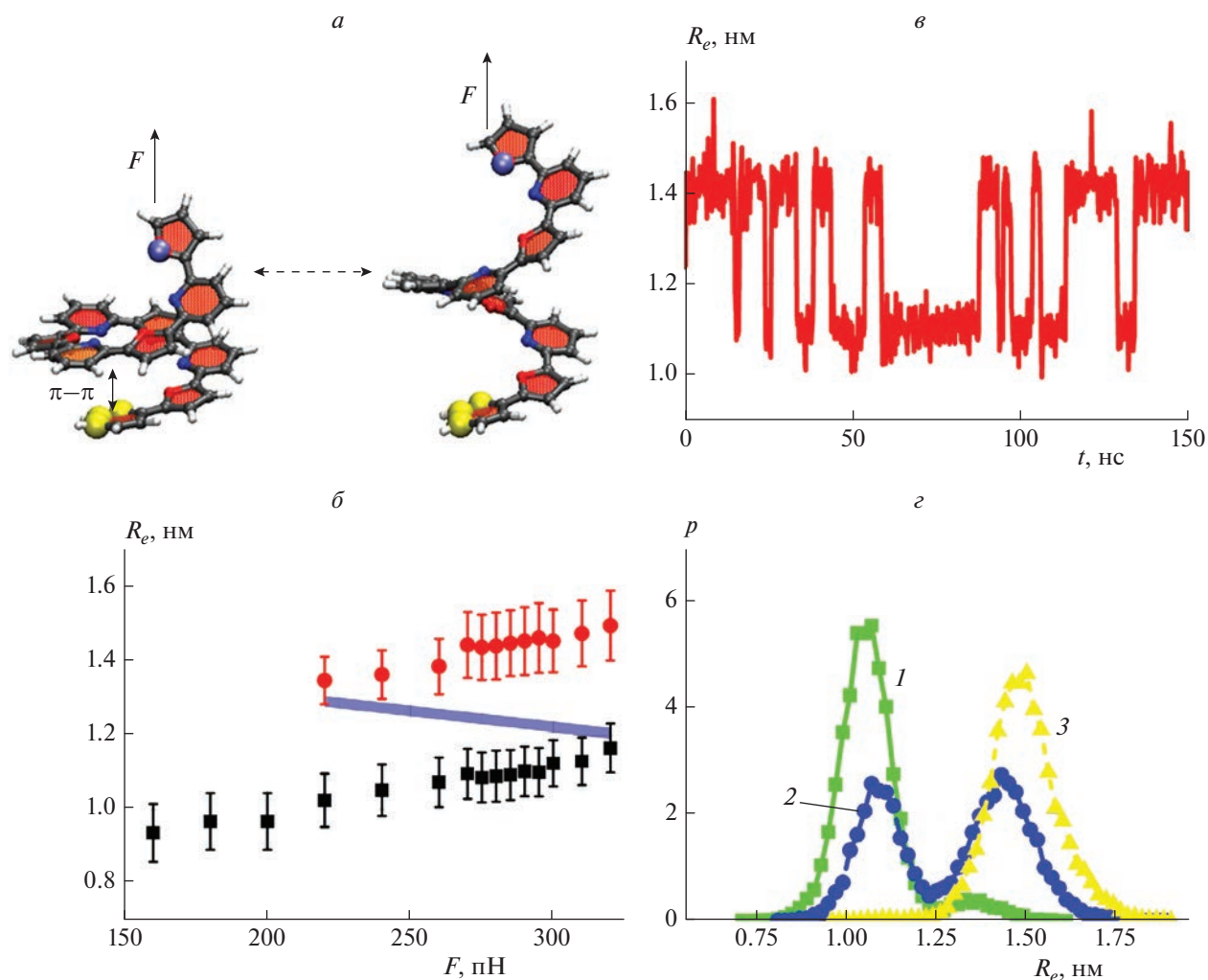


Рис. 8. Бистабильность олиго-PF-5-пружины: *a* – вид “сжатого” (слева) и напряженно-растянутого (справа) состояний пружины с зафиксированным концом в атомном представлении: F – сила, растягивающая нанопружину; *b* – фазовый портрет сжатого (■) и напряженно-растянутого (●) динамических состояний олиго-PF-5 (широкая линия – барьер бистабильности); *c* – спонтанные вибрации олиго-PF-5; *d* – изменение статистики посещений $p(R_e)$ олиго-PF-5 при удалении от точки бифуркации в область бистабильности: симметричная бистабильность наблюдается при $F_{sym} \approx 280$ пН (2); 1 – $F = 240$ пН, 3 – $F = 320$ пН.

бистабильности (там, где сильно растянутый олигомер теряет спиралеобразную форму) статистика посещений двух состояний обратная – пружина в основном находится в напряженно-растянутом состоянии. Режим симметричных спонтанных вибраций наблюдаются примерно в середине этой области. Средние времена жизни сжатого и напряженно-растянутого состояний в этом режиме равны друг другу и составляют величину $\tau \approx 6$ нс. Отсюда при тех же предположениях, что были сделаны в разд. 2 для оценки барьера бистабильности олиго-NIPMA-30, получаем барьер бистабильности олиго-PF-5-пружины примерно равным $\sim 10k_B T$.

Далее, вводя олиго-PF-5-пружину в режим симметричных спонтанных вибраций, мы стимулировали стохастический резонанс, прикладывая к нанопружине дополнительную осциллирующую силу, направленную вдоль оси пружины. Как и в экспериментах с олиго-NIPMA-30, осциллирующая сила создавалась внешним электрическим полем $E(t) = E_0 \cos 2\pi\nu t$, действующим на единичный заряд, расположенный на вибрирующем конце пружины (компенсирующий заряд был расположен на зафиксированном конце пружины). Данные этих экспериментов при $E_0 \approx 0.2$ В/нм приведены на рис. 9. Наибольший резонансный

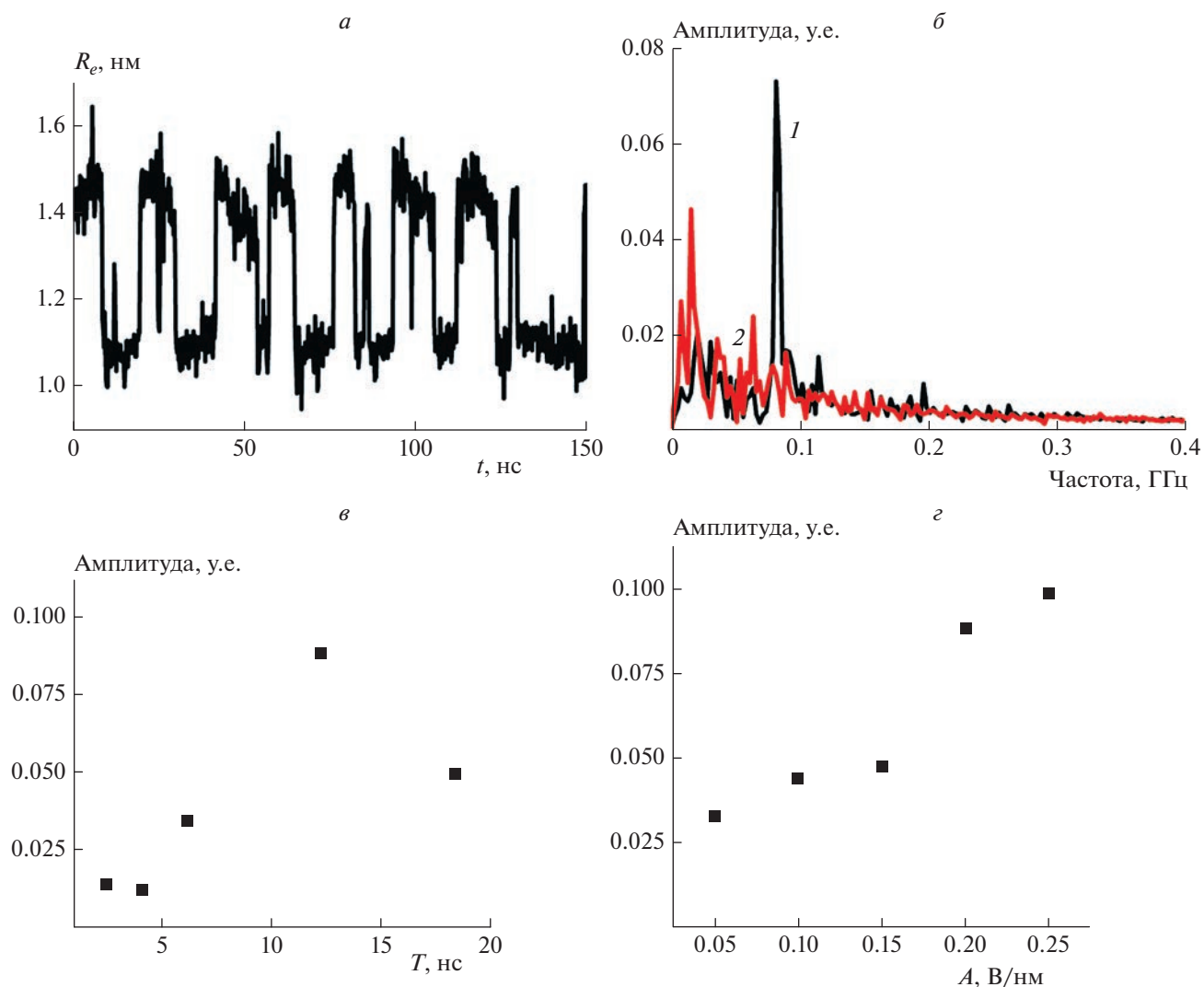


Рис. 9. Стохастический резонанс олиго-PF-5-пружины: *а* – вибрации пружины в режиме стохастического резонанса; *б* – частотный спектр стохастического резонанса (1) в сравнении со спектром спонтанных вибраций (2); *в* – изменение амплитуды резонансного пика при изменении периода T колебаний внешнего осциллирующего поля; *г* – изменение амплитуды резонансного пика при увеличении амплитуды A внешнего осциллирующего поля.

пик (рис. 9в) наблюдался при частоте переменного электрического поля $\nu \sim 100$ МГц.

Здесь тоже следует отметить, что максимальный резонансный отклик наблюдался именно в том случае, когда период осциллирующего поля был близок к удвоенному среднему времени жизни состояний бистабильной системы в режиме симметричных спонтанной вибрации. Что касается амплитуды осциллирующего поля, то понятно, что при достаточно больших амплитудах E_0 внешнего осциллирующего поля бистабильная система может войти в режим вынужденных колебаний, которые генерируются самим переменным полем, а не спонтанными переходами бистабильной системы между состояниями. Эксперименты показали, что режим вынужденных колебаний

возникает при $E_0 > 0.3$ В/нм, т.е. при заметно больших амплитудах переменного поля, чем те, которые мы использовали для возбуждения стохастического резонанса. Следует также отметить, что на краях области бистабильности времена жизни олиго-PF-5-пружины в сжатом и напряженно-растянутом состояниях сильно различаются и подобрать частоту переменного поля для возбуждения стохастического резонанса оказывается проблематичным.

Помимо этих экспериментов, мы исследовали и другой способ перевода олиго-PF-нанопружины в бистабильное состояние. Идея заключалась в том, чтобы оба конца пружины могли притягивать серединный виток за счет образования с ним стэкинг-пары. Предполагалось, что при не-

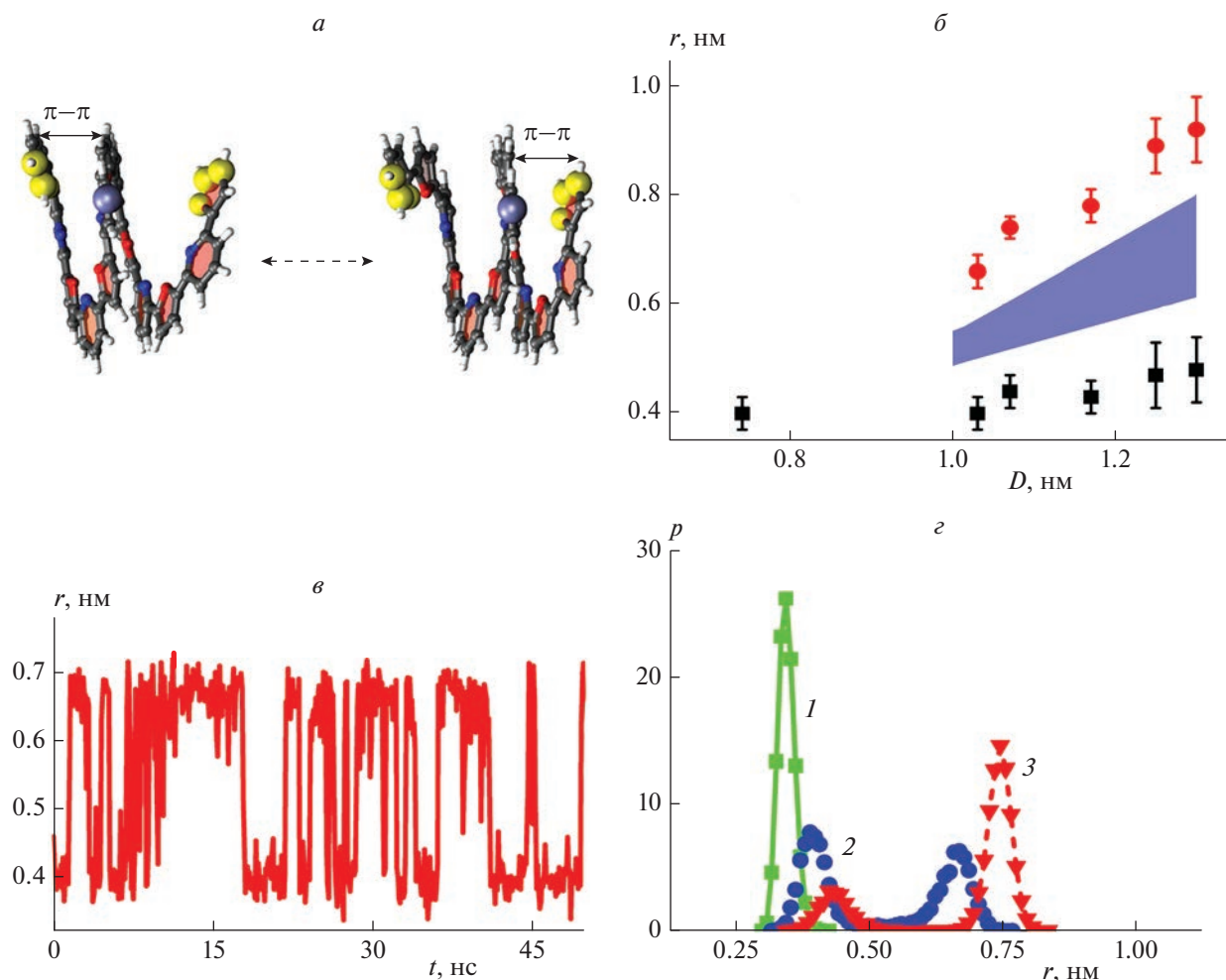


Рис. 10. Бистабильность олиго-PF-7-пружины: *a* – левое (слева) и правое (справа) состояния нанопружины с зафиксированными группами на концах олиго-PF-7 в атомном представлении; *б* – фазовый портрет левого (■) и правого (●) динамических состояний олиго-PF-7 (синим цветом выделен барьер бистабильности); r – расстояние между витком и левым концом пружины, D – расстояние между концами пружины; *в* – спонтанные вибрации между левым и правым состояниями нанопружины; *г* – изменение статистики посещений левого и правого состояний при увеличении D ; симметричные спонтанные вибрации наблюдаются при $D \approx 1.03$ нм (2); 1 – $D = 0.74$ нм, 3 – $D = 1.07$ нм.

котором растяжении нанопружины виток станет вибрировать между ее концами, попеременно создавая стекинговую пару с одним и другим концом пружины. Предварительный скрининг показал, что подходящим образом для такой конструкции является PF-олигомер длиной, равной семи звеньям. В уравновешенном состоянии расстояние между концами олиго-PF-7-пружины составляло ≈ 0.70 нм, т.е. виток находился на равном удалении от ее концов и расстояние между витком и каждым из концов пружины соответствовало длине стекинговой пары ≈ 0.35 нм.

Бистабильность олиго-PF-7-пружины достигалась путем ее растягивания с контролем расстояния D между ее концами. Как и ожидалось, при достаточно больших растяжениях нанопружины центральное положение витка становится не-

устойчивым и он смещается либо к левому, либо к правому концу пружины, образуя вблизи этих концов устойчивые состояния, стабилизированные стекинговым взаимодействием витка с соответствующим концом пружины. Ниже мы называем эти состояния левым и правым состояниями соответственно. Вид этих двух состояний в атомном представлении показан на рис. 10а.

Фазовый портрет динамических состояний олиго-PF-7-пружины показан на рис. 10б. При расстояниях между концами нанопружины, меньших критического расстояния $D_c \approx 1.00$ нм, последняя имеет только одно динамическое состояние, отвечающее срединному положению витка. Однако при сверхкритических растяжениях $D > D_c$ пружина оказывается бистабильной: аттрактор с срединным расположением витка

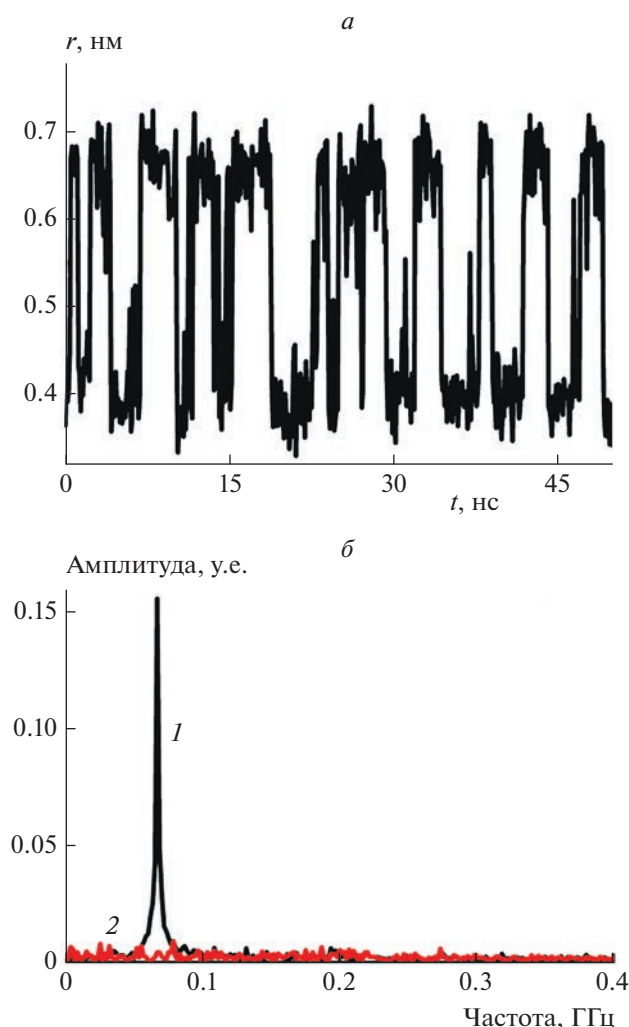


Рис. 11. Стохастический резонанс олиго-PF-7-пружины: *a* — вибрации нанопружины в режиме стохастического резонанса; *б* — частотный спектр вибраций в режиме стохастического резонанса (1) в сравнении со спектром спонтанных вибраций (2).

расщепляется на два аттрактора, расположенные у концов пружины (рис. 6б), а само серединное состояние витка оказывается неустойчивым. Расстояние $D_c \approx 1.00$ нм между концами пружины соответствует критическому растяжению пружины, при котором происходит смена фазового портрета нанопружины с бифуркацией ее динамических состояний.

При превышении критического растяжения D_c пружина олиго-PF-7 становится бистабильной и виток может самопроизвольно вибрировать между левым и правым концами пружины. Типичная траектория спонтанных вибраций олиго-PF-7-пружины показана на рис. 10в. Эволюция распределения плотности вероятности найти пружину в состоянии r (напомним, что r есть рас-

стояние между витком и левым, для определенности, концом пружины) при увеличении расстояния D между ее концами, представленная на рис. 10г, дает представление об изменении характера вибраций в области бистабильности. В начале области бистабильности система в основном находится в левом (для определенности) состоянии, лишь изредка посещая правое состояние. При увеличении расстояния D время жизни в левом состоянии уменьшается, а в правом — увеличивается; времена жизни в этих состояниях выравниваются, но затем начинает доминировать уже правое состояние.

Эксперименты показали, что статистика посещений левого и правого состояний очень чувствительна к изменению расстояния между концами пружинки, что вполне ожидаемо для короткодействующих стэкинг-взаимодействий. В наших экспериментах симметричные спонтанные вибрации олиго-PF-5-пружины наблюдались при расстоянии $D_{sym} \approx 1.03$ нм. Типичная траектория симметричных спонтанных вибраций олиго-PF-7-пружины показана на рис. 10в. Среднее время жизни в левом и правом состояниях при симметричных вибрациях было равно $\tau \approx 6.5$ нс. Соответственно, барьер бистабильности олиго-PF-7-пружины оказался равным $\sim 10k_B T$, т.е. таким же, как у олиго-PF-5-пружины и олиго-NIPMA-наноарки Эйлера.

Как и в предыдущих случаях, мы и здесь исследовали режим стохастического резонанса. В данном случае дополнительный единичный заряд располагался на витке олиго-PF-7-пружины, а компенсирующий заряд — в окружающей пружину воде. Типичная траектория стохастического резонанса вибрирующей пружины олиго-PF-7 показана на рис. 11а. Соответствующий резонансный пик в частотном спектре вибраций показан на рис. 11б.

В действительности, и в данном случае был просканирован широкий диапазон частот внешнего переменного поля, генерирующего режим стохастического резонанса, и максимальный резонансный сигнал был получен для переменного поля с периодом колебаний $T \sim 2\tau \approx 13$ нс, равным двойному времени жизни состояний олиго-PF-7 при симметричных спонтанных вибрациях.

6. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Описанные выше компьютерные эксперименты дают основания полагать, что олигомерные структуры нанометрового размера, конформационные состояния которых стабилизированы слабыми межмолекулярными взаимодействиями, могут, при определенных условиях, демонстрировать бистабильную динамику. Приведенные примеры бистабильных олигомерных структур

действительно демонстрируют такое поведение, напоминая арки Эйлера и пружины Дuffинга не только динамически, но и структурно. Эти примеры показывают, что динамическая бистабильность может быть присуща олигомерным структурам размером всего в несколько нанометров, т.е. таким молекулярным структурам, размер которых на порядок меньше характерных размеров, например, белковых молекулярных машин. Следует подчеркнуть, что бистабильная динамика олигомерных структур, подобных аркам Эйлера и пружинам Дuffинга, реализуется при внешних силовых нагрузках, выводящих молекулярные структуры из термодинамически равновесных состояний. В таких условиях структуры, олиго-NIPMA-30, олиго-PF-5 и олиго-PF-7 являются, по сути, нелинейными динамическими системами, однако столь малыми, что их спонтанные вибрации и стохастический резонанс могут активироваться непосредственно тепловыми флуктуациями окружающей среды.

Обращаясь к проблеме предбиологической эволюции, можно пока лишь отметить, что самосборка в подходящих условиях столь малых и, вообще говоря, неспецифичных бистабильных олигомеров, как олиго-NIPMA-30, олиго-PF-5 и олиго-PF-7, не представляется столь же невероятной, как самосборка биологических молекулярных машин. Вместе с тем следует заметить, что да, конечно, теперь есть некоторые основания полагать, что даже очень короткие олигомеры могли осуществлять функции нелинейных динамических систем и, следовательно, быть простейшими молекулярными машинами. Однако пока трудно что-либо сказать о той “алгоритмической химии”, которую гипотетически они могли реализовать на стадиях предбиологической эволюции. Пока не ясно, достаточно ли собственных функциональных возможностей таких простейших молекулярных машин для сборки гораздо более сложных и специфичных молекулярных структур, какими являются биологические макромолекулы, или такая возможность появляется только у существенно более сложных функциональных систем, образованных такими простейшими машинами. В последнем случае, естественно, возникает вопрос о вероятности самосборки таких функциональных систем в неспецифических условиях предбиологии. Так что центральный вопрос предбиологической теории остается пока открытым.

Конечно, компьютерный эксперимент не заменяет реальный эксперимент, а лишь дает аргументированный прогноз. Однако, когда речь идет об экспериментальном исследовании динамики единичных молекулярных структур размером в не-

сколько нанометров, без предварительного компьютерного экспериментирования рассчитывать на успех в реальном эксперименте едва ли приходится.

В этой связи заметим, что экспериментальное наблюдение бистабильности, спонтанных вибраций и стохастического резонанса столь малых молекулярных структур, как олиго-NIPMA-30, олиго-PF-5, олиго-PF-7, может быть связано с рядом ограничений, видных из компьютерного моделирования. Эти ограничения мы прокомментируем на примере олиго-PF-7-пружины.

Сравнивая критическое расстояние $D_c \approx 1.00$ нм между концами олиго-PF-7-пружины, при котором возникает вторая ветвь динамических состояний пружины, с равновесной длиной стэкинг-пары ≈ 0.35 нм, можно предположить, что бистабильность олиго-PF-7 управляется перекрытием потенциалов стекинг-взаимодействия витка с левым и правым концами пружины. Феноменологический потенциал нанопружины в этом случае можно записать в виде

$$U(x) = U_{stack}(x) + U_{stack}(D - x),$$

$$U_{stack}(x) = A \left[\left(\frac{2x_{min}}{x} \right)^m - \left(\frac{2x_{min}}{x} \right)^n \right], \quad (4)$$

где $m > n > 0$, x_m — равновесная длина стекинг-пары (минимум потенциала $U_{stack}(x)$), $2x_{min}$ — радиус обрезания стекинг-взаимодействия, и D — расстояние между концами нанопружины. Отсюда непосредственно видно, что при $D \approx 2x_{min}$ перекрытие стекинг-потенциалов $U_{stack}(x)$ и $U_{stack}(D - x)$ дает единственный минимум в области $x \approx D/2$. При $D > 2x_{min}$ этот минимум формально расщепляется на два минимума, и, следовательно, бифуркацию состояний нанопружины можно было бы ожидать в точке $D = 2x_{min} \approx 0.70$ нм. Однако, как показывает компьютерный эксперимент, она наблюдается при существенно больших значениях $D_c \approx 1.00$ нм. Здесь следует иметь в виду, что имеется еще одно ограничение в наблюдении бистабильности и спонтанных вибраций, характерное для наноразмерных систем. При слишком малых барьерах бистабильности $\sim k_B T$, два состояния бистабильной системы неразличимы на фоне флуктуаций траектории и переходы между состояниями наблюдаться не будут. Вибрации бистабильной системы могут наблюдаться тогда, когда барьер бистабильности существенно больше $k_B T$. Но, с другой стороны, если тепловые флуктуации среды являются единственным активирующим переходы фактором, барьер бистабильности должен быть соизмерим с $k_B T$. Отсюда следует, что спон-

танные вибрации могут наблюдаться у таких молекулярных структур, барьеры бистабильности которых ограничены с двух сторон, например, интервалом от $\sim k_B T$ до $\sim 10 k_B T$. Именно такие барьеры бистабильности характерны для приведенных примеров нанопрок Эйлера и нанопружин Дюффинга.

Возвращаясь к обсуждению олиго-PF-7-пружины, отметим, что если $D > 4x_{min}$, т.е. расстояние между концами олиго-PF-7 превышает двойной радиус обрезания стеклинговых взаимодействий, то формально $U(x)$ остается двухъямным потенциалом, но в серединной части пружины возникает широкая зона нулевого градиента потенциала, в которой виток пружины может надолго застревать, и спонтанные вибрации наблюдаться тоже не будут. Именно это и наблюдалось нами при $D > 1.30$ нм [40].

Таким образом, помимо ограничений в выборе подходящих молекулярных структур, для наблюдения динамической бистабильности структур размером в несколько нанометров требуется не только прецизионное экспериментирование с единичными такими объектами, но и тонкое управление наномасштабной динамикой этих структур.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peschot A. // *Micromachines*. 2015. V. 6. № 8. P. 1046.
2. Dutreix C., Avriller R., Lounis B. et al. // *Phys. Rev. Res.* 2020. V. 2. № 2. P. 023268.
3. Benda L., Doistau B., Rossi-Gendron C. et al. // *Commun. Chem.* 2019. V. 2. № 1. P. 1.
4. Erbas-Cakmak S., Kolemen S., Sedgwick A. C. et al. // *Chem. Soc. Rev.* 2018. V. 47. P. 2228.
5. Varghese S., Elemans J. A. A. W., Rowan A. E. et al. // *Chem. Sci.* 2015. V. 6. P. 6050.
6. Shu T., Shen Q., Zhang X. et al. // *Analyst*. 2020. V. 145. № 17. P. 5713.
7. Lemme M.C., Wagner S., Lee K. et al. // *Research*. 2020. V. 2020. P. 1.
8. Zhang L., Marcos V., Leigh D.A. // *PNAS*. 2018. V. 115. № 38. P. 9397.
9. Shi Z.-T., Zhang Q., Tian H. et al. // *Adv. Intelligent Systems*. 2020. V. 2. № 5. P. 1900169.
10. Aprahamian I. // *ACS Central Sci.* 2020. V. 6. № 3. P. 347.
11. Nicoli F., Paltrinieri E., Tranfić M. // *Coord. Chem. Rev.* 2021. V. 428. P. 213589.
12. Evans D.J., Searles D.J. // *Adv. Phys.* 2002. V. 51. № 7. P. 1529.
13. Seifert U. // *Rep. Prog. Phys.* 2012. V. 75. № 12. P. 126001.
14. Horowitz J.M., Gingrich T.R. // *Nat. Phys.* 2020. V. 16. № 1. P. 15.
15. Ciliberto S. // *Phys. Rev. X*. 2017. V. 7. P. 021051.
16. Wang G.M., Seveck E.M., Mittag E. et al. // *Phys. Rev. Lett.* 2002. V. 89. № 5. P. 050601.
17. Jop P., Petrosyan A., Ciliberto S. // *Europhys. Lett.* 2008. V. 81. № 5. P. 50005.
18. Vroylandt H., Esposito M., Verley G. // *Phys. Rev. Lett.* 2020. V. 124. № 25. P. 250603.
19. Аветисов В.А., Гольданский В.И. // *УФН*. 1996. Т. 166. № 8. С. 873.
20. Avetisov V.A., Goldanskii V.I. // *PNAS*. 1996. V. 93. P. 11435.
21. Аветисов В.А., Гольданский В.И. // *Хим. физика*. 1997. Т. 16. № 8. С. 59.
22. Аветисов В.А. // *Хим. физика*. 2003. Т. 22. № 2. С. 16.
23. Arnold V.I. // *Catastrophe Theory*. Berlin-Heidelberg: Springer, 1984.
24. Poston T., Stewart I. *Catastrophe theory and its applications*. Mineola, N.Y.: Dover Publication, 1996.
25. Duffing G. *Erzwungene schwingungen bei veranderlicher Eigenfrequenz und ihre technische Bedeutung*. Sammlung Vieweg № 41—42. F. Vieweg & Sohn, 1918.
26. Chaos / Eds. Korsch H.J., Jodl H.-J., Hartmann T. Berlin—Heidelberg: Springer, 2008. P. 157.
27. Kramers H.A. // *Physica*. 1940. V. 7. № 4. P. 284.
28. Benzi R., Sutera A., Vulpiani A. // *J. Phys. A: Math. Gen.* 1981. V. 14. № 11. P. L453.
29. Benzi R., Parisi G., Sutera A. et al. // *Tellus*. 1982. V. 34. № 1. P. 10.
30. Benzi R., Parisi G., Sutera A. et al. // *SIAM J. Appl. Mathem.* 1983. V. 43. № 3. P. 565.
31. Gammaitoni L., Haönggi P., Jung P. et al. // *Rev. Modern Phys.* 1998. V. 70. № 1. P. 223.
32. Wellens T., Shatokhin V., Buchleitner A. // *Rep. Prog. Phys.* 2004. V. 67. № 1. P. 45.
33. Baughman R.H., Cui C., Zakhidov A.A., Iqbal Z. et al. // *Science*. 1999. V. 284. P. 1340.
34. Fujii H., Setiadi A., Kuwahara Y. et al. // *Appl. Phys. Lett.* 2017. V. 111. № 13. P. 133501.
35. Huang K., Zhang S., Li J. et al. // *Microsystem Technol.* 2019. V. 25. № 11. P. 4303.
36. Ackerman M.L., Kumar P., Neek-Amal M. et al. // *Phys. Rev. Lett.* V. 117. № 12. P. 126801.
37. Hayashi K., Lorenzo S., Manosas M. et al. // *Phys. Rev. X*. 2012. V. 2. № 3. P. 031012.
38. Cecconi C., Shank E.A., Bustamante C. et al. // *Science*. 2005. V. 309. № 5743. P. 2057.
39. Avetisov V.A., Markina A.A., Valov A.F. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2019. V. 10. № 17. P. 5189.
40. Avetisov V.A., Frolkina M.A., Markina A. et al. // *Nanomaterials*. 2021. V. 11. P. 3264.

41. *Markina A., Muratov A., Petrovskyy V. et al.* // *Nanomaterials*. 2020. V. 10. P.2519.
42. *Convertine A.J., Ayres N., Scales C.W. et al.* // *Biomacromolecules*. 2004. V. 5. № 4. P. 1177.
43. *Gao Y., Wei M., Li X. et al.* // *Macromol. Res.* 2017. V. 25. № 6. P. 513.
44. *Kamath G., Deshmukh S.A., Baker G.A.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013. V. 15. № 30. P. 12667.
45. *Jones R.A., Civeir P.U.* // *Tetrahedron*. 1997. V. 53. № 34. P. 11529.
46. *Sahu H., Gupta S., Gaur P. et al.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. V. 17. № 32. P. 20647.
47. *Berendsen H.J.C., Grigera J.R., Straatsma T.P.* // *J. Phys. Chem.* 1987. V. 91. № 24. P. 6269.
48. *Abraham M.J., Murtola T., Schulz R. et al.* // *Software X*. 2015. V. 1–2. P. 19.
49. *Kaminski G.A., Friesner R.A., Tirado-Rives J. et al.* // *J. Phys Chem. B*. 2001. V. 105. № 28. P. 6474.
50. *Liang X., Nakajima K.* // *Macromol. Chem. Phys.* 2018. V. 219. № 3. P. 1700394.
51. *Bussi G., Donadio D., Parrinello M.* // *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126. № 1. P. 014101.
52. *Avetisov V.A., Kuz'min V.V., Anikin S.A.* // *Chem. Phys.* 1987. V. 112. № 2. P. 179.
53. *Lai Z., Leng Y.* // *Mech. Systems Signal Processing*. 2016. V. 81. P. 60.

ПОЧЕМУ БЕЛОК СВОРАЧИВАЕТСЯ В УНИКАЛЬНУЮ 3D-СТРУКТУРУ? И НЕ ТОЛЬКО ЭТО...

© 2023 г. К. В. Шайтан*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

**E-mail: shaytan@ya.ru*

Поступила в редакцию 11.01.2023;
после доработки 18.01.2023;
принята в печать 20.01.2023

В статье кратко рассмотрена история развития представлений о динамике белков и других биополимеров и отмечен существенный вклад В.И. Гольданского в организацию и проведение этих исследований в нашей стране. Обсуждается современное развитие более ранних представлений о динамике биополимеров и фолдинге белков. Показано, что фолдинг не является изолированной проблемой и связан с фундаментальными динамическими свойствами линейных полимеров в конденсированной фазе. Аналитическими методами с использованием подходов, основанных на многомерной геометрии, показано, что вязкость среды является одним из важнейших факторов, который определяет правила движения репрезентативной точки по ультрамногомерной поверхности потенциальной энергии (ППЭ). Эти правила приводят к концентрации траекторий в тех областях конфигурационного пространства макромолекулы, которые соответствуют относительно гладким участкам ППЭ, что важно для понимания причин устойчивости результатов расчетов больших систем методом молекулярной динамики, несмотря на принципиальную неточность имеющихся силовых полей. В статье кратко описывается также новый подход к определению и изучению свойств многомерных ППЭ, который основан на особенностях топологии конфигурационного пространства линейных полимеров (биополимеров), симметрии относительно перестановок одинаковых звеньев цепи и теории Морса для изучения топографии многомерных поверхностей. При определенных условиях этот подход дает полезные результаты для топографии ППЭ и поверхности свободной энергии (ПСЭ) макромолекулы и позволяет с единых позиций связать между собой весьма разнородные результаты экспериментов по фолдингу белков. При этом появляется новая постановка для ряда принципиальных и дискуссионных вопросов, связанных с физическими закономерностями формирования живых систем. В частности, прослеживается связь между температурным режимом на планете и химической реализацией энергии невалентных взаимодействий в макромолекуле, которые необходимы для формирования уникальных пространственных структур биополимеров.

Ключевые слова: динамика белка, поверхность потенциальной энергии, энергетические ландшафты, симметрия и вязкость, фолдинг и рефолдинг белков, молекулярная динамика полимеров, силовые поля, стрела физико-химической молекулярной эволюции.

DOI: 10.31857/S0207401X23060109, EDN: UILUTU

ВВЕДЕНИЕ

Современная биология переживает интересный этап развития. Идет накопление огромного объема информации о самых различных биосистемах. Но этот прогресс пока не сопровождается генерацией новых идей [1]. Остаются без ответа и даже без конкретной постановки фундаментальные вопросы, связанные с физическими механизмами формирования и взаимного согласования пространственных структур биообъектов на различных уровнях организации — от макромолекулярного в клетке до макроструктур в организме. Создается впечатление, что в настоящее время мы уже достаточно много знаем, но мало что

понимаем в самых базовых физических принципах целостной организации живых систем. В этом отношении показателен пример наиболее элементарного с точки зрения биологии процесса — формирования уникальных пространственных структур белков (и вообще биополимеров) в результате спонтанного фолдинга (folding — сворачивание, укладка). После известных исследований (отмеченных Нобелевской премией в 1972 г.) [2] стало понятно, что существуют физические закономерности, которые при выполнении определенных внешних условий приводят развернутую структуру длинного линейного биополимера (полипептида) в устойчивую уникальную про-

пространственную конфигурацию (конформацию), причем получаемая в результате фолдинга 3D-структура определяется конкретной аминокислотной последовательностью. Считается, что белок сворачивается в пространственную структуру, которая является термодинамически равновесной [2], т.е. отвечает минимуму свободной энергии системы. В некотором смысле фолдинг биополимера напоминает кристаллизацию, когда атомы в растворе спонтанно формируют строго определенную кристаллическую решетку. Замечено, что часто пространственная укладка атомов в кристалле такова, чтобы плотность упаковки шаров (атомов) была максимально компактной. Это позволяет формулировать некие правила [3], которые неплохо работают для относительно простых соединений.

С биополимерами ситуация иная. Например, полипептидную цепь можно представить как цепь, состоящую из шариков практически одинакового размера ($\sim 3 \text{ \AA}$) с маленькими “пупырышками” — атомами водорода. Но представления о плотной укладке шаров здесь совершенно не работают, так как атомы соединены валентными связями, которые ограничивают стерические возможности для укладки в 3D-структуру. За прошедшие несколько десятилетий с момента осознания принципиальной важности для функционирования живых систем процесса фолдинга и возникающих в связи с этим физических проблем [4–17] был накоплен большой и разнообразный экспериментальный материал [5, 6] и сформулированы весьма общие концепции для объяснения наблюдаемых явлений [5–18], о сути которых будет сказано ниже.

При обсуждении физических причин и закономерностей фолдинга мы исходим из базовых представлений о динамике линейной полимерной и биополимерной цепей и основных физических и физико-химических параметрах, которые регулируют динамическое поведение такого рода многоатомных объектов. Отметим, что понимание закономерностей фолдинга важно не только с точки зрения организации и функционирования живых систем. Другие, весьма разнообразные молекулярные системы склонны к пространственной самоорганизации. В последние годы активно изучаются так называемые “умные” полимеры и системы на их основе [17, 19]. Например, еще лет 10 назад никто и подумать не мог, что полимеры типа сополимеров стирола и малеиновой кислоты за счет тонкого баланса кулоновских сил и гидрофобных эффектов [20] способны при динамическом взаимодействии с клеточной стенкой спонтанно вырезать из биомембраны и стабилизировать липодиски размером $\sim 150 \text{ \AA}$, в том числе и с включенными в них мембранными белками, что можно использовать в препаративных целях и структурных исследованиях [21].

ДИНАМИКА И ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ ПРОЦЕССЫ В БИОПОЛИМЕРАХ

Современный этап развития представлений в области физико-химической биологии, касающийся самых фундаментальных закономерностей формирования пространственной структуры и механизмов функционирования биомолекул и их комплексов, был в значительной степени подготовлен работами в области динамики белков, изучения их конформационной подвижности современными физическими методами и методами компьютерного молекулярного моделирования [22–24]. Активность исследований в этом направлении резко выросла во всем мире, начиная с середины 70-х и в 80-х годах прошлого века. Многие известные исследователи, работавшие в области атомной физики, в это время переклкнули свои интересы на область биологии и привнесли в нее разработанные в атомной и молекулярной физике методы точных физических измерений. Здесь можно упомянуть разнообразные методы мессбауэровской спектроскопии и рассеяния мессбауэровского излучения [25–30], спектрально-кинетические методы для изучения внутрибелковых процессов с использованием импульсных лазерных технологий на примере диффузии лигандов [31, 32], переносе электрона [33] и др.

В связи с этими достижениями в изучении динамики биополимеров нельзя не отметить роль академика В.И. Гольданского (см., например, [25–29, 33]), 100-летию со дня рождения которого и посвящается эта работа. Во многом именно благодаря усилиям В.И. Гольданского все эти годы наша наука была достойно представлена в международной кооперации ученых в данной области. Обращаясь к событиям почти 40-летней давности, можно сказать, что благодаря редкому дару научной дипломатии В.И. Гольданский смог организовать взаимодействие между учеными разных стран таким образом, что отечественная наука получила мощный импульс развития в самых современных по тем временам направлениях теоретической биологии и биофизики. Это было непростое время для нашей науки (впрочем, когда оно было простым?). Нарастало отставание в приборной базе, обеспечении реактивами и пр. Наше сотрудничество с такими яркими мировыми лидерами, как Нобелевский лауреат Р. Мессбауэр [26, 30] (ФРГ) и Г. Фрауэнфельдер [31, 32] (США), их учениками и коллегами, было чрезвычайно важно как для развития новых научных направлений, так и поднятия мирового престижа отечественной науки. Причем от российских ученых исходили не только первоклассные экспериментальные работы, но и принципиально новые идеи и теоретические разработки о динамическом устройстве биополимеров и связи динамики

макромолекул с функциональной активностью [34–44]. Не случайно летом 1991 г. в Черноголовке собрался первый (и, к сожалению, последний) советско-американский симпозиум по динамике белков, на котором присутствовали практически все мировые лидеры этого направления и представительная делегация Научного фонда США (подробнее см. статью Ю.Ф. Крупянского в этом выпуске журнала). Это мероприятие произвело на всех весьма благоприятное впечатление. Когда в феврале 2016 г. нам довелось по приглашению одного из активных участников этого сотрудничества У. Итона (W. Eaton) выступать на его известном семинаре по химической физике биосистем в National Institute of Health (США, Бетесда), то присутствующими высказывались пожелания, что хорошо было бы в России опять повторить такой симпозиум...

Даже после известных событий конца 1991 г. и последовавшего глубочайшего кризиса отечественной науки В.И. Гольданский продолжал оставаться центром притяжения российских и западных ученых, которые занимались передовыми исследованиями в области структурной динамики биополимеров. Благодаря созданной В.И. Гольданским атмосфере активного научного поиска и международного научного сотрудничества достижения российских ученых и сами эти направления не потерялись в кризисные годы и были продолжены. Новый этап развития работ в области структуры и динамики биополимеров и их комплексов основан на использовании современной экспериментальной базы [45], применении суперкомпьютерных технологий [46] и новых математических и физических идеях устройства биосистем на молекулярном уровне.

Ниже мы рассматриваем некоторые развиваемые нами в последние годы новые подходы к постановке задач и теоретическим представлениям о динамике биополимеров и механизмах самоорганизации их пространственной структуры [47–51]. Несмотря на повальное увлечение в последние годы молекулярным моделированием с использованием высокопроизводительных вычислений, мы полагаем, что современные аналитические (математические) методы себя далеко не исчерпали, а в ряде случаев остаются пока единственным инструментом для поиска ответов на наиболее трудные вопросы динамики биополимеров и молекулярной организации живых систем. В качестве примера перечислим 10 таких проблем, на которые непонятно как можно было бы конкретно ответить с традиционных позиций.

1. Биополимеры, которые являются основой для функционирования живых систем (ДНК, РНК, белки) представляют собой длинные линейные полимеры, каждый из которых построен из нескольких типов мономерных звеньев. Для

этих полимеров и их комплексов свойственно образование специфических (уникальных) пространственных структур. Функциональная активность этих макромолекул теснейшим образом связана с возможностью формирования такого рода 3D-структур. И первый вопрос на пути понимания физических принципов, лежащих в основе живого, состоит в следующем — имеются ли у линейных полимеров некие общие физические особенности, которые могут оказаться полезными для их использования в живых системах? И если есть, то при каких условиях они могут проявиться?

2. Как известно, биополимеры построены из хиральных мономерных звеньев. Мы намеренно здесь не касаемся вопроса о причинах и механизмах выбора в процессе молекулярной эволюции мономерных единиц с определенным знаком хиральности [52–54]. Но наш вопрос заключается в поиске физической причины, которая определила использование именно хиральных структур для биополимеров или почему для биополимеров нельзя было ограничиться зеркально симметричными структурами?

3. В настоящее время известны пространственные структуры почти 200 тыс. биополимеров и их комплексов. Следует заметить, что в их укладках преобладают различные спиральные структуры. Есть ли общая для всех этих структур физическая причина столь частого использования разнообразных спиральных мотивов?

4. При сворачивании полимерной цепи репрезентативная точка движется по ультрамногомерной поверхности потенциальной энергии. Почему биополимерная цепь при сворачивании не запутывается и почему наблюдаются случаи с резко различными временами сворачивания (от относительно редких значений порядка наносекунд до типичных миллисекунд)? Этот вопрос тесно связан с другим. Для многомерной поверхности потенциальной энергии биополимеров, которые за разумное время сворачиваются в уникальные пространственные структуры, около 30 лет назад был предложен принцип определенного устройства этих поверхностей в виде относительно гладкой воронки (принцип минимальной фрустрации энергетической воронки [8–11]). Есть ли физические причины, по которым для полимерных структур определенного типа этот принцип справедлив и чем выделены эти полимеры?

5. Многомерная поверхность потенциальной энергии для биополимера, который сворачивается в уникальную пространственную структуру, должна быть устроена по принципу энергетической воронки. Вместе с тем многочисленные эксперименты по кинетике фолдинга показывают, что поверхность свободной энергии для этого процесса имеет вулканообразный профиль [5, 6], который требует преодоления некоторого энерге-

тического барьера для биополимерной цепи перед переходом в состояние, из которого возможен фолдинг. Считается, что этот барьер имеет энтропийную природу. Является ли вулканообразный профиль поверхности свободной энергии следствием общих физических закономерностей, которые регулируют процесс фолдинга для линейных полимеров? Какими физическими характеристиками биополимера определяется высота этого энтропийного барьера?

6. При мягкой денатурации белков в растворе происходит разрушение пространственной структуры и переход полимерной цепи в состояние, близкое к клубковому. После нейтрализации денатурирующего агента наблюдается процесс рефолдинга и сворачивание полимерной цепи в исходную 3D-структуру. Однако замечено, что быстрое силовое разворачивание белковой цепи, например атомно-силовым микроскопом, переводит полимерную цепь в конформации, из которых рефолдинга не происходит [55, 56]. Другими словами не все развернутые состояния полимерной цепи эквивалентны с точки зрения фолдинга или сворачивания в уникальную пространственную структуру. Возникает вопрос, при каких условиях и для каких систем могут проявиться физические закономерности дифференциации развернутых (денатурированных) состояний биополимерной цепи, которые на первый взгляд кажутся полностью случайными? В чем причина неспособности белка к рефолдингу после быстрого силового разворачивания его 3D-структуры? С этим мы тесно связываем и другой вопрос — о механизме котрансляционного фолдинга [57], когда конформации полипептидной цепи, которые получаются в процессе ее биосинтеза на рибосоме, оказываются благоприятными для последующего сворачивания этой цепи в уникальную пространственную структуру. При каких условиях возникает физическая причина для связи между механизмом биосинтеза белка и его фолдингом?

7. Существующий вариант жизни на нашей планете тесно связан с наличием достаточного количества жидкой воды. Большую роль в стабилизации пространственных структур биополимеров играют водородные связи с энергией ~ 5 ккал/моль [3]. С другой стороны, первичные последовательности белков построены из альфа-аминокислот. В этом случае в основной цепи каждый аминокислотный остаток имеет две степени свободы — углы поворотов вокруг двух одинарных связей (углы ϕ и ψ). В принципе, использование, например, для построения структур “белков” бета-аминокислот, у которых имеются три подобных степени свободы, могло бы дать много больше возможностей для эволюции и естественной инженерии разнообразных 3D-структур. Природа остановилась только на альфа-аминокислотах. Есть ли физическая причина (и в чем она) выбора именно альфа-

аминокислот (а не, например, их бета-аналогов) при построении белковых структур?

8. В обсуждаемом выше контексте интересно оценить, насколько критичны температурные условия для формирования уникальных 3D-структур линейными полимерами? Есть ли физические и количественные связи между диапазоном температур на планете и химическим составом линейных полимеров, которые для проявления функциональной активности должны формировать уникальные 3D-структуры?

9. Характерной чертой известных нам живых систем является использование для обеспечения разнообразных функций линейных полимеров, которые в заданном диапазоне внешних условий формируют уникальные пространственные структуры. Если с этой точки зрения взглянуть на проблему возникновения жизни [58, 59], то возникает вопрос о наличии фундаментальных физических закономерностей, которые шаг за шагом в ходе физико-химической эволюции приводят к полимерным макромолекулам, способным спонтанно сворачиваться в уникальные 3D-структуры. В свою очередь, подобные макромолекулярные образования, являясь некими первичными “кирпичиками”, могли бы химически эволюционировать, вступать во взаимодействия, приводя к протоформам биоструктур и далее. Тем самым возникает вопрос о возможном существовании физических закономерностей, которые могут определять конструктивное для биологии направление добиологической молекулярной эволюции.

10. Многие значимые и полезные результаты в современной биологии получены методами компьютерного молекулярного моделирования, которые в значительной мере основаны на молекулярной динамике (МД), то есть решении системы классических уравнений движения для системы из большого числа атомов. Ключевым моментом здесь является точное знание сил, которые действуют на каждый атом в текущей конфигурации системы в заданный момент времени. Эти силы задаются как отрицательные градиенты многомерной функции (поверхности) потенциальной энергии системы, которая зависит от координат всех атомов. Даже для систем, состоящих из сотни и более атомов, задание в общем виде 300-мерной функции и работа с ней непосильна для самых совершенных компьютеров без кардинальных упрощений. Одно из наиболее существенных упрощений при моделировании биополимерных систем состоит в оценке вклада невалентных взаимодействий в потенциальную энергию через сумму парных атом-атомных потенциалов [60, 61]. При этом параметры этих потенциалов определяются калибровкой (иначе говоря, подгонкой), которая работает при вычислении некоторых стандартных характеристик для узкого класса систем [62].

С другой стороны, для системы, состоящей, например, из нескольких тысяч атомов (не очень большой белок), число слагаемых в сумме парных взаимодействий будет несколько миллионов. Даже если принять, что точность определения каждого из этих парных потенциалов составляет доли процента (в самом оптимистичном варианте), то понятно, что подобные суммы мало контролируемы, не говоря уже об их градиентах. С этой точки зрения результаты молекулярной динамики можно было бы признать сплошными артефактами. Однако в целом ряде случаев (далеко не во всех) мы видим хорошую предсказательную силу расчетов методом МД [20, 63]. Налицо определенный парадокс: не должно быть, но получается. Вопрос состоит в понимании физических причин успеха правильно проведенных расчетов методом молекулярной динамики и понимании проблемы в целом — что нужно принимать во внимание, дабы избежать явных артефактов при молекулярном моделировании сложных биополимерных систем?

Мы привели пример, состоящий из 10 достаточно разнородных вопросов (их на самом деле много больше), но, как это ни странно, они могут быть рассмотрены с единых позиций на основе вполне понятной и хорошо известной физики с использованием математических идей. Последние базируются на понятиях симметрии [64, 65], топологии конфигурационного пространства линейных полимеров [66], асимптотических свойствах многомерных поверхностей [67] и теории Морса [68] для описания топографии многомерных поверхностей (в данном случае поверхностей потенциальной энергии биополимера). Ниже мы кратко обобщим полученные нами в этом направлении результаты [47–51] и наметим возможные пути дальнейшего развития этой области науки.

ЭФФЕКТЫ ВЯЗКОСТИ И КИНЕМАТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

Кинематические связи в вязкой среде

Эффекты вязкости в динамике и кинетике внутрибелковых процессов изучались и обсуждались в основном с точки зрения наблюдаемых зависимостей констант скоростей от вязкости [7, 31, 32, 69]. Согласно известной теории Крамерса [70], скорость преодоления активационного барьера в вязкой среде должна быть обратно пропорциональна вязкости среды. Но для внутрибелковых процессов обычно получалась обратно пропорциональная зависимость от вязкости в степени, близкой к $1/2$. Этому эффекту было несколько объяснений [36, 43, 71], на которых мы не будем останавливаться. По данным работы [69] характерное время фолдинга примерно пропорционально вязкости. С другой стороны, из более

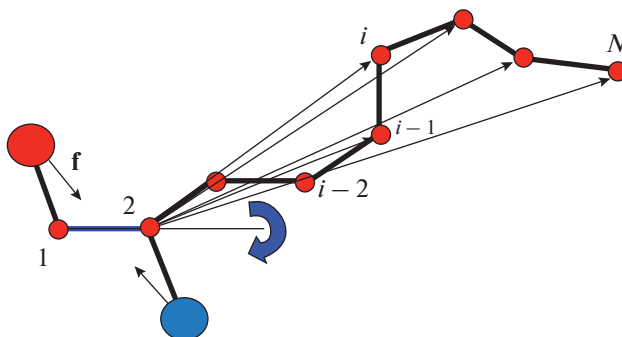


Рис. 1. Пространственная конфигурация полимерной цепи. Узлы 1 и 2 закреплены. Повороты вокруг связи 1–2 происходят под действием сил взаимодействия $\mathbf{f}$ между боковыми группами. Линейные скорости движения удаленных узлов цепи и силы трения растут пропорционально соответствующим расстояниям узлов цепи от оси поворота. Уменьшение скорости диссипации энергии и согласование этой скорости со скоростью убывания потенциальной энергии цепи возможно при уменьшении линейной скорости удаленных от оси вращения узлов за счет подстройки или корреляции поворотов по другим связям.

ранних теорий как-то совершенно выпал общий анализ влияния вязкости на конформационную динамику полимеров и биополимеров, хотя некоторые неожиданные и интересные обсуждения были [11]. Практически все биологически значимые процессы происходят в конденсированных (жидких) средах. И влияние эффектов вязкости оказывается довольно разнообразным [47, 51].

Рассмотрим длинную шарнирно-сочлененную цепь, помещенную в вязкую жидкость. Зададимся вопросом, как будут двигаться звенья такой цепи при поворотах вокруг связей, соединяющих узлы цепи? Задача кажется очень сложной (и это в самом деле так), если мы интересуемся детальным описанием движений звеньев. Подойдем к этой проблеме с другой стороны. Есть ли ограничения на движения узлов цепи (рис. 1)?

Будем поворачивать одно из звеньев цепи, которое расположено на рис. 1 горизонтально. Если вязкость среды нулевая, то вслед за этим звеном будет поворачиваться весь длинный участок до конца цепи. Если вязкость большая, то свободное движение цепи невозможно. Как известно, в системе уравнений движения для узлов цепи можно пренебречь инерциальными членами [72]

$$\gamma_i \dot{\mathbf{r}}_i = -\frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_i}, \quad (1)$$

где γ_i — коэффициент трения i -го атома; U — потенциальная энергия, зависящая от расстояний между частицами и их взаимодействия с окружающей средой; $\mathbf{r}_i$ — радиус-векторы положений частиц в пространстве. Точка сверху переменной означает, как обычно, дифференцирование по

времени. Методом молекулярной динамики показано, что для движений атомных частиц в жидкости, например воде, среда с точки зрения динамики оказывается сильно вязкой, начиная с амплитуд движения атомов порядка и более 0.45 Å [24, 73].

Скорость поворота звеньев цепи возрастает пропорционально удалению от оси вращения и в вязкой среде будет расти сила сопротивления (вязкого трения) этих звеньев цепи, которая пропорциональна линейной скорости частиц. В результате кинематической связи между узлами цепи вынужденно начнутся взаимные согласования поворотов звеньев, чтобы минимизировать потери энергии на трение.

Закрепим на рис. 1 положения узлов 1 и 2 в начале цепи и будем полагать, что за счет взаимодействия боковых групп происходит поворот вокруг связи. В однородной вязкой среде система является изотропной относительно поворотов вокруг оси 1–2. Так как система симметрична относительно поворотов по оси вдоль связи 1–2, то проекция на эту ось суммы моментов сил взаимодействия между узлами при спонтанном сворачивании цепи равна нулю [72]:

$$\dot{\Phi} \sum_i \left[\frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_i} \mathbf{r}_i \right] = 0.$$

Тем самым, согласно уравнениям (1), сохраняется и равна нулю проекция суммы моментов сил трения на эту ось:

$$\dot{\Phi} \sum_{i=3}^N \gamma_i [\mathbf{r}_i \dot{\mathbf{r}}_i] = 0. \quad (2)$$

Здесь мы ввели векторы угловых скоростей поворотов вокруг связей:

$$\dot{\Phi}_i = \frac{\mathbf{b}_i}{b_i} \frac{d\phi_i}{dt}, \quad \mathbf{b}_i = \mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i. \quad (3)$$

Так как длины связей и валентные углы полагаем фиксированными, то конформационное движение, вызванное вращением вокруг первой связи распространяется вдоль цепи, причем линейная скорость движения узла i определяется как сумма вклада от скорости движения узла $i - 1$ и вклада от поворота вокруг связи между узлами $i - 2$ и $i - 1$ в соответствии с формулой

$$\dot{\mathbf{r}}_i = \dot{\mathbf{r}}_{i-1} + [\dot{\Phi}_{i-2} (\mathbf{r}_i - \mathbf{r}_{i-1})] = \dot{\mathbf{r}}_{i-1} + [\dot{\Phi}_{i-2} \mathbf{b}_{i-1}]. \quad (4)$$

Подставляя выражение (4) в уравнение (2) получаем, что при произвольном распределении коэффициентов трения по узлам цепи должно выполняться соотношение

$$[\dot{\Phi}_i \mathbf{r}_i] (\dot{\mathbf{r}}_{i-1} + [\dot{\Phi}_{i-2} \mathbf{b}_{i-1}]) = 0. \quad (5)$$

Следовательно, вклад в скорость движения узла i от поворота вокруг связи между узлами $i - 2$ и $i - 1$ дол-

жен определенным образом компенсировать линейную скорость движения предыдущего узла $i - 1$. Наиболее наглядно эту ситуацию можно представить, если все узлы цепи находятся в одной плоскости. Линейная скорость смещения узла 3 определяется только скоростью поворота вокруг связи 1–2. Направление скорости поворота по связи 2–3 в силу соотношения (5) должно быть противоположным по отношению к предыдущему направлению скорости поворота. И так далее. В результате получаем тенденцию к формированию спиральной структуры, которая является результатом равенства нулю проекции суммарного момента сил трения в данном случае на ось вращения вокруг первой связи.

Динамические эффекты вязкости на многомерных энергетических ландшафтах.

Равнораспределение средних скоростей диссипации энергии по степеням свободы

Если полимерная цепь достаточно длинная, то возникает еще один интересный эффект, который относится к статистическим свойствам динамического поведения цепи и определяет правила движения репрезентативной точки по многомерной поверхности потенциальной энергии макромолекулы [47]. Для определения этих правил движения полезно использовать методы многомерной геометрии и асимптотические свойства многомерных сфер [67].

Умножим каждое из уравнений (1) скалярно на соответствующий вектор скорости и просуммируем по всем узлам. В результате получим

$$\sum_i \gamma_i \dot{\mathbf{r}}^2 = - \sum_i \frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_i} \dot{\mathbf{r}}_i. \quad (6)$$

Слева в уравнении (6) имеем величину скорости диссипации энергии макромолекулярной цепи:

$$S = \sum_i \gamma_i (\dot{\mathbf{r}}_i)^2, \quad (7)$$

а справа – скорость уменьшения потенциальной энергии этой цепи:

$$\frac{dU}{dt} = \sum_i \frac{\partial U}{\partial \mathbf{r}_i} \dot{\mathbf{r}}_i. \quad (8)$$

Соотношение (6) – это просто закон сохранения энергии, который перепишем в виде

$$\frac{dU}{dt} + S = 0. \quad (9)$$

Из очевидных формул (6)–(9) можно извлечь полезную информацию о динамике длинной цепи. Дело в том, что уравнения (7) и (9) можно свести к уравнениям для гиперсфер очень большой размерности. Такие гиперсферы обладают рядом интересных асимптотических свойств [67], которые позволяют устанавливать статистические за-

кономерности для переменных в этих уравнениях. На этих свойствах гиперсфер большой размерности основаны многие широко известные закономерности в статистической физике и теории вероятностей [67].

Путем замены переменных представим выражение (7) в виде уравнения единичной гиперсферы

$$\sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} Y_{i\alpha}^2 = 1, \quad (10)$$

где мы ввели переменные, пропорциональные компонентам скоростей узлов цепи:

$$Y_{i\alpha} = \dot{r}_{i\alpha} / (\gamma_i S)^{1/2}. \quad (11)$$

Уравнение (9) в этих переменных также является уравнением гиперсферы с радиусом $1/2$ и центром, который находится на расстоянии $1/2$ от начала координат:

$$\sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} (Y_{i\alpha} - L_{i\alpha})^2 = 1/4. \quad (12)$$

Мгновенное положение центра гиперсферы (12) находится на поверхности гиперсферы радиуса $1/2$, вложенной в гиперсферу, определяемую выражением (10), и определяется набором компонент сил, действующих на узлы цепи в данный момент времени:

$$L_{i\alpha} = -\frac{\partial U}{\partial r_{i\alpha}} \frac{1}{2(\gamma_i S)^{1/2}}. \quad (13)$$

Заметим, что

$$\sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} L_{i\alpha}^2 = 1/4. \quad (14)$$

Переходя на язык многомерной геометрии в пространстве скоростей, масштабированных описанным выше способом, можно представить очень сложное динамическое поведение длинной полимерной цепи в вязкой среде в виде вращения гиперсферы сохранения энергии внутри гиперсферы диссипации энергии (рис. 2).

Решение уравнений механики (1) и значения скоростей движения узлов цепи в каждый момент времени определяются координатами точки касания этих гиперсфер. Конечно, конкретная траектория движения точки касания по гиперсфере диссипации энергии нам не известна. Для этого мы должны решить уравнения движения. Однако, если число степеней свободы велико, то мы можем сделать важные статистические выводы о характере движения рассматриваемой цепи. Ключевым моментом здесь является известная теорема, изложенная в работе [67], смысл которой состоит в следующем. Если имеется физически разумная функция большого числа переменных $f(x_1, x_2, \dots, x_n)$ и мы рассматриваем значения

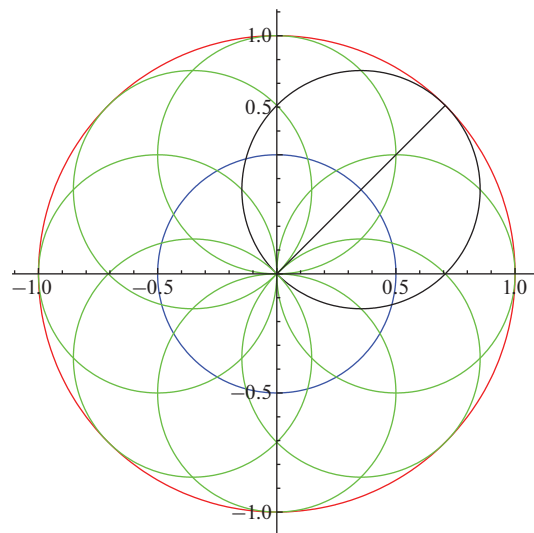


Рис. 2. Схематическое изображение единичной гиперсферы диссипации энергии (уравнение (10)) и гиперсферы (уравнение (12)) радиуса $1/2$, которые касаются поверхности гиперсферы диссипации энергии и отражают закон сохранения энергии. Центр гиперсфер имеет координаты $\{L_{i\alpha}\}$ и при движении звеньев цепи движется по поверхности гиперсферы радиуса $1/2$ с тем же центром в нуле, что и гиперсфера диссипации энергии.

этой функции на поверхности гиперсферы конечного радиуса a :

$$x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2 = a^2,$$

то в пределе большой размерности $n \gg 1$ значения функции на поверхности гиперсферы будут практически постоянными. Такому факту есть не строгое, но простое объяснение. Если мы рассматриваем объем, ограниченный гиперсферой конечного радиуса, то при неограниченном возрастании размерности этот объем стремится к нулю. Это связано с тем, что в знаменателе формулы объема многомерного шара стоит гамма-функция и объем шара стремительно убывает при увеличении числа измерений.

Суть возникающего при больших размерностях эффекта состоит в следующем. При движении (поворотах вокруг связей) центр гиперсферы сохранения энергии, заданный уравнением (12), движется по поверхности гиперсферы половинного радиуса. Координаты этой точки определяются компонентами сил, которые действуют на узлы цепи, нормированы в соответствии с выражением (13) и достаточно сложным образом меняются в диапазоне от $-1/2$ до $1/2$ как при изменении конфигурации цепи при движении, так и за счет столкновений с молекулами среды (если мы исходим из уравнений Ланжевена [47]). Некоторые отличия в распределении скоростей репрезентативной точки можно ожидать для неболь-

шого числа переменных, связанных с атомами на краях цепи, но в пределе больших значений N это принципиально не сказывается на общей физической картине конформационных движений линейного полимера. В результате при большом числе конформационных степеней свободы распределение плотности репрезентативных точек на гиперсфере диссипации энергии становится практически равномерным, что дает возможность вычислить распределение для скоростей диссипации энергии для каждого из узлов цепи.

Фиксируя одну из переменных в уравнении гиперсферы (10) и вычисляя отношение площадей соответствующих гиперсфер, получаем при $N \gg 1$ формулу для плотности вероятности скорости диссипации энергии по заданной степени свободы:

$$\begin{aligned} \rho(Y_{i\alpha}) &\sim (1 - Y_{i\alpha}^2)^{3N/2} = \\ &= \left(1 - \frac{\gamma_i \dot{r}_{i\alpha}^2}{3N\sigma}\right)^{3N/2} \sim \exp\left(-\frac{\gamma_i \dot{r}_{i\alpha}^2}{2\sigma}\right), \end{aligned} \quad (15)$$

где

$$\sigma = S/3N \quad (16)$$

— средняя скорость диссипации энергии, приходящаяся на одну степень свободы.

Примечательно, что это распределение для скоростей диссипации энергии не зависит от номера узла! Иными словами, конформационные движения в вязкой среде устроены так, что диссипация энергии в среднем равномерно распределена по всем внутренним узлам и степеням свободы (естественно, значительные отклонения можно ожидать для концевых участков). То есть, *конформационные движения должны происходить таким образом, чтобы не было резких различий в скоростях диссипации энергии между различными узлами цепи, что достигается определенной согласованностью поворотов вокруг связей* (рис. 3).

Смысл средней скорости диссипации энергии (16) нуждается в некотором пояснении. Скорость диссипации энергии зависит, естественно, от конфигурации цепи или времени. Корректность вывода формулы (15) требует достаточно полного представительства репрезентативных точек в пространстве скоростей на гиперсфере диссипации энергии. Это возможно по истечении некоторого времени релаксации, когда система “забывает” о начальных значениях скоростей узлов и действующих сил. Тепловые флуктуации среды способствуют более быстрой релаксации скоростей. Результирующие силы, действующие на каждый узел, привязаны к мгновенной конфигурации цепи и весьма сложным образом изменяются при даже небольшом шевелении конфигурации длинной цепи. Нужно некоторое время, чтобы при шевелении конфигурации цепи (в результате механического движения и флуктуаций)

произошла релаксация этого параметра. Можно грубо оценить диапазон этих времен релаксации. Как известно, время релаксации скорости в жидкости очень мало и составляет порядка 10^{-13} с. Время релаксации сил, действующих на узел цепи, можно оценить из расчетов методом МД. По нашим оценкам в полноатомном приближении это время лежит в диапазоне 10–100 пс [74–78]. Таким образом, в формуле (15) параметр средней парциальной скорости диссипации энергии имеет смысл усредненной величины на масштабе времени релаксации сил, действующих на узлы цепи. При значительном изменении конфигурации цепи этот параметр меняется и изменяются средние парциальные скорости диссипации энергии. Но важно, что принцип равномерного распределения средних скоростей диссипации по узлам цепи остается неизменным.

Обсуждаемый эффект равномерного распределения скоростей диссипации энергии по узлам цепи имеет принципиальное значение, так как эти величины напрямую связаны со скоростями изменения потенциальной энергии и их распределением по степеням свободы, которое оказывается также равномерным. Это означает, что при сворачивании полимерная цепь будет избегать таких изменений конфигурации, когда потенциальная энергия будет резко уменьшаться (изменяться) только по относительно небольшому числу степеней свободы. Эта особенность движения на многомерном энергетическом ландшафте чем-то напоминает поведение “начинающего горнолыжника” [45]. Как работает этот принцип наглядно показано в работах [74, 75], где методом молекулярной динамики изучалось влияние вязкости на результат сворачивания полипептидных цепей длиной до 150 остатков. В вязкой среде при сворачивании цепи имеется четкая корреляция поворотов по торсионным углам ϕ и ψ . Повороты по этим углам происходят, в основном, в противоположных направлениях, формируя спиральную пространственную структуру цепи (в соответствии с формулой (5)). Уменьшение вязкости среды ниже некоторого порога приводит к полной дезорганизации сворачивания цепи и вместо спиральной структуры получается хаотическая глобула [74].

В результате выравнивая скоростей диссипации энергии при поворотах по торсионным углам репрезентативная точка “выбирает” на многомерной поверхности потенциальной энергии относительно гладкие маршруты. В этом смысле существенно уменьшается необходимость в гипотезе минимальной фрустрации энергетической воронки [10] для ППЭ биополимеров, которые формируют уникальные пространственные структуры. Достижение глобального минимума и избегание репрезентативной точкой энергетических ловушек за счет низкой вероятности движения по траектории

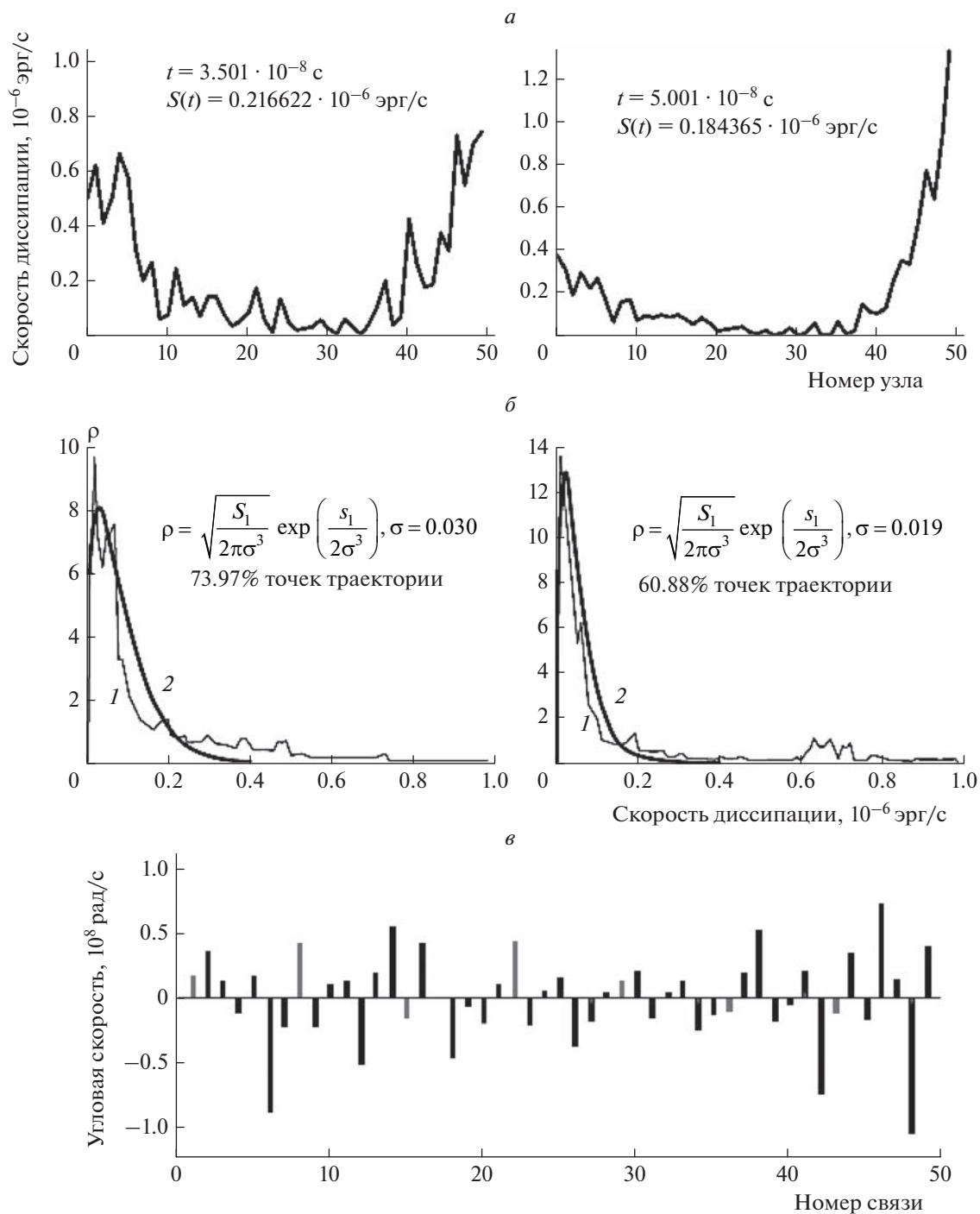


Рис. 3. Результаты численного моделирования динамики сворачивания цепи из 50 одинаковых узлов [74, 75]: *а* — скорости диссипации энергии по различным узлам цепи для двух моментов времени; *б* — функции распределения (усредненные по времени) для скоростей диссипации энергии 16-го (слева) и 26-го (справа) узлов (кривые 1) и соответствующие им гауссовские аппроксимации (кривые 2); *в* — гистограмма распределения угловых скоростей поворотов вокруг связей в момент времени 40 нс (общая длина траектории сворачивания цепи — 340 нс, а наблюдаемое чередование направлений скоростей поворотов по двугранным углам находится в соответствии с формулой (5)); *г* — зависимость потенциальной энергии при сворачивании цепи от времени (для наглядности график профиля энергетической воронки совмещен с зеркальным отображением).

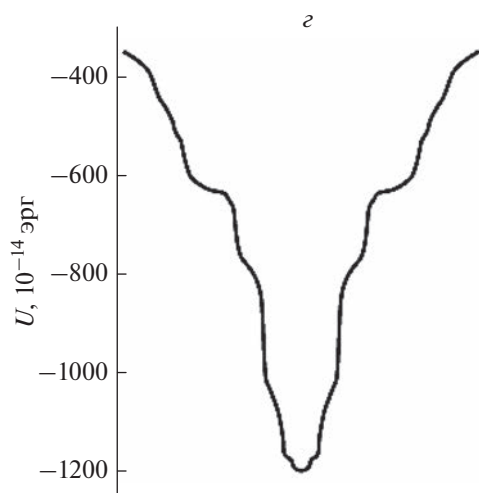


Рис. 3. Окончание.

ям с резким изменением потенциальной энергии по относительно небольшому числу степеней свободы не требует каких-то исключительных требований к гладкому устройству ППЭ для, например, белков, хотя определенные требования к топографии ППЭ белков продолжают сохраняться.

Обсудим некоторые дополнительные особенности динамики системы, описываемой уравнениями механики с сильным трением (1), которые могут быть получены рассмотрением свойств решений этой системы и условных экстремумов для скорости убывания потенциальной энергии и скорости диссипации энергии [47]. Эти свойства интуитивно понятны, но, будучи применены к конкретной ситуации, дают существенное дополнение к физической картине формирования пространственных структур в вязкой среде, в том числе и при сворачивании линейной полимерной цепи.

Мы можем задаться следующими двумя вопросами. Пусть репрезентативная точка двигается в соответствии с системой уравнений (1).

Вопрос первый — есть ли ограничения на скорость уменьшения потенциальной энергии в каждый момент времени (т.е. для каждой мгновенной конфигурации цепи)? Ответ состоит в том, что для каждой заданной конфигурации цепи *скорость убыли потенциальной энергии на механической траектории будет максимально возможной по сравнению со всеми другими виртуальными перемещениями*. Это означает, что репрезентативная точка будет спускаться по самому крутому склону многомерной(!) ППЭ в том смысле, что суммарное(!) уменьшение потенциальной энергии по всем(!) N степеням свободы будет максимальным.

Вопрос второй — есть ли ограничения на скорость диссипации энергии в каждый момент вре-

мени (т.е. для каждой мгновенной конфигурации цепи)? Ответ состоит в том, что для каждой заданной конфигурации цепи *скорость диссипации энергии на механической траектории будет минимальной по сравнению с другими виртуальными перемещениями*! Так как эти величины — скорость убыли потенциальной энергии и скорость диссипации энергии равны друг другу, то эти два утверждения можно воспринять как парадокс! На самом деле никакого парадокса нет. Дело в том, что скорость диссипации энергии и скорость убыли потенциальной энергии системы должны рассматриваться в различных подпространствах скоростей узлов цепи [47].

Таким образом, общий анализ эффектов вязкости показывает, что вязкость среды является важнейшим фактором, который непосредственным образом влияет на динамику полимерной и биополимерной цепи и способствует формированию коллективных степеней свободы и спиральных структур. Есть еще один очень важный вывод. В условиях вязкой среды движение репрезентативной точки по многомерной поверхности потенциальной энергии сильно ограничено условием равномерного распределения по степеням свободы средней скорости изменения потенциальной энергии. Поэтому реально репрезентативная точка “заметает” лишь ничтожную часть от энергетически доступного конфигурационного пространства. Иными словами, в условиях вязкой среды или имитирующих ее алгоритмов нам не нужно знать в деталях всю поверхность потенциальной энергии (что практически невозможно по техническим причинам), *а нужно быть уверенными в рельефе ППЭ только вдоль относительно гладких траекторий* (этого в неявном виде и добиваются при калибровке параметров силовых полей). Неаккуратное обращение с протоколами молекулярного моделирования и некорректный учет вязкости будут практически обесценивать результат для длинных цепей.

ТОПОЛОГИЯ КОНФИГУРАЦИОННОГО ПРОСТРАНСТВА. СИММЕТРИЯ ПОЛИМЕРНОЙ ЦЕПИ ОТНОСИТЕЛЬНО ПЕРЕСТАНОВКИ ОДИНАКОВЫХ ЗВЕНЬЕВ

В известной статье, посвященной 50-летию проблемы фолдинга [5], обсуждались и не решенные вопросы, среди которых отмечалось отсутствие экспериментальных данных об устройстве энергетического ландшафта, необходимого для фолдинга, и отсутствие микроскопической картины понимания физики и правил фолдинга для произвольных последовательностей. Выше мы обсудили влияние вязкости среды на корреляцию конформационных движений линейных полимеров и биополимеров и связанную с этим тенденцию к формированию различных спиральных

пространственных структур. Это ни в коей мере не снимает вопроса о топографии энергетических ландшафтов и их особенностях, которые лежат в основе связи между пространственной укладкой и химической структурой отдельных биополимеров. Заметим, что обычно используемое представление поверхности потенциальной энергии макромолекулярной системы в части вклада невалентных взаимодействий в виде суммы парных или несколько модифицированных парных атомных потенциалов не дает целостной картины возможных эффектов влияния последовательности на топографию энергетических ландшафтов, а приводит к рассмотрению конкретных и не очень сложных (по техническим причинам) примеров.

Как мы видели из анализа эффектов вязкости, для понимания процесса фолдинга *важно знать не все детали энергетического ландшафта, а те, которые относятся к топографии относительно гладких (в которых изменение потенциальной энергии распределено равномерно практически по всем степеням свободы) и потому доступных в вязкой среде участков поверхности потенциальной энергии*. Ниже мы рассмотрим, что можно сделать для разработки представлений о топографии энергетических ландшафтов, исходя из топологии конфигурационного пространства и соображений симметрии. Заметим, что имеются некоторые данные о том, что топография энергетических ландшафтов белков, у которых наблюдается пространственная симметрия, устроена более гладким и регулярным образом [9]. Ниже мы увидим, что совершенно другой тип симметрии — симметрия относительно перестановки одинаковых звеньев линейной полимерной цепи — оказывается важнейшим фактором для топографии многомерной энергетической поверхности макромолекулы.

Хорошо известно [17, 18, 79, 80], что пространственная структура и динамика линейных полимеров определяется поворотами по двугранным (торсионным) углам вокруг одинарных химических связей с барьерами внутреннего вращения порядка нескольких ккал/моль. Валентные колебания не вносят заметного вклада в изменение пространственной конфигурации макромолекулы. Деформация валентных углов может иметь некоторое значение для уменьшения высоты барьера в случае стерических ограничений при повороте вокруг связи [80]. Для дальнейшего рассмотрения этот эффект также не имеет принципиального значения.

Топография симметрических энергетических ландшафтов

Потенциальная энергия линейной полимерной цепи (точнее, ее часть, которая зависит от

конформации) может быть представлена функцией N торсионных углов ϕ_i . Для линейного полимера это функция большого числа переменных, каждое из которых циклически меняется от $-\pi$ до $+\pi$. Область определения каждого угла — точки окружности. Область определения множества N углов — это топологическое произведение окружностей или многомерный тор (гипертор) [66], т.е. функция потенциальной энергии задана в конфигурационном пространстве с топологией многомерного тора. Это обстоятельство мы используем далее, а в данный момент рассмотрим общие эффекты симметрии, связанные с перестановкой одинаковых мономерных звеньев цепи.

До недавнего времени представления об относительно гладкой энергетической воронке (принцип минимальной фрустрации энергетической воронки) и энергетической “щели” между нативной и ближайшими конформациями макромолекулы [10, 12] были практически единственными обсуждаемыми вариантами устройства ППЭ, которые могли бы быть согласованы с наблюдаемым феноменом фолдинга биополимеров (белков). При этом никаких физических аргументов в пользу столь удачного с точки зрения фолдинга устройства многомерной ППЭ для некоторых типов макромолекул не приводилось. Вместе с тем, исходя из топологии пространства конфигураций линейного полимера и симметрии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев, оказывается возможным проследить закономерности формирования ППЭ с топографией, которая является “удачной” с точки зрения процесса фолдинга полимерной цепи в уникальные 3D-структуры [48–51].

Наиболее ярко симметрия относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев или участков полимерной цепи выражена у циклических гомополимеров. Гомополимеры большой длины также обладают этой симметрией за исключением концевых участков. Рассматривая ППЭ для полипептидов, можно ожидать, что симметрия будет частично нарушенной из-за изменений в боковых группах различных аминокислотных остатков, хотя сам полипептидный остов остается неизменным и в некотором приближении эффекты симметрии будут продолжать проявляться.

Для компактности изложения и выявления общих закономерностей рассмотрим простейший случай, когда конформация каждого мономерного звена характеризуется одним двугранным углом и ППЭ симметрична относительно перестановки любых угловых переменных:

$$\begin{aligned} U(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_i, \dots, \phi_j, \dots, \phi_N) &= \\ = U(\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_j, \dots, \phi_i, \dots, \phi_N). \end{aligned} \quad (17)$$

Изучение топографии многомерных поверхностей основано на теории Морса [66, 68]. Необходимо найти критические точки поверхности (где все частные производные равны нулю). Далее, в каждой критической точке вычислить и привести к диагональному виду гессиан (матрицу вторых производных) и определить индекс критической точки (иначе говоря, число отрицательных элементов на диагонали приведенного гессиана). Критические точки с индексом 0 — локальные минимумы. Критические точки с максимальным значением индекса N — локальные максимумы. Остальные — седловые точки соответствующего индекса. Седловая точка с индексом 1 — обычное седло. Пути через седловые точки с более высокими индексами можно представить как “трубки” с размерностью, равной индексу критической точки, на торе соответствующей размерности. Репрезентативная точка при движении по ППЭ перемещается между минимумами через систему энергетически доступных “трубок” различной размерности, обтекая области максимумов. Как следует из анализа эффектов вязкости, движение репрезентативной точки будет происходить преимущественно по энергетически доступным “трубкам” с максимально возможной размерностью.

Условие симметрии (17) накладывает существенные ограничения на возможные топографии многомерных ППЭ. Функции с условием (17) являются симметрическими функциями [65]. Так, если при некотором значении угла $\phi_i = \phi_{ik}$, первая производная U обращается в нуль, то и производные U по остальным углам при таких же численных значениях переменных также равны нулю и эта точка k является критической. Аналогично, значения соответствующих вторых производных в этой точке оказываются одинаковыми:

$$\left. \frac{\partial^2 U}{\partial \phi_i^2} \right|_k = 2x_k, \quad \left. \frac{\partial^2 U}{\partial \phi_i \partial \phi_j} \right|_k = 2y_k. \quad (18)$$

Тогда в окрестности критической точки k можно представить разложение ППЭ в виде

$$U = U_k + (x_k - y_k) \sum_i (\phi_i - \phi_{ik})^2 + y_k \left[\sum_i (\phi_i - \phi_{ik}) \right]^2. \quad (19)$$

Таким образом, симметрия относительно перестановки звеньев цепи приводит к тому, что в окрестности критической точки топография ППЭ определяется двумя обобщенными переменными:

$$R_k^2 = \sum_i (\phi_i - \phi_{ik})^2; \quad Z_k = \sum_i (\phi_i - \phi_{ik}), \quad (20) \\ R_k \geq |Z_k|.$$

Первая переменная — радиус сферы (гиперсферы), описанной вокруг критической точки; вторая — расстояние (с точностью до знака) от критической точки до гиперплоскости, перпендикулярной к вектору с единичными компонентами в пространстве углов. Неравенство в выражении (20) означает, что только при его выполнении существуют такие значения углов, которые удовлетворяют конкретным значениям этих двух обобщенных переменных. Именно возможность выделения двух обобщенных переменных в выражении (20) в разложении ППЭ в окрестности критических точек и является причиной относительной гладкости таких ППЭ и может рассматриваться как некое обоснование принципа минимальной фрустрации для энергетической воронки в случае линейных полимеров, которые симметричны (или почти симметричны) относительно перестановки мономерных звеньев. Это дает также возможность для наглядного представления особенностей топографии ППЭ в зависимости от знака коэффициентов перед обобщенными переменными в уравнении (19). Отметим также, что в случае рассматриваемой симметрии все критические точки соответствуют различным спиральным конформациям полимерной цепи ($\phi_{ik} = \theta_k$).

Разложение уравнения (19) можно выразить и через ортогональные координаты. В окрестности критической точки k справедлива, например, следующая диагонализация квадратичной формы:

$$U = U_k + (x_k - y_k + Ny_k) \xi_1^2 + (x_k - y_k) \sum_{n=2}^N \xi_n^2, \quad (21)$$

где введен ортонормированный базис

$$\xi_1 = \frac{1}{\sqrt{N}} \sum_i (\phi_i - \phi_{ik}), \quad (22)$$

$$\xi_n = \frac{1}{[n(n-1)]^{1/2}} \sum_{j=1}^{n-1} (\phi_j - \phi_n); \quad n = 2, 3, \dots, N.$$

Разложение выражений (19) и (21) показывает, что в случае симметричной функции потенциальной энергии (17) имеется всего четыре типа критических точек: локальный минимум, локальный максимум и два типа седловых критических точек с индексами 1 и $N-1$. На рис. 4 представлены два типа критических (седловых) точек с индексами 1 и 2 для размерности $N = 3$.

Репрезентативная точка движется в область минимума по траектории, которая проходит через седловые точки. Как следует из анализа эффектов вязкости, переход репрезентативной точки через седловую точку осуществляется по коллективным степеням свободы, в которых задействованы повороты по множеству торсионных углов таким образом, чтобы скорости уменьшения потенциальной энергии были почти равномерно распределены по степеням свободы, а

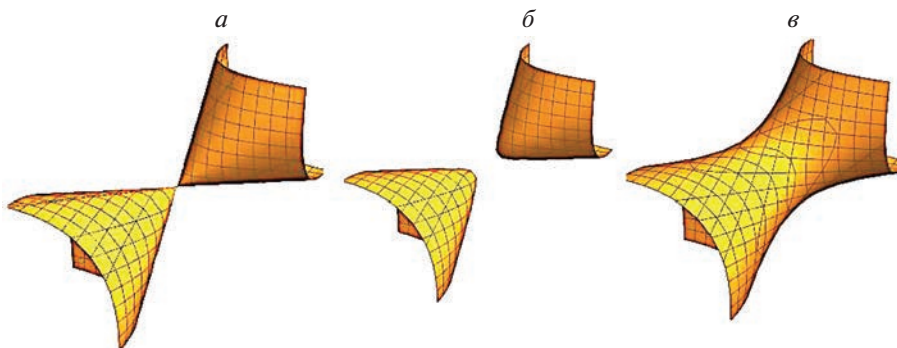


Рис. 4. Седловые точки трехмерной ($N = 3$) поверхности (в четырехмерном пространстве) индексов 1 и 2: а – поверхность уровня $U - U_k = 0$, который соответствует значению U в критической точке; б – простая седловая точка (индекса 1), $x_k = 0.5$, $y_k = -0.5$, показана поверхность уровня $U - U_k = -0.1$; в – седловая точка индекса 2, $x_k = -0.5$, $y_k = 0.5$, показана поверхность уровня $U - U_k = -1.5$.

скорость убыли потенциальной энергии макромолекулы при сворачивании полимера была максимальной. Из формулы (21) и рис. 4 видно, что в случае простой седловой точки уменьшение потенциальной энергии происходит при движении вдоль координаты Z_k (см. (20)). Движение по этой координате является коллективным движением с участием всех степеней свободы. Но скорость уменьшения потенциальной энергии по траектории движения через седловую точку индекса 1 будет пропорциональна сумме знакопеременных вкладов угловых скоростей. Эта сумма ожидаемо существенно меньше, чем аналогичная величина при движении через седловую точку с индексом $N - 1$. В последнем варианте задействована коллективная степень свободы R_k . Скорость уменьшения потенциальной энергии по этой степени свободы включает N слагаемых одного знака и соответствует равномерному распределению изменения потенциальной энергии по степеням свободы. Поэтому при прочих равных условиях переход через критическую точку с большим индексом является много более вероятным.

Используя формулу разложение ППЭ в окрестности критической точки (19) достаточно просто вычисляется поверхность свободной энергии макромолекулы, которая зависит от обобщенных координат R_k и Z_k . Заданным разрешенным значениям обобщенных координат из выражения (20) соответствует объем конфигурационного пространства макромолекулы, который равен объему гиперсферы размерностью $N - 1$ и радиусом

$$r_k = (R_k^2 - Z_k^2)^{1/2}. \quad (23)$$

Следуя общим правилам [81], получим выражение для энтропии состояния в окрестности критической точки k с заданными значениями обобщенных переменных R_k и Z_k в виде

$$S_k(R_k, Z_k) = k_B(N - 1) \ln r_k. \quad (24)$$

В формуле для энтропии имеется расходимость в точке $r_k = 0$ или в точке касания гиперсферы и гиперплоскости. Эта расходимость может быть устранена при учете квантовых поправок. Принимая во внимание нулевые колебания по конформационным степеням свободы, выражение для энтропии приобретает вид

$$S_k(R_k, Z_k) = S_0 + k_B N \ln \left(1 + \frac{r_k}{r_0} \right), \quad (25)$$

$$S_0 = k_B N \ln r_0, \quad r_0^2 \approx \frac{1}{2} N \langle \phi^2 \rangle_0.$$

Здесь мы полагали $N \gg 1$, а величина $\langle \phi^2 \rangle_0$ – квадрат амплитуды нулевых колебаний по торсионному углу [79], который оценивается, исходя из параметров торсионного потенциала, как

$$\langle \phi^2 \rangle_0 \approx \frac{\hbar}{3l(Mu)^{1/2}} \sim 0.01, \quad (26)$$

где M – масса боковой группы, которая поворачивается при торсионных нулевых колебаниях; l – длина связи между узлом и этой группой; u – высота барьера внутреннего вращения. Полагая $M \sim 20$ а.е.м., $l \sim 1.5$ Å, $u \sim 3$ ккал/моль, для квадрата амплитуды нулевых колебаний получаем значение ~ 0.01 (кв. рад).

Соответственно, формула для поверхности свободной энергии в окрестности критической точки k имеет вид

$$G_k(R_k, Z_k, T) \sim G_{0k}(T) + (x_k - y_k) R_k^2 + y_k Z_k^2 - k_B T N \ln \left(1 + \frac{r_k}{r_0} \right), \quad (27)$$

где $G_{0k}(T) = U_k - k_B T S_0$.

В принципе, если задаться конкретными значениями параметров в формулах (19) и (27), мож-

но построить множество примеров топографии двумерных поверхностей свободной энергии. Однако мы подойдем к этой проблеме с другой стороны.

Представление энергетических ландшафтов многомерными рядами Фурье

Как известно, топология пространства, на котором заданы функции, оказывает существенное влияние на свойства этих функций [66, 68]. Функция, заданная на гиперторе, может быть разложена в многомерный ряд Фурье [82]

$$U(\vec{\phi}) = \sum_{\vec{n}} A(\vec{n}) e^{i\vec{n}\vec{\phi}}, \quad (28)$$

где мы для сокращения записи ввели алгебраический вектор [83] набора торсионных углов в виде

$$\vec{\phi} = (\phi_1, \phi_2, \dots, \phi_i, \dots, \phi_N) \quad (29)$$

и алгебраический вектор $\mathbf{n}$ соответствующих номеров гармоник ряда Фурье (здесь и всюду ниже мы будем в тексте векторы выделять жирным шрифтом, оставляя в формулах обозначения с чертой сверху):

$$\vec{n} = (n_1, n_2, \dots, n_i, \dots, n_N); \quad n_k = 0, \pm 1, \pm 2, \dots \quad (30)$$

Скалярное произведение векторов определено обычным образом.

Коэффициенты разложения в выражении (28) определяются интегралом

$$A(\vec{n}) = \frac{1}{(2\pi)^N} \int_{-\pi}^{\pi} \dots \int_{-\pi}^{\pi} U(\vec{\phi}) e^{-i\vec{n}\vec{\phi}} d^N \vec{\phi}. \quad (31)$$

Заметим, что привычные нам межатомные потенциалы имеют сингулярность в нулевой точке. Однако эта сингулярность лежит в классически запрещенной области и не мешает пользоваться разложением в ряд Фурье для ППЭ. Более подробно это обстоятельство изложено в работе [50].

В коэффициентах разложения выражения (28) содержится вся информация об устройстве многомерной ППЭ, которая связана с особенностями химического строения макромолекулы, ее электронном состоянии и свойствах ее окружения, взаимодействием с растворителем. Возможность учета таким образом вклада растворителя связана с тем, что время релаксации растворителя (для воды это время равно примерно 10^{-12} с) много меньше, чем характерные времена конформационных движений цепи. Молекулы растворителя успевают подстраиваться под мгновенные конформации цепи. В некотором смысле это аналогично адиабатическому приближению при взаимодействии быстрой и медленной подсистем.

Комплексная форма представления разложения в ряд выбрана из соображений удобства. Так как функция потенциальной энергии веществен-

на, то для коэффициентов разложения имеем очевидные соотношения:

$$A(\vec{n}) = |A(\vec{n})| e^{i\theta(\vec{n})}, \quad (32)$$

$$A(-\vec{n}) = A(\vec{n})^* = |A(\vec{n})| e^{-i\theta(\vec{n})}.$$

Из вещественности суммы (28) приходим также к заключению, что амплитуды и фазы коэффициентов разложения связаны следующими условиями:

$$|A(-\vec{n})| = |A(\vec{n})|, \quad \theta(-\vec{n}) = -\theta(\vec{n}). \quad (33)$$

Соотношение для фаз θ можно представить также в виде скалярного произведения вектора номеров гармоник $\mathbf{n}$ и некоторого вектора $\mathbf{C}(\mathbf{n})$, который является четной функцией векторов номеров гармоник:

$$\theta(\pm\vec{n}) = \pm\pi h(\vec{n}) - \vec{C}(\vec{n}) \vec{n}. \quad (34)$$

Здесь $h(\mathbf{n})$ принимает значение нуля, если фаза θ лежит в правой комплексной полуплоскости или единицы — в противоположном случае.

Так как в сумме (28) слагаемые для векторов $\mathbf{n}$ и $-\mathbf{n}$ встречаются всегда парой, получаем

$$U(\vec{\phi}) = \sum_{\vec{n}} (-1)^{h(\vec{n})} |A(\vec{n})| \cos[\vec{n}(\vec{\phi} - \vec{C}(\vec{n}))]. \quad (35)$$

Коэффициенты разложения $A(\mathbf{n})$ и фазы $\theta(\mathbf{n})$ членов ряда определяют сложное строение многомерной поверхности потенциальной энергии с огромным числом критических точек. Эти почти очевидные соотношения полезны для анализа общих свойств энергетической поверхности (35), заданной на многомерном торе множества углов поворотов вокруг химических связей. Так, например, для зеркально симметричных структур (т.е. линейных полимеров без хиральных звеньев) имеем

$$U_s(\vec{\phi}) = U_s(-\vec{\phi}). \quad (36)$$

В этом случае разложение для ППЭ сводится к виду

$$U_s(\vec{\phi}) = \sum_{\vec{n}} (-1)^{h(\vec{n})} |A(\vec{n})| \cos[\vec{n}\vec{\phi}]. \quad (37)$$

Среди множества теоретически возможных потенциальных поверхностей в выражении (35) выделяется класс поверхностей для хиральных линейных полимеров, которые могут иметь единственный четкий глобальный минимум, отвечающий уникальной пространственной структуре. В наиболее благоприятном случае для таких поверхностей значение фазы $\theta(\mathbf{n})$ в членах разложения может быть выбрано, например, следующим образом [48, 51]:

$$\theta(\pm\vec{n}) = \pm\pi - \vec{n}\vec{\phi}_m, \quad (38)$$

где $\vec{\phi}_m$ — вектор торсионных углов для положения глобального минимума. В этом случае поверх-

ность потенциальной энергии может быть записана в виде

$$U(\bar{\Phi}) \sim - \sum_{\bar{n}} |A(\bar{n})| \cos[\bar{n}(\bar{\Phi} - \bar{\Phi}_m)]. \quad (39)$$

Необходимым условием существования такой ППЭ, как уже отмечалось, является хиральность полимерной молекулы. Заметим, что при зеркальном отражении, когда меняются знаки всех угловых переменных и мы переходим к структуре с другой хиральностью, значение потенциальной энергии (39) не изменяется.

Такой вид потенциальной поверхности (см. (39)) при определенных условиях является оптимальным для формирования уникальной пространственной структуры с точки зрения феномена фолдинга биополимеров. В работе [51] обсуждаются возможные закономерности поэтапного формирования молекулярных конструкций, для которых ППЭ устроены по типу, аналогичному выражению (39). При некоторых условиях для коэффициентов разложения в выражении (39) можно получить рациональное объяснение многим и весьма разнородным экспериментальным фактам, которые наблюдаются в процессе фолдинга и которые, на первый взгляд, никак не связаны друг с другом [48, 49, 51].

Многомерное гауссовское приближение.

Обобщенные координаты.

Топография вложенных энергетических воронок

Обратимся далее к зависимости коэффициентов разложения в формуле (39) от векторов номеров гармоник в условиях симметрии полимера относительно перестановки мономерных звеньев. Есть общие соображения о том, каким образом должны быть устроены эти коэффициенты разложения. Ввиду симметрии ППЭ относительно перестановки угловых переменных (17) коэффициенты разложения в формуле (39) не должны зависеть от перестановки номеров гармоник и в этом случае они будут функциями некоторых инвариантов векторов номеров гармоник (т.е. функциями, которые не изменяются при перестановке компонент векторов $\mathbf{n}$ для звеньев цепи). Простейшими инвариантами являются: длина вектора, сумма компонент вектора (модуль компонента вектора) или, например, скалярное произведение вектора $\mathbf{n}$ на вектор, пропорциональный вектору с одинаковыми компонентами. Инвариант типа произведения компонента вектора номера гармоник явно не годится по понятным причинам. В простейшем варианте, когда в мономере имеется только один торсионный угол, мы будем исходить из суммы гауссовских форм для коэффициентов разложения:

$$|A(\bar{n})| = \sum_k |A(\bar{n})|_k, \\ |A(\bar{n})|_k = u_k \frac{1}{2\lambda_k \sqrt{\pi}} \left\{ \exp \left[-\frac{1}{\lambda_k^2} (\bar{n} - \bar{a}_k)^2 \right] + \exp \left[-\frac{1}{\lambda_k^2} (\bar{n} + \bar{a}_k)^2 \right] \right\} \exp \left[-\epsilon \sum_i |n_i| \right]. \quad (40)$$

Коэффициенты разложения в выражении (40) симметричны относительно перестановок компонент вектора номеров гармоник, если алгебраические векторы $\mathbf{a}_k$ равны нулю или пропорциональны векторам с единичными компонентами. Ниже мы увидим, что все формулы также работают и при некотором нарушении идеальной симметрии в случае произвольных векторов $\mathbf{a}_k$. Результаты могут быть обобщены и на случай, когда в мономерном звене есть несколько торсионных степеней свободы [51]. Последний множитель в выражении (40) указывает на то, что для физически разумной функции с ростом номеров гармоник коэффициенты ряда Фурье уменьшаются примерно экспоненциально [51, 82]. Быстрота затухания коэффициентов с увеличением номера гармоники определяется параметром ϵ . Ниже в конечных формулах для ППЭ мы перейдем к пределу ϵ , стремящемуся к нулю, и здесь не важны различия в этом параметре для разных степеней свободы. Параметры λ определяют масштаб допустимых отклонений величин в показателях гауссовских экспонент от нуля. При стремлении λ к нулю гауссовские экспоненты превращаются в дельта-функции.

Удобство формул типа уравнения (40) для получения аналитических результатов основано на применении интегральных представлений и производящих функций. В результате получаем для одного слагаемого в выражении (40)

$$U_1(\bar{\Phi}) \sim -u_1 \lambda_1^N \pi^{N/2} \exp \left\{ -\frac{\lambda_1^2}{4} \sum_i (\Phi_i - \Phi_{im})^2 \right\} \times \\ \times \cos \sum_i a_{1i} (\Phi_i - \Phi_{im}); \quad \lambda_1 \epsilon \ll 1. \quad (41)$$

По структуре выражения (41) видно, что целесообразно ввести две обобщенные переменные, которые аналогичны (20)

$$R^2 = \sum_i (\Phi_i - \Phi_{im})^2 = (\bar{\Phi} - \bar{\Phi}_m)^2; \\ Z_1 = \frac{1}{\|\bar{a}_1\|} \sum_i a_{1i} (\Phi_i - \Phi_{im}) = \frac{\bar{a}_1}{\|\bar{a}_1\|} (\bar{\Phi} - \bar{\Phi}_m); \quad R \geq |Z_1|. \quad (42)$$

Норма вектора $\mathbf{a}_1$ в выражении (42) определена обычным образом [83]. Первая переменная по геометрическому смыслу задает гиперсферы радиуса R в пространстве торсионных углов, описанных вокруг точки глобального минимума. Вторая переменная определяет гиперплоскости, перпендикулярные вектору $\mathbf{a}_1$ и находящиеся на

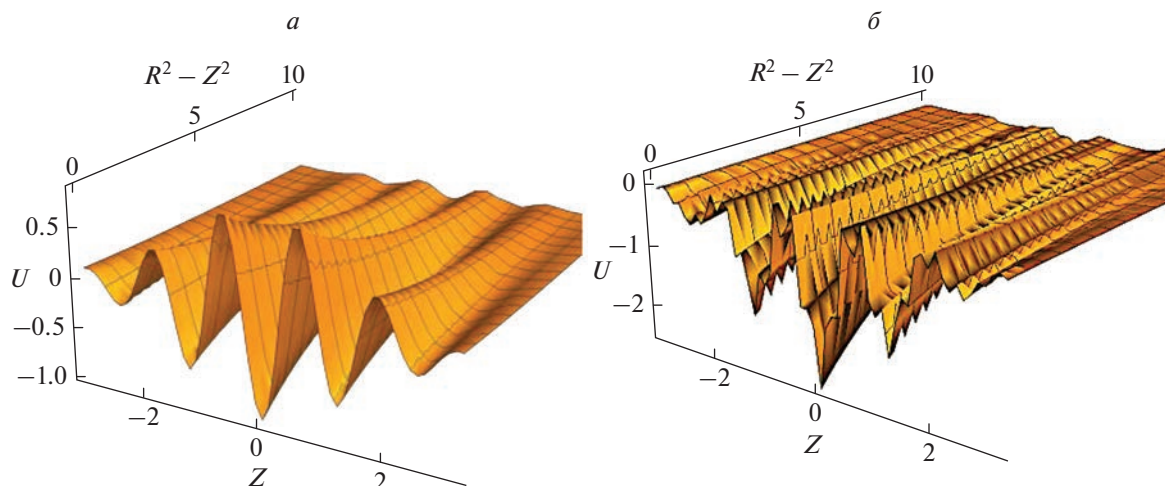


Рис. 5. Центральная и сателлитные энергетические воронки для ППЭ в обобщенных переменных R и Z : a – $U(R, Z) = -\exp(-R^2/4)\cos 5Z$; b – $U(R, Z) = -\exp(-R^2/4)(1 + \cos 5Z + 0.5\cos 20Z)$. Самая глубокая – центральная воронка, справа и слева – сателлитные воронки с уменьшающейся глубиной. Воронки отделены друг от друга барьерами, высоты которых уменьшаются по мере удаления от точки глобального минимума. На правом рисунке видны мелкие осцилляции, которые можно интерпретировать как конформационные подсостояния или “потенциальную гребенку” [30, 31, 33].

расстоянии Z_1 (с точностью до знака) от точки глобального минимума. В результате ППЭ можно переписать в простом виде

$$U_1(\bar{\Phi}) = U_1(R, Z_1) = -U_{01} \exp(-\lambda_1^2 R^2/4) \cos \|\bar{a}_1\| Z_1; \quad (43) \\ R \geq |Z_1|.$$

Напомним, что соблюдение нестрогого неравенства $R \geq |Z_1|$ в формуле (43) очень важно, так как в противном случае не существует такого набора угловых переменных, которые одновременно удовлетворяют условиям (42).

Если вектор $\mathbf{a}_1$ равен нулю, то мы имеем простую гауссовскую воронку. При достаточной длине вектора $\mathbf{a}_1$ рельеф ППЭ представляет собой набор большого числа воронок (рис. 5). Имеется самая глубокая центральная воронка, которую окружают сателлитные воронки с уменьшающейся глубиной по мере удаления от центральной воронки.

Все воронки отделены друг от друга потенциальными барьерами. Если рассматриваемый полимер состоит из абсолютно одинаковых мономерных звеньев и поверхность симметрична относительно перестановки торсионных углов одинакового типа, то по соображениям симметрии этот вектор должен быть или равен нулю, или быть пропорциональным вектору с единичными компонентами. В первом случае мы имеем ППЭ с простой топографией. Такая топография ППЭ полностью соответствует принципу минимальной фрустрации и идеальна для очень быстрого

сворачивания в уникальную пространственную структуру (в данном случае – спиральную), которая достижима из любой начальной конфигурации цепи. Отметим, что известны примеры очень быстрого фолдинга полипептидов за времена порядка наносекунд [7, 84].

Если вектор $\mathbf{a}_1$ не равен нулю, то формируется топография множества вложенных энергетических воронок. (Заметим, что похожее строение энергетических поверхностей, состоящих из множества воронок (энергетических “бассейнов”), возникает и при численном моделировании фрагментов биополимеров и иных многоатомных систем [61, 85]). При такой топографии ППЭ появляются определенные особенности процесса сворачивания полимера. Имеется набор обширных областей конформаций цепи (или энергетических воронок), между которыми переход репрезентативной точки сильно затруднен. В этом случае топография ППЭ *включает механизм связи между стартовой конформацией цепи, которая возникает в процессе синтеза и конечной пространственной структурой, получаемой в процессе фолдинга*. С точки зрения возможного отбора линейных полимеров, формирующих уникальные пространственные структуры, преимущество должны были бы получить макромолекулы, ППЭ которых устроено максимально симметрично и гладко. В рамках рассматриваемой гауссовской модели это структуры с ППЭ, у которых вектор $\mathbf{a}_1 = 0$. Если мономерные звенья у таких структур подвергались далее модификациям, например, в области

боковых групп, то такая идеальная симметрия для коэффициентов разложения нарушается, что в рамках рассматриваемой модели трактуется как возникновение не нулевого вектора $\mathbf{a}_1$ и усложнение топографии ППЭ. Соблюдая общие условия симметрии для коэффициентов разложения в рамках рассматриваемой гауссовской модели, мы описываем эти изменения как расщепление центра распределения коэффициентов разложения в пространстве номеров гармоник на векторы $\mathbf{a}_1$ и $-\mathbf{a}_1$. Это минимальный шаг в усложнении топографии ППЭ, который очень похож на снятие вырождения состояния при включении дополнительного возмущения.

Заметим, что добавление к коэффициентам разложения второго слагаемого в формуле (40) с много меньшей амплитудой и существенно большей нормой вектора $\mathbf{a}_2$, чем у первого слагаемого, вводит дополнительные мелкомасштабные осцилляции внутри энергетических воронок, которые могут быть интерпретированы как конформационные подсостояния [31, 32] или как “потенциальная гребенка” [34, 35].

Из полученных формул мы также видим, что имеется энергетическая “щель” [12, 13] между самым нижним состоянием и ближайшими конформациями. В простейшем варианте выражения (43) величина этой энергетической “щели” может быть определена как разность энергий между глобальным минимумом и минимумом ближайшей сателлитной воронки:

$$\delta U \sim \frac{\pi^2 \lambda_1^2}{\|\mathbf{a}_1\|^2} U_{01}; \quad \frac{\lambda_1}{\|\mathbf{a}_1\|} \ll 1. \quad (44)$$

В рамках простой гауссовской модели (43) согласование порядков наблюдаемых величин в формуле (44) возможно при малых значениях отношения параметра λ_1 к длине вектора $\mathbf{a}_1$ порядка $N^{-1/2}$. При $\lambda \sim 1$ рельеф ППЭ и ПСЭ биополимера будет содержать огромное число сателлитных воронок, что согласуется с нашими интуитивными представлениями о сложной топографии ППЭ. Заметим, что использование дополнительных членов в разложении (40) (см. также рис. 5б) дает возможности для дополнительной интерпретации энергетической “щели”.

***Вулканообразный профиль свободной энергии.
Температура денатурации пропорциональна
удельной энергии невалентных связей
между мономерами***

Перейдем далее к рассмотрению поверхности свободной энергии (ПСЭ) линейной полимерной цепи, которая формирует уникальную пространственную структуру. В реальных экспериментах по фолдингу при конечных температурах наблю-

даемые эффекты определяются именно поверхностью свободной энергии макромолекул. В рамках развиваемых гауссовских моделей для ППЭ имеется достаточно простой и логичный переход от ППЭ к поверхности свободной энергии цепи (ПСЭ) в терминах обобщенных координат R и Z . Используя стандартные процедуры, что и при выводе формулы (27) получим выражение для свободной энергии:

$$G_1(R, Z_1, T) = -U_{01} \left\{ \exp\left(-\lambda_1^2 R^2 / 4\right) \cos\|\mathbf{a}_1\| Z_1 + \frac{T}{T_0} \ln \left[1 + \frac{\sqrt{R^2 - Z_1^2}}{r_0} \right] \right\}; \quad R \geq |Z_1|, \quad (45)$$

где мы ведем отсчет энергии от состояния глобального минимума, а параметр r_0 определяется амплитудой нулевых колебаний и формулой для энтропии (25). Мы также ввели параметр характеристической температуры T_0 , который по смыслу пропорционален удельному уменьшению (выигрышу) потенциальной энергии при сворачивании, приходящемуся на одну конформационную степень свободы в основной цепи:

$$T_0 = U_{01}/k_B N. \quad (46)$$

Пример поверхности свободной энергии приведен на рис. 6.

По формуле (45) можно оценить порог температуры, при котором свободная энергия свернутого состояния перестает быть ниже, чем энергия полностью денатурированного состояния. При заданных значениях параметров в выражении (26) и значении $N \sim 200$ свернутое состояние оказывается термодинамически выгодным при $T < 0.26 T_0$ (рис. 6). Заметим, что эта оценка при больших значениях N практически не зависит от длины цепи, а также параметра λ .

Полагая, например, что температурный порог денатурации белка составляет $\sim 60^\circ\text{C}$ (~ 333 К), оценим параметр T_0 , который составит около 1280 К. Данная модель предсказывает по требуемой температуре денатурации величину выигрыша в потенциальной энергии макромолекулы за счет невалентных взаимодействий, который приходится на одну степень свободы и составляет в рассматриваемом случае около 2.56 ккал/моль. То есть энергия невалентных взаимодействий мономерных звеньев с двумя конформационными степенями свободы для сворачивания при $T < 333$ К должна составлять ~ 5 ккал/моль, что соответствует энергии водородной связи в водной среде. Естественно, это ориентировочные значения, которые демонстрируют разумный порядок величин. Две степени свободы в основной цепи типично для альфа-аминокислот. Например, для бета-аминокислот в основной цепи имеем три степени свободы и выигрыш в энергии для формирования уникальных пространственных струк-

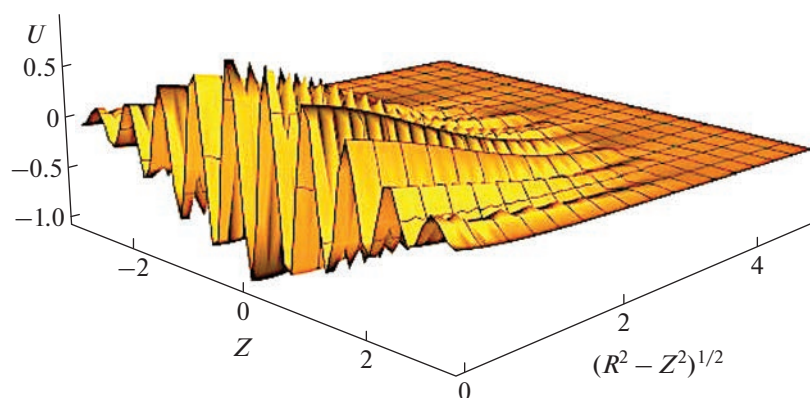


Рис. 6. Топография поверхности свободной энергии, соответствующая формуле (45), в пространстве обобщенных переменных: $G = -\exp(-R^2/4)\cos 10Z - 0.2\ln[1 + (R^2 - Z^2)^{1/2}]$.

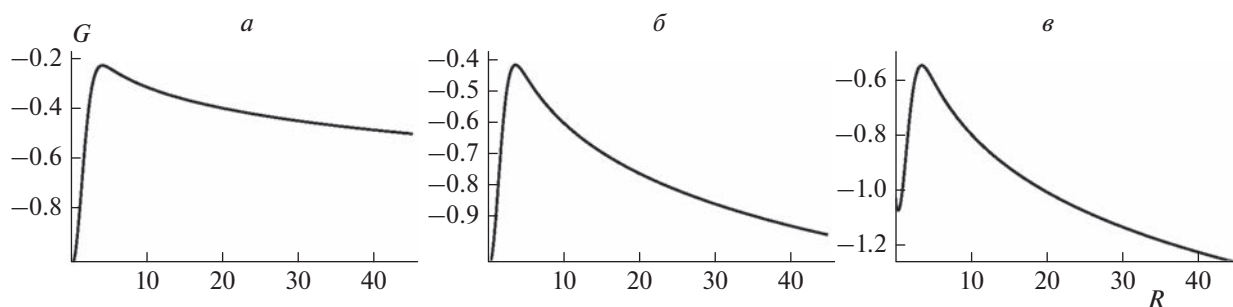


Рис. 7. Профиль свободной энергии (потенциальная энергия задана так же, как на рис. 5а) в центральной воронке ($Z=0$): а – $T/T_0 = 0.13$; б – $T/T_0 = 0.25$; в – $T/T_0 = 0.33$; а, б – свернутое состояние термодинамически выгодно; в – свернутое состояние термодинамически не выгодно.

тур при той же температуре денатурации должен был бы быть $\sim 7-8$ ккал/моль в расчете на одно мономерное звено, что в сильной степени изменяет требования к химическому составу мономерных звеньев. Из рис. 7 виден также характерный вулканообразный профиль свободной энергии, который обычно наблюдается в экспериментах по фолдингу белков в растворах [5, 6]. Область энергетической воронки, приводящей к свернутому состоянию, отделена от денатурированного состояния барьером, который имеет энтропийную природу.

ОБСУЖДЕНИЕ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вернемся к вопросам, которые были поставлены во введении и обсудим их с точки зрения полученных результатов о влиянии вязкости на динамику полимерных цепей и эффектов симметрии и топологии конфигурационного пространства для топографии поверхности потенциальной энергии.

1. Линейные полимеры реально имеют ряд особенностей, которые могут быть при опреде-

ленных условиях использованы для формирования уникальных пространственных структур. Динамика конформационных движений таких полимеров в вязкой среде сопровождается эффектами корреляции поворотов по двугранным углам, что создает предпосылки для формирования и отбора пространственных структур, содержащих спиральные элементы.

2. Топология конфигурационного пространства линейного полимера оказывает непосредственное влияние на возможные варианты топографии многомерной поверхности потенциальной энергии. В частности, наличие единственного глобального минимума на многомерной ППЭ наиболее естественно возникает для зеркально несимметричных макромолекул.

3. Эффекты корреляции конформационных движений и равномерное распределение средних скоростей диссипации энергии между узлами цепи в вязкой среде стимулируют формирование спиральных структур. С другой стороны, симметрия полимера относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев также приводят к фор-

мированию различных спиральных структур. Для полимеров, симметричных относительно перестановки мономерных звеньев, критические точки ППЭ соответствуют различным спиральным структурам. Может возникнуть вопрос — почему, например, полиэтилен не формирует спиралей? Здесь есть две причины. Во-первых, конформация цепей полиэтилена обычно формируется в условиях расплава, когда цепи мешают друг другу. Во-вторых, конформация полимера при конечной температуре T определяется поверхностью свободной энергии, определяемой выражением (45), где присутствует энтропийный вклад, который при значениях T больше некоторой критической температуры выводит конформации в неупорядоченное состояние (рис. 7а).

4. Как известно, для феноменологического объяснения фолдинга белков была высказана гипотеза о специальной топографии энергетического ландшафта полипептидной цепи, суть которой состоит в том, что общее устройство ППЭ представляет собой относительно гладкую энергетическую воронку (принцип минимальной фрустрации энергетической воронки). При этом оставались непонятными физические аргументы в пользу столь удачного устройства ППЭ для этих биополимеров. Выше мы видели, что движение репрезентативной точки по многомерной поверхности потенциальной энергии происходит практически только по относительно гладким участкам, для которых изменение потенциальной энергии равномерно “размазано” по всем степеням свободы. При этом требования к гладкости самой ППЭ существенно снижаются. С другой стороны, топология конфигурационного пространства линейного полимера и симметрия относительно перестановки почти одинаковых мономерных звеньев приводит к определенному устройству ППЭ и ПСЭ, которые характеризуются двумя обобщенными координатами, набором энергетических воронок и относительно гладким устройством поверхностей внутри каждой из воронок. С этой точки зрения линейные полимеры оказываются удобной платформой для формирования макромолекулярных конструкций, которые могут в результате спонтанного сворачивания формировать уникальные 3D-структуры.

5. Как следует из формулы (45) для ПСЭ, вулканообразный энергетический профиль возникает вследствие энтропийных эффектов и должен быть характерен для сворачивания линейных полимеров, у которых есть выделенный глобальный энергетический минимум.

6. Из формул (43) и (45) видны условия формирования энергетических ландшафтов с множеством энергетических воронок, которые отделены друг от друга и от центральной (самой глубокой) воронки потенциальными барьерами. При

этом попадание репрезентативной точки уже на стадии приготовления (синтеза) полимера в область притяжения одной из воронок фактически приводит к выбору сценария фолдинга, который диктуется данной воронкой. Что касается процессов ренатурации свернутых состояний макромолекул, то при таком устройстве энергетических ландшафтов имеется зависимость от интенсивности процесса разворачивания. При мягком варианте разворачивания 3D-структуры конформации макромолекулы остаются в пределах области притяжения начальной энергетической воронки (или группы очень близких друг к другу воронок). При жестком быстром разворачивании (например, с использованием атомно-силового микроскопа) может произойти переброс конформации макромолекулы в области притяжения удаленных от центра воронок и результат ренатурации окажется иным.

7. В формуле (45) четко прослеживается связь между температурой денатурации свернутого состояния макромолекулы и удельной энергией притяжения за счет невалентных взаимодействий мономерных звеньев. Так, при условии, что температура денатурации составляет $\sim 60^\circ\text{C}$, получаем необходимый выигрыш в энергии на одну конформационную степень свободы в основной цепи ~ 2.5 ккал/моль. В полипептидной цепи, состоящей из альфа-аминокислот, на мономер приходится две степени свободы и выигрыш в энергии невалентных взаимодействий должен составлять величину, близкую к энергии водородной связи в водной среде. Увеличение числа конформационных степеней свободы при использовании, например, бета-аминокислот потребует при тех же температурах денатурации пропорционального увеличения вклада энергии невалентных взаимодействий в стабилизацию пространственной структуры макромолекулы.

8. Приведенный выше анализ полезен для понимания связи между температурными условиями жизни на планете и возможными химическими платформами для реализации макромолекул с уникальными пространственными структурами. Процесс возникновения жизни (несмотря на имеющуюся в настоящее время неопределенность и недостаточность наших знаний о конкретных механизмах этого явления), несомненно, происходил поэтапно. С высокой вероятностью этот процесс включал в себя этапы физико-химической молекулярной эволюции и формирование некоторых протоформ биополимеров с уникальными пространственными структурами. Вариант с альфа-аминокислотами и водородными связями оказался, по-видимому, адекватным температурным условиям и наличию воды на нашей планете. Для формирования уникальных 3D-структур в другом диапазоне температур необходима “подгонка” параметров температуры денатурации, энергии

взаимодействия мономерных звеньев и числа конформационных степеней свободы мономерного звена в основной цепи.

9. Дополнительным интересным фактором в организации пространственной структуры полимеров является возможность совместного действия эффектов вязкости на конформационную динамику сворачивания макромолекул и эффектов симметрии относительно перестановки одинаковых звеньев на топографию ППЭ. Из рис. 6 видно, что, в соответствии с формулой (42), поверхность свободной энергии для развернутого состояния полимера (при больших значениях координаты R) мало чувствительна к изменению координаты Z . Это может приводить к ситуации, когда результат сворачивания полимерной цепи (попадания в одну из многочисленных энергетических воронок) был бы практически не предсказуем за счет движения репрезентативной точки по координате Z . Сходные идеи обсуждались в работе [4]. Однако в вязкой среде возникает определенная корреляция конформационных движений (формулы (5) и (15)), причем из формулы (5) и численного моделирования (рис. 3) видно, что сумма угловых скоростей поворотов по двугранным углам близка к нулю. Скорость изменения координаты Z в выражении (42) также является линейной комбинацией скоростей поворотов вокруг связей. При определенном согласовании коэффициентов (определяемых параметрами структуры мономерных звеньев) возможна ситуация, когда производная Z по времени будет практически равна нулю вследствие рассмотренных выше эффектов вязкости. Это означает, что Z – координата репрезентативной точки, не будет значительно изменяться в процессе сворачивания и результат фолдинга будет определяться областью начальных конфигураций цепи, возникающих в процессе приготовления начального состояния полимера. Такое согласование эффектов вязкости для динамики сворачивания и эффектов симметрии для топографии ППЭ могло бы создать принципиальные возможности для отбора полимерных молекул, формирующих уникальные пространственные структуры.

10. Проведенный анализ влияния эффектов вязкости на динамику репрезентативной точки по многомерной ППЭ показывает необходимость более внимательного отношения при молекулярном моделировании к выбору параметров силовых полей и алгоритмов поддержания на заданном уровне макропараметров (температура, вязкость, давление и пр.). Проблема состоит в том, что в настоящее время никаким разумным способом нельзя получить (или вычислить) многомерную ППЭ с точностью, которая необходима для надежного вычисления сил. Даже для системы, состоящей из одной сотни атомов, число необходимых операций на много порядков превосходит

число гугл (10¹⁰⁰), которое с любой практической точки зрения ассоциируется с бесконечностью. Обычно используются различные приближения для обхода этой проблемы: введение радиусов обрезания для атом-атомных потенциалов [22, 62], использование метода Эвальда для учета кулоновских взаимодействий в ситуации периодических граничных условий [86] и др. Вопрос о точности этих аппроксимаций априори остается не очень понятным и проблему обычно пытаются решить за счет калибровки параметров потенциалов для узких классов молекулярных систем [62]. В вязкой среде (заметим, что даже большинство сжиженных газов с точки зрения конформационных движений также относятся к средам с большой вязкостью [75]) репрезентативная точка движется преимущественно по гладким траекториям, т.е. областям ППЭ для которых изменение потенциальной энергии практически равномерно “размазано” по всем степеням свободы. В этом отношении понятно, что калибровка параметров силовых полей должна проводиться отдельно для макромолекул в вязких средах и, например, в вакууме, где движение репрезентативной точки ограничено лишь энергетическими возможностями. Область конфигурационного пространства, которая доступна для репрезентативной точки на многомерной ППЭ в вязкой среде неизмеримо меньше, чем в вакууме и требования к определению параметров силовых полей при этом становятся менее жесткими. Использование динамики Ланжевена [62, 87] или столкновительного термостата [88], которые имитируют вязкость [89], нам представляется более правильным для изучения конформационной динамики биополимеров с точки зрения минимизации артефактов [90, 91].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В статье изложены сформировавшиеся у нас на данный момент общие представления о динамическом устройстве биополимеров, которые сворачиваются в уникальные пространственные структуры и которые являются естественной молекулярной платформой для реализации биологических функций. Развитие этих представлений имеет более чем 40-летнюю историю. Наше участие в этих работах началось с предложений по интерпретации парадоксальных (на первый взгляд) данных мессбауэровской спектроскопии по динамике белков [34, 35]. Механизм ограниченной диффузии для конформационных движений с амплитудами порядка или более 0.3 Å удивительно точно описывает температурные зависимости мессбауэровских спектров белков и позволяет экспериментально определить усредненные параметры конформационных движений. Интерес к этим проблемам увеличивается

также благодаря высокой корреляции между параметрами конформационной динамики и функциональной активностью белков. Заметим, что такого рода эффекты не являются уникальными именно для биополимеров, а свойственны и другим полимерным системам [17, 19–21, 92]. Использование относительно простых модельных представлений об ограниченной диффузии [34–39] или представлений о конформационных подсостояниях [31, 32] дает физическую картину для мелкомасштабных конформационных движений. Теория крупномасштабных конформационных изменений при фолдинге белков развивалась на основе идей о минимальной фрустрации энергетической воронки [10] и энергетической “щели” [12], которые необходимы по кинетическим и термодинамическим соображениям для согласования характерных времен сворачивания и устойчивости структуры белка в уникальной пространственной конфигурации. Однако эти перечисленные физические идеи напрямую не стыкуются. Оценка сложившейся ситуации привела нас к выводу о необходимости более широкого подхода к анализу динамических свойств биополимерных систем и использования математических инструментов многомерной геометрии и топологии [66–68] уже на стадии постановки задачи. Здесь автор признателен коллегам механико-математического факультета МГУ, неформальное общение с которыми поддерживало его стремление продолжить работу в выбранном направлении.

Автор благодарен М.П. Кирпичникову за поддержку и внимание к работе.

Поддержка со стороны Междисциплинарных научно-образовательных школ Московского университета “Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология” и “Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект” стимулировала нас уделять больше внимания фундаментальным исследованиям.

Работа была бы невозможна без многолетней финансовой поддержки Российским фондом фундаментальных исследований и Российским научным фондом, а в последнее время — Минобрнауки РФ (грант № 075-15-2021-1354).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nurse P. // Nature. 2021. V. 597. P. 305.
2. Anfinsen C.B. // Science. 1973. V. 181 (4096). P. 223; [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64176-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64176-6)
3. Pauling L. The Nature of the Chemical Bond. 3rd Ed. Cornell Univ. Press, 1960.
4. Levinthal C. // J. Chem. Phys. 1968. V. 65. № 1. P. 44.
5. Dill K.A., MacCallum J.L. // Science. 2012. V. 338. P. 1042; <https://doi.org/10.1126/science.1219021>
6. Finkelstein A.V., Bogatyreva N.S., Ivankov D.N., Garbuzynskiy S.O. // Biophys. Rev. 2022. V. 14. P. 1255; <https://doi.org/10.1007/s12551-022-01000-1>
7. Eaton W.A. // J. Phys. Chem. B. 2021. V. 125. P. 3452; <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c00206>
8. Bryngelson J.D., Wolynes P.G. // J. Phys. Chem. 1989. V. 93. P. 6902.
9. Wolynes P.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. № 25. P. 14249; <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14249>
10. Onuchic J.N., Wolynes P.G. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. № 1. P. 70.
11. Wolynes P.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 7. P. 2426; <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2426>
12. Shakhnovich E.I., Gutin A.M. // Stud. Biophys (Berlin). 1989. V. 132. P. 47.
13. Sali A., Shakhnovich E., Karplus M. // Nature. 1994. V. 369(6477). P. 248.
14. Jacobs W.M., Shakhnovich E.I. // J. Phys. Chem. B. 2018. V. 122(49). P. 11126; <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b05842>
15. Chekmarev S.F., Krivov S.V., Karplus M. // Ibid. 2005. V. 109(11). P. 5312; <https://doi.org/10.1021/jp047012h>
16. Chekmarev S.F. // Phys. Rev. E. 2019. V. 99. P. 022412; <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.99.022412>
17. Grosberg A.Y., Khokhlov A.R. Giant Molecules: Here, There, and Everywhere. 2nd Ed. Singapore: World Scientific Publ., 2011.
18. Лишин И.М., Гросберг А.Ю., Хохлов А.П. // УФН. 1979. Т. 127. С. 353.
19. Khokhlov A.R., Khalatur P.G. // Physica A. 1998. Issues 1–4. V. 249. P. 253; [https://doi.org/10.1016/S0378-4371\(97\)00473-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4371(97)00473-1)
20. Orekhov P.S., Bozdaganyan M.E., Voskoboynikova N. et al. // Nanomaterials. 2022. V. 12. № 3. P. 361; <https://doi.org/10.3390/nano12030361>
21. Voskoboynikova N., Orekhov P., Bozdaganyan M. et al. // Intern. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 5. P. 2548; <https://doi.org/10.3390/ijms22052548>
22. Методы компьютерного молекулярного моделирования для исследования полимеров и биополимеров / Под ред. Иванова В.А., Рабиновича А.Л., Хохлова А.П. М.: Книжный дом Либроком, 2009.
23. Шайтан К.В., Турлей Е.В., Голик Д.Н. и др. // Хим. физика. 2006. Т. 25. № 9. С. 31.
24. Шайтан К.В. // Хим. физика. 2014. Т. 33. № 7. С. 53; <https://doi.org/10.7868/S0207401X14070085>
25. Goldanskii V.I., Krupyanskii Y.F. // Q. Rev. Biophys. 1989. V. 22. № 1. P. 39.
26. Krupyanskii Y.F., Goldanskii V.I., Parak F., Mössbauer R.L., Suzdalev I.P., Engelmann H. // Z. Naturforsch., C: Biosci. 1982. V. 37. № 1–2. P. 57.
27. Krupyanskii Yu.F., Goldanskii V.I., Nienhaus G.U., Parak F. // Hyperfine Interact. 1990. V. 53. № 1–4. P. 59.
28. Krupyanskii Y.F., Shaitan K.V., Gol'danskii V.I., Kurinov I.V., Rubin A.B., Suzdalev I.P. // Biophysics. 1987. V. 32. № 5. P. 820.

29. *Krupyanskiĭ Yu.F., Goldanskiĭ V.I.* // *Physics-Uspekhi*. 2002. V. 45. № 11. P. 1131.
30. *Mossbauer R.L.* // *Hyperfine Interact.* 1987. V. 33. P. 199; <https://doi.org/10.1007/BF02394109>
31. *Austin R.H., Beeson K.W., Eisenstein L., Frauenfelder H., Gunsalus I.C.* // *Biochem.* 1975. V. 14(24). P. 5355.
32. *Frauenfelder H.* // *The Physics of Proteins. Ser. Biol. Med. Phys., Biomed. Eng.* / Eds. Chan S.S., Chan W.S. N.Y.: Springer, 2010; https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1044-8_12
33. *Кононенко А.А., Нокс П.П., Чаморовский С.К., Рубин А.Б., Лихтенштейн Г.И., Крупянский Ю.Ф., Суздальев И.П., Гольданский В.И.* // *Хим. физика*. 1986. Т. 5. № 6. С. 795.
34. *Шайтан К.В., Рубин А.Б.* // *Молекуляр. биология*. 1980. Т. 14. С. 1323.
35. *Шайтан К.В., Рубин А.Б.* // *Биофизика*. 1980. Т. 25. С. 796.
36. *Ebeling W., Schimansky-Gefer L., Romanovsky Y.M.* *Stochastic Dynamics of Reacting Biomolecules*. Singapore: World Scientific Publ., 2003. P. 285; https://doi.org/10.1142/9789812795434_0010
37. *Rubin A.B., Shaitan K.V., Kononenko A.A., Chamorovsky S.K.* // *Photosynth. Res.* 1989. V. 22. P. 219.
38. *Шайтан К.В., Рубин А.Б.* // *Молекуляр. биология*. 1983. Т. 17. № 6. С. 1280.
39. *Шайтан К.В., Упоров И.В.* // *Хим. физика*. 1984. Т. 3. № 10. С. 1416.
40. *Basovets S.K., Uporov I.V., Shaitan K.V., Krupyanskiĭ Y.F., Kurinov I.V., Suzdalev I.P., Rubin A.B., Goldanskiĭ V.I.* // *Hyperfine Interact.* 1988. V. 39. № 4. P. 369; <https://doi.org/10.1007/bf02397646>
41. *Shaitan K.V., Mikhailyuk M.G., Plachinda A.S., Khromov V.I.* // *Russ. Chem. Bull.* 2002. V. 51. № 12. P. 2196.
42. *Шайтан К.В., Михайлюк М.Г.* // *Хим. физика*. 2001. Т. 20. № 2. С. 3.
43. *Шайтан К.В.* // *Биофизика*. 1994. Т. 39. № 6. С. 949.
44. *Avetisov A., Bikulov A.H., Kozurev S.V.* // *J. Phys. A: Math. Gen.* 1999. V. 32. № 50. P. 8785; <https://doi.org/10.1088/0305-4470/32/50/301>
45. *Zabelskii D., Alekseev A., Kovalev K. et al.* // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. Article 5707; <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19457-7>
46. *Armeev G.A., Kniazeva A.S., Komarova G.A., Kirpichnikov M.P., Shaytan A.K.* // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. Article 2387; <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22636-9>
47. *Шайтан К.В.* *Биофизика*. 2018. Т. 63. № 1. С. 5; <https://doi.org/10.1134/S0006350918010165>
48. *Шайтан К.В.* // *Биофизика*. 2018. Т. 63. № 4. С. 629; <https://doi.org/10.1134/S0006350918040152>
49. *Шайтан К.В.* // *Биофизика*. 2018. Т. 63. № 5. С. 850; <https://doi.org/10.1134/S0006350918050214>
50. *Шайтан К.В.* // *Биофизика*. 2018. Т. 63. № 6. С. 1057; <https://doi.org/10.1134/S0006350918060246>
51. *Шайтан К.В.* // *Биофизика*. 2022. Т. 67. № 3. С. 492; <https://doi.org/10.1134/S0006350922030204>
52. *Гольданский В.И., Кузьмин В.В.* // *УФН*. 1989. Т. 157. № 1. С. 3; <https://doi.org/10.3367/UFNr.0157.198901a.0003>
53. *Аветисов В.А., Гольданский В.И.* // *УФН*. 1996. Т. 166. № 8. С. 873; <https://doi.org/10.3367/UFNr.0166.199608d.0873>
54. *Академик Виталий Иосифович Гольданский. Избранные статьи, воспоминания* / Под ред. акад. Берлина А.А. М.: Наука, 2007. С. 204; http://elbib.biblioatom.ru/text/akademik-goldanskiy_2007/go/0/
55. *Edwards D.T., LeBlanc M.-A., Perkins T.T.* // *PNAS*. 2021. V. 118. № 12 e2015728118; <https://doi.org/10.1073/pnas.2015728118>
56. *Borgia A., Williams P.M., Clarke J.* // *Ann. Rev. Biochem.* 2008. V. 77(1). P. 101; <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.060706.093102>
57. *Kramer G., Boehringer D., Ban N., Bukau B.* // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. № 6. P. 589; <https://doi.org/10.1038/nsmb.1614>
58. *Бернал Д.* *Возникновение жизни*. Пер. с англ. М.: Мир, 1969.
59. *Кунин Е.В.* *Логика случая. О природе и происхождении биологической эволюции*. Пер. с англ. М.: Центр-полиграф, 2014.
60. *Stillinger F.H.* *Energy Landscapes, Inherent Structures, and Condensed-Matter Phenomena*. Princeton Univ. Press, 2016.
61. *Wales D.J.* *Energy Landscapes*. Cambridge Univ. Press, 2003.
62. *Frenkel D., Smit B.* *Understanding Molecular Simulation*. Academic Press, 2002.
63. *Piana S., Klepeis J.L., Shaw D.E.* // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014. V. 24. P. 98; <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.12.006>
64. *Эллиот Дж., Добер П.* // *Симметрия в физике*. В 2 томах. Пер. с англ. Т. 1. М.: Мир, 1983.
65. *Макдональд И.* // *Симметрические функции и многочлены Холла*. Пер. с англ. М.: Мир, 1985.
66. *Фоменко А.Т.* // *Дифференциальная геометрия и топология. Дополнительные главы*. 2-ое изд. Ижевск: Ижевская республиканская тип., 1999.
67. *Зорич В.А.* // *Теория вероятностей и ее применение*. 2017. Т. 62. № 2. С. 292; <https://doi.org/10.4213/tvp5109>
68. *Milnor J.* // *Morse Theory*. Princeton Univ. Press, 1963.
69. *Hagen S.J.* // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2010. V. 11. P. 385.
70. *Kramers H.A.* // *Physica (Utrecht)*. 1940. V. 7. P. 284.
71. *Zwanzig R.* // *J. Chem. Phys.* 1992. V. 97. P. 3587; <https://doi.org/10.1063/1.462993>
72. *Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.* *Теоретическая физика*. Т. 1. Механика. М.: Наука, 1988.
73. *Шайтан К.В., Сарайкин С.С.* // *Биофизика*. 2000. Т. 45. № 3. С. 407.
74. *Шайтан К.В., Попеленский Ф.Ю., Армеев Г.А.* // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 3. С. 443; <https://doi.org/10.1134/S0006350917030186>

75. Эрендженова А.А., Армеев Г.А., Шайтан К.В. // Биофизика. 2020. Т. 65. № 5. С. 860; <https://doi.org/10.31857/S0006302920050026>
76. Шайтан К.В., Федик И.В. // Биофизика. 2015. Т. 60. № 3. С. 421; <https://doi.org/10.1134/S0006350915030161>
77. Шайтан К.В., Ложников М.А., Кобельков Г.М. // Биофизика. 2016. Т. 61. № 4. С. 629; <https://doi.org/10.1134/S0006350916040205>
78. Шайтан К.В., Ложников М.А., Кобельков Г.М. // Биофизика. 2017. Т. 62. № 2. С. 249; <https://doi.org/10.1134/S0006350917020233>
79. Волькенштейн М.В. Конфигурационная статистика полимерных цепей. М.-Л.: Изд. АН СССР, 1959.
80. Финкельштейн А.В., Птицын О.В. // Физика белка. М.: Книжный дом Ун-та, 2012. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1319.8320>
81. Gibbs Y.W. Elementary principles in statistical mechanics. New York: Charles Scribner's Sons, 1902; <https://doi.org/10.1017/CBO9780511686948>
82. Зигмунд А. // Тригонометрические ряды. Пер. с англ. Т. 2. М.: Мир, 1965.
83. Розенфельд Б.А. // Многомерные пространства. Изд. 2-е. М.: Ленанд, 2021.
84. Kubelka J., Hofrichter J., Eaton W.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2004. V. 14. № 1. P. 76; <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.01.013>
85. Roder K., Wales D.J. // Front. Mol. Biosci. 2022. V. 9. Article 820792; <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.820792>
86. Lee H., Cai W. Ewald summation for Coulomb interactions in a periodic supercell. Stanford Univ., 2009; http://micro.stanford.edu/mediawiki/images/4/46/Ewald_notes.pdf
87. Хир К. // Статистическая механика, кинетическая теория и стохастические процессы. Пер. с англ. М.: Мир, 1976.
88. Lemak A.S., Balabaev N.K. // Mol. Simul. 1995. V. 15. P. 223.
89. Шайтан К.В., Сарайкин С.С. // Журн. физ. химии. 2002. Т. 76. № 6. С. 1101; https://www.elibrary.ru/download/elibrary_44545193_46227090.pdf
90. Голо В.Л., Шайтан К.В. // Биофизика. 2002. Т. 47. № 4. С. 611.
91. Golo V.L., Salnikov V.N., Shaitan K.V. // Phys. Rev. E. 2004. V. 70. P. 046130; <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.70.046130>
92. Yolamanova M., Meier C., Shaytan A.K. et al. // Nat. Nanotechnol. 2013. V. 8. № 2. P. 130; <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.248>

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ НЕЛИНЕЙНОГО ХАРАКТЕРА ДИНАМИКИ ДЕЗАКТИВАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ТРИПТОФАНА В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

© 2023 г. В. В. Горохов¹, П. П. Нокс¹, Б. Н. Корватовский¹, Н. Х. Сейфуллина¹, С. Н. Горячев¹, Н. П. Гришанова¹, В. З. Пашенко^{1*}, А. Б. Рубин¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Поступила в редакцию 11.01.2022;

после доработки 18.01.2022;

принята в печать 20.01.2022

Представлен обзор работ авторского коллектива по исследованию динамики возбужденных состояний триптофана в различных растворителях в зависимости от температуры ($-170 \div +20^\circ\text{C}$). Был обнаружен антибатный ход температурных зависимостей времен затухания двух компонент (быстрой и средней) флуоресценции триптофана в температурном диапазоне от -60 до $+10^\circ\text{C}$. Третья, медленная, компонента показывала слабую зависимость от температуры. Антибатное поведение времен затухания двух компонент кинетики флуоресценции моделировали в предположении, что в определенном температурном интервале происходит переход части молекул триптофана, находящихся в возбужденном состоянии, из коротковолновой ротамерной В-формы, обладающей коротким временем жизни флуоресценции, в длинноволновую ротамерную R-форму с промежуточным временем жизни флуоресценции. Для объяснения наблюдаемых изменений в спектрах и длительности флуоресценции триптофана в зависимости от температуры была также разработана новая модель переходов между возбужденным и основным состояниями с привлечением состояния с переносом заряда (CTS), учитывающая нелинейный характер динамики этих переходов. В данных процессах важную роль играет взаимодействие молекул триптофана с его микроокружением, а также перестройки в системе водородных связей в окружении молекулы триптофана. Выделены три основных спектральных области флуоресценции триптофана, отличающиеся различным поведением температурных зависимостей скоростей перехода из возбужденного состояния триптофана в CTS. Показана ключевая роль динамики системы водородных связей, определяющих нелинейный характер изменения параметров флуоресценции триптофана в выделенных спектральных областях.

Ключевые слова: триптофан, кинетика флуоресценции, температурная зависимость, водородные связи, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0207401X23060055, **EDN:** UHHZSJ

ВВЕДЕНИЕ

Функциональная активность главных “исполнительных” молекул любой живой системы — белков существенно зависит от их конформационной динамики — способности к конформационным перестройкам, необходимым для реализации их специфических функций [1]. Считается, что решающее значение для функционально значимых конформационных изменений имеют быстрые стохастические структурные флуктуации в пико или наносекундном временном интервале [2] между различными конформационными подсостояниями белковых молекул [3]. Полагают, что белки характеризуются большим набором этих конформационных подсостояний, разделенных локальными энергетическими барьерами и отражающих сложные рельефы их энергетических поверхностей. Поскольку

высоты данных энергетических барьеров могут значительно варьировать, временная шкала белковой подвижности может охватывать диапазон в несколько порядков величины [4, 5].

При понижении температуры стохастическая белковая подвижность замедляется и может локализоваться на временной шкале, характерной для специфического функционального процесса, осуществляемого конкретным белком. На динамические характеристики белка существенное воздействие оказывают также тип и количество окружающих его молекул растворителя (прежде всего — воды). Эти молекулы создают локальный поверхностный слой, который может действовать как пластификатор или, наоборот, как стабилизатор конформационных мод, соответственно облегчая или затрудняя переходы между конформационными

ми подсостояниями [3, 6]. Следовательно, подвижность белка, влияющая на его функциональную активность, может быть модифицирована не только с помощью температурного фактора, но и путем внедрения белка в матрицу полимерного геля, сольватации различными криорастворителями и дегидратации [6–10].

Флуоресцентная спектроскопия триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного внутреннего индикатора конформации белков, их динамики, межмолекулярных взаимодействий. Известно, что динамическое (спектрально-кинетическое) поведение молекул триптофана (Trp) очень чувствительно к состоянию окружающей среды [11, 12]. Флуоресценция индольного хромофора высокочувствительна к состоянию его окружения, в результате чего он является индикатором даже небольших изменений в этом окружении [13]. Если структура белков известна, то изменения триптофановой флуоресценции могут быть, в принципе, интерпретированы в терминах структурных изменений на уровне атомного разрешения. В качестве показателя состояния внутримолекулярной динамики белка, в том числе при понижении/повышении температуры, уже давно определяют положение максимума спектра флуоресценции белковых триптофанилов, характеризующее релаксационными параметрами полярного окружения возбужденного хромофора [14, 15]. Сложнее обстоит ситуация с интерпретацией влияния состояния окружения на длительность флуоресценции белковых триптофанилов. Детальное выяснение природы локальных изменений окружения триптофановых остатков в структуре белка, влияющих на регистрируемые в эксперименте температурные зависимости длительности флуоресценции, требует тщательных комплексных исследований. Возможным подходом на этом пути является изучение температурных зависимостей времен жизни флуоресценции Trp в различных средах.

Исследование динамики окружения возбужденных биологических молекул, ее влияния на фотофизические и фотохимические переходы в таких системах, роли водородных связей в динамике этих переходов остается актуальной экспериментальной и теоретической задачей. В свое время академик В.И. Гольдманский в ряде пионерских работ уделил большое внимание объяснению нарушения зеркальной симметрии биологических молекул при их возбуждении в результате неравновесного фазового перехода окружающей среды [16]. Он отмечал, что эксперименты по моделированию процесса возникновения и нарушения асимметрии в хиральных системах до настоящего времени практически ограничивались лишь экспериментами с различными биомолекулами (и некоторыми исследованиями связи матричного синтеза олигонуклеотидов с хиральным составом среды), причем изучались в основном про-

цессы деструкции или каталитического синтеза. Однако экспериментальный поиск необходимо вести и в направлении реализации систем, в которых цепи физико-химических превращений создают положительные обратные связи по хиральной поляризации продуктов — систем со спонтанным нарушением зеркальной симметрии. В.И. Гольдманский отмечал, что интерес представляют и эксперименты по исследованию процесса стабилизации хиральности молекул изомеров в твердых телах и растворах при низких температурах, которые моделировали бы условия перехода фотоактивных молекул в несимметричную форму, фактически предлагая тем самым измерять температурные зависимости процессов переходов фотоактивных белков для таких систем.

В представленном обзоре наших работ в качестве модельной системы исследовались фотофизические переходы в возбужденных молекулах триптофана, находящихся в разном микроокружении (в водном растворе, в глицерине, в водном растворе трегалозы, в водно-белковой среде). Проводились исследования температурных зависимостей кинетики флуоресценции Trp. Для некоторых сред данные температурные зависимости носили аномальный характер. Для объяснения такого аномального характера использовалась концепция неравновесного фазового перехода в данных средах, приводящих к нелинейному взаимодействию возбужденных состояний Trp с окружением, вызывающему изменение их конформационного состояния. При этом в водных растворах существенное влияние на динамику таких переходов возбужденных молекул триптофана оказывают водородные связи.

ПЕРЕХОДЫ МЕЖДУ РОТАМЕРАМИ ТРИПТОФАНА В ВОЗБУЖДЕННОМ СОСТОЯНИИ

В литературе уже давно было отмечено, что кинетика флуоресценции триптофана в водном растворе состоит из двух-трех отчетливых компонент в зависимости от pH и трех компонент в присутствии органических растворителей типа метанола, этанола или диметилсульфоксида. Это объясняется наличием ротамеров вокруг связи α -C– β -C [17, 18]. При этом наблюдение двух, а не трех компонент может быть обусловлено близкими временами жизни двух компонент или незначительным квантовым выходом одного из них. Также понижение температуры, согласно работе [19], может приводить к “вымораживанию” определенных ротамеров. Данная точка зрения впоследствии подтверждалась во многих исследованиях [20–24].

Наши исследования температурных зависимостей длительности флуоресценции триптофана в 50%-ном водно-глицериновом растворе и в 1 М водном растворе трегалозы показали, что при

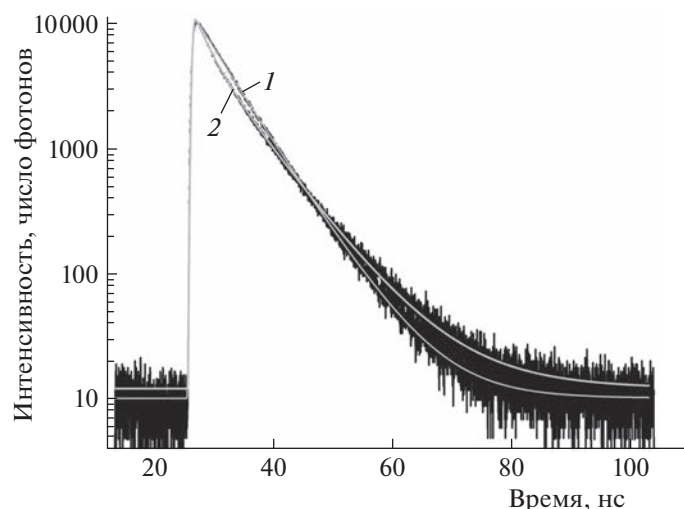


Рис. 1. Кинетические кривые затухания флуоресценции триптофана в водно-глицерином растворе при температуре -100 (1) и -30°C (2).

комнатной температуре кинетика флуоресценции в обоих случаях хорошо аппроксимируется тремя экспонентами со временами $\tau_1 \approx (4 \pm 0.05)$ нс, $\tau_2 \approx (6.5 \pm 0.08)$ нс и $\tau_3 \approx (12.5 \pm 0.2)$ нс. Согласно нашим результатам [25], сложный характер кинетики затухания флуоресценции молекул триптофана в растворе и в составе белков можно объяснить наличием трех возможных ротамеров индольных колец вокруг связи $\alpha\text{-C}-\beta\text{-C}$, возникающих в результате электростатических взаимодействий в молекуле Тгр. При этом заселенность одного из ротамеров обычно существенно выше, чем двух других. В свою очередь, из двух последних ротамеров один также преобладает по заселенности. В случае, когда молекулы триптофана находятся в составе белковой матрицы, в дополнение к явным ротамерам боковой цепи Тгр специфической причиной гетерогенности кинетики регистрируемого сигнала флуоресценции являются микроконформационные состояния белков в локальном окружении индольного кольца. Поэтому для белков правильнее говорить о конформерах вместо ротамеров [20]. Для описания кинетики затухания флуоресценции триптофанов в белке больше подходит непрерывное распределение времен жизни, чем описание с использованием дискретного набора экспонент. Физической основой для таких распределений являются взаимные переходы между различными конформациями, каждая из которых характеризуется квазиконтинуумом энергетических подсостояний для триптофанового остатка в различных окружениях [20]. Вместе с тем и описание дискретными экспонентами, очевидно, может дать адекватную качественную картину характера происходящих в исследуемых образцах изменений состояния флуоресцирующих хромофоров при широком варьировании

температуры среды. Мы смоделировали эту ситуацию для регистрируемой температурной зависимости кинетики флуоресценции водных растворов триптофана в глицерине и трегалозе.

На рис. 1 приведены экспериментальные кинетические кривые затухания флуоресценции триптофана и их аппроксимация при температурах -100 и -30°C . Видно, что трехэкспоненциальное приближение хорошо описывает кинетику затухания флуоресценции. Точность определения при данном трехэкспоненциальном приближении (95%-ный доверительный интервал) короткой компоненты времени затухания флуоресценции составляет примерно ± 50 пс, промежуточной компоненты — ± 80 пс и длинной компоненты — ± 200 пс. Пример полученного набора спектров DAS (decay associated spectra) разложения кинетик флуоресценции в трехэкспоненциальном приближении для триптофана в водно-глицериновой среде при температурах -100 и -30°C показан на рис. 2.

Результаты анализа спектрально-временных параметров флуоресценции (рис. 1) показали, что в исследуемых образцах при низких температурах триптофан присутствует главным образом в двух ротамерных формах, отвечающих коротковолновой (“голубой”, В) и длинноволновой (“красной”, R) областям спектра флуоресценции. При температуре жидкого азота В-форма характеризуется временем жизни $\tau_1 \approx 4.8$ нс и максимумом флуоресценции в спектре при $\lambda \approx 295$ нм; R-форма при этой температуре имеет время жизни флуоресценции $\tau_2 \approx 6.5$ нс с максимумом при $\lambda \approx 315$ нм. Вклад третьей формы с $\tau_3 = 12.5$ нс мал, и в последующем кинетическом анализе мы его не учитывали.

Из приведенных данных следует, что длительности компонент кинетики затухания флуорес-

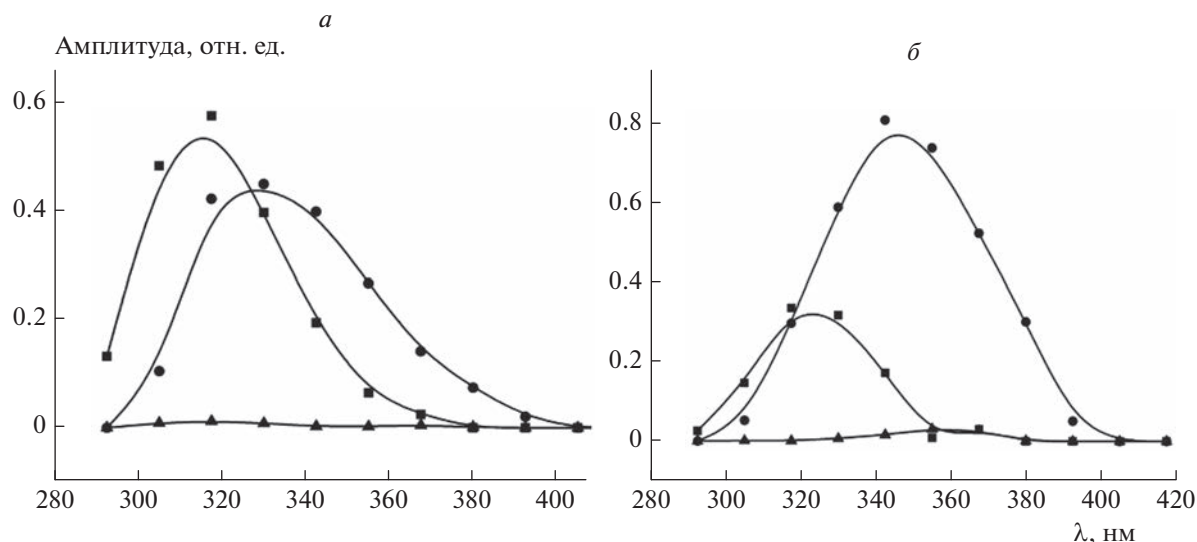


Рис. 2. Спектральное распределение амплитуд при трехэкспоненциальном разложении кинетики затухания флуоресценции триптофана при температурах -100 (а) и -30 °С (б); ■, ●, ▲ – спектры быстрого, промежуточного и медленного компонентов кинетики флуоресценции.

ценции (рис. 3) и их спектральные амплитуды (данные не приводятся) существенным образом зависят от температуры. Наиболее характерным для триптофанов как в водных растворах глицерина и трегалозы является существование температурной области, в которой времена жизни флуоресценции В- и R-форм изменяются антибатно. Длительность третьей компоненты во всей области температур была практически постоянной (данные не приводятся), при этом ее спектральная амплитуда оставалась незначительной (рис. 2). Как видно из рис. 3, переход части В-формы ротамеров в R-форму, попадает в область температур выше -50 °С. Это та область, в которой происходит размораживание исследованных нами застеклованных растворов. Так, по данным дифференциальной сканирующей калориметрии для $\sim 30\%$ -ного (по весу) раствора трегалозы в воде точка стеклования (T_g) составляет около -42 °С [26]. Согласно данным из работы [26], раствор трегалозы при этой концентрации частично кристаллизуется в ходе нагревания в интервале между температурами стеклования и плавления (около -10 °С). Иными словами, в ходе нагревания застеклованного раствора в этой области происходят существенные изменения внутримолекулярной динамики системы, которые и приводят к наблюдаемому переходу между ротамерами триптофана. Сходные процессы, очевидно, протекают и в ходе нагревания замороженного 50%-ного раствора глицерина. Очевидно, что состав растворителя, определяющий механизм его взаимодействия с индольным ядром и аланильной боковой цепью молекулы Trp, явным образом влияет на величину конкретных соотношений популяций разных

ротамеров, фиксируемых при самой низкой температуре (-170 °С).

Из табл. 1 видно, что по сравнению с чисто водным раствором точка, соответствующая температуре половинного сдвига λ_{max} первой компоненты τ_1 , смещается к ≈ -30 и ≈ -40 °С в растворах, содержащих по 50% глицерина и ДМСО соответственно. При увеличении содержания глицерина и ДМСО до 75% эта точка снова смещается к более высоким температурам: к -12 и -22 °С соответственно. Этот факт является дополнительным подтверждением связи температурной области регистрируемых нами переходов между ротамерами Trp с молекулярной динамикой окружающего растворителя. Действительно, температуры затвердевания водных растворов как глицерина, так и диметилсульфоксида (ДМСО) немономонно зависят от соотношения глицерин/ H_2O и ДМСО/ H_2O . При смешивании двух чистых компонентов растворителя – глицерина и H_2O температура затвердевания (замерзания) раствора понижается по мере увеличения массовой доли глицерина вплоть до -38 °С при 70%-ном содержании глицерина. При дальнейшем же увеличении концентрации глицерина температура замерзания резко повышается. Аналогичная картина наблюдается и с водными растворами ДМСО с тем уточнением, что минимальные температуры затвердевания смеси ДМСО/ H_2O еще более низкие, чем у смесей глицерина с водой [27–29]. Что касается раствора трегалозы, то на основании второго закона Рауля [30] можно оценить, на какую величину должна понизиться температура замерзания чистой воды в присутствии 1 М трегала-

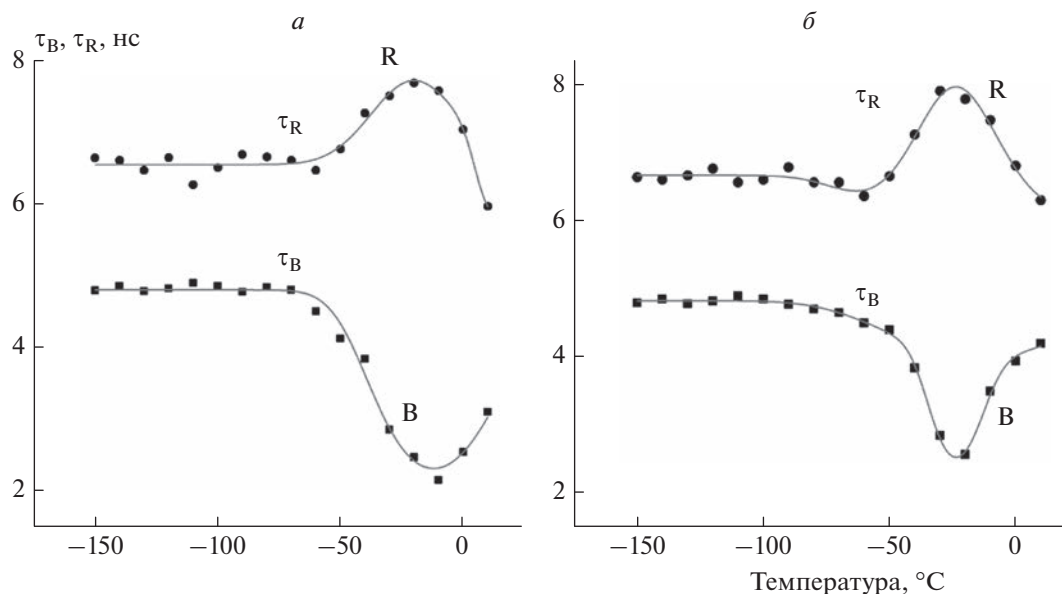


Рис. 3. *а* – Температурная зависимость длительности флуоресценции В- и R-форм триптофана в водно-глицериновом растворе; *б* – температурная зависимость длительности флуоресценции В- и R-форм триптофана в трегалозе.

лозы. Оказывается, что эта температура составляет $\sim -3^\circ\text{C}$, что практически совпадает с величиной половинного сдвига λ_{max} первой компоненты кинетики флуоресценции Тгр в растворе трегалозы: -5°C (см. табл. 1).

Таким образом, при определенной температуре в среде возникают условия для перехода части В-формы ротамеров в R-форму. Как будет показано ниже, это происходит в результате попадания точки пересечения электронных поверхностей возбужденных состояний двух форм ротамеров в область перекрывания спектров локальных колебаний этих ротамеров в данной области энергии. Как следствие, происходит увеличение скорости затухания флуоресценции В-формы ротамеров (уменьшение времени жизни) и замедление скорости затухания флуоресценции R-ротамеров (увеличение времени жизни). Условия для перехода $\text{B}^* \rightarrow \text{R}^*$ носят резонансный характер типа гауссовой зависимости, аналогичный характеру перекрытия спектров локальных колебаний.

Отвечающие длительностям флуоресценции τ_1 , τ_2 и τ_3 типы ротамеров триптофана 1, 2, 3 определяются смещением индольного кольца вокруг связи $\alpha\text{-C}-\beta\text{-C}$ на различные углы: 0° , 60° и 120° соответственно. Переход от ротамера 1* к ротамеру 2* (звездочка обозначает возбужденные состояния ротамеров) сопряжен с преодолением потенциального барьера ~ 4.4 ккал/М ($E_a \approx 1550$ см $^{-1}$) [31]. Предлагаемая схема динамики потенциальных поверхностей для акцептирующих мод ротамеров Тгр в возбужденном состоянии показана на рис. 4.

Принцип работы этой схемы (рис. 4) состоит в следующем. При таком расположении потенциальных поверхностей вследствие большой величины энергии активации E_a надбарьерный переход из B^* - в R^* -форму затруднен. Однако если предположить, что при повышении температуры взаимное положение индольных колец триптофана изменяется, потенциальная поверхность B^* -формы может сблизиться с потенциальной поверхностью R^* -формы, при этом условия для перехода $\text{B}^* \rightarrow \text{R}^*$ существенно облегчаются. Можно отметить, что переходы между различны-

Таблица 1. Зависимость отношения спектральных вкладов A_1/A_2 и температуры половинного сдвига λ_{max} спектра первой компоненты кинетики флуоресценции Тгр от растворителя

Растворитель	A_1/A_2 (-170°C)	Температура половинного сдвига λ_{max} первой компоненты флуоресценции, $^\circ\text{C}$
H_2O	1.54	-20
Глицерин – 50%	1.86	-30
Глицерин – 75%	2.3	-12
ДМСО – 50%	≈ 1	-40
ДМСО – 75%	≈ 1	-22
Трегалоза – 1 М	1.27	-5

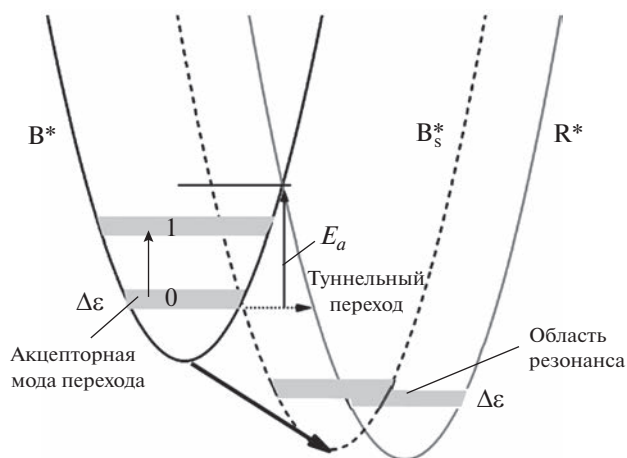


Рис. 4. Схема динамики потенциальных поверхностей возбужденных состояний ротамерных форм триптофана V^* и R^* при повышении температуры. Жирной стрелкой показано движение потенциальной поверхности V^* к потенциальной поверхности R^* при изменении температуры; E_a — энергия активации перехода $V^* \rightarrow R^*$; 0, 1 — нулевой и первый колебательный уровни энергии V -ротамера; $\Delta\epsilon$ — ширина спектра акцепторной моды.

ми ротамерными формами Тгр в некотором приближении аналогичны переходам в возбужденных фотоактивных биологических молекулах, сопровождающимся изменением их симметрии [16].

Для описания безызлучательных переходов в ароматических молекулах типа бензола справедливо приближение локальных мод, когда в качестве акцепторных мод рассматриваются различные колебания валентных связей [32]. Для ароматических циклических соединений акцепторные моды перехода связаны с колебаниями $C-H$ групп, при этом расстояния между колебательными уровнями достаточно велики (рис. 4). Мы считаем, что для перехода $V^* \rightarrow R^*$ активными являются деформационные колебания вне плоскости индольного макроцикла, частота которых составляет $\sim 1300 \text{ см}^{-1}$ [33].

При низких и комнатных температурах акцептирующая мода перехода $V^* \rightarrow R^*$ с подавляющей вероятностью находится в основном состоянии (рис. 4), при этом расстояние между нулевым и первым колебательными уровнями составляет для деформационных колебаний $\sim 1300 \text{ см}^{-1}$. При достаточно высокой энергии реорганизации среды активационный барьер перехода является большим (рис. 4, E_a). В результате при обычных условиях переход V^* -формы ротамера в R^* -форму происходит по туннельному механизму с низкой скоростью.

В области температуры стеклования среды в ближайшем окружении молекулы триптофана могут происходить значительные флуктуации

структуры, в том числе микроконформационные переходы, связанные с перестройкой водородных связей и зарядовых групп. Такой процесс может вызывать поворот индольного кольца ротамера в V^* -форме на некоторый угол в направлении к его положению в R^* -форме, что приводит к смещению потенциальной поверхности V^* -состояния в сторону потенциальной энергии R^* -состояния и, как следствие, к уменьшению энергии реорганизации и снижению активационного барьера перехода $V^* \rightarrow R^*$ (рис. 4). Более того, при определенной температуре может произойти совпадение колебательных спектров акцепторной моды для разных потенциальных поверхностей, в результате чего деформационная колебательная мода становится активной для перехода $V^* \rightarrow R^*$.

На рис. 4 этот момент изображен промежуточным положением потенциальной поверхности V^* . Таким образом, при изменении температуры может происходить совмещение (резонанс) спектров локальных колебаний молекулы ротамера триптофана в возбужденном состоянии для V^* - и R^* -форм.

При дальнейшем увеличении температуры происходит нарушение этого резонанса. При этом время затухания τ_b начинает возвращаться к первоначальному значению, составляющему 4.8 нс. Однако время затухания τ_R не возвращается к величине в 6.5 нс, а продолжает уменьшаться и при $T > 0^\circ \text{C}$ падает ниже 6 нс, так как для R -формы, вероятно, открывается свой канал дополнительного тушения флуоресценции, например канал перехода данного ротамера в третью форму.

Отметим, что правильное описание антибатного характера температурной зависимости компонентов кинетики затухания флуоресценции триптофана возможно только в предположении, что переход $V \rightarrow R$ происходит в возбужденном состоянии молекулы Тгр.

ДИНАМИКА ПЕРЕХОДОВ МЕЖДУ ВОЗБУЖДЕННЫМИ СОСТОЯНИЯМИ ТРИПТОФАНА С УЧАСТИЕМ СОСТОЯНИЯ С ПЕРЕНОСОМ ЗАРЯДА

Для объяснения антибатного характера наблюдаемых температурных зависимостей можно также использовать модель, описывающую переход молекулы Тгр из возбужденного состояния (Trp^*) в состояние с разделенными зарядами ($\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$, где CTS — состояние с переносом заряда (Charge Transfer State)), обратный переход $\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$, а также излучательный и безызлучательный переходы CTS в основное состояние. Физический смысл процессов перехода в данной модели иной, чем в ротамерной модели, использованной нами в работе [34]. Суть отличий состоит в том, что в ротамерной модели трехкомпо-

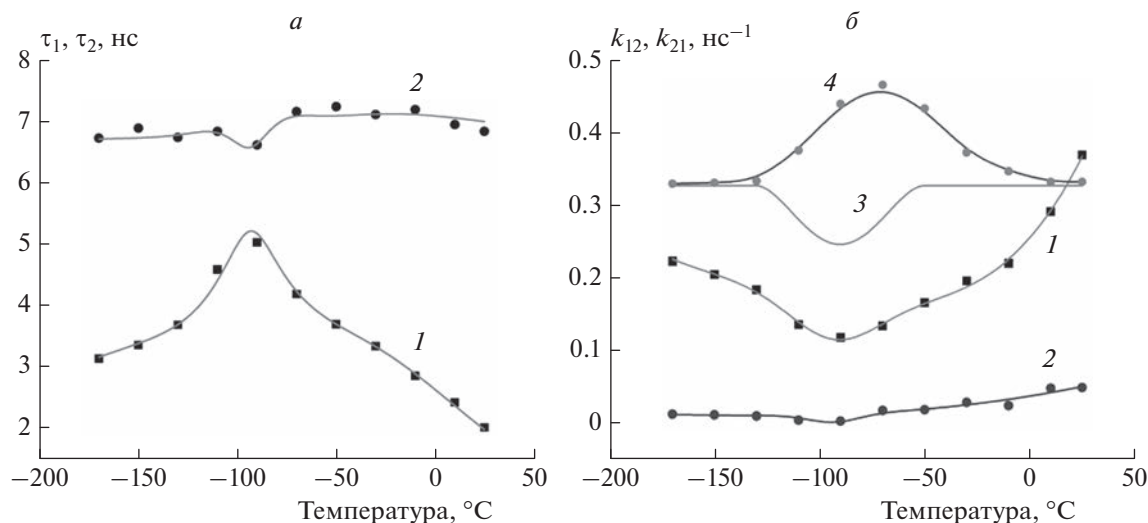


Рис. 5. *a* — Температурная зависимость τ_1 (1) и τ_2 (2) — быстрой и медленной компонент времен кинетики затухания флуоресценции триптофана в водном растворе; *б* — температурная зависимость констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ (1) и k_{21} обратного перехода $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ в возбужденное состояние триптофана (2); 3 — вид температурной зависимости $\Delta G(T)$ для триптофана в водном растворе; 4 — вид температурной зависимости скорости сольватационного сдвига $\Delta\lambda_m(T)/\Delta T$ спектра флуоресценции триптофана в водном растворе; кривые 3 и 4 приведены для наглядности.

нентное свечение Тгр объясняется присутствием трех разных центров свечения, тогда как в новой модели три компоненты в кинетике затухания флуоресценции являются следствием других физических процессов, описывающих дезактивацию Trp^* с участием промежуточного состояния с переносом заряда.

В последнее время в ряде работ появились сведения, что кинетика флуоресценции собственно ротамерных форм Тгр моноэкспоненциальна, причем длительности флуоресценции разных ротамеров различаются незначительно [35]. При этом тушение флуоресценции какой-либо ротамерной формы триптофана и связанный с этим многокомпонентный характер кинетики затухания флуоресценции Тгр в белках объясняются возникновением дополнительного канала дезактивации возбужденного состояния Тгр — переноса электрона с возбужденного индольного кольца на амидные группы основного скелета триптофана либо на его электрон-акцепторные боковые связи. В белке также возможен перенос протона с ближайших аминокислот, например с тирозина на индольное кольцо [36].

Для объяснения природы многокомпонентного свечения триптофана в водном растворе, а также механизмов тушения флуоресценции Тгр в работе [37] выдвинуто предположение, что при возбуждении его молекул происходит делокализация электронной плотности между индольным кольцом и соседними молекулами воды. При этом происходит напряжение сети водородных связей,

приводящее к сильному сдвигу спектра флуоресценции Тгр в водном растворе в длинноволновую область. Как следует из наших экспериментальных данных, это предположение справедливо только в определенном температурном диапазоне ($-50 \div 10^\circ\text{C}$), в котором регистрируются широкие полосы с длинным крылом как в спектре поглощения, так и в спектре флуоресценции, а также происходит сдвиг спектра флуоресценции быстрой компоненты на ~ 20 нм. В остальной области температур перенос электрона может происходить на амидные группы основного скелета молекулы Тгр, либо на обладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Кроме того, мы предположили, что состояние с переносом заряда может переходить обратно в возбужденное состояние триптофана, а также в основное состояние за счет излучательного и безызлучательного процессов. В этом случае моноэкспоненциальная кинетика затухания флуоресценции Тгр приобретает двухкомпонентный характер. Для исследования данных процессов были измерены температурные зависимости времени и скоростей затухания флуоресценции триптофана в водной среде (рис. 5).

Процессы, происходящие при возбуждении триптофана в водном окружении, можно представить в виде модельной схемы, показанной на рис. 6. Эта схема использовалась для проведения целевого анализа (“Target analysis”) кинетики затухания флуоресценции Тгр и определения параметров, характеризующих динамику процессов

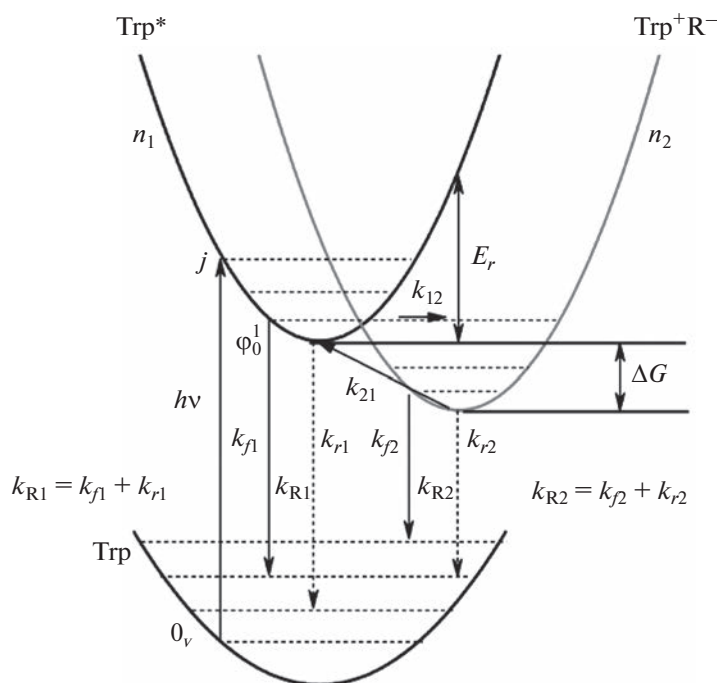


Рис. 6. Модельная схема кинетических переходов в триптофане. Обозначения: n_1 , n_2 — населенности возбужденного состояния молекул Tgr и состояния с переносом заряда; Tgr^+R^- — состояние с переносом заряда (CTS), где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Tgr, так и амидные группы пептидных связей с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Tgr; k_{R1} — константа скорости затухания возбужденного состояния Tgr, включающая флуоресценцию (k_{J1}) и безызлучательную релаксацию (k_{r1}): $\text{Tgr}^* \xrightarrow{k_{R1}} \text{S}_0$ ($k_{R1} = k_{J1} + k_{r1}$); k_{R2} — константа скорости затухания CTS, включающая флуоресценцию (k_{J2}) и безызлучательную релаксацию (k_{r2}): $\text{Tgr}^+\text{R}^- \xrightarrow{k_{R2}} \text{S}_0$; k_{12} — скорость перехода $\text{Tgr}^* \rightarrow \text{CTS}$; k_{21} — скорость рекомбинации зарядов CTS с образованием Tgr^* .

при возбуждении Tgr в водной среде. При аппроксимации кинетики флуоресценции на основе схемы рис. 6 определенные параметры приходилось задавать априори из известных спектроскопических данных: например, константа скорости затухания флуоресценции Tgr полагалась равной обратному времени затухания флуоресценции компонента τ_3 , составлявшему 14.5 нс; константа скорости излучательного перехода CTS в основное состояние молекулы триптофана оценивалась по ширине полосы минорной формы (S2) спектра флуоресценции Tgr (рис. 7) и принималась равной 8 нс^{-1} .

Остальные параметры кинетической схемы (рис. 6) определялись в процессе аппроксимации кинетики затухания флуоресценции. При этом предполагалось, что состояние с делокализованным электроном в системе водородных связей существует только в области температур $-50 \div 10^\circ\text{C}$. По нашему мнению, в области температур $-170 \div -50^\circ\text{C}$ тушение флуоресценции Tgr и немонотонноэкспоненциальный характер кинетики затухания флуоресценции обусловлены переносом электрона с возбужденного индольного кольца молекулы Tgr на амидные группы основного скелета либо на об-

ладающие электрон-акцепторными свойствами боковые пептидные связи. Этот процесс сопровождается образованием состояния с переносом заряда и обратным переходом в возбужденное состояние индольного кольца, а также возможной релаксацией CTS в основное состояние.

Описываемая схема кинетических процессов (рис. 6) применима также и для описания переходов между ротамерными формами Tgr, приводящих к антибатной температурной зависимости времени жизни компонент в кинетике флуоресценции [34]. В математическом плане использованная нами в работе [34] модель перехода одной ротамерной формы в другую сходна с моделью, описывающей переходы каждой ротамерной формы в состояние с переносом заряда с учетом обратного перехода. Для ответа на вопрос, какая модель физически более адекватно описывает переходы в возбужденном состоянии молекулы Tgr, необходимы дополнительные экспериментальные измерения изменения во времени оптической плотности в области поглощения триптофана.

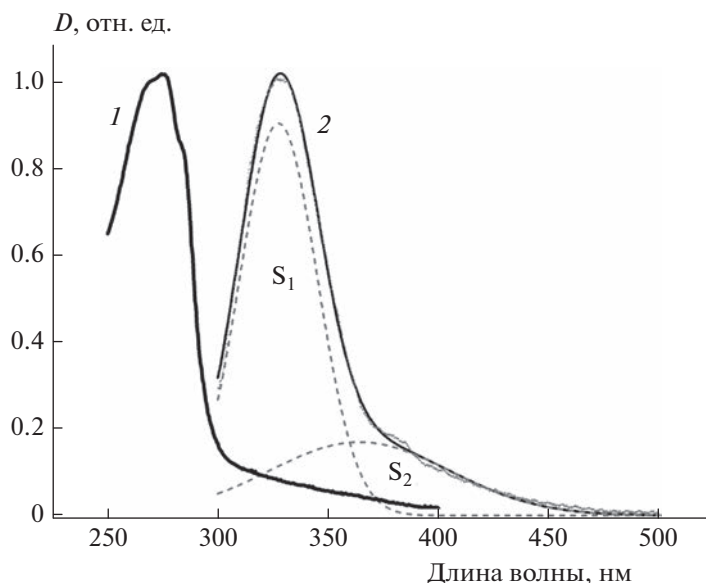


Рис. 7. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) триптофана в водном растворе при комнатной температуре. Приведено разложение спектра флуоресценции Тгр на две гауссовы компоненты (формы) — S1 и S2.

РОЛЬ ДИНАМИКИ ВОДОРОДНЫХ СВЯЗЕЙ В ДЕЗАКТИВАЦИИ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ТРИПТОФАНА

Остановимся теперь на возможной роли динамики водородных связей в дезактивации возбужденных состояний триптофана. В работе [38] методом квазиупругого рассеяния нейтронов были определены три основных температурных области, определяющие динамику протонов водородных связей в водно-белковой среде. В области I ($T < -150^\circ\text{C}$) происходят чисто гармонические колебания протонов около равновесных положений, в области II ($-150 \leq T < -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды характеризуется скачкообразной диффузией протонов вдоль Н-связей в пикосекундном временном диапазоне. В температурной области III ($T > -30^\circ\text{C}$) происходят более медленные масштабные движения крупных молекулярных фрагментов [38].

В водном растворе триптофана в температурной области III формируется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей молекулы Тгр с водным окружением [37]. В результате вокруг образовавшегося цвиттерионного комплекса образуется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами пептидных связей Тгр [37, 38]. Кроме того, в электронно-возбужденном состоянии молекулы Тгр может происходить дополнительное упорядочивание Н-связей за счет увеличения их жесткости [37]. В результате в достаточно упорядоченной системе Н-связей может образоваться квазизона проводимости, в которой электрон, находящийся на индольном кольце возбужден-

ной молекулы Тгр, делокализуется и затем может перейти на N—Н-группы пептидных связей с образованием CTS [37].

Данный эффект возможен при достаточно низких температурах, причем скорость переноса электрона от индольного кольца Тгр* в систему водородных связей должна увеличиваться при понижении температуры. При высоких температурах за счет тепловых колебаний молекул квазизона проводимости разрушается, а перенос электрона с индольных колец на амидные группы будет проходить по термоактивационному механизму. В температурной области II возможно также дополнительное упорядочивание Н-связей аналогично структурному фазовому переходу в сегнетоэлектрических кристаллах с Н-связями типа сегнетовой соли [39]. Этот процесс реализуется при таких низких температурах, когда взаимодействие диполей Н-связей молекул воды уже достаточно велико для их взаимного упорядочивания, но энергия теплового движения еще слишком мала, чтобы вызвать их разупорядочивание. Вследствие этого происходит диффузионный перескок протонов по Н-связям [38], что приводит к образованию суммарного дипольного момента в окружении молекулы Тгр*, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Тгр. В результате за счет кулоновского взаимодействия Тгр* с диполями Н-связей происходит сильный сдвиг спектра флуоресценции в водном растворе в длинноволновую область.

Итак, мы проанализировали температурную зависимость кинетики затухания флуоресценции

триптофана в разных растворителях, рассмотрели возможность использования состояния с переносом заряда для описания процессов дезактивации возбужденного состояния молекулы триптофана [40] и предложили адекватную физическую модель переходов молекулы Трп между возбужденным и основным состояниями с привлечением состояния с переносом заряда. Именно включение CTS в процесс дезактивации приводит к возникновению нелинейной динамики этих переходов. При этом особый акцент был сделан на выяснение роли динамики водородных связей ближайшего окружения триптофана, а также на изучение особенностей спектральных и кинетических характеристик его флуоресценции в широком диапазоне изменений температуры. Согласно схеме электронных переходов в молекуле Трп, показанной на рис. 6, кинетика затухания флуоресценции Трп имеет двухкомпонентный характер.

Дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит по двум каналам — с испусканием флуоресценции (k_f) и безызлучательной релаксацией (k_r) в основное состояние ($k_{R1} = k_f + k_r$), а также с переходом в промежуточное состояние — состояние с переносом заряда, (Trp^+R^-) со скоростью k_{12} , рекомбинирующее затем со скоростью k_{21} обратно в состояние Трп*. Согласно изложенному в работе [37], помимо обратного перехода в S^* -состояние распад CTS также может происходить с испусканием флуоресценции и безызлучательной релаксацией в основное состояние. Двухкомпонентное свечение Трп* характеризуется двумя спектральными формами, S_1 и S_2 , присутствующими в разложении спектра флуоресценции с различными временами жизни. Мы предполагаем, что форма S_1 в спектре флуоресценции Трп соответствует излучательному переходу S^* -состояния в основное состояние, тогда как компонента S_2 соответствует излучательному переходу CTS в основное состояние.

В последние годы исследованию динамики водородных связей в окружении возбужденных молекул Трп и их влиянию на фотофизические и фотохимические переходы в этих системах уделяется большое внимание [40–44]. В частности, в работе [37] было показано, что в водном растворе образуется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей с молекулой Трп. Вокруг этого комплекса формируется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами Трп [37, 44].

В ближайшем окружении возбужденной молекулы Трп может происходить укорочение длин и, как следствие, усиление Н-связей молекул воды, взаимодействующих с электрическим полем индольной части молекул Трп. В результате увеличивается жесткость этих связей и происходит их дополнительная упорядоченность [37]. В свою оче-

редь, в упорядоченной системе Н-связей может формироваться квазизона проводимости, на которую электрон переходит от индольной части возбужденной молекулы Трп и делокализуется. Затем делокализованный электрон может перейти на амидные группы и образовать состояние с переносом заряда [37]. Такой процесс наиболее вероятен в области достаточно низких температур (область I). При этом при дальнейшем понижении температуры скорость переноса электрона от индольной части Трп* в систему водородных связей должна увеличиваться.

В области более высоких температур (области II и III) за счет тепловых флуктуаций молекул растворителя квазизона проводимости вырождается. Таким образом, перенос электрона с индольной части на амидные группы будет идти уже по термоактивационному механизму. В окрестности возбужденной молекулы триптофана в системе водородных связей возможен также конформационный (фазовый) переход, приводящий к возникновению в этой системе электрического дипольного момента [39]. Этот процесс может происходить в определенном интервале температур: $T_1 < T < T_2$, когда энергия теплового движения протонов достаточно велика для их перескоков вдоль водородной связи ($T > T_1$), однако все еще остается меньше энергии взаимодействия диполей Н-связей молекул, что позволяет сохранить упорядоченность ($T < T_2$) [39]. В результате происходит перестройка системы водородных связей за счет диффузионного перескока протонов по Н-связям [38], что приводит к образованию суммарного дипольного момента, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Трп. При этом изменение состояния системы водородных связей в окрестности Трп* играет роль мягкой моды, т.е. критической подсистемы, испытывающей фазовый переход в результате взаимодействия дипольных моментов водородных связей в области температур $T_1 < T < T_2$ [39]. Кулоновское взаимодействие Трп* с суммарным дипольным моментом системы водородных связей будет вызывать значительный сдвиг спектра флуоресценции триптофана в водно-белковой среде в длинноволновую область.

Детально исследованы температурные зависимости быстрого и медленного компонентов кинетики затухания флуоресценции и динамику спектров флуоресценции водного раствора триптофана в температурном диапазоне от -170 до 20°C . Нелинейный характер зависимостей τ_1 и τ_2 от температуры был объяснен возникновением дополнительного канала дезактивации Трп* — переноса электрона от индольной части молекулы триптофана на Н-связи водного окружения и затем — на ее амидные группы. В результате образу-

ется состояние с переносом заряда — комплекс Trp^+R^- . Деактивация этого CTS происходит как в результате обратного перехода из данного состояния в возбужденное состояние Trp , так и за счет флуоресценции, либо в процессе релаксации в основное состояние.

Проведенный количественный анализ модели прямых и обратных электронных переходов в молекуле триптофана из возбужденного состояния в основное и в состояние с переносом заряда для образцов, замороженных в темноте и на свету, показал, что микроконформационные изменения для образцов, замороженных на свету, сохраняются с понижением температуры главным образом в системе водородных связей в окружении Trp^* и CTS. Было экспериментально обнаружено возникновение конформационных (фазовых) переходов в системе водородных связей в окружении Trp^* и CTS в температурном диапазоне от -80 до 20°C . В этом температурном диапазоне наблюдается нелинейное поведение таких параметров, как τ_1 , τ_2 , энергии активации E_a , а также скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции. Важно отметить, что в диапазоне температур $-110 \div -80^\circ\text{C}$ молекула Trp^* сольватируется быстрее, чем Trp^+R^- , тогда как при более высоких температурах ($T > -80^\circ\text{C}$) скорость сольватации этого комплекса становится больше, чем скорость сольватации Trp^* . Этот факт объяснен нами тем, что в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ в окружении CTS структурный (фазовый) переход захватывает большее число Н-связей, чем в окружении Trp^* . Именно в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ происходит отклонение температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного аррениусовского поведения с постоянным значением E_a . Таким образом динамика системы Н-связей играет определяющую роль в возникновении нелинейного характера изменения параметров, описывающих деактивацию Trp^* и CTS.

Анализ полученных в ходе исследований экспериментальных и теоретических кривых позволил выделить три области в спектре флуоресценции Trp : коротковолновую (В) при $300 < \lambda < 386$ нм, промежуточную (М) при $386 < \lambda < 400$ нм и длинноволновую (R) при $400 < \lambda < 470$ нм области, для которых температурная зависимость скорости образования CTS имеет различный характер. Оказалось, что в области В при изменении температуры от -80 до 20°C наблюдается отклонение температурной зависимости константы скорости k_{12} фазового перехода (рис. 8) от стандартного аррениусовского поведения с постоянной энергией активации. В температурной области $-80 < T < -20^\circ\text{C}$ константа скорости перехода k_{12} увеличивается до максимума при $T = -20^\circ\text{C}$. При дальнейшем росте температуры до 20°C происходит уменьшение k_{12} .

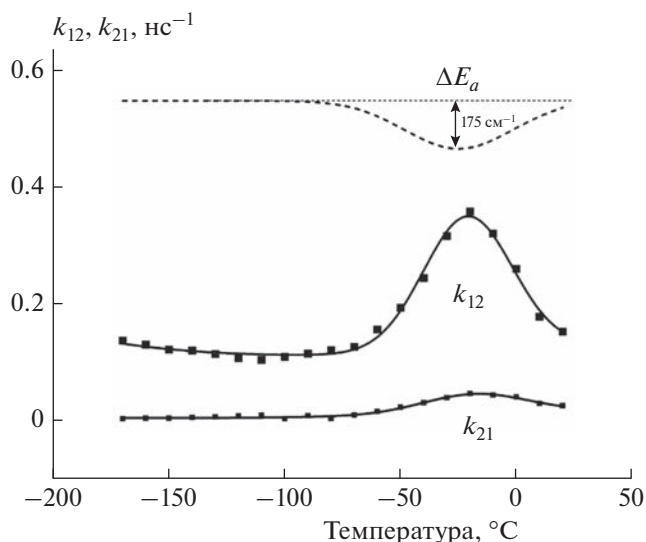


Рис. 8. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ и k_{21} обратной реакции $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$, а также энергии активации реакции ΔE_a образцов в коротковолновой спектральной области (В). Для наглядности здесь и ниже на рис. 9 и 10 приведен вид температурной зависимости ΔE_a .

Такую нелинейную колоколообразную зависимость скорости перехода возбужденного состояния Trp в состояние с переносом заряда по сравнению со стандартной реакцией с постоянной энергией активации E_a можно связать с возможным структурным фазовым переходом системы водородных связей в окружении Trp^* в области температур $-80 < T < 20^\circ\text{C}$. Действительно, система водородных связей в окрестности возбужденной молекулы триптофана при фазовом переходе в температурной области $T_1 < T < T_2$ перестраивается и описывается критической, мягкой модой [39], при которой протоны водородных связей переходят в новое положение равновесия. Возникающее электрическое поле индольной части возбужденной молекулы Trp способствует процессу фазового перехода в системе окружающих водородных связей, при этом важную роль играет их взаимное взаимодействие.

Сам коротковолновый (В) участок спектра флуоресценции при $300 < \lambda < 386$ нм соответствует излучению той части возбужденных молекул Trp , в окрестности которой система водородных связей находится в начале перестройки и испытывает флуктуации положений протонов вдоль водородных связей. Известно, что потенциальная энергия движения протонов вдоль водородных связей имеет вид двухъямного потенциала [39]. Под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы Trp энергия движения протонов становится выше потенци-

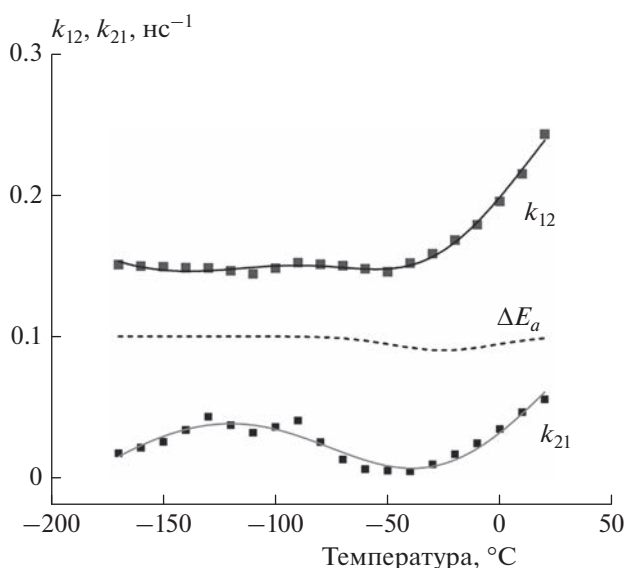


Рис. 9. То же, что и на рис. 8, но для образцов в спектральной области М.

альных барьеров потенциальных ям, в результате чего они могут определенное время двигаться вдоль водородных связей практически свободно. Также возможен переход протона вдоль водородной связи из одной потенциальной ямы в более близкую к индольной части потенциальную яму возбужденной молекулы Тгр по туннельному механизму. Данный механизм рассмотрен в работах [45, 46]. На этом участке спектра аномальный характер температурной зависимости константы скорости k_{12} перехода Тгр* в СТС можно объяснить уменьшением энергии реорганизации данной реакции за счет уменьшения коэффициента упругости (жесткости) части водородных связей при их перестройке в данной температурной области. При уменьшении энергии реорганизации процесса переноса электрона уменьшается и энергия активации этого перехода, так как при этом величина свободной энергии перехода, ΔG , остается еще практически постоянной. С ростом температуры количество взаимодействующих критических водородных связей, теряющих часть жесткости в начале фазового перехода, растет за счет увеличения числа эффективно взаимодействующих протонов, в результате чего продолжает уменьшаться энергия реорганизации перехода. Это приводит к уменьшению энергии активации перехода для В-участка спектра с ростом температуры, которая достигает минимума при температуре $T_m = -20^\circ\text{C}$. При этом значение константы скорости перехода k_{12} возбужденного состояния триптофана в СТС увеличивается и достигает максимума при этой же температуре (рис. 8).

При дальнейшем росте температуры от T_m до $T_2 = 20^\circ\text{C}$ растет тепловая энергия движения протонов, уменьшается количество взаимодействующих водородных связей мягкой моды, участвующих в фазовом переходе, что приводит к увеличению энергии реорганизации и соответствующему увеличению энергии активации. В результате при достижении максимальной температуры фазового перехода T_2 энергия активации возвращается к постоянной для стандартного термоактивационного перехода величине. При этом скорость перехода Тгр* $\rightarrow$ СТС уменьшается до величины, наблюдаемой при стандартном переходе с постоянной энергией активации (рис. 8). Это подтверждает высказанное ранее предположение, что в начале перестройки водородных связей в результате их взаимодействия, а также под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы Тгр образуется виртуальная (временная) зона проводимости системы водородных связей, которая приводит к увеличенной скорости перехода возбужденного состояния Тгр в состояние с переносом заряда СТС в коротковолновой области спектра (В).

Средний (М) участок спектра флуоресценции триптофана при $386 < \lambda < 400$ нм соответствует излучению той части возбужденных молекул триптофана, в окружении которых уже произошел фазовый переход некоторого числа водородных связей, сопряженный с возникновением дипольного момента системы водородных связей и восстановлением их жесткости. Такой фазовый переход приводит к увеличению энергии реорганизации перехода E_r и уменьшению ΔG , что вызывает соответствующий рост E_a . В то же время для оставшейся части возбужденных молекул система водородных связей все еще находится в состоянии перестройки и вносит вклад в уменьшение E_r и E_a . В результате в спектральной области М увеличение энергии активации за счет фазового перехода и соответствующего уменьшения ΔG компенсируется снижением величины E_a за счет уменьшения E_r для той части молекул, в окрестности которых перестройка системы водородных связей еще не завершена. При этом в спектральной области М энергия активации слабо зависит от температуры (рис. 9).

Для молекул Тгр*, флуоресцирующих на длинноволновом (R) участке спектра при $400 < \lambda < 470$ нм, фазовый переход водородных связей в окрестности возбужденных молекул триптофана в основном завершен. В этом случае водородные связи находятся в новом устойчивом положении за счет затухания флуктуаций движения протонов вдоль водородных связей. В результате увеличивается их жесткость, что вызывает соответствующее увеличение энергии реорганизации перехода. При этом в данной температурной области в окрест-

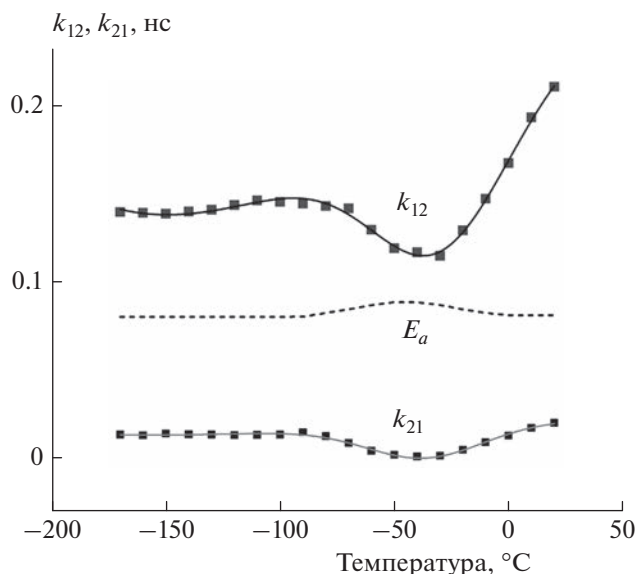


Рис. 10. То же, что и на рис. 8, но для образцов в спектральной области R.

ности возбужденных молекул Trp за счет смещения протонов возникает дополнительный дипольный момент в системе водородных связей. В результате взаимодействия электрического поля возникающего дипольного момента системы элементарных ячеек Н-связей с возбужденным электронным состоянием молекулы Trp происходит ее дополнительная сольватация, которая достигает максимума при $T_s = -40^\circ\text{C}$. Как следствие, в данной области температур происходит уменьшение свободной энергии перехода $\Delta G(T)$ и увеличение энергии активации перехода E_a (рис. 10). В результате в температурной области $-80 < T < -40^\circ\text{C}$ наблюдается уменьшение скорости перехода (рис. 10) и соответствующее увеличение времени жизни возбужденного состояния Trp* относительно стандартной аррениусовской зависимости данных величин с постоянной энергией активации (рис. 10). При росте температуры выше -40°C увеличивается тепловая энергия протонов водородных связей, нарушающая их взаимное взаимодействие, и происходит уменьшение $\Delta G(T)$. В следствие этого происходит уменьшение энергии активации E_a до значения стандартного аррениусовского перехода и, соответственно, увеличивается константа скорости k_{12} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментально обнаружено возникновение конформационных (фазовых) переходов в системе водородных связей в окружении Trp* и CTS в температурном диапазоне от -80 до 20°C . В этом температурном диапазоне наблю-

дается нелинейное поведение таких параметров, как τ_1 , τ_2 , энергии активации E_a , а также скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции. Важно отметить, что в диапазоне температур $-110 \div -80^\circ\text{C}$ молекула Trp* сольватируется быстрее, чем комплекс Trp⁺R⁻, тогда как при более высоких температурах ($T > -80^\circ\text{C}$) скорость сольватации этого комплекса становится больше, чем скорость сольватации Trp*. Этот факт объяснен тем, что в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ в окрестности CTS структурный (фазовый) переход захватывает большее число Н-связей, чем в окрестности Trp*. Именно в температурном диапазоне $-80 \div 20^\circ\text{C}$ происходит отклонение температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного аррениусовского поведения с постоянным значением E_a . Таким образом, динамика системы Н-связей играет определяющую роль в возникновении нелинейного характера изменения параметров, описывающих дезактивацию Trp* и CTS.

Отметим, что основные выводы из проведенных нами исследований температурной зависимости динамики фотофизических переходов возбужденных молекул триптофана очень сходны с результатами работ В.И. Гольданского, где обсуждается неравновесный фазовый переход в окружении возбужденных молекул для объяснения нарушения их симметрии.

Частичное финансирование работы осуществлялось в рамках госпрограммы № 121032500058-7.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Frauenfelder H., McMahon B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 4795.
2. Fitter J., Lechner R.E., Buldt G., Dencher N.A. // Ibid. 1996. V. 93. P. 7600.
3. Frauenfelder H., Sligar S.G., Wolynes P.G. // Science. 1991. V. 254. P. 1598.
4. Jackson T.A., Lim M., Anfinrud P.A. // Chem. Phys. 1994. V. 180. P. 131.
5. Johnson J.B., Lamb D.C., Frauenfelder H. et al. // Biophys. J. 1996. V. 71. P. 1563.
6. Paciarony A., Cinelli S., Onori G. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 1157.
7. Palazzo G., Mallardi A., Hochkoeppler A. et al. // Biophys. J. 2002. V. 82. P. 558.
8. Kriegl J.M., Forster F.K., Nienhaus G.U. // Biophys. J. 2003. V. 85. P. 1851.
9. Mei G., Di Venere A., Agro A.F., De Matteis F., Rosato N. // J. Fluorescence. 2003. V. 13. P. 467.
10. Malferrari M., Savitsky A., Mamedov M.D. et al. // Biophys. Acta. 2016. V. 1857. P. 1440.
11. Schlammadinger D.E., Gable J.E., Kim J.E. // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. P. 14769.
12. Dashnau J.L., Zelent B., Vanderkooi J.M. // Biophys. Chem. 2005. V. 114. P. 71.

13. *Chen Y., Barkley M.D.* // *Biochemistry*. 1998. V. 3. P. 9976.
14. *Бурштейн Э.А.* // *Молекуляр. биология*. 1983. Т. 17. С. 455.
15. *Нокс П.П., Корватовский Б.Н., Красильников П.М. и др.* // *ДАН*. 2016. V. 467. P. 350.
16. *Гольданский В.И., Кузьмин В.В.* // *УФН*. 1989. Т. 157. С. 3.
17. *Szabo A.G., Rayner D.M.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1980. V. 102. P. 554.
18. *Gudgin E., Lopez-Deigado R., Ware W.R.* // *Phys. Chem.* 1983. V. 87. P. 1559.
19. *Petrich J.W., Chang M.C., McDonald D.B., Fleming G.R.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 1983. V. 105. P. 3824.
20. *Ross J.A., Jameson D.M.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. V. 7. P. 1301.
21. *Hellings M., De Maeyer M., Verheyden S.* // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 1894.
22. *Liu T., Callis P.R., Hesp B.H., de Groot M.* // *J. Amer. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 4104.
23. *Pan C.-P., Muino P.L., Barkley M.D., Callis P.R.* // *J. Phys. Chem. B*. 2011. V. 115. P. 3245.
24. *Kadyan A., Juneja S., Pandey S.J.* // *Phys. Chem. B*. 2019. V. 123. P. 7578.
25. *Нокс П.П., Лукашев Е.П., Корватовский Б.Н. и др.* // *Биофизика*. 2016. Т. 61. С. 1118.
26. *Olsson C., Jansson H., Swenson J.* // *J. Phys. Chem. B*. 2016. V. 120. P. 4723.
27. *Physical properties of glycerine and its solutions*. N.Y.: GlycerineProducers' Association, 1963.
28. *Havemeyer R.N.* // *J. Pharmaceutic. Sci.* 1966. V. 55. P. 851.
29. *Towey J.J., Soper A.K., Dougan L.* // *J. Phys.Chem. B*. 2016. V. 120. P. 4439.
30. *Краснов К.С.* *Физическая химия*. Т. 1. М.: Высш. шк., 2001.
31. *Adams P.D., Chen Y., Ma K., Zagorski M.G et al.* // *JACS*. 2002. V. 124. P. 9278.
32. *Nayward B.J., Henry B.B.* // *Chem. Phys.* 1976. V. 12. P. 387.
33. *Тарасевич Б.Н.* *ИК спектры основных классов органических соединений*. Справочные материалы. М.: Хим. факультет МГУ, 2012.
34. *Горохов В.В., Нокс П.П., Корватовский Б.Н. и др.* // *Биохимия*. 2017. Т. 82. С. 1615.
35. *Hilairea M.R., Ahmed I.A., Lina C.-W. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 6005.
36. *Callis P.R.* // *J. Mol. Struct.* 2014. V. 1077. P. 22.
37. *Liu H., Zhang H., Jin B.* // *Spectrochim. Acta, Part A*. 2013. V. 106. P. 54.
38. *Doster W., Settles M.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1749. P. 173.
39. *Блинц Р., Жеки Б.* *Сегнетоэлектрики и антисегнетоэлектрики. Динамика решетки*. М.: Мир, 1975.
40. *Knox P.P., Gorokhov V.V., Korvatovsky B.N. et al.* // *J. Photochem. Photobiol., A*. 2020. V. 393. P. 112435.
41. *Knox P.P., Lukashev E.P., Gorokhov V.V. et al.* // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2018. V. 189. P. 145.
42. *Горохов В.В., Корватовский Б.Н., Нокс П.П. и др.* // *Докл. РАН. Науки о жизни*. 2021. Т. 498. С. 19.
43. *Пашенко В.З., Горохов В.В., Корватовский Б.Н. и др.* // *Биофизика*. 2021. Т. 66. С. 454.
44. *Han K.L., Zhao G.J.* *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State*. Chichester, UK: John Wiley&Sons Ltd., 2011.
45. *Krasilnikov P.M., Knox P.P., Rubin A.B.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2009. V. 8. P. 181.
46. *Рубин А.Б.* *Биофизика*. Т. 3. М.: Высш. шк., 2013.

ДИПОЛЬНЫЙ МОМЕНТ ПЕРЕХОДА $S_0 \rightarrow S_1$ ХЛОРОФИЛЛА *a* В РАСТВОРИТЕЛЯХ С РАЗЛИЧНЫМ ИНДЕКСОМ РЕФРАКЦИИ

© 2023 г. Д. А. Черепанов^{1, 2*}, Г. Е. Милановский², А. В. Айбуш¹, В. А. Надточенко^{1, 3}

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия

²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: cherepanov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 11.01.2023;

после доработки 18.01.2023;

принята в печать 20.01.2023

Проведен расчет зависимости дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла *a* от величины индекса рефракции *n* растворителя. Проанализированы взаимодействия между электрическим полем световой волны, электронным переходом пигмента в возбужденное состояние и диэлектрической поляризацией оптической среды. Эффект реактивного увеличения переходного дипольного момента молекулы хлорофилла *a* в растворителях с различной величиной индекса рефракции рассчитан в рамках нестационарной теории функционала плотности (TD–DFT) с использованием гибридного функционала LC- ω PBE и модели поляризуемого континуума. Расчеты *ab initio* аппроксимированы моделью реактивного поля Онзагера с эффективной поляризуемостью хлорофилла равной 21 Å³. Модель количественно описывает экспериментальную зависимость коэффициента экстинкции хлорофилла *a* в растворителях с индексом рефракции $1.3 < n < 1.7$. В белковом окружении с индексом рефракции $n = 1.4$ величина дипольного момента перехода хлорофилла составляет 5.5 Д. Для этого окружения было рассчитано распределение электростатического потенциала в основном и возбужденном состояниях хлорофилла; расчеты *ab initio* аппроксимированы набором парциальных переходных зарядов, расположенных на тяжелых атомах π -сопряженной системы молекулы хлорофилла.

Ключевые слова: хлорофилл *a*, реактивное поле, сила осциллятора, дипольный момент перехода, модель континуальной поляризуемой среды, переходные парциальные заряды.

DOI: 10.31857/S0207401X23060031, **EDN:** UGYOSZ

1. ВВЕДЕНИЕ

Светособирающие пигмент-белковые комплексы, участвующие в процессах окислительного фотосинтеза, содержат десятки и сотни взаимодействующих молекул хлорофилла (Хл) *a* (всюду ниже — просто Хл) в совокупности которых практически невозможно выделить свойства индивидуальных пигментов. Для количественной интерпретации стационарных спектров поглощения и, тем более, дифференциальных спектров поглощения, полученных методами фемтосекундной спектроскопии при исследовании процессов миграции энергии и разделения зарядов в фотосинтетических комплексах с известной атомной структурой [1], необходимо знание коэффициентов экстинкции (сил осциллятора, дипольных моментов оптического перехода) отдельных мономеров Хл [2, 3].

Современные методы криогенной электронной микроскопии позволяют определить структуру фотосинтетических пигмент-белковых комплексов с атомным разрешением. Ключевыми параметрами в теоретическом описании являются собственная энергия возбужденного состояния мономера (энергия перехода $S_0 \rightarrow S_1$), рассчитанная без учета взаимодействий пигментов друг с другом, и энергия межмолекулярных пигмент-пигментных взаимодействий, где преобладает электростатическое диполь-дипольное взаимодействие [1]. Прямое экспериментальное определение спектральных параметров отдельных хлорофиллов в белковой матрице в фотосинтетических комплексах затруднено. В частности, для их расчета необходимо знание величины дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла. В литературе неоднократно проводили определение вели-

чины [4–7] и ориентации [8] вектора дипольного момента перехода на основе спектров Хл в органических растворителях. Экстраполяция зависимости наблюдаемой величины от индекса рефракции, или показателя преломления растворителя, n , к предельному значению $n = 1$ давала оценку дипольной силы (μ^2) Хл в вакууме приблизительно в 14–20 Д² [9, 10]. Прямые расчеты дипольного момента перехода $\mu = \langle \psi_0^* | \mathbf{M} | \psi_1 \rangle$ для полосы Q_Y поглощения Хл с помощью различных квантовохимических методов дают существенно большую оценку: $\mu^2 \approx 30$ Д² [3, 11, 12]. Указанное расхождение обусловлено не только неточностью квантовохимических расчетов, но и трудностями теоретического описания взаимодействий между пигментом и диэлектрическим окружением.

Переход молекулы из вакуума в диэлектрическую среду растворителя сопровождается изменением электронного спектра поглощения. Эти изменения включают в себя как сдвиг максимумов длины волны полос поглощения, так и увеличение или уменьшение наблюдаемой силы осциллятора. Ретиналь [13], хлорофилл [10] и другие хромофоры в пигмент-белковых комплексах не могут быть изучены в паровой фазе в обычных условиях, поэтому важно иметь теоретические методы, которые позволяют скорректировать полученные в растворах спектральные данные с их значениями в паровой фазе.

Цель данной работы – дать критический обзор теоретических моделей описания влияния внешней среды на дипольный момент перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла и на основе сравнения с экспериментальными данными для Хл в органических растворителях различной полярности оценить величину дипольного момента перехода в белковой матрице.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Квантовохимические расчеты молекулы Хл проводили с помощью пакета программ Gaussian 16 [14] в рамках теории функционала плотности (density functional theory (DFT) для основного состояния S_0 и в рамках нестационарного расширения этой теории (time-dependent density functional theory (TD-DFT)) для возбужденного состояния S_1 . Для расчетов *ab initio* в молекуле Хл формильный радикал в положении 7 хлоринового кольца и фитильный радикал были заменены метильными группами. Оптимизация геометрических параметров была выполнена с использованием гибридного функционала CAM-B3LYP [15] в базисе 6-31G(d). Расчет первого возбужденного состоя-

ния S_1 проводился в приближении TD-DFT с использованием гибридного функционала LC- ω PBE [16] в базисе 6-311+G(d); рассчитывалось пять возбужденных состояний. Реактивное поле диэлектрика рассчитывалось в приближении поляризуемого континуума (polarizable continuum model (PCM)) [17] с использованием модели сольватации [18]. Переходные парциальные заряды (TrESP) тяжелых атомов Хл были рассчитаны из электростатического потенциала по методу из работы [3] с помощью программы Multiwfn 3.7 [19] (детали расчетов описаны в работе [20]).

3. ТЕОРИЯ

При описании поглощения электромагнитного излучения молекулами пигмента, распределенными в однородной диэлектрической среде (растворителе), необходимо учитывать взаимодействие пигмента с молекулами среды. Начиная с пионерской работы Чако [21], описание влияния растворителя на экстинкцию растворенного пигмента основывают на комбинации теории диэлектриков в статических полях и теории распространения электромагнитных волн в линейной дисперсионной среде с поглощением (среда Лоренца). Поскольку при поглощении света изменения электронной подсистемы можно рассматривать в приближении Борна–Оппенгеймера при фиксированном положении ядер, для анализа с хорошей степенью точности можно ограничиться моделями неполярных диэлектриков, в которых учитывается влияние только электронной поляризации.

Электростатические модели диэлектриков

Для однородного неполярного диэлектрика, состоящего из смеси молекул j -типа, которые не обладают собственным дипольным моментом и характеризуются электронной поляризуемостью в вакууме α_j , имеет место общее соотношение между средним электрическим полем E и макроскопической проницаемостью ϵ :

$$\frac{\epsilon - 1}{4\pi} E = \sum_j N_j \alpha_j E_{loc}^{(j)}, \quad (1)$$

где N_j – количество молекул j -типа в единице объема, а $E_{loc}^{(j)}$ представляет собой локальное электрическое поле, действующее на молекулы данного типа. В электростатической теории неполярных диэлектриков используется два основных метода расчета локального поля, которые восходят к модели Лорентца [22] и модели Онзагера [23].

В модели Лорентца рассматривается электрическое поле E_L , действующее на одну молекулу в

однородном диэлектрике. Окружение молекулы представлено диэлектрическим континуумом с макроскопической проницаемостью ϵ . Для расчета поля из макроскопической среды выделяют сферическую область, объем которой достаточно велик, чтобы иметь те же диэлектрические свойства, что и континуум. Взаимодействие центральной молекулы с диполями молекул внутри сферической области рассчитывается микроскопически, а взаимодействие с остальной частью образца рассматривается в континуальном приближении. В соответствии с этим локальное электрическое поле есть сумма двух слагаемых: поля виртуальной сферической полости макроскопического диаметра с центром на выбранной частице и поля, обусловленного внешней частью поляризованного диэлектрика: $E_L = E_{in} + E_{out}$.

Легко показать, что внутренне поле однородно поляризованного диэлектрика равно нулю [24]. Слагаемое E_{out} представляет собой поле внутри сферической области от всех источников, за исключением поляризации самой сферы. Однородное электрическое поле E в диэлектрике обусловлено частично зарядами вне образца (поле E_0), а частично — поляризацией P диэлектрика, ориентированной в противоположном направлении: $E = E_0 - 4\pi P = E_0/\epsilon$.

Чтобы рассчитать E_{out} , следует исключить из общей величины поля E вклад E_s , обусловленный поляризацией сферической области. По определению собственное поле E_s представляет собой поле внутри сферического образца с постоянной поляризацией P . Прямой электростатический расчет показывает, что $E_s = -(4\pi/3)P$.

Таким образом,

$$E_L = E - E_s = \frac{\epsilon + 2}{3} E. \quad (2)$$

В этом выражении отсутствует геометрический размер сферической области, что согласуется с результатом, полученным при рассмотрении диполь-дипольного взаимодействия внутри сферы. Если диэлектрик образован молекулами одного типа, то при подстановке (2) в уравнение (1) получаем известное уравнение Клаузиуса—Моссотти:

$$\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} = \frac{4\pi}{3} N\alpha, \quad (3)$$

где N — число частиц в см^3 , α — скалярная поляризуемость частицы. Отсюда следует, что проницаемость можно выразить через молекулярную поляризуемость:

$$\epsilon = \frac{1 + 8\pi N\alpha/3}{1 - 4\pi N\alpha/3}.$$

В модели Онзагера рассматривается электрическое поле E_O в неоднородном диэлектрике: сферическая область радиуса a с диэлектрической проницаемостью $\epsilon_{in} = 1$ содержит только одну молекулу, которая взаимодействует с диэлектрическим окружением, макроскопическая проницаемость которого равна ϵ . Электрическое поле, действующее на молекулу, является суммой электрического поля E_c , возникающего в пустой полости за счет поляризованного окружения, и реактивного поля отклика R , возникающего за счет взаимодействия между поляризованной молекулой и диэлектриком:

$$E_O = E_c + R.$$

Поле E_c внутри сферической полости, индуцированное внешним полем E , являющимся однородным на большом удалении от сферы, задается выражением

$$E_c = \frac{3\epsilon}{2\epsilon + 1} E. \quad (4)$$

Поле отклика, возникающее как реакция среды на появление дипольного момента μ в центре сферы, равно

$$R = \frac{2(\epsilon - 1)}{2\epsilon + 1} \frac{\mu}{a^3} = \xi\mu,$$

где ξ — фактор отклика сферической полости. Поскольку диполь μ индуцирован полем E_c , имеет место соотношение

$$R = \alpha\xi(E_c + R),$$

откуда следует

$$R = \frac{\alpha\xi}{1 - \alpha\xi} E_c \quad (5)$$

и

$$E_O = \frac{3\epsilon}{2\epsilon + 1} \frac{1}{1 - \alpha\xi} E. \quad (6)$$

Таким образом, локальное поле в модели Онзагера зависит от размеров и формы молекулы; эта модель может также феноменологически учитывать локальные взаимодействия молекул растворителя (например, водородные связи), а также обобщена на случай описания полярных растворителей, молекулы которых обладают постоянным диэлектрическим моментом [25]. Если всеми перечисленными эффектами можно пренебречь, что оправдано для анализа электронной поляризуемости среды, то эффективный радиус молекулы растворителя задается соотношением $(4\pi/3)Na^3 = 1$. В

этом случае, подставляя (6) в (1), вновь получаем уравнение (3) Клаузиуса–Моссотти. Таким образом, модели Лорентца и Онзагера эквивалентны для описания электронной поляризуемости неполярных неструктурированных диэлектриков.

Модель Лорентца диэлектрической дисперсии

Анализ взаимодействия света с пигментом в диэлектрической среде обычно опирается на классическую модель Лорентца для диэлектрической дисперсии, возникающей в результате резонансной поляризации [22]. Эта модель адекватно описывает дисперсию в оптической области в условиях слабых полей, когда справедлива линейная зависимость между средней молекулярной поляризуемостью и диэлектрической проницаемостью.

Рассмотрим плоскую электромагнитную волну, распространяющуюся в положительном направлении z через линейную однородную изотропную с временной дисперсией среду, занимающую полупространство $z > 0$. Пусть электрическое поле линейно поляризовано вдоль оси x , а $E(z, t)$ обозначает x -компоненту электрического поля; влияние магнитного поля на поглощение принимается пренебрежимо малым. Поскольку электрическое поле плоской световой волны параллельно поверхности раздела фаз вакуум/диэлектрик, амплитуда поля непрерывна на границе $z = 0$. Диэлектрическая среда характеризуется комплексным показателем преломления

$$k = n - i\alpha,$$

где n соответствует показателю преломления, а α — коэффициенту поглощения, величина которого зависит от концентрации растворенного пигмента. Коэффициент прохождения световой волны в область $z > 0$ определяется индексом рефракции растворителя и не зависит от наличия пигмента, поэтому амплитуда световой волны задается выражением

$$\begin{aligned} E(z, t) &= E_0 \exp\{i\omega(t - kz/c)\} = \\ &= E_0 \exp(-2\pi\alpha z/\lambda) \exp\{i(\omega t - 2\pi n z/\lambda)\}. \end{aligned}$$

Если концентрация пигмента равна C (моль/л), а коэффициент молярной экстинкции равен $\mathcal{E}$ (л · моль⁻¹ · см⁻¹), то из экспоненциальной зависимости поглощения $\exp(-\mathcal{E} C z)$, пропорциональной квадрату амплитуды, следует соотношение

$$\mathcal{E} C = 4\pi\alpha/\lambda. \quad (7)$$

Задача заключается в том, чтобы в рамках дисперсионной модели определить, как показатель преломления n влияет на коэффициент поглощения α . В литературе было рассмотрено несколько

моделей локального поля, действующего на пигмент, и их предсказания детально сравнивались с экспериментальными данными.

В ранних работах [21, 26–31] оценка влияния неполярных растворителей на интенсивность электронного перехода пигмента основывалась на объединении классической теории дисперсии Лорентца [22] с диэлектрической моделью Лоренца [32]. Локальное поле в модели Лоренца связано с поляризацией соотношением

$$E_L(z, t) = E(z, t) + \frac{4\pi}{3} P(z, t). \quad (8)$$

Переходя к фурье-представлению и определяя среднюю поляризацию как

$$\tilde{P}(z, \omega) = [N_0\alpha_0(\omega) + N_1\alpha_1(\omega)] \tilde{E}_L(z, \omega),$$

где N_j и $\alpha_j(\omega)$ — концентрация и молекулярная поляризуемость компонента j на частоте ω , из уравнения (8) и соотношения $\tilde{P}(z, \omega) = \chi(\omega) \tilde{E}(z, \omega)$ находим частотную зависимость электрической восприимчивости:

$$\chi(\omega) = \frac{\sum N_j \alpha_j(\omega)}{1 - (4\pi/3) \sum N_j \alpha_j(\omega)}. \quad (9)$$

Поскольку $\epsilon(\omega) = 1 + 4\pi\chi(\omega)$, из (9) следует формула Лорентц–Лоренца, являющаяся дисперсионным аналогом уравнения Клаузиуса–Моссотти:

$$\sum N_j \alpha_j(\omega) = \frac{3}{4\pi} \frac{\epsilon(\omega) - 1}{\epsilon(\omega) + 2}. \quad (10)$$

Молекулярную поляризуемость растворителя в области поглощения пигмента α_s , можно считать действительной константой. Поляризуемость пигмента $\alpha_1(\omega)$ аппроксимируется моделью поляризации демпфированного гармонического осциллятора под действием силы Лоренца, обусловленной локальным полем $\tilde{E}_L(z, \omega)$:

$$\alpha_1(\omega) = \frac{q^2}{m} \frac{f_1}{\omega_1^2 - \omega^2 + i\gamma\omega}, \quad (11)$$

где q и m — заряд и масса электрона, f_1 и ω_1 — сила и собственная резонансная частота осциллятора для пигмента в вакууме, γ — феноменологическая константа затухания. После подстановки α_s и $\alpha_1(\omega)$ в формулу Лорентц–Лоренца получается соотношение для комплексной диэлектрической проницаемости:

$$\epsilon(\omega) = \frac{1 + (8\pi/3) [N_s \alpha_s + \beta^2 N_1 f_1 / (\omega_1^2 - \omega^2 + i\gamma\omega)]}{1 - (4\pi/3) [N_s \alpha_s + \beta^2 N_1 f_1 / (\omega_1^2 - \omega^2 + i\gamma\omega)]}, \quad (12)$$

где $\beta^2 = q^2/m$. Диэлектрическая проницаемость и комплексный индекс рефракции связаны соот-

ношением $\varepsilon(\omega) = k(\omega)^2$; сравнивая мнимые части в этом соотношении, получаем искомую связь показателя преломления и коэффициента поглощения:

$$2n\kappa = \frac{3q}{(1-p)^2 + q^2},$$

где

$$p = \frac{4\pi}{3} \left[N_s \alpha_s + \beta^2 N_1 \frac{f_1(\omega_1^2 - \omega^2)}{(\omega_1^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2} \right], \quad (13)$$

$$q = \frac{4\pi}{3} \beta^2 N_1 \frac{f_1 \gamma \omega}{(\omega_1^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}. \quad (14)$$

У типичных растворителей, таких как диметилсульфоксид и N,N -диметилформамид (ДМФ), молекулярная поляризуемость α_s равна примерно $8 \text{ \AA}^3$, тогда как объем одной молекулы этих растворителей составляет около $130 \text{ \AA}^3$ [33], поэтому первое слагаемое в выражении (13) имеет значение порядка 0.2. Второе слагаемое для молекулы хлорофилла в растворе ДМФ при концентрации $C = 10^{-5}$ моль/л в области резонанса не превышает по абсолютной величине $3 \cdot 10^{-4}$, поэтому его вкладом можно пренебречь. Такой же порядок величины имеет в области резонанса и коэффициент q , определяемый выражением (14). Если концентрация пигмента мала, можно пренебречь

его влиянием на индекс рефракции и приписать n значение, равное индексу рефракции растворителя на частоте ω_1 . Тогда из соотношения (7) получаем

$$\mathcal{E}_C = \frac{4\pi q^2 \theta_L}{mc} \frac{N_1 f_1 \gamma \omega^2}{n (\omega_1^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2}, \quad (15)$$

где

$$\theta_L = \frac{(n^2 + 2)^2}{9} \quad (16)$$

представляет собой поправочный коэффициент, отражающий усиление амплитуды электромагнитной волны в полости Лоренца в соответствии с выражением (2). В дальнейшем поправочный коэффициент θ будет рассчитан для различных моделей диэлектрика.

Уравнение (15) было впервые выведено Чако [21]; предсказываемая этим уравнением зависимость поглощения от индекса рефракции предполагает увеличение экстинкции пигмента при увеличении n (кривая 1 на рис. 1). Данное соотношение было экспериментально проверено в целом ряде работ [26–31] и признано всеми авторами неадекватным. На рис. 1 приведены экспериментальные данные из работ [4–6] для силы осциллятора X_L , рассчитанные по площади полосы поглощения Q_Y в различных растворителях. На основании аналогичных эмпирических на-

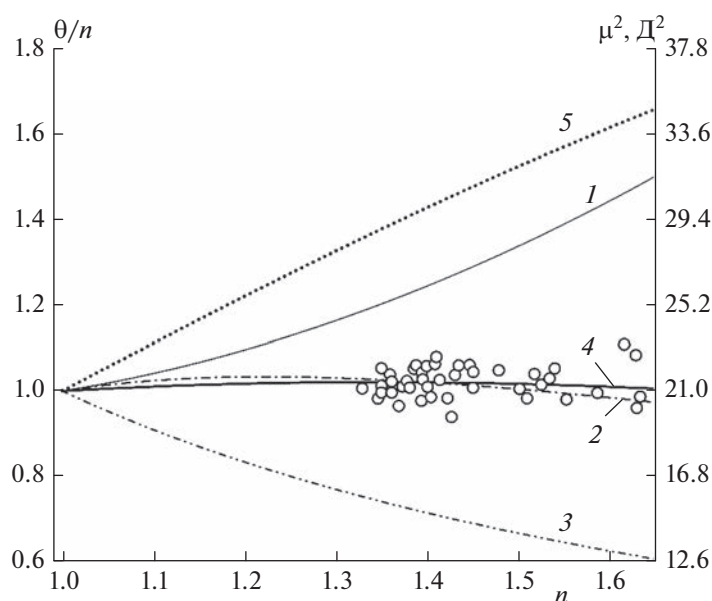


Рис. 1. Зависимость поправочного коэффициента усиления поля, θ/n , от показателя преломления n : 1 – формула (23) Чако, 2 – модель (24) Онзагера, 3 – приближение Нокса с соавт. ($\theta = 1$), 4 – поляризационная модель (25) Онзагера, 5 – дипольная сила μ^2 перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла a , рассчитанная в данной работе. Кружками показаны экспериментальные значения из работ [4–6].

блюдений было высказано предположение, что поправочный коэффициент θ_L/n лучше всего принять равным единице [26, 29].

В работах [29, 34–38] было предложено использовать для описания взаимодействия пигмента и растворителя модель Онзагера, в которой учитывается как поле E_c поляризованного диэлектрика в сферической полости (4), так и поле отклика R , индуцированное образуемым внутри полости диполем (5). Фактор усиления поля θ для уравнения (15) в этой модели учитывает индуктивное взаимодействие пигмента с растворителем (поле отклика). После пренебрежения малыми поправками он равен [38, 39]

$$\theta_o = \frac{9n^4}{(2n^2 + 1)^2} \left(1 + \frac{2\alpha_o(\omega)}{a^3} \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right), \quad (17)$$

где $\alpha_o(\omega)$ — электронная поляризуемость молекулы пигмента в основном состоянии в вакууме:

$$\alpha_o(\omega) = \frac{4\pi}{3h} \sum_i \frac{\omega_{0k} |\mu_{0k}|^2}{\omega_{0k}^2 - \omega^2}, \quad (18)$$

а параметр a представляет собой радиус полости в диэлектрической среде, содержащей одну молекулу пигмента (в растворе он соответствует геометрическому размеру молекулы пигмента). Для Хл статическая поляризуемость в основном состоянии составляет около $17 \text{ \AA}^3$ [40], а эффективный радиус — около $4 \text{ \AA}$, поэтому второе слагаемое в уравнении (17) заметно меньше единицы. Использование поправочного коэффициента θ_o/n в этом случае предполагает снижении интенсивности поглощения пигмента при увеличении индекса рефракции (кривая 2 на рис. 1).

Нокс с соавт. [10, 41, 42] предложили не учитывать отличие локального поля, действующего на пигмент, от среднего поля, индуцированного электромагнитной волной в растворителе; в этом предположении в уравнении (15) $\theta = 1$, что означает гиперболическое уменьшение интенсивности поглощения при увеличении индекса рефракции (кривая 3 на рис. 1). Данная аппроксимация неоднократно использовалась для вычисления энергии экситонного сопряжения молекул хлорофилла в различных фотосинтетических комплексах [43–45].

Суммируя, можно заключить, что между имеющимися в литературе моделями нет даже качественного согласия в определении зависимости интенсивности поглощения от коэффициента поглощения растворителя. Причиной для такого расхождения может быть некорректное использование классических электростатических моделей для описания взаимодействия электромаг-

нитной волны, диэлектрика и фотовозбуждаемого пигмента.

В электростатической модели Лоренца внутреннее поле однородно поляризованной макроскопической сферы равно нулю, так как вклады от всех диполей внутри сферы компенсируют друг друга [25]. Эта компенсация нарушается при волновой поляризации, поскольку диполи, расположенные на фазовых поверхностях z и $(z + \lambda/2)$, ориентированы в противоположных направлениях. По этой причине модель (2) Лоренца и вытекающее из него уравнение (3) Клаузиуса–Моссотти неприменимы для описания волновой дисперсии.

Модель Онзагера лишена этого недостатка, так как размер полости в диэлектрической среде, содержащей одну молекулу пигмента, много меньше длины световой волны. Однако эта модель неприменима по другой причине. В модели Онзагера электронное состояние молекулы внутри полости не меняется, а лишь незначительно возмущается под действием внешнего электрического поля. Данная модель описывает индуктивное взаимодействие одинаково возмущенных молекул диэлектрика друг с другом и принципиально не подходит для анализа перехода пигмента в другое электронное состояние и связанного с поглощением кванта изменения самого поля. По этой причине предложение Нокса и ван Амеронгена [41] учитывать амплитуду именно среднего поля как источник энергии для электронного перехода пигмента в возбужденное состояние представляется совершенно справедливым.

4. КВАНТОМЕХАНИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Поляризация дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла

Во всех приведенных моделях опускается из рассмотрения один существенный эффект: молекула Хл обладает постоянным дипольным моментом в основном и возбужденном состояниях, поэтому взаимодействие с диэлектриком ведет к поляризации обоих состояний и тем самым вызывает изменение дипольного момента перехода пигмента. Поскольку поляризуемость Хл увеличивается при переходе в возбужденное состояние [46, 47], следует ожидать возрастания дипольного момента перехода при увеличении индекса рефракции. Увеличение дипольного момента перехода за счет реактивного поля диэлектрика может быть описано поляризационной моделью Онзагера [48], которая предсказывает следующую зависимость коэффициента усиления θ от индекса рефракции в уравнении (15):

$$\theta_{ref} = \left(1 + \frac{\alpha^* \xi}{1 - \alpha^* \xi}\right)^2. \quad (19)$$

Здесь α^* — поляризуемость дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ молекулы Хл, а ξ — фактор отклика диэлектрика, окружающего молекулу. В сферическом приближении фактор отклика равен

$$\xi = \frac{1}{a^3} \frac{2(n^2 - 1)}{2n^2 + 1}. \quad (20)$$

Форма молекулы Хл соответствует сжатому эллипсоиду, поэтому сферическое приближение (20) будет плохо аппроксимировать реактивное поле при больших значениях диэлектрической проницаемости.

Квантовохимический расчет поляризуемости α^* и эффективного радиуса a был проведен в приближении TD-DFT с использованием гибридного функционала LC- ω PBE, в котором проведена коррекция обменных взаимодействий на больших расстояниях [16]. Поле отклика диэлектрического окружения молекулы Хл рассчитывалось методом PCM [17], реализованным в программе Gaussian 16. Схема расчета включала следующую последовательность шагов.

1. Геометрическая структура Хл в основном состоянии S_0 была получена минимизацией энергии в приближении DFT с функционалом CAM-B3LYP в базисе 6-31G(d) (см. разд. 2). Для этой конформации был проведен расчет зависимости статического дипольного момента $\mu_0(\epsilon)$ основного состояния Хл от величины диэлектрической проницаемости в приближении DFT/PCM с функционалом LC- ω PBE и базисом 6-311+G(d) (рис. 2, ромбы). Эта зависимость была аппроксимирована уравнением

$$\mu_0(\epsilon) = \mu_0 \left(1 + \frac{\alpha_0 \xi}{1 - \alpha_0 \xi}\right), \quad (21)$$

где дипольный момент в вакууме, μ_0 , был равен 6.38 Д, а поляризуемость хлорофилла в вакууме, α_0 , была принята равной $17 \text{ \AA}^3$ в соответствии с данными из работы [40]. При этих параметрах эффективный радиус хлорофилла a получился равным $3.7 \text{ \AA}$ (кривая 1 на рис. 2).

2. Методом TD-DFT/PCM с теми же функционалом (LC- ω PBE) и базисом (6-311+G(d)) была рассчитана зависимость $\mu_{01}(\epsilon)$ для величины дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ молекулы Хл (рис. 2, кружки). Полученная зависимость была аппроксимирована аналогичным уравнением:

$$\mu_{01}(\epsilon) = \mu_{01} \left(1 + \frac{\alpha^* \xi}{1 - \alpha^* \xi}\right), \quad (22)$$

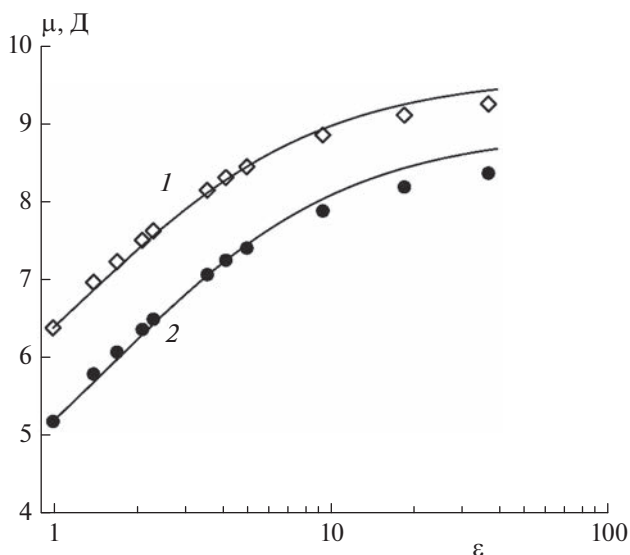


Рис. 2. Зависимость статического дипольного момента в основном состоянии (ромбы) и дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ (кружки) для молекулы хлорофилла a в зависимости от диэлектрической проницаемости окружающей среды. Результаты квантовохимических расчетов (символы) аппроксимированы уравнениями (26) и (27).

где радиус молекулы ХФ был фиксирован ($a = 3.7 \text{ \AA}$), а дипольный момент перехода в вакууме $\mu_{01} = 5.2 \text{ Д}$ и поляризуемость $\alpha^* = 21 \text{ \AA}^3$ были определены подгонкой в области $1 < \epsilon < 10$ (кривая 2 на рис. 2).

Полученные таким методом параметры $a = 3.7 \text{ \AA}$ и $\alpha^* = 21 \text{ \AA}^3$ были использованы для расчета по формуле (19) зависимости наблюдаемой интенсивности полосы Q_Y поглощения Хл от индекса рефракции (кривая 4 на рис. 1), которая хорошо соответствует экспериментальным данным. Слабая зависимость наблюдаемого коэффициента поглощения хлорофилла от индекса рефракции раствора является, таким образом, результатом взаимной компенсации двух факторов, входящих в поправочный коэффициент θ_{ref}/n : при возрастании n в экспериментально достижимом интервале $1.3 < n < 1.7$ собственная дипольная сила перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла также возрастает практически линейно (кривая 5 на рис. 1). Поскольку индекс рефракции белков находится в интервале $1.38 < n < 1.46$ [49–51], величина дипольного момента перехода ХФ в белке составляет около 5.5 Д , а дипольная сила — 30 Д^2 .

Для характеристики ориентации дипольного момента перехода μ_{01} обычно используют систему координат, в которой ось x направлена вдоль вектора NA–NC, а ось y — вдоль вектора NB–ND атомов азота молекулы Хл (рис. 3). В этих координатах

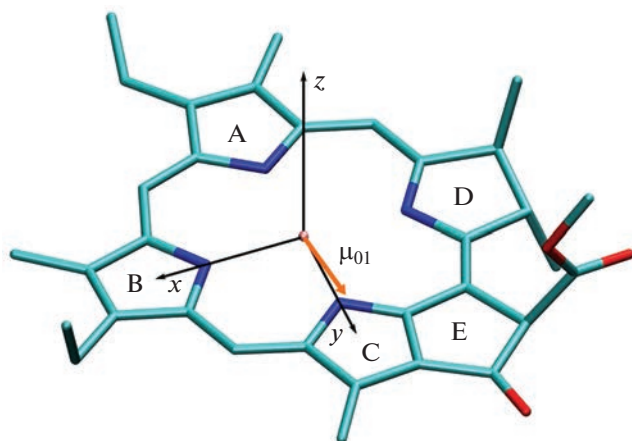


Рис. 3. Ориентация дипольного момента перехода μ_{01} мономера хлорофилла. Буквами обозначены кольца макроцикла хлорофилла.

натах азимутальный угол между μ_{01} и осью x составляет $\sim 95^\circ$ (т.е. повернут на $\sim 5^\circ$ в сторону четвертого пиррольного кольца порфиринового

Таблица 1. Парциальные заряды тяжелых атомов макроцикла хлорофилла a для основного состояния S_0 (q_{00}) и перехода $S_0 \rightarrow S_1$ полосы поглощения Q_Y (q_{01}) с учетом поляризации пигмента в белковом окружении с индексом рефракции $n = 1.4$

Атом	q_{00}	q_{01}	Атом	q_{00}	q_{01}
MG	0.8946	-0.0048	C1C	0.0666	0.1959
CHA	-0.3507	0.1438	C2C	-0.0812	-0.0277
CHB	-0.1326	-0.0356	C3C	-0.1536	0.0195
CHC	0.0590	-0.1998	C4C	0.0543	-0.0385
CHD	0.1597	0.0399	CMC	0.1235	0.0072
NA	-0.3811	0.0507	CAC	0.1147	0.0107
C1A	0.1958	-0.1437	CBC	-0.0030	0.0054
C2A	0.0861	0.0006	ND	-0.3667	0.0921
C3A	0.1907	0.0013	C1D	-0.1231	-0.0817
C4A	0.0140	0.0878	C2D	0.0656	-0.0110
CMA	-0.0043	0.0057	C3D	-0.2348	-0.0195
CAA	-0.0252	-0.0047	C4D	0.2361	-0.1450
NB	-0.4691	-0.1097	CMD	0.1165	-0.0381
C1B	0.2237	0.0643	CAD	0.4895	0.0136
C2B	-0.0789	0.0071	OBD	-0.5284	-0.0294
C3B	-0.1224	-0.0231	CBF	0.1354	-0.0241
C4B	0.1029	0.1915	CGD	0.6832	0.0006
CMB	0.1252	0.0244	O1D	-0.5587	-0.0016
CAB	0.0172	0.0093	O2D	-0.4841	0.0020
CBV	0.0406	0.0170	CED	0.8946	-0.0048
NC	-0.4160	-0.0471			

макроцикла), а полярный угол с осью z , перпендикулярной плоскости макроцикла, равен 87° . Ориентация дипольного момента перехода μ_{01} практически не зависит от величины диэлектрической проницаемости.

Модель распределенных монополей перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла

Для количественного анализа стационарных спектров фотосинтетических комплексов и моделирования динамики переноса энергии и разделения зарядов необходимо проводить расчет диполь-дипольных взаимодействий экситонно-сопряженных молекул хлорофилла [52–55]. В применявшемся ранее приближении точечных диполей предполагалось, что взаимодействие мономеров описывается кулоновскими потенциалами, сфокусированными в геометрических центрах соответствующих порфириновых макроциклов. Однако такой модели недостаточно для описания взаимодействия близкорасположенных молекул Хл с протяженными сопряженными π -электронными системами. Было предложено более точное описание, основанное на аппроксимации распределения дипольного момента перехода системой точечных монополей (парциальных зарядов), приписанных атомам макроцикла молекулы Хл (модель TrESP, см. [3, 56]). Величины парциальных зарядов, рассчитанные методами *ab initio* в вакууме, для практического применения масштабировались в соответствии с экстраполяцией экспериментально наблюдаемой величины дипольной силы μ^2 к значению индекса рефракции $n = 1$ [43, 55], которое для Хл принимается равным 20–21 Д² [10]. Однако в белковом окружении за счет поляризуемости порфиринового макроцикла величина дипольной силы увеличивается до 30 Д² (рис. 2).

С целью практического расчета энергии экситонного взаимодействия молекул Хл в фотосинтетических комплексах был проведен расчет парциальных зарядов его атомов для основного состояния S_0 и перехода $S_0 \rightarrow S_1$ полосы поглощения Q_Y с учетом поляризации макроцикла в белковом окружении с индексом рефракции $n = 1.4$. Электростатический потенциал рассчитывался на расстояниях от 2 до 4 Å вокруг тяжелых атомов с помощью программы Multiwfn 3.7 [19] в соответствии с алгоритмом, предложенным в работе [3]. Аппроксимация распределения электростатического потенциала точечными монополями была проведена стандартным методом линейной регрессии с ограничениями, чтобы воспроизвести общий нулевой заряд молекулы и три компоненты суммарного дипольного момента, рассчитан-

ного *ab initio*. Заряды атомов водорода были фиксированы равными нулю. Результаты представлены в табл. 1.

Маджет с соавт. рассчитывали распределение парциальных зарядов дипольного момента перехода Хл в вакууме, используя функционал B3LYP без коррекции обменных взаимодействий и минимальный базис 6-31G(d) [3]. Дипольная сила μ^2 в этих расчетах получилась равной 31.6 Д². Мы проанализировали, насколько чувствительны результаты метода TD-DFT к выбору функционала плотности и размеру базиса. Аналогичные расчеты в вакууме с функционалом CAM-B3LYP, учитывающим коррекцию обменных взаимодействий на больших расстояниях, в базисе 6-31G(d) дают меньшую величину дипольной силы: $\mu^2 = 27.8$ Д². Переход к функционалу LC- ω PBE приводит к дополнительному уменьшению дипольной силы до 25.5 Д². Расширение базиса до 6-311+G(d) увеличивает дипольную силу до 26.9 Д². Наконец, наиболее существенным эффектом является поляризация молекулы Хл реактивным полем Онзагера, за счет которого в белковом окружении с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 2$ дипольная сила перехода увеличивается до 39.1 Д². Экспериментальная оценка, полученная на основе анализа спектральных данных [4–6], для этой диэлектрической проницаемости составляет 30 Д² (рис. 1).

В модели Онзагера (19) не учитывается, что наличие в белке статической диэлектрической проницаемости ($\epsilon \approx 4$) ведет к поляризации статического дипольного момента основного состояния хлорофилла и к дополнительному увеличению переходного момента. Этот эффект может объяснить разброс экспериментальных данных по экстинкции Хл в растворителях с близким индексом рефракции, но различающихся по величине статической проницаемости (рис. 1).

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дипольный момент перехода $S_0 \rightarrow S_1$ хлорофилла полосы поглощения Q_Y является ключевым параметром, определяющим энергию экситонного сопряжения, форму стационарных спектров поглощения и кругового дихроизма, а также скорость переноса энергии в фотосинтетических пигмент-белковых комплексах. Математический анализ указанных явлений основывается на рассмотрении электромагнитных взаимодействий между электрическим полем световой волны, электронным переходом пигмента в возбужденное состояние и диэлектрической поляризацией оптической среды с индексом рефрак-

ции $n > 1$. Используемые в литературе методы определения дипольного момента перехода хлорофилла a основываются на комбинации классических моделей электростатической поляризации диэлектриков и теории распространения электромагнитных волн в линейной дисперсионной среде с поглощением (среда Лоренца), однако в них не учитывается реактивное изменение электронных состояний пигмента за счет его взаимодействия с диэлектрическим окружением. В данной работе с помощью нестационарной теории функционала плотности (TD-DFT) и модели поляризуемого континуума проанализировано увеличение переходного дипольного момента молекулы хлорофилла a в растворителях с различной величиной индекса рефракции. Расчеты *ab initio* аппроксимированы моделью реактивного поля Онзагера, в которой эффективная поляризуемость хлорофилла составила 21 Å³. Модель количественно описывает экспериментальную зависимость коэффициента экстинкции хлорофилла a в растворителях с индексом рефракции $1.3 < n < 1.7$. Величина дипольного момента перехода хлорофилла в белковом окружении с индексом рефракции $n = 1.4$ равна 5.5 Д. Для этого окружения рассчитано распределение электростатического потенциала в основном и возбужденном состояниях хлорофилла; расчеты *ab initio* аппроксимированы набором парциальных переходных зарядов, расположенных на тяжелых атомах π -сопряженной системы молекулы хлорофилла.

Работа выполнена при поддержке грантом Российского научного фонда № 22-24-00705.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mirkovic T., Ostroumov E.E., Anna J.M. et al. // Chem. Rev. 2017. V. 117. № 2. P. 249; <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00002>
2. Zucchelli G., Jennings R.C., Garlaschi F.M. et al. // Biophys. J. 2002. V. 82. № 1. P. 378; [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75402-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75402-7)
3. Madjet M.E., Abdurahman A., Renger T. // J. Phys. Chem. B. 2006. V. 110. № 34. P. 17268; <https://doi.org/10.1021/jp0615398>
4. Seely G.R., Jensen R.G. // Spectrochim. Acta. 1965. V. 21. № 10. P. 1835; [https://doi.org/10.1016/0371-1951\(65\)80095-9](https://doi.org/10.1016/0371-1951(65)80095-9)
5. Houssier C., Sauer K. // J. Amer. Chem. Soc. 1970. V. 92. № 4. P. 779; <https://doi.org/10.1021/ja00707a007>
6. Colbow K. // BBA – Bioenerg. 1973. V. 314. № 3. P. 320; [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90116-3)
7. Shipman L.L., Cotton T.M., Norris J.R., Katz J.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. № 25. P. 8222; <https://doi.org/10.1021/ja00441a056>

8. Linke M., Lauer A., Von Haimberger T. et al. // Ibid. 2008. V. 130. № 45. P. 14904; <https://doi.org/10.1021/ja804096s>
9. Shipman L.L. // Photochem. Photobiol. 1977. V. 26. № 3. P. 287; <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1977.tb07486.x>
10. Knox R.S. // Ibid. 2003. V. 77. № 5. P. 492; [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0770492-daosoc2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0770492-daosoc2.0.co2)
11. Oviedo M.B., Sánchez C.G. // J. Phys. Chem. A. 2011. V. 115. № 44. P. 12280; <https://doi.org/10.1021/jp203826q>
12. Khokhlov D., Belov A. // Biophys. Chem. 2019. V. 246. P. 16; <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.01.001>
13. Birge R.R., Sullivan M.J., Kohler B.E. // J. Amer. Chem. Soc. 1976. V. 98. № 2. P. 358; <https://doi.org/10.1021/ja00418a007>
14. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Petersson G.A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A.V., Bloino J., Janesko B.G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H.P., Ortiz J.V., Izmaylov A.F., Sonnenberg J.L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T. // Gaussian 16. Rev. C. 01. Wallingford CT: Gaussian Inc., 2016.
15. Yanai T., Tew D.P., Handy N.C. // Chem. Phys. Lett. 2004. V. 393. № 1–3. P. 51; <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2004.06.011>
16. Henderson T.M., Izmaylov A.F., Scalmani G., Scuseria G.E. // J. Chem. Phys. 2009. V. 131. № 4. P. 044108; <https://doi.org/10.1063/1.3185673>
17. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. // Chem. Rev. 2005. V. 105. № 8. P. 2999; <https://doi.org/10.1021/cr9904009>
18. Marenich A.V., Cramer C.J., Truhlar D.G. // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. № 18. P. 6378; <https://doi.org/10.1021/jp810292n>
19. Lu T., Chen F. // J. Comput. Chem. 2012. V. 33. № 5. P. 580; <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>
20. Черепанов Д.А., Милановский Г.Е., Надточенко В.А., Семёнов А.Ю. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 5.
21. Chako N.Q. // J. Chem. Phys. 1934. V. 2. № 10. P. 644; <https://doi.org/10.1063/1.1749368>
22. Lorentz H.A. The Theory of Electrons. 2nd edn. Leipzig, New York: Dover, 1952.
23. Onsager L. // J. Amer. Chem. Soc. 1936. V. 58. № 8. P. 1486; <https://doi.org/10.1021/ja01299a050>
24. Fröhlich H. Theory of Dielectrics: Dielectric Constant and Dielectric Loss. Oxford: Clarendon Press, 1949.
25. Böttcher C.J.F., van Belle O.C., Bordewijk P., Rip A. Theory of electric polarization. 2nd ed. V. 1. Dielectrics in static fields. Amsterdam, New York: Elsevier Scientific Pub. Co, 1974.
26. Mulliken R.S., Rieke C.A. // Rep. Prog. Phys. 1941. V. 8. № 1. P. 231; <https://doi.org/10.1088/0034-4885/8/1/312>
27. Pickett L.W., Paddock E., Sackter E. // J. Amer. Chem. Soc. 1941. V. 63. № 4. P. 1073; https://doi.org/10.1021/JA01849A051/ASSET/JA01849-A051.FP.PNG_V03
28. Jacobs L.E., Platt J.R. // J. Chem. Phys. 1948. V. 16. № 12. P. 1137; <https://doi.org/10.1063/1.1746745>
29. Neporent B.S., Bakhshiev N.G. // Opt. Spectrosc. 1958. V. 5. № 634. P. 1954.
30. Moffitt W., Moscovitz A. // J. Chem. Phys. 1959. V. 30. № 3. P. 648; <https://doi.org/10.1063/1.1730025>
31. Bakhshiev N.G., Girin O.P., Libov V.S. // Opt. Spectrosc. 1963. V. 14. P. 255.
32. Lorenz L. // Ann. Phys. 1880. V. 247. № 9. P. 70; <https://doi.org/10.1002/andp.18802470905>
33. Pacak P. // J. Solut. Chem. 1987. V. 16. № 1. P. 71; <https://doi.org/10.1007/BF00647016>
34. Bakhshiev N.G. // Opt. Spectrosc. 1958. V. 5. № 646. P. 1954.
35. Schuyler J. // Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas. 1953. V. 72. № 11. P. 933; <https://doi.org/10.1002/recl.19530721104>
36. Bakhshiev N.G., Girin O.P., Libov V.S. // Opt. Spectrosc. 1963. V. 14. P. 395.
37. Liptay W. // Z. Naturforsch. A. 1966. V. 21. № 10. P. 1605; <https://doi.org/10.1515/zna-1966-1010>
38. Weigang O.E. // J. Chem. Phys. 1964. V. 41. № 5. P. 1435; <https://doi.org/10.1063/1.1726086>
39. Хохлова С.С., Михайлова В.А., Иванов А.И. // Хим. физика. 2007. Т. 26. № 7. С. 27.
40. Karakas A., Ceylan Y., Karakaya M. et al. // Open Chem. 2018. V. 16. № 1. P. 1242; <https://doi.org/10.1515/chem-2018-0134>
41. Knox R.S., van Amerongen H. // J. Phys. Chem. B. 2002. V. 106. № 20. P. 5289; <https://doi.org/10.1021/jp013927+>
42. Knox R.S., Spring B.Q. // Photochem. Photobiol. 2003. V. 77. № 5. P. 497; [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2003\)0770497-dsitc2.0.co2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2003)0770497-dsitc2.0.co2)
43. Adolphs J., Müh F., Madjet M.E.A. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 2010. V. 132. № 10. P. 3331; <https://doi.org/10.1021/ja9072222>
44. Novoderezhkin V.I., Palacios M.A., Van Amerongen H., Van Grondelle R. // J. Phys. Chem. B. 2005. V. 109. № 20. P. 10493; <https://doi.org/10.1021/jp044082f>
45. Adolphs J., Müh F., Madjet M.E.A., Renger T. // Photosynth. Res. 2008. V. 95. № 2–3. P. 197; <https://doi.org/10.1007/s11120-007-9248-z>

46. *Krawczyk S.* // BBA – Bioenerg. 1991. V. 1056. № 1. P. 64;
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(05\)80073-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80073-8)
47. *Altmann R.B., Haarer D., Renge I.* // Chem. Phys. Lett. 1993. V. 216. № 3–6. P. 281;
[https://doi.org/10.1016/0009-2614\(93\)90095-I](https://doi.org/10.1016/0009-2614(93)90095-I)
48. *Хохлова С.С., Михайлова В.А., Иванов А.И.* // ЖФХ. 2008. Т. 82. № 6. С. 1161.
49. *Van Manen H.J., Verkuijlen P., Wittendorp P. et al.* // Biophys. J. 2008. V. 94. № 8. P. L67;
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127837>
50. *Vörös J.* // Biophys. J. 2004. V. 87. № 1. P. 553;
<https://doi.org/10.1529/biophysj.103.030072>
51. *Zölls S., Gregoritz M., Tantipolphan R. et al.* // J. Pharm. Sci. 2013. V. 102. № 5. P. 1434;
<https://doi.org/10.1002/jps.23479>
52. *Byrdin M., Jordan P., Krauss N. et al.* // Biophys. J. 2002. V. 83. № 1. P. 433;
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75181-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75181-3)
53. *Yang M., Damjanović A., Vaswani H.M., Fleming G.R.* // Ibid. 2003. V. 85. № 1. P. 140;
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74461-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74461-0)
54. *Akhtar P., Caspy I., Nowakowski P.J. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 2021. V. 143. № 36. P. 14601;
<https://doi.org/10.1021/jacs.1c05010>
55. *Kimura A., Kitoh-Nishioka H., Aota T., et al.* // J. Phys. Chem. B. 2022. V. 126. № 22. P. 4009;
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c00869>
56. *Philipson K.D., Cheng Tsai S., Sauer K.* // J. Phys. Chem. 1971. V. 75. № 10. P. 1440;
https://doi.org/10.1021/J100680A013/ASSET/J100-680A013.FP.PNG_V03

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ БАРЬЕР ФОТОИНДУЦИРОВАННОГО РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДОВ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИСТЕМ 1 И 2

© 2023 г. Д. А. Черепанов^{1, 2*}, Г. Е. Милановский², В. А. Надточено^{1, 3}, А. Ю. Семёнов^{1, 2}¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия²Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: tscherepanov@gmail.com

Поступила в редакцию 11.01.2023;

после доработки 18.01.2023;

принята в печать 20.01.2023

В работе анализируется энергетика реакций фотоиндуцированного разделения зарядов между близкорасположенными молекулами хлорофилла (Хл) и феофитина (Фео). Реакционные центры фотосистем (ФС) 1 и 2 включают в себя три пары спектрально-сходных порфириновых кофакторов, структура которых допускает возможность реализации альтернативных механизмов первичного разделения зарядов. Рассматривается континуальная модель образования ион-радикальных пар в диэлектрическом окружении, основанная на рассчитанных *ab initio* парциальных зарядах. Модель описывает экспериментальную зависимость средноточечных редокс-потенциалов Хл и Фео в растворах с различной диэлектрической проницаемостью. В рамках этой модели определена энергия образования первичных ион-радикальных пар для обсуждаемых в литературе альтернативных механизмов разделения зарядов в ФС 1 и ФС 2. В рассматриваемом приближении в ФС 2 первичное разделение зарядов между мономером Хл (Хл_{D1}) и Фео (Фео_{D1}) является единственным энергетически допустимым механизмом. Отсутствие Фео в аналогичной позиции в реакционном центре ФС 1 приводит к тому, что в этом комплексе мономер Хл не может выступать в качестве первичного донора электрона. Стабилизация первичной ион-радикальной пары в ФС 1 может происходить за счет дelokализации электронной плотности в димере специальной пары молекул Хл (P₇₀₀) и гетеродимере молекул Хл, образующих первичный акцептор A₀.

Ключевые слова: фотосистема 1, фотосистема 2, хлорофилл *a*, феофитин *a*, ион-радикальная пара, первичное разделение зарядов.

DOI: 10.31857/S0207401X23060043, EDN: UHNDNJ

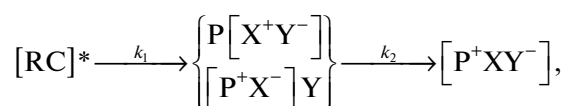
1. ВВЕДЕНИЕ

Реакция разделения зарядов между близкорасположенными кофакторами в фотосинтетических белковых комплексах сходна с переходом электрона в зону проводимости в полупроводниковых материалах. Скорость реакций переноса электрона, протекающих между кофакторами фотосинтетического комплекса по адиабатическому механизму, критически зависит от тонкой регуляции редокс-потенциала, достигаемой за счет модуляции диэлектрической проницаемости белка [1]. В случае комплексов фотосистем (ФС) 1 и 2 окислительного фотосинтеза цианобактерий и высших растений образование первичной ион-радикальной пары индуцируется поглощением кванта света, энергия которого должна превышать ширину “запрещенной зоны”. Данное термодинамическое ограничение по энергии разде-

ленных зарядов дает возможность исключить из рассмотрения некоторые из интермедиатов, возникновение которых в качестве первичной ион-радикальной пары предполагалось на основании известной молекулярной структуры комплекса.

Первичные реакции фотоиндуцированного разделения зарядов происходят в реакционных центрах ФС 1 и ФС 2 растений, водорослей и цианобактерий с участием порфириновых кофакторов — хлорофилла (Хл) *a* и феофитина (Фео) *a* (рис. 1). Общая схема первичных реакций переноса электрона в обоих комплексах включает в себя две принципиальные стадии:

Схема 1



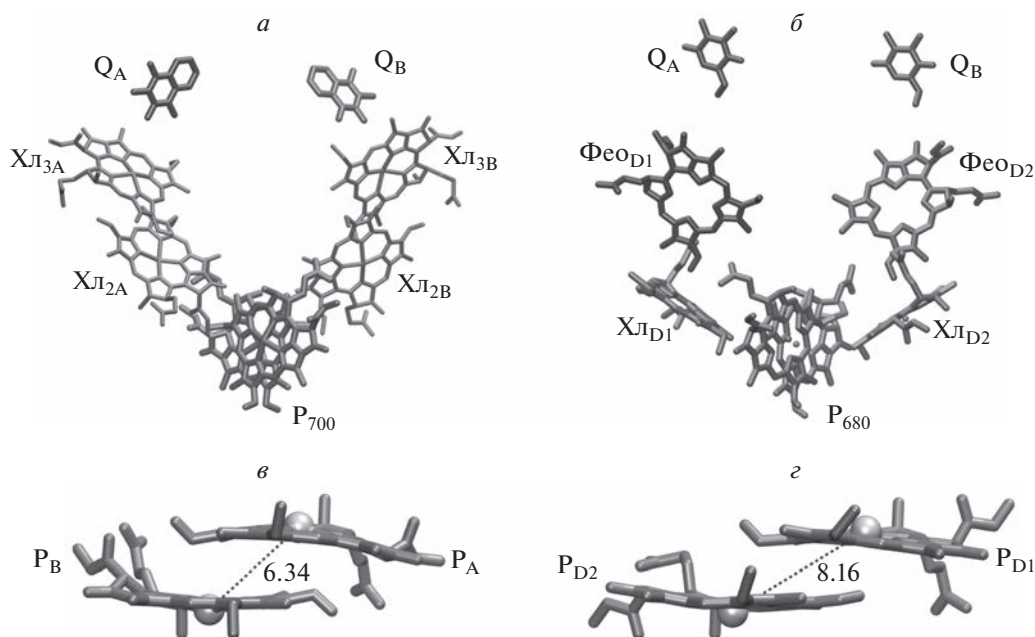


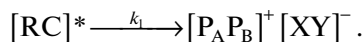
Рис. 1. Пространственное расположение кофакторов, участвующих в первичных реакциях разделения заряда в реакционных центрах ФС 1 (а) и ФС 2 (б). Две симметричных цепи переносчиков электрона включают в себя специальную пару хлорофилла (P_{700} и P_{680}), вспомогательный хлорофилл ($Xl_{2A/2B}$ и $Xl_{D1/D2}$), терминальный порфирин ($Xl_{3A/3B}$ и $Фео_{D1/D2}$), а также хинонные акцепторы (Q_A/Q_B). Детально показано взаимное расположение мономеров Хл а в спецификациях P_{700} (в) и P_{680} (г); указано расстояние в ангстремах между атомами магния (согласно кристаллографическим структурам, pdb-коды 1jb0 и 6jlo).

где $[RC]^*$ — возбужденное состояние реакционного центра и длинноволновых форм Хл светособирающей антенны; Р — структурный димер (специальная пара) симметрично расположенных молекул Хл, функционирующих как финальный донор электрона; Х — ближайшая к Р молекула Хл; Y — порфириновый макроцикл, выступающий как финальный акцептор электрона в рассматриваемой последовательности реакций.

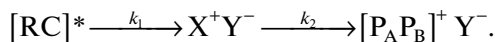
В ФС 1 (рис. 1а и в) специальная пара обозначается как P_{700} ; она состоит из молекул хлорофилла P_A и P_B , которые структурно связаны с двумя ветвями кофакторов А и В, участвующих в переносе электрона. Мономеры Х и Y в каждой из ветвей ФС 1 представлены молекулами Хл2 и Хл3 (обе ветви активны).

В ФС 2 (рис. 1б и г) специальная пара обозначается как P_{680} ; она состоит из мономеров P_{D1} и P_{D2} , которые относятся к двум симметричным субъединицам D1 и D2, формирующим центральную часть фотосинтетического комплекса. В ФС 2 функционально активна только ветвь переносчиков, относящихся к субъединице D1: в качестве промежуточного порфирина выступает мономер Xl_{D1} , а в качестве финального акцептора — $Фео_{D1}$.

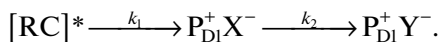
В ФС 1 специальная пара P_{700} имеет максимум поглощения в области длин волн около 700 нм, средноточечный редокс-потенциал окисления $E_m[P_{700}^+/P_{700}] = +0.45$ В [2]; максимум поглощения акцептора A_0 , который рассматривается как гетеродимер молекул Хл2 и Хл3 [3], находится при 686 нм [4, 5], а средноточечный редокс-потенциал $E_m[A_0/A_0^-] = -1.25$ В [6] (данные приведены по водородному электроду, SHE). Функциональная роль промежуточного Хл2 (Х на Схеме 1) — предмет длительных исследований, и на настоящий момент этот вопрос остается нерешенным. Согласно одной точке зрения первичным донором электрона является специальная пара P_{700} , а первичный акцептор A_0 представляет собой гетеродимер ХУ [7–10]. Спиновая плотность и положительный заряд в катион-радикале P_{700}^+ делокализованы в соотношении 1 : 3 между мономерами P_A и P_B в пользу P_B [11, 12]; делокализация спиновой плотности в сходном соотношении 1 : 3 между Хл2 и Хл3 наблюдается также в анион-радикале A_0^- [3]. Поэтому кинетический механизм разделения зарядов в этой модели представлен электронным переходом



Согласно альтернативной точке зрения [13, 14], после возбуждения ФС 1 с образованием возбужденного состояния $[RC]^*$ разделение зарядов происходит между Хл2 и Хл3, так что первичным донором является Хл2 (ниже – Х), который далее получает электрон от специальной пары P_{700} :



В ФС 2 среднеточечный редокс-потенциал специальной пары равен $E_m[P_{680}^+/P_{680}] = +1.25$ В [15, 16], что на 0.8 В превышает $E_m[P_{700}^+/P_{700}]$. Столь большая разница в окислительных потенциалах ФС 1 и ФС 2 необходима, чтобы обеспечить поток электронного транспорта через ряд переносчиков сопрягающей мембраны хлоропластов, обеспечивающих генерацию NADPH и АТФ – основных продуктов световой стадии фотосинтеза, необходимых для ассимиляции углекислоты и синтеза углеводов [17]. В отличие от P_{700} спиновая плотность в окисленном состоянии P_{680} локализована на мономере P_{D1} специальной пары. В качестве акцептора Y в ФС 2 выступает не Хл, как в ФС 1, а Фео. Как и в случае ФС 1, функциональная роль мономера Х в ФС 2 остается предметом исследования. В ряде работ [18] по аналогии с бактериальным реакционным центром, предполагается, что первичным донором является P_{D1} , первичным акцептором – мономер Хл_{D1} (ниже – Х), который далее передает электрон на вторичный акцептор – Фео_{D1} (Y):



Однако в большинстве работ предполагается, что первичным донором является мономер Хл_{D1} (ниже – Х), а первичным акцептором – Фео_{D1} (Y) [19, 20]:



Таким образом, несмотря на сходную структурную организацию, можно предположить, что первичная реакция разделения зарядов в ФС 1 и ФС 2 происходит между разными порфириновыми макроциклами, сильно различающимися по химическим и электрохимическим свойствам. Для выяснения механизма рассматриваемых реакций большое значение имеют термодинамические ограничения по механизму образования ион-радикальных пар порфириновых макроциклов. В данной работе проводится расчет энергии образования ион-радикальных состояний $Хл^+ - Хл^-$ и $Хл^+ - Фео^-$ в реакционных центрах ФС 1 и ФС 2 на основе данных потенциометрических измерений среднето-

точных редокс-потенциалов этих соединений в растворах, квантовохимических расчетов в приближении теории функционала плотности и анализа электростатических взаимодействий в рамках континуальной модели сольватации.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Структуры Хл а и Фео а были рассчитаны с помощью программы Gaussian 16 [21] в приближении функционала плотности (density functional theory (DFT)) [22]. Конформации мономеров Хл и Фео с удаленными алифатическими хвостами были взяты из кристаллографических структур ФС 1 цианобактерии *Synechococcus elongatus* (pdb-код 1jb0 [23]) и ФС 2 из цианобактерии *Thermosiphon vulcanus* (pdb-код 6jlo [24]). Положения атомов водорода были рассчитаны с использованием функционала B3LYP в базисе 6-31G(d). Молекулярные орбитали мономера Хл и Фео были рассчитаны на основе оптимизированной структуры с использованием гибридного функционала LC-ωPBE с учетом коррекции обменных взаимодействий на больших расстояниях [25] в базисе 6-311+G(d) для нейтрального состояния, а также для катиона и аниона.

Распределение электронной плотности в молекулах пигментов в нейтральном и заряженных состояниях аппроксимировали набором точечных парциальных зарядов δq_i , приписанных атомам макроцикла. Их расчет проводился путем подгонки классического распределения электростатического потенциала (ESP), генерируемого зарядами δq_i , к предварительно рассчитанному квантовомеханическому молекулярному потенциалу, рассчитанному в приближении DFT в области до 4 Å вокруг исследуемых молекул (детали см. в работе [26]). Расчет проводился с помощью программы Multiwfn [27]. При аппроксимации распределения электростатического потенциала точечными парциальными зарядами в качестве дополнительных условий использовался общий заряд молекулы (0, +1 или –1), а также, для нейтрального состояния, значения дипольного момента молекулы, полученные путем расчета *ab initio*. Парциальные заряды катиона и аниона определяли как разницу между заряженным и нейтральным состояниями хромофора. Для расчета энергии сольватации и электростатического взаимодействия катиона и аниона исследуемых ион-радикальных пар использовали программу Delphi 8.0 [28].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Рассмотрим два порфириновых макроцикла, А и В, находящихся на расстоянии R друг от друга в

однородной диэлектрической среде с проницаемостью ϵ . Электронное состояние фотовозбужденного гетеродимера Хл [DA]* можно описать как суперпозицию локально возбужденных экситонных состояний D⁺A и DA* на каждом мономере и состояния D⁺A⁻ с переносом заряда [29]. Относительный вклад состояния с разделенными зарядами чувствителен к диэлектрической проницаемости растворителя [30], а также к электронному сопряжению мономеров. Термодинамическим условием реакции разделения зарядов и формирования устойчивой ион-радикальной пары: [DA]* $\rightarrow$ D⁺A⁻, является такое расположение энергетических уровней, при котором потенциометрическая ширина запрещенной зоны (т.е. разность потенциалов окисления донора D и восстановления акцептора A) оказывается меньше оптической ширины запрещенной зоны:

$$E_m[D^+/D] - E_m[A/A^-] < h\nu_0,$$

где $h\nu_0$ — энергия нижнего экситонного перехода эксимера S₀ $\rightarrow$ S₁.

Электростатическая энергия ион-радикальной пары в диэлектрике включает в себя три составляющих:

$$\Delta G_{DA} = (\Delta G_D^{self} + \Delta G_A^{self}) + \Delta G_{DA}^{Coul} + \Delta G_{DA}, \quad (1)$$

где ΔG_D^{self} и ΔG_A^{self} — собственная энергия взаимодействия ионов D и A с диэлектриком (борновская энергия сольватации), ΔG_{DA}^{Coul} — суммарная кулоновская энергия взаимодействия зарядов катиона с зарядами аниона и ΔG_{DA} — энергия ион-радикальной пары в вакууме, которая определяется химической природой хромофоров. Если рассматривать ионы D и A как сферические частицы с радиусами a_D и a_A , соответственно, то энергию ион-радикальной пары можно записать следующим образом [31, 32]:

$$\Delta G_{DA}(\epsilon) = e^2 \left(\frac{1}{\epsilon} - \frac{1}{\epsilon'} \right) \left(\frac{1}{2a_D} + \frac{1}{2a_A} - \frac{1}{R} \right) + \Delta G'_{DA}.$$

Здесь $\Delta G'_{DA}$ — энергия образования ион-радикальной пары в растворителе с диэлектрической проницаемостью ϵ' , выбранном в качестве стандартного.

Для учета несферической формы полости, которую занимают молекулы хромофоров, а также неравномерного распределения электронной плотности по протяженной π -сопряженной системе макроцикла в окисленном и восстановленном состояниях электростатические взаимодействия ионов были рассчитаны в рамках континуальной модели. Координаты тяжелых атомов молекул Хл *a* и Фео *a* были взяты из кристалло-

графических структур ФС 1 [23] и ФС 2 [24]. Парциальные заряды δq_i тяжелых атомов катиона и аниона порфиринового макроцикла находили аппроксимацией распределения электростатического потенциала, полученного квантовохимическими расчетами в приближении DFT (метод ESP, см. разд. 2). Порфириновые макроциклы молекул Хл и Фео моделировались как вакуумные полости с диэлектрической проницаемостью $\epsilon_{in} = 1$, находящиеся в окружении с диэлектрической проницаемостью $\epsilon > 1$. Полости содержали атомы порфириновых колец, их границы были проведены на вандер-ваальсовом расстоянии от атомов макроцикла с дополнительным слоем толщиной 1.5 Å. Распределение электростатического потенциала, индуцированного парциальными зарядами δq_i на атомах макроцикла, было получено путем решения уравнения Пуассона с помощью программы DelPhi 8 [28].

Величину неэлектростатического вклада в энергию, $\Delta G'_{DA}$, находили по экспериментальным данным потенциометрического титрования Хл *a* и Фео *a* в апротонных растворителях (табл. 1). Потенциометрические данные позволяют определить энергию образования пар Хл⁺–Хл⁻ и Хл⁺–Фео⁻ в растворителях с различной диэлектрической проницаемостью (рис. 2). Через экспериментальные точки были проведены теоретические кривые *I'* и *I''* в соответствии с уравнением (1), в котором кулоновское взаимодействие ионов было принято равным нулю. В этом же приближении была рассчитана энергия образования двух возможных ион-радикальных состояний: P_{D1}⁺X⁻, где X – Хл_{D1} и X⁺Y⁻, где Y – Фео_{D1} (Схема 1, кривые 2' и 2'' на рис. 2). Электростатическое взаимодействие ионов рассчитывалось для геометрического расположения кофакторов в кристаллографической структуре ФС 2 в приближении распределенных парциальных зарядов, полученных методом DFT (подробнее см. в разд. 2). Экстраполяция энергии к величине диэлектрической проницаемости белка в центральной части фотосинтетического комплекса: $\epsilon \leq 4$ [33] (вертикальная линия на рис. 2), показывает, что энергия образования первичной ион-радикальной пары P_{D1}⁺X⁻ (Хл⁺–Хл⁻) на 0.2 эВ превышает световую энергию $h\nu_0 = 1.82$ эВ нижнего перехода S₀ $\rightarrow$ S₁ комплекса ФС 2, тогда как участие Фео_{D1} (Y) в качестве первичного акцептора (ион-радикальная пара Хл⁺–Фео⁻) понижает энергию первичной ион-радикальной пары на ~0.24 эВ, что делает образование ион-радикального состояния X⁺Y⁻ термодинамически устойчивым.

Таблица 1. Значения среднеточечных потенциалов окисления и восстановления Хл и Фео в растворителях с различной диэлектрической проницаемостью

Среда	ϵ	E_m (SCE), В			
		$\text{Хл}^+/\text{Хл}$	$\text{Хл}/\text{Хл}^-$	$\text{Фео}/\text{Фео}^-$	источник
THF	7.6	0.81	-1.20	-0.97	[37]
BCN	20.5	0.62	-1.20	-0.94	[37]
DMF	36.7	0.60	-1.12	-0.87	[37]
DMF	36.7	0.62	-1.12	-0.90	[38]
DMF	36.7	0.59	-1.14		[39]

Примечания: THF – тетрагидрофуран, BCN – бутиронитрил, DMF – диметилформамид, SCE – стандартный каломельный электрод.

В канонической ФС 1 отсутствует феофитин, и акцептором электрона выступает Хл. Энергия ион-радикального состояния $\text{Хл}^+\text{У}^-$, рассчитанная аналогичным образом для геометрической конфигурации кофакторов в структуре ФС 1 цианобактерий (кривая 3 на рис. 2), оказывается на ~ 0.08 эВ ниже энергии ион-радикальной пары $\text{Хл}^+\text{У}^-$ в ФС 2 (за счет более близкого расположения кофакторов), однако остается на ~ 0.15 эВ вы-

ше световой энергии $h\nu_0 = 1.77$ эВ. Таким образом, образование ион-радикального состояния $\text{Хл}^+\text{У}^-$, в котором роль первичного донора выполняет мономер Хл 2, а акцептором является Хл 3, в реакционном центре ФС 1 представляется термодинамически нереализуемым.

Понижение энергии первичной ион-радикальной пары в ФС 1 может обеспечиваться сочетанием нескольких факторов. Во-первых, это делокализация электронной плотности как в димере $\text{Р}_\text{А}\text{Р}_\text{В}$ (первичный донор Р_{700}), так и в гетеродимере Хл2/Хл3 (первичный акцептор – А_0). Расчеты *ab initio* в том же приближении в вакууме показывают, что делокализация электронной плотности в катион-радикале Р_{700}^+ димера и анион-радикале А_0^- гетеродимера понижает энергию образования ион-радикальной пары на 0.26 эВ. Во-вторых, порфириновые макроциклы Хл в реакционном центре ФС 1 сильно деформированы и не являются плоскими. Энергия порфиринового макроцикла линейно возрастает при отклонении от плоской равновесной конформации, достигая максимального значения для седловидной конформации [34–36]. Сильно искаженные конформации порфириновых макроциклов Р_{700} , Хл2 и Хл3 (рис. 1в) могут быть причиной существенных сдвигов энергетических уровней относительно плоской равновесной конформации макроцикла в растворе. В-третьих, дополнительные сдвиги электронных уровней могут возникать из-за специфических химических взаимодействий Хл с белком (координация магния, образование водородных связей, локальные электростатические эффекты).

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках континуального приближения проведен расчет электростатической энергии фотоиндуцированного образования первичных ион-радикальных пар в системе близкорасположенных порфириновых кофакторов в реакционных центрах фотосистем 1 и 2. Модель количественно воспроизводит наблюдаемую зависимость среднеточечных редокс-потенциалов хлорофилла и феофитина в апротонных растворителях с различной диэлектрической проницаемостью. В этом же приближении рассчитана свободная энергия образования ион-радикальных пар $\text{Хл}^+ - \text{Хл}^-$ и $\text{Хл}^+ - \text{Фео}^-$ в фотосинтетических комплексах. Энергия образования ион-радикальной пары $\text{Хл}^+ - \text{Хл}^-$ в реакционных центрах ФС 1 и ФС 2 превышает порог в 1.8 эВ, обусловленный энергией поглощаемого кванта света. В рамках рассмотренной модели в комплексе ФС 2 первичное разделение зарядов

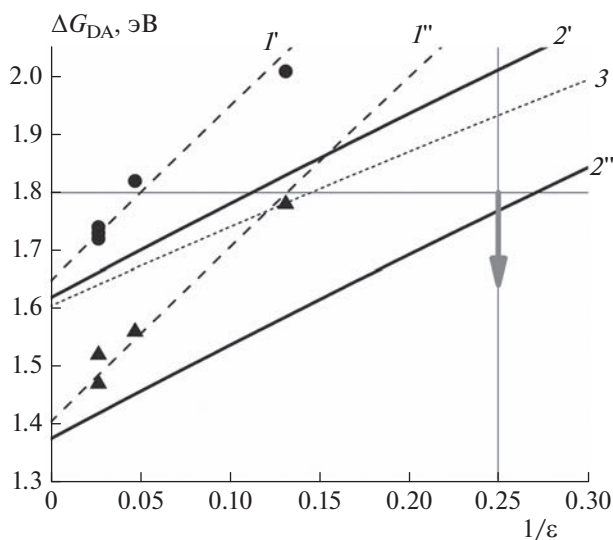


Рис. 2. Свободная энергия образования ион-радикальных пар $\text{Хл}^+ - \text{Хл}^-$ (I' , $2'$, 3) и $\text{Хл}^+ - \text{Фео}^-$ (I'' , $2''$) в растворе (I') и в реакционном центре ФС 2 ($2'$, 3). Данные потенциометрического титрования Хл (кружки) и Фео (треугольники) приведены согласно табл. 1. Линией 3 показана энергия образования ион-радикальной пары $\text{Хл}2(\text{А}^+) - \text{Хл}3(\text{А}^-)$ в реакционном центре ФС 1. Горизонтальная линия показывает среднюю энергию перехода $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ реакционных центров ФС 1 и ФС 2, вертикальная линия – значение диэлектрической проницаемости белка ($\epsilon \approx 4$), а вертикальная стрелка – разрешенную зону перехода.

между мономерами Хл_{D1} и Фео_{D1} является единственным энергетически допустимым механизмом. По этой же причине мономер Хл_2 в реакционном центре ФС I не может выступать в качестве первичного донора электрона. Стабилизация первичной ион-радикальной пары в ФС I, вероятнее всего, происходит за счет делокализации электронной плотности в димере P_{700} и гетеродимере A_0 , сильной структурной деформации порфириновых макроциклов и их локальных взаимодействий с белком.

Работа выполнена при поддержке грантом Российского научного фонда № 22-24-00705.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медведев Э.С., Котельников А.И., Горячев Н.С. и др. // Хим. физика. 2011. Т. 30. № 3. С. 71.
2. Schenderlein M., Çetin M., Barber J. et al. // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 2008. V. 1777. № 11. P. 1400; <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.08.008>
3. Gorka M., Charles P., Kalendra V. et al. // iScience. 2021. V. 24. № 7. P. 102719; <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102719>
4. Chauvet A., Dashdorj N., Golbeck J.H. et al. // J. Phys. Chem. B. 2012. V. 116. № 10. P. 3380; <https://doi.org/10.1021/jp211246a>
5. Cherepanov D.A., Shelaev I. V., Gostev F.E. et al. // Photochem. Photobiol. Sci. 2021. V. 20. № 9. P. 1209; <https://doi.org/10.1007/s43630-021-00094-y>
6. Shuvalov V.A. // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 1976. V. 430. № 1. P. 113; [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(76\)90227-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(76)90227-9)
7. Savikhin S. Photosystem I. Advances in Photosynthesis and Respiration. V. 24 / Ed. Golbeck J.H. Dordrecht: Springer, 2006. P. 155; https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4256-0_12
8. Shelaev I.V., Gostev F.E., Mamedov M.D. et al. // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 2010. V. 1797. № 8. P. 1410; <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.026>
9. Gorka M., Baldansuren A., Malnati A. et al. // Front. Microbiol. 2021. V. 12. P. 2776; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735666>
10. Cherepanov D.A., Shelaev I. V., Gostev F.E. et al. // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 2017. V. 1858. № 11. P. 895; <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.08.008>
11. Plato M., Krauß N., Fromme P., Lubitz W. // Chem. Phys. 2003. V. 294. № 3. P. 483; [https://doi.org/10.1016/S0301-0104\(03\)00378-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0104(03)00378-1)
12. Artiukhin D.G., Eschenbach P., Neugebauer J. // J. Phys. Chem. B. 2020. V. 124. № 24. P. 4873; <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.0c02827>
13. Müller M.G., Niklas J., Lubitz W., Holzwarth A.R. // Biophys. J. 2003. V. 85. № 6. P. 3899; [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(03\)74804-8](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(03)74804-8)
14. Molotokaite E., Remelli W., Casazza A.P. et al. // J. Phys. Chem. B. 2017. V. 121. № 42. P. 9816; <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07064>
15. Климов В.В., Аллавердиев С.И., Деметер Ш., Красновский А.А. // Докл. АН СССР. 1979. Т. 49. С. 227.
16. Tomo T., Allakhverdiev S.I., Mimuro M. // J. Photochem. Photobiol., B. 2011. V. 104. № 1–2. P. 333; <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.02.017>
17. Кувыкин И.В., Вершубский А.В., Тихонов А.Н. // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 4. С. 63.
18. Nadtochenko V.A., Shelaev I. V., Mamedov M.D. et al. // Biochem. 2014. V. 79. № 3. P. 197; <https://doi.org/10.1134/S0006297914030043>
19. Raszewski G., Saenger W., Renger T. // Biophys. J. 2005. V. 88. № 2. P. 986; <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050294>
20. Novoderezhkin V.I., Romero E., Dekker J.P., Van Gron-delle R. // Chem. Phys. Chem. 2011. V. 12. № 3. P. 681; <https://doi.org/10.1002/cphc.201000830>
21. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Scalmani G., Barone V., Petersson G.A., Nakatsuji H., Li X., Caricato M., Marenich A.V., Bloino J., Janesko B.G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H.P., Ortiz J.V., Izmaylov A.F., Sonnenberg J.L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T. // Gaussian. 16. Rev. C. 01. Wallingford CT: Gaussian Inc., 2016.
22. Parr R.G., Weitao Y. Density-Functional Theory of Atoms and Molecules. N.Y.: Oxford Academic, 1995; <https://doi.org/10.1093/OSO/9780195092769.003.0005>
23. Jordan P., Fromme P., Witt H.T. et al. // Nature. 2001. V. 411. № 6840. P. 909; <https://doi.org/10.1038/35082000>
24. Britt R.D., Marchiori D.A. // Science. 2019. V. 366. № 6463. P. 305; <https://doi.org/10.1126/science.aaz4522>
25. Henderson T.M., Izmaylov A.F., Scalmani G., Scuseria G.E. // J. Chem. Phys. 2009. V. 131. № 4. P. 044108; <https://doi.org/10.1063/1.3185673>
26. Черепанов Д.А., Милановский Г.Е., Айбуш А.В., Надточенко В.А. // Хим. физика. 2023.
27. Lu T., Chen F. // J. Comput. Chem. 2012. V. 33. № 5. P. 580; <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>
28. Rocchia W., Alexov E., Honig B. // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. № 28. P. 6507; <https://doi.org/10.1021/jp010454y>
29. Vauthey E. // Chem. Phys. Chem. 2012. V. 13. № 8. P. 2001; <https://doi.org/10.1002/cphc.201200106>
30. Kellogg M., Akil A., Muthiah Ravinson D.S. et al. // Faraday Discuss. 2019. V. 216. P. 379; <https://doi.org/10.1039/c8fd00201k>
31. Krishtalik L.I. // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 2011. V. 1807. № 11. P. 1444; <https://doi.org/10.1016/J.BBABI.2011.07.002>

32. Хохлова С.С., Михайлова В.А., Иванов А.И. // Хим. физика. 2007. Т. 26. № 7. С. 27.
33. Ptushenko V.V., Cherepanov D.A., Krishtalik L.I., Semenov A.Y. // Photosynth. Res. 2008. V. 97. № 1. P. 55; <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9309-y>
34. Lebedev A.Y., Filatov M.A., Cheprakov A.V., Vinogradov S.A. // J. Phys. Chem. A. 2008. V. 112. № 33. P. 7723; <https://doi.org/10.1021/jp8043626>
35. Sazanovich I.V., Galievsky V.A., Van Hoek A. et al. // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. № 32. P. 7818; <https://doi.org/10.1021/jp010274o>
36. Röder B., Büchner M., Rückmann I., Senge M.O. // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. V. 9. № 8. P. 1152; <https://doi.org/10.1039/c0pp00107d>
37. Wasielewski M.R., Smith R.L., Kostka A.G. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 102. № 23. P. 358; https://doi.org/10.1021/JA00543A004/ASSET/JA00-543A004.FP.PNG_V03
38. Kobayashi M., Ohashi S., Iwamoto K. et al. // Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg. 2007. V. 1767. № 6. P. 596; <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2007.02.015>
39. Saji T., Bard A.J. // J. Amer. Chem. Soc. 1977. V. 99. № 7. P. 2235; <https://doi.org/10.1021/ja00449a034>