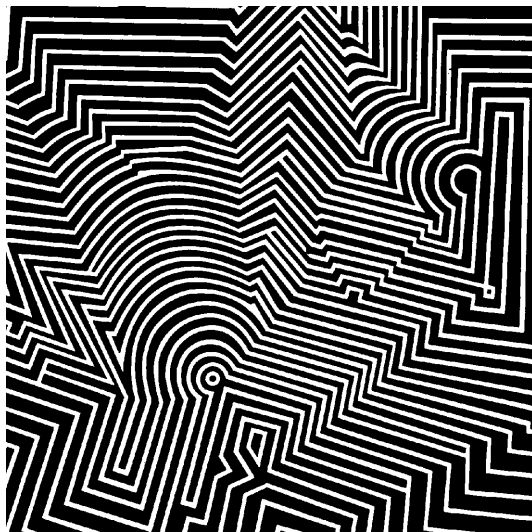


IV

Динамические свойства глобулярных белков



X

Динамика белков

XI

Физические модели динамической подвижности белков

Глава X

Динамика белков



§ 1. Структурные изменения белков

Нативная трехмерная структура устанавливается в результате действия целого ряда энергетических и энтропийных факторов. В биохимии хорошо известно, что изменение конформационного состояния молекулы белка за счет различных внешних воздействий (рН, температура, ионный состав) отражается и на его функциональной активности. Возникает вопрос: насколько остается стабильной структура белка в самом процессе его функционирования и не претерпевает ли она изменений, непосредственно связанных с протеканием реакции, в которую вовлечена молекула белка? Иными словами, вопрос заключается в том, какой собственной конформационной подвижностью обладает структура биополимеров, в чем состоит ее природа и каково ее функциональное значение? Сформулированная таким образом проблема имеет огромное значение для понимания молекулярных механизмов функциональной активности биомакромолекул и участия их в фундаментальных биологических процессах. Речь идет о выполнении принципа единства структуры и функции в биологии на макромолекулярном уровне.

Известно, что характерные времена многих внутримолекулярных превращений, в том числе ферментативных процессов в биоструктурах, не превышают 10^{-2} — 10^{-3} с, а подчас могут быть и на несколько порядков короче. Очевидно, сопровождающие их конформационные перестройки также должны происходить весьма быстро. Однако за столь короткие времена они не могут затронуть сразу глубоко всю макромолекулярную структуру и поэтому должны на первых стадиях носить локальный микроконформационный характер, вызывая смещения лишь отдельных атомных групп. Распространение таких локальных смещений на остальные области макромолекулярной структуры приведет уже к общему конформационному изменению молекулы биополимера. Только в последние годы благодаря разработке и внедрению новых методов удалось преодолеть экспериментальные трудности и получить непосредственную информацию о такого рода внутримолекулярной подвижности биополимеров.

Вначале будут приведены данные о конформационных изменениях белков, тесно связанных с их функциональной активностью, а затем рассмотрены природа и физические механизмы конформационной подвижности биомакромолекул.

Кооперативные перестройки в белках. Рассмотрим в качестве примера конформационные перестройки глобулярных белков-переносчиков молекулярного кислорода — миоглобина (Mb) и гемоглобина (Hb). Строение этих белков в

кристаллической форме детально изучено методом рентгеноструктурного анализа (рис. X.1).

Пространство между α -спиральными участками, в том числе и полость активного центра гемовой группы внутри молекулы Mb, заполнено гидрофобными боковыми цепями аминокислот. В окружающую водную среду выступает большинство полярных белковых цепей. Молекула Hb состоит из четырех субъединиц (две α и две β), образующих почти правильный тетрамер размером $6,0 \times 5,5 \times 6,9$ нм. Каждая

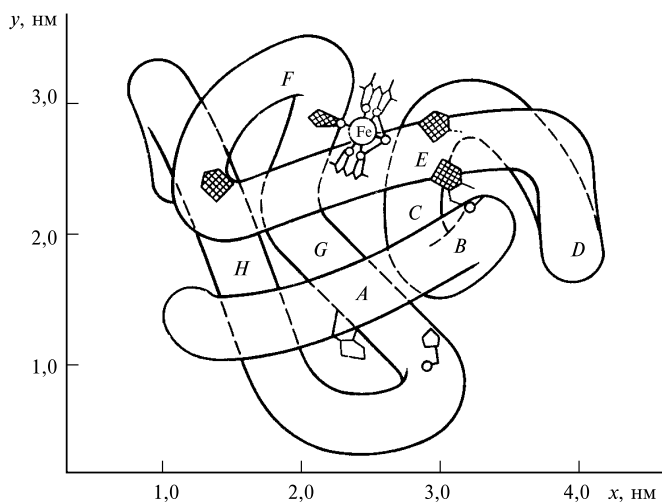


Рис. X.1

Пространственная структура миоглобина (кашало) в проекции xy

Миоглобин (переносчик кислорода в мышцах) содержит один гем и одну полипептидную цепь, включающую 153 остатка, которые распределены в основном по 8 α -спиральным участкам (A–H). Гем, в центре которого расположен атом Fe, находится между спиралями E и F.

из субъединиц мономеров гемоглобина в основных чертах подобна молекуле Mb. Полость внутри тетрамера длиной 5 нм и сечением около $2,0 \times 1,0$ нм пронизывает всю молекулу Hb. Молекулы воды, локализованные в области контактов субъединиц, образуют солевые мостики и дополнительно стабилизируют тетрамер. Железо может находиться в высоком низкоспиновом состоянии в зависимости от способа заполнения d -орбиталей электронами. В Fe^{2+} шесть внешних электронов заполняют $3d$ -орбитали таким образом, что на одной из них располагаются два электрона с антипараллельными спинами, а оставшиеся четыре орбитали заполняются каждая одним электроном, так что суммарный спин равен 2. Ситуация меняется, когда Fe^{2+} и Fe^{3+} находятся в комплексах, где они связаны с лигандными атомами ковалентной связью (например, в ионах ферро- или феррицианида) или входят в состав гема.

В этом случае ион железа находится в окружении шести отрицательно заряженных лигандов, расположенных на осях x , y , z октаэдрического комплекса. Электрическое поле лигандов приводит к тому, что d -орбитали начинают различаться по энергии: орбитали d_{z^2} и $d_{x^2-y^2}$ обладают более высокой энергией, чем другие d -орбитали (d_{xy} , d_{yz} , d_{zx} ; рис. X.2).

В зависимости от разности энергии орбиталей Δ ион Fe может находиться в разных спиновых состояниях. Если энергия, требующаяся для помещения двух электронов на одну из нижних d -орбиталей (т. е. энергия отталкивания двух электронов на одной d -орбитали) больше Δ , то электроны «разойдутся» и займут d -орбитали на верхнем и нижнем уровнях. Однако, если Δ значительно больше энергии спаривания d -электронов на одной d -орбитали, то все d -электроны разместятся на нижних

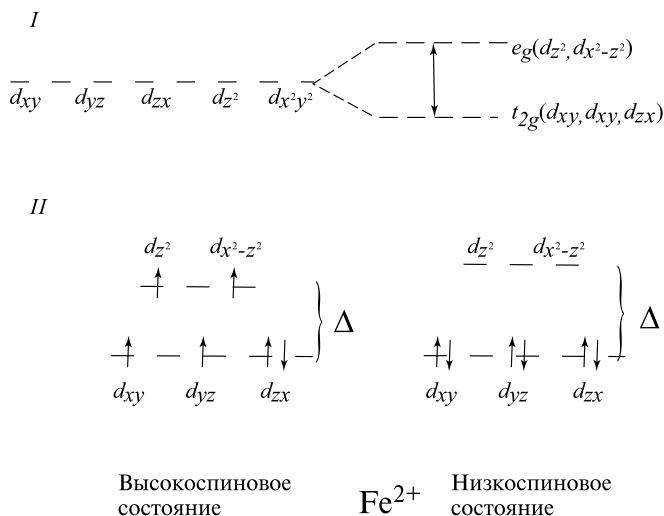


Рис. X.2

Расщепление d -орбиталей в октаэдрическом комплексе (I): и распределение d -электронов по орбиталям высокоспинового (расщепление Δ мало) и низкоспинового (расщепление Δ велико) состояний иона Fe^{2+} (II)

Символы e и t относятся к дважды и трижды вырожденным орбиталям

d -орбиталях таким образом, что суммарный спин будет равным $1/2$ (низкоспиновое состояние): Fe^{2+} , имеющий 6 d -электронов, в высокоспиновом состоянии обладает суммарным спином d -электронов, равным 2, а в низкоспиновом — 0 (рис. X.2).

Спиновое состояние центрального атома в комплексах определяется характером лигандного окружения: симметрией, силой связывания лигандов в комплексе. В силу этого изменения в лигандном окружении могут приводить к изменениям в спиновом состоянии иона металла, что, в свою очередь, может вызывать изменения конформации белка, с которым связан ион металла.

Изменения спинового состояния ионов Fe, индуцированные присоединением субстратов, сменой температуры, были продемонстрированы для ряда гемопротейнов. Переход иона Fe из низкоспинового в высокоспиновое состояние увеличивает диаметр иона и приводит к выходу его из плоскости гема, что обуславливает и конформационные изменения в ближайшем «белковом» окружении гема.

В высокоспиновом ферросостоянии Fe^{2+} обладает координационным числом 5 и расположен вне плоскости гема на расстоянии около 0,05–0,07 нм. Он коорди-

национно связан с четырьмя атомами азота пиррольных групп плоского порфиринового кольца, а в 5-м положении взаимодействует с атомом N имидазольного кольца гистидина. Оксигенация и образование связи кислород–железо не меняют валентности атома железа Fe^{2+} , но переводят его из высокоспинового состояния в низкоспиновое, увеличивая число лигандов в координационной сфере до шести. В 6-м положении железо координируется с кислородом или с другими лигандами.

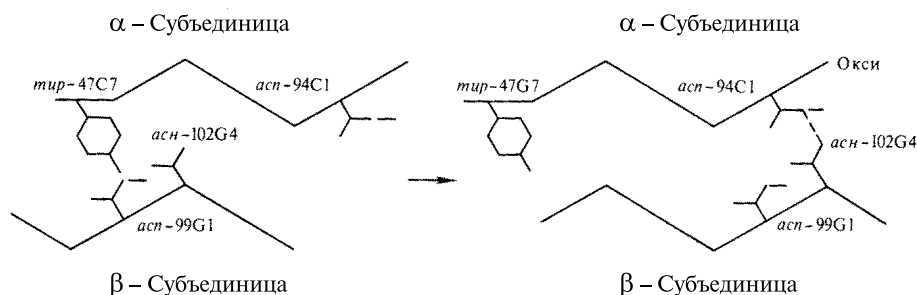


Рис. X.3

Структурные изменения, происходящие в гемоглобине при оксигенации (объяснение см. в тексте) (по Д. Мецлеру, 1980)

Присоединение кислорода индуцирует ряд конформационных изменений в молекуле Нб, раскрытых в работах Perutz М. Связывание кислорода с переводом иона Fe^{2+} в низкоспиновое состояние сопровождается одновременным смещением железа на 0,07 нм в плоскость гемовой группы. Это смещение передается через гистидин ($F-8$), и спираль (F) вместе с гистидином «подтягивается» в сторону гема к центру молекулы, выталкивая из полости остаток тирозина. Затем происходит поэтапный разрыв солевых мостиков между α -субъединицами и смещение субъединиц вдоль контактов $\alpha_1 - \beta_2$ и $\alpha_2 - \beta_1$ на 0,07 нм (рис. X.3). Расстояние между гемами α -субъединиц увеличивается с 3,49 до 3,60 нм, а между гемами β -субъединиц, наоборот, сокращается с 3,9 до 3,3 нм. Центральная полость при этом сжимается. Разрыв шести солевых мостиков и освобождение протонов (эффект Бора) характерны для изменений, происходящих в Нб. Энергия взаимодействия между субъединицами уменьшается на 25–50 кДж/моль. Конформация самих α - и β -субъединиц также изменяется, в частности на С-концах цепи. В целом оксигенация переводит каждую из субъединиц из дезокси- и оксиконформацию. Разрыв четырех солевых мостиков из шести при оксигенации первых двух α -субъединиц способствует разрыву двух остальных мостиков и, следовательно, облегчает присоединение следующих молекул кислорода к остальным субъединицам, увеличивая сродство их к кислороду в несколько сотен раз. В этом и состоит кооперативный характер присоединения O_2 к Нб, при котором начало оксигенации Нб облегчает связывание остальных молекул O_2 . □

Мы приведем еще два примера кооперативных взаимодействий в белках, играющих важную роль в их каталитической активности.

Фосфорилаза — ключевой фермент в процессах трансформации химической энергии гликолиза. В активном состоянии фосфорилаза катализирует фосфорилирование гликогена с освобождением глюкозы-1-фосфат. Фермент представляет собой димер из двух идентичных субъединиц, содержащих по 842 аминокислотных остатка каждый.

Фосфорилаза может активироваться и по аллостерическому механизму различными агентами, в том числе АМФ, а также другим ферментом фосфорилазкиназой, которая вызывает активацию фосфорилазы за счет фосфорилирования остатков серина. Гидролиз фосфатных связей серина ингибирует фосфорилазу. В нефосфорилированной форме фермент неактивен.

Перевод фермента, состоящего из 1684 аминокислотных остатков, в активное состояние за счет фосфорилирования одной пары остатков серина является ярким примером кооперативных взаимодействий в белке. Рентгеноструктурный анализ различных форм фосфорилазы — неактивной *T*-формы и активной *R*-формы, позволили выяснить механизмы процесса аллостерической активации. Ядро каждой из субъединиц состоит из β -складок, окруженных α -спиральными участками. На каждой из субъединиц расположены каталитический центр, остаток фосфат-серина, а также участки белка, связывающие активатор АМФ и ингибитор глюкозо-6-фосфат.

Область контакта между субъединицами в димере фосфорилазы занимает не более 10% всей поверхности глобулы, что облегчает ее внутримолекулярную подвижность. Места связывания эффекторов и каталитический центр находятся далеко друг от друга. Так, фосфат-серин и участок связывания АМФ разделены на расстояние ~ 15 Å, а расстояние от них до ближайшего каталитического центра превышает 30 Å. Между каталитическими центрами на субъединицах расстояние составляет не менее 60 Å. Тем не менее, присоединение лиганда к любому из этих мест влияет на состояние всех остальных.

Фосфорилирование серина 14 изменяет характер связи на границе между субъединицами, что сопровождается упорядочиванием расположения 16 аминокислотных остатков *N*-конца и «разрыхлением» расположения 5 остатков на *C*-конце.

В свою очередь это сопровождается изменением водородных связей, солевых мостиков в глобуле, образованных фосфат-серином 14 и двумя аргининами, а также гистидином и аспаратом из двух субъединиц.

Аллостерический переход заключается во вращении на 10° двух субъединиц. Их вращение влияет на положение двух $\alpha 7$ - и $\alpha 8$ -спиралей, которые образуют мостик между каталитическим центром и регуляторным участком соседних субъединиц (рис. X.3а). Угол между α -спиралями резко меняется при переходе от *T*-формы к *R*-форме фермента.

Петля в $\alpha 7$ -спирали закрывает доступ субстрата к центру (замок) в *T*-форме. Она разрушается, а центр открывается в *R*-форме. Таким образом, фосфорилирование серина вблизи границы между субъединицами дает начало аллостерическим превращениям, которые распространяются на всю глобулу с помощью $\alpha 7$ - и $\alpha 8$ -спиралей, изменяющих свое взаимное расположение.

Открытие доступа субстрата к каталитическому центру в *R*-форме сопровождается также доступом туда катионных боковых цепей и переходом кофактора

пиридоксальфосфата из моноионной в дианионную форму, что необходимо для катализа.

Рассмотрим теперь превращение другого фермента — фосфофруктокиназы ФФК (PFK), катализирующего в гликолизе фосфорилирование фруктозо-6-фосфата Ф6Р (F6R) с образованием 1,6-дифосфата ФДФ (FDP) за счет переноса γ -фосфатной группы АТФ при гидролизе:



Мы уже говорили (гл. II, § 2), что на этой стадии происходит активация фермента ФФК продуктами катализируемой ими реакции (АДФ, ФДФ), что вызывает автоколебания в гликолизе. Фермент ФФК обладает двумя состояниями, которые

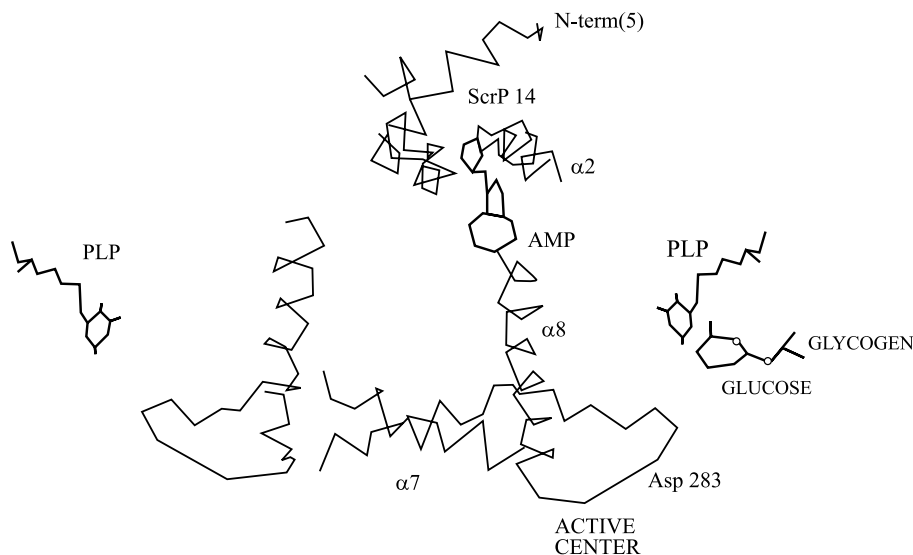


Рис. X.3а

В молекуле фосфорилазы (Т-форма) $\alpha 7$ - и $\alpha 8$ -спирали соединяют регуляторные (АМР) участки и активный центр (пиридоксаль-фосфат PLP)

отличаются сродством к АДФ. В активной *R*-форме активатор $\text{Mg}-\text{АДФ}$ связан водородными связями с полярными группами субъединиц белка. Каталитический центр ФФК лежит на границе между субъединицами, где происходит аллостерический переход, влияющий на активность фермента. Активирование фермента ФФК происходит здесь не за счет индуцирования вращения субъединиц, как в гемоглобине и фосфорилазе, а в ходе изменений его четвертичной структуры, оказывающих свое влияние в области границы между субъединицами.

Движения элементов четвертичной структуры здесь связаны с замыканием и раскрытием полипептидных петель, которые «тянут» за собой субъединицы наподобие рычагов.

Неравновесные конформационные состояния

Экспериментальное изучение релаксации неравновесных состояний в Hb и Mb проводят импульсными методами, позволяющими создать за короткое время большие концентрации неравновесных форм, отличающихся определенными спектральными свойствами. Последующее изменение во времени этих свойств, например коэффициентов поглощения при определенных длинах волн, позволяет судить о кинетике превращения соответствующих неравновесных состояний.

Эксперименты по фотодиссоциации карбоксигемоглобина, проводимые методом импульсного фотолиза с помощью лазерных импульсов, показали образование короткоживущих неравновесных состояний восстановленного гемоглобина. Оказалось также, что собственно фотодиссоциация Hb O₂ проходит через 10⁻⁵–10⁻⁷ с и связана с конформационными изменениями в области гема. Ей, однако, предшествует образование короткоживущего промежуточного состояния $\tau \leq 10^{-9}$ с.

Методом импульсного радиолиза достигается быстрое ($\tau \leq 10^{-6}$ с) восстановление иона металла в активном центре металлопротеина электронами, которые образуются во время радиолиза. Таким образом проводили восстановление ферригемоглобина и его комплексов с OH⁻, F⁻, CN⁻, N₃⁻ термализованными электронами (Л. А. Блюменфельд). Восстановление атома железа до Fe²⁺ происходит в этих условиях в конформации белка, соответствующей исходной ферриформе (Fe³⁺), так что белок в первые моменты находится в неравновесном состоянии. При низкой температуре (77 К) неравновесные восстановленные формы можно зафиксировать и идентифицировать по характерным особенностям в спектрах поглощения. Гемовое железо Fe²⁺ в этих неравновесных белках находится в низкоспиновом состоянии в отличие от равновесных белков, где оно исходно высокоспиновое. Конформационная релаксация к равновесному состоянию протекает в несколько стадий с константами скоростей порядка от 1–10² до 10⁴–10⁵ с⁻¹.

Как видно, времена жизни промежуточных неравновесных состояний металлопорфиринов достаточно велики по сравнению с характерными временами обычных ферментативных процессов. Восстановленные металлопорфирины в неравновесных состояниях могут обладать повышенной реакционной способностью. Так, неравновесные низкоспиновые комплексы феррогемоглобина и ферромиоглобина с CN⁻ и N₃⁻ гораздо быстрее отдают электроны, окисляясь феррицианидом, чем высокоспиновые равновесные формы этих же белков. Повышенная реакционная способность неравновесных восстановленных белков в окислительно-восстановительных реакциях, где они служат донорами электрона, может объясняться тем, что они исходно обладают конформацией, соответствующей их окисленному состоянию. За время существования этой неравновесной конформации отрыв электрона происходит в условиях, не требующих дополнительной перестройки белка, что и должно обеспечить его быстрое окисление.

☐ Рассмотренные на примере Hb и Mb конформационные изменения, протекающие в процессе функционирования белков, присущи и другим белкам (цитохромы, пероксидаза, ферредоксин). Характерная особенность описанных изменений, имеющая принципиальное значение для понимания механизмов функционирования биомакромолекул, состоит в том, что они имеют явно выраженное функциональное значение (например, облегчают присоединение O₂ к Hb). В свою очередь, это об-

стоятельство является следствием определенной внутримолекулярной организации белка, отличающей его от случайной конфигурации атомов, подчиняющихся только статистическим закономерностям. Описанные конформационные перестройки глубоко затрагивают структуру белков и представляют собой каскад последовательных взаимообусловленных внутримолекулярных актов, идущих направленно и тесно связанных с функционированием переносчиков O_2 . Эти превращения идут самопроизвольно после первоначального «толчка» при соединении атома Fe с O_2 и последующего смещения атома Fe в полость гемовой группы. Это локальное конформационное изменение в молекуле белка затем распространяется и на остальную ее часть. Физическая причина данного процесса состоит в том, что первоначальное равновесие сил и, следовательно, равновесная дезоксиконформация белка оказались необратимо нарушенными в результате присоединения кислорода. Новая равновесная оксиконформация и равновесие сил устанавливаются при другом взаимном расположении атомных групп в белке, что и находит свое отражение в происходящих конформационных изменениях. Весь процесс достижения конечной равновесной оксиконформации проходит через ряд последовательных неравновесных стадий как релаксация первоначально неравновесного состояния, образованного быстрым присоединением O_2 к исходно равновесной дезоксиформе. □

§ 2. Конформационная подвижность белков по данным различных методов

Рассмотренные выше конформационные превращения в белках, установленные методом рентгеноструктурного анализа, относятся к области относительно крупномасштабных макромолекулярных сдвигов, которые отражают суммарный результат более мелких локальных конформационных изменений. Очевидно, в белковой молекуле существует ряд различных конформационных подсостояний, которые быстро возникают в результате короткоживущих возмущений и флуктуаций основной структуры и между которыми быстро устанавливается равновесие. Напомним, что энергия тепловых колебаний $k_B T \sim 2$ кДж/моль при 300 К сравнима по величине с высотами барьеров на конформационных энергетических картах биополимеров (см. гл. IX). Это является причиной флуктуаций с изменением взаимного расположения атомов, не связанных валентными связями в основной цепи. Так, флуктуации молекулярного объема у молекул с молекулярной массой до 14 000 могут при 300 К составить 0,03–0,04 нм³, а флуктуации поверхности — до 0,01 нм², т. е. 0,1% всей площади поверхности молекулы. Длина водородной связи — основного фактора, стабилизирующего вторичную структуру, может меняться при тепловых флуктуациях (300 К) на 0,01 нм, а углы — на 20–25°.

Отсюда ясно, что различные части белковой структуры участвуют в быстрых спонтанных движениях, отличающихся друг от друга по ряду параметров. «Увидеть» эти быстрые внутренние движения, измерить их характерные времена, определить места локализации в белковой глобуле стало возможным главным образом благодаря внедрению современных физических методов. Среди них решающую роль в исследовании динамики белка сыграли резонансные методы радиоспектроскопии (электронный парамагнитный, ядерный магнитный резонансы, ядерный гамма-резонанс), методы люминесценции, водородного обмена. Полная картина динамики

белка еще весьма далека от своего завершения. Физические механизмы конформационной подвижности белка интенсивно изучают в настоящее время. Предлагаемые для их понимания модели динамической подвижности тесно связаны с физическими основами и временным разрешением используемых методов исследования.

Метод изотопного обмена

Исторически возникновение понятия о конформационной подвижности белков связано с развитием метода изотопного обмена атомов водорода. Явление изотопного обмена состоит в том, что атомы водорода, входящие в основном в амидные пептидные группы, могут вступать в обратимую реакцию обмена с атомами дейтерия и трития, находящимися в окружающем растворителе. К. У. Линдештрем-Ланг первым обратил внимание на тот факт, что изотопный обмен протекает даже в свернутой компактной конформации белка, но более медленно, чем в рыхлом денатурированном состоянии. Очевидно, недоступные для растворителя пептидные группы могут тем не менее на короткое время экспонироваться в раствор вследствие конформационных переходов типа свертывания–развертывания, которые непрерывно происходят в белковой глобуле.

Механизм обмена можно представить в виде схемы



где N — нативное усредненное состояние белка, в котором внутренние NH-группы практически не обмениваются; I — промежуточное состояние белка, в котором некоторые NH-группы становятся доступными для растворителя, а значит, и для обмена; k_+ , k_- — константы реакций первого порядка конформационных переходов; k_o — константа скорости обмена в условиях полной доступности для растворителя NH-группы. Зависимость скорости обмена от pH позволила установить, что водородный обмен белков проходит по схеме так называемого EX_2 механизма, условием которого является

$$k_+ \gg k_o, \quad (\text{X.2.2})$$

согласно которому скорость конформационных переходов $N \rightleftharpoons I$ намного выше скорости изотопного обмена в условиях полной доступности.

Значения констант равновесия $K = k_+/k_-$, полученные по изотопному обмену, совпадают с величинами, выведенными из данных по тепловой денатурации, и составляют $10^{-2} - 10^{-10}$, а $\Delta G \simeq 40 \div 60$ кДж/моль. Видно, что только около 10^{-10} части времени нативный белок проводит в денатурированном (развернутом) состоянии.

Температурная зависимость скорости водородного обмена показывает, что вдали от температуры денатурации реакция обмена характеризуется малыми значениями энергии активации, а вблизи нее — высокими.

Очевидно, в белке могут происходить два типа конформационных изменений. Переходы одного типа температурно зависимы и аналогичны общему кооперативному разворачиванию белковой глобулы при обратимой денатурации с большими тепловыми и энтропийными эффектами ($\Delta G^0, \Delta H^0, \Delta S^0 \gg 0$). Конформационные переходы другого типа можно назвать локальными. Связанный с ними обмен про-

ходит без общего теплового разворачивания белковой глобулы, а обусловлен именно «локальной подвижностью» белковой матрицы. Кинетические кривые этого типа многокомпонентны, скорость самого обмена слабо зависит от температуры, а изменения термодинамических параметров характеризуются отрицательными значениями ΔS и величинами ΔH , близкими к нулю. Они отличаются, таким образом, от переходов общего денатурационного типа. Видимо, слабо зависящие от температуры локальные движения отражают динамику жестких плотноупакованных участков белковой матрицы.

Изучение кинетических кривых изотопного обмена широко используют для оценки динамической подвижности белка в разных конформационных состояниях. Оказалось, например, что отрыв гема от гемоглобина или диссоциация этого белка на субъединицы приводят к небольшому увеличению объема апобелка и возрастанию конформационной подвижности с одновременным исчезновением рН-зависимых изменений внутримолекулярной подвижности. В лигандных формах гемоглобина по сравнению с нелигандной дезоксиформой смещение атома Fe вместе с гистидином к гемовой плоскости увеличивает локальную подвижность. У цитохрома с скорость обмена в окисленной менее компактной форме — феррицитохроме — выше, чем в восстановленной — ферроцитохроме.

☐ Метод изотопного обмена дает уникальную возможность регистрировать ничтожные концентрации конформационно неравновесных состояний. Однако он не позволяет установить, какая часть молекулы белка и каким образом должна перестроиться, чтобы ее NH-группы оказались доступными растворителю. К сожалению, этим методом нельзя также определить и частоту конформационных движений, которая представляет собой важную характеристику внутримолекулярной подвижности белка. Ценность метода изотопного обмена определяется информацией о локальных конформационно неравновесных состояниях, которые, накапливаясь в достаточных концентрациях, могут способствовать конформационным переходам, сопровождающим функциональные процессы в белках. ☐

Люминесценция и ее применение для изучения динамики белков

Как известно, поглощение кванта света молекулами переводит их в возбужденное состояние в результате переброски одного электрона на более высокий энергетический уровень. Обратный переход из возбужденного в основное состояние может сопровождаться испусканием кванта света люминесценции. Чаще всего таким фотозлектроном сложных органических молекул является π -электрон, участвующий в образовании системы делокализованных двойных сопряженных связей молекулы. Сами переходы с поглощением и испусканием света в системе π -электронов представляют соответственно переходы $\pi \rightarrow \pi^*$ и $\pi^* \rightarrow \pi$ между основным и так называемым синглетным возбужденным состоянием. Они соответствуют переходам между связывающими π^- и разрыхляющими π^* -орбиталями.

Электронные уровни в молекуле. На рис. X.4 изображены кривые потенциальной энергии основного (S_0) и возбужденного (S^*) состояний (ср. рис. VIII.1). Потенциальная электронная энергия включает кулоновские взаимодействия всех электронов и ядер между собой и друг с другом без учета кинетической энергии

ядер. Поскольку электроны движутся со скоростями, на 2–3 порядка превышающими скорости движения ядер, то можно считать, что электроны изменяют свое положение при практически неподвижных ядрах. Следовательно, электронная энергия $U(R)$ зависит от межъядерного расстояния R как от параметра.

Разделение внутримолекулярных движений на быстрые электронные и медленные ядерные обуславливает один из фундаментальных законов спектроскопии, связанный с так называемым принципом Франка–Кондона. Каждое электронное состояние S_0 и S^* характеризуется своей потенциальной кривой $U^0(R)$, $U^*(R)$, переходы между которыми соответствуют переходам электрона между разными энергетическими уровнями. Движение (колебание) самих ядер происходит в поле, создаваемом быстро движущимися электронами, и $U(R)$ есть потенциальная энергия для движения ядер. Решение квантово-механической задачи для движения ядер показывает, что энергия ядерных колебаний принимает дискретные значения, т. е. квантуется так же, как и энергия электронов. Соответствующие колебательные

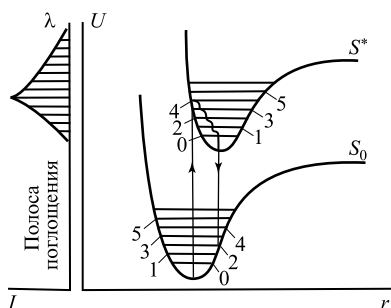


Рис. X.4

Кривые потенциальной энергии основного (S_0) и синглетного возбужденного (S^*) состояний двухатомной молекулы:

U — потенциальная энергия; r — межъядерное расстояние; I — интенсивность поглощения; λ — длина волны; $0-5$ — колебательные подуровни ядерных состояний

подуровни (1, 2, 3) для ядер приведены на каждой из кривых электронной энергии (рис. X.4). Поглощение света и переход $S_0 \rightarrow S^*$ происходят за $10^{-15} - 10^{-16}$ с, т. е. практически мгновенно, так что тяжелые ядра не успевают изменить своих положений и скоростей (принцип Франка–Кондона). Как видно из рис. X.4, при этом переходе, изображенном вертикальной стрелкой, повышается запас внутренней колебательной и потенциальной электронной энергии.

Причина этого состоит в том, что кривые $U^0(R)$ и $U^*(R)$ неидентичны. Исходное межъядерное расстояние для состояния $U^0(R)$ соответствует более высоким колебательным подуровням на кривой $U^*(R)$ состояния S^* , ядерная конфигурация остается характерной все еще для основного состояния S_0 . Вся система оказывается в возбужденном колебательном состоянии. Колебательная релаксация происходит за время существования электронного возбужденного состояния S^* , которое для ароматических соединений составляет в среднем $10^{-9} - 10^{-8}$ с. Этот избыточный запас колебательной энергии диссипирует в теплоту в течение $10^{-12} - 10^{-11}$ с, и ядра попадают на нижние подуровни (волнистая кривая, рис. X.4) состояния S^* , откуда и происходит переход на основной уровень S_0 с испусканием кванта света флуоресценции.

Запас колебательной энергии молекулы при этом переходе опять возрастает с последующей диссипацией его за $10^{-12} - 10^{-11}$ с.

Таким образом, в силу принципа Франка–Кондона «вертикальные» переходы между электронными состояниями происходят при практически неподвижных ядрах и сопровождаются кратковременным (на 10^{-12} – 10^{-11} с) повышением колебательной энергии молекулы. «Невертикальные» переходы гораздо менее вероятны. Положение максимума спектральной полосы флуоресценции определяется наиболее вероятным переходом $S^* \rightarrow S_0$, а сама величина квантов флуоресценции — потерями энергии электронного возбуждения при переходе на колебательные подуровни состояния S_0 . □

Помимо испускания света флуоресценции состояние S^* может дезактивироваться и другими путями. Возможен безызлучательный переход на основной уровень $S^* \rightarrow S_0$, когда вся энергия электронного возбуждения переходит в теплоту. Наряду с синглетными (S) молекула обладает и триплетными (T) электронными уровнями, расположенными в шкале энергий ниже, чем синглетные. Безызлучательный переход из состояния S^* в состояние T называется интеркомбинационной

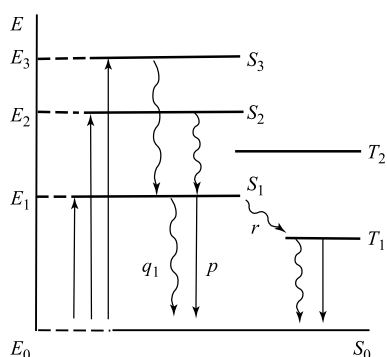


Рис. X.5

Электронные уровни органической молекулы и переходы между ними (схема Яблонского):

p — вероятность переходов в единицу времени на основной уровень с испусканием флуорисценции, q_1 — то же, без излучения; r — вероятность конверсии и триплетное состояние

Молекула обладает системой триплетных T_1, T_2, \dots и синглетных возбужденных уровней S_1, S_2, \dots, S_n . При переходе на один из высших возбужденных синглетных уровней избыток энергии быстро (10^{-12} с) диссипирует; молекула попадает на низший возбужденный синглетный уровень S_1 , с которого и происходит переход ($S_1 \rightarrow S_0$) или внутримолекулярная конверсия ($S_1 \rightarrow T_1$). Суммарная вероятность (P_1) дезактивации определяется суммой величин p, q_1, r :

$$P = p + q_1 + r$$

конверсией $S^* \rightarrow T$. Он связан с изменением ориентации спина фотозлектрона на противоположную на уровне S^* , в результате чего спины двух ранее спаренных π -электронов, образующих химическую связь в основном состоянии S_0 , теперь становятся параллельными. В силу этого триплетная молекула обладает двумя неспаренными электронами и проявляет парамагнитные свойства, как бирадикалы.

Переход из триплетного состояния в основное $T \rightarrow S_0$ также требует переориентации спина, в связи с чем вероятность этого перехода мала. Поэтому время жизни триплетного состояния намного больше, чем синглетного S^* , и составляет 10^{-6} – 10^{-2} с и больше. Переходы $T \rightarrow S_0$ сопровождаются фосфоресценцией или могут происходить безызлучательно. Возможен обратный переход из триплетного в синглетное возбужденное состояние $T \rightarrow S^*$ за счет тепловой энергии, после чего наблюдается замедленная флуоресценция, сходная по спектрам с обычной флуоресценцией $S^* \rightarrow S_0$, а по длительности — с фосфоресценцией. Поскольку триплетная

молекула T живет достаточно долго, она может успеть поглотить второй квант и перейти на второй триплетный уровень ($T_1 \rightarrow T_2$ -поглощение).

На рис. X.5 представлена общая схема электронных уровней и переходов между ними (схема Яблонского).

Время жизни состояния. Время жизни τ состояния S_1 определяется суммарной вероятностью его дезактивации:

$$\tau = 1/(p + q_1 + r); \quad (\text{X.2.3})$$

$$p + q_1 + r = 1/\tau = 10^8 \div 10^9 \text{ с}^{-1}. \quad (\text{X.2.4})$$

В соответствии с экспоненциальным законом убыли возбужденных молекул

$$N_1 = N_0 \exp[-t(p + q_1 + r)] = N_0 \exp(-t/\tau), \quad (\text{X.2.5})$$

где N_1 — количество возбужденных молекул в состоянии S_1 ; N_0 — общее число молекул хромофора; затухание флуоресценции в простейшем случае носит также экспоненциальный характер и происходит за время $\tau \sim 10^{-9} \div 10^8$ с. В триплетном состоянии длительность и выход фосфоресценции подчиняются аналогичным феноменологическим соотношениям.

Квантовый выход флуоресценции. Величина квантового выхода (B) определяется как отношение количества квантов флуоресценции, испущенных с уровня S_1 , к поглощенным квантам и зависит от вероятности дезактивации синглетного возбужденного состояния по излучательному пути. В отсутствие каких-либо процессов тушения

$$B = p/(p + q_1 + r) \quad (\text{X.2.6})$$

или с учетом (X.2.3)

$$B = p\tau. \quad (\text{X.2.7})$$

Если в течение времени жизни возбужденного состояния в среде происходят и другие процессы тушения помимо внутримолекулярной тепловой дезактивации, то они сокращают выход и длительность флуоресценции:

$$\begin{aligned} \tau' &= 1/(p - q_1 + r + Q), & \tau' < \tau; \\ B' &= p/(p + q_1 + r + Q), & B' < B, \end{aligned}$$

где Q — вероятность дополнительной дезактивации состояния (например, за счет столкновения с тушащими примесными молекулами).

В тех случаях, когда переход в возбужденное состояние значительно изменяет электрический дипольный момент молекулы по сравнению с дипольным моментом в состоянии S_0 , поле диполей окружающей среды также оказывается неравновесным. Диполи среды за время жизни молекулы-хромофора в возбужденном состоянии могут успеть переориентироваться в соответствии с новым полем диполя возбужденного хромофора. Очевидно, релаксация диполей лимитируется динамическими свойствами среды. Ясно, что если время дипольной релаксации среды τ_p

много больше времени жизни возбуждения хромофора τ^* ($\tau_p \gg \tau^*$), то релаксация за время τ^* не успевает произойти, т. е. окружение хромофора жесткое. Наоборот, при $\tau_p \ll \tau^*$ быстрая дипольная релаксация успевает произойти за время τ^* существования возбуждения в молекуле хромофора. Это снижает энергетический уровень возбужденного электрона, вызывая сдвиг максимума спектра флуоресценции в длинноволновую сторону.

Рассмотрим систему хромофор — окружающая среда как единую с помощью диаграммы рис. X.5. Можно считать, что в случае $\tau - p \ll \tau^*$ релаксация успевает за время τ^* пройти на нижние ядерные подуровни возбужденного состояния, откуда и высвечивается квант люминесценции. Наоборот, при $\tau_p \gg \tau^*$ высвечивание происходит с верхних колебательных подуровней, что вызывает сдвиг максимума спектра свечения в коротковолновую сторону. В сложной системе (белок), где изменение электронного состояния молекулы-хромофора вызывает реорганизацию его микроокружения, время релаксации среды может быть больше времени жизни электронного возбуждения ($\tau_p > \tau^*$). Этого не наблюдается в отдельных молекулах-хромофорах, где внутримолекулярная колебательная релаксация занимает $10^{-12} - 10^{-11}$ с, т. е. намного меньше времени τ^* состояний S_1 и T_1 .

Изменяя релаксационные свойства среды (при изменении температуры), можно влиять на соотношение между τ_p и τ^* . Это находит свое отражение в положении максимума λ_{\max} спектра флуоресценции согласно уравнению

$$\frac{1}{\lambda_{\max}} = \frac{1}{\lambda_{\infty}} + \left(\frac{1}{\lambda_0} - \frac{1}{\lambda_{\infty}} \right) \frac{\tau^*}{\tau_p + \tau^*}. \quad (\text{X.2.8})$$

где λ_0 — положение максимума спектра соответственно при $\tau_p \ll \tau^*$; λ_{∞} — при $\tau_p \gg \tau^*$. Таким методом можно получить ценную информацию о подвижности белков, изучая собственную флуоресценцию триптофана.

Индол триптофана характеризуется большим изменением момента перехода при возбуждении (до $4D$). Поэтому положение максимума его спектра флуоресценции сильно зависит от подвижности диполей среды и может варьировать до 30 нм. Так как τ^* для S^* -состояния триптофана составляет единицы наносекунд, то по этим данным можно судить о структурных перестройках в белке в наносекундном временном диапазоне. Было показано (Э. А. Бурштейн), что белки обладают характерными двухступенчатыми кривыми зависимости положения спектра флуоресценции от температуры в области от -90 до 0°C . Сдвиги полосы флуоресценции на 4–9 нм в области от -90 до -20°C и на 5–12 нм в области от -20 до 0° (рис. X.6) свидетельствуют о замораживании движений в белковой матрице в наносекундном диапазоне. Высушенные белки не дают этих спектральных сдвигов, что подчеркивает роль воды как необходимого фактора для появления подвижности белка (см. § 4 гл. IX). Очевидно, «замораживание» быстрой релаксационной подвижности белка имеет кооперативный характер, причем белковые структуры и связанная вода замерзают как единая микрофаза.

Кинетика затухания флуоресценции триптофана в различных белках оказалась многоэкспонентной. Отсюда следует, что существует набор разных по своим флуоресцентным свойствам конформеров белка и что время установления равновесия между ними больше времени жизни флуоресценции. Тушение флуоресценции за счет столкновений возбужденного хромофора с соседними группами происходит

во время структурных флуктуаций частей и участков глобулы. Это находит свое отражение в зависимости квантового выхода от температуры:

$$1/B = 1 + r/p + f(T) \sum_i k_i = a + bf(T), \quad (\text{X.2.9})$$

где $a = 1 + r/p$ не зависит от температуры, а член $f(T) \sum_i k_i$ описывает все температурно зависимые процессы дезактивации. Эксперимент показал, что функция $f(T)$ соответствует T/η , где η — вязкость раствора. Оказалось, что функция T/η хорошо описывает температурную зависимость флуоресценции тирозиновых и триптофановых остатков, что свидетельствует об общих динамических закономерностях тушения в белковой матрице, обусловленных частотой структурных изменений.

Подобные структурные флуктуации позволяют низкомолекулярным тушителям флуоресценции, в частности кислороду, диффундировать во внутренние области белка, дезактивируя возбужденные состояния.

Наряду с измерением параметров собственной флуоресценции белка (триптофановых остатков) большое значение имеет изучение свечения экзогенных фосфо-

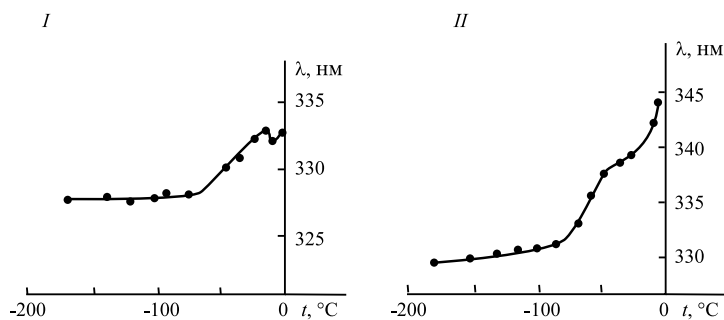


Рис. X.6

Зависимость положения спектра флуорисценции водного раствора β -лактоглобулина (I) и нейротоксина II кобры (II) от температуры при pH 6,5 (по Е. А. Пермякову, 1977)

ресцентных меток (например, производных эозина). Поскольку времена триплетных и синглетных состояний изменяются в широких пределах, это позволяет расширить диапазон измерений характерных времен структурных перестроек от 10^{-9} до 1 с. Этим методом удалось, например, зарегистрировать более медленные движения $\tau_p \sim 10^{-3}$ с в поверхностных слоях и $\tau_p < 1$ с внутри белковых макромолекул в фотосинтетическом реакционном центре.

Метод спиновых меток

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР). Известно, что в постоянном магнитном поле напряженности H_0 спины электронов будут ориентироваться вдоль поля. Энергетический уровень электрона со спином $s = 1/2$ расщепляется на два

уровня в соответствии с параллельным и антипараллельным полю \mathbf{H}_0 направлением спина (рис. X.7).

Разность энергетических уровней составляет

$$E_2 - E_1 = \Delta E = g\beta H_0. \quad (\text{X.2.10})$$

Здесь g — безразмерная постоянная (так называемый g -фактор), зависящая от электронной структуры окружения и равная для свободного электрона 2,0023; β — магнетон Бора:

$$\beta = e\hbar/(2m_e c) = 0,93 \cdot 10^{-23} \text{ Дж/Тл},$$

где e и m_e — заряд и масса электрона; c — скорость света; $\hbar = h/(2\pi)$ — постоянная Планка ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж · с). Очевидно, при общем числе спинов в системе N отношение заселенностей спинов на нижнем (N_1) и верхнем (N_2) уровнях определяется разностью энергий ΔE по закону Больцмана:

$$N_1/N_2 = \exp[g\beta H_0/k_B T], \quad (\text{X.2.11})$$

где $N_1 + N_2 = N$ и $N_1 > N_2$.

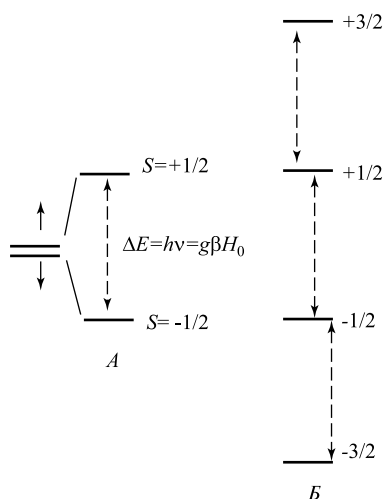


Рис. X.7

Энергетические уровни электрона в магнитном поле. А — один электрон (спин 1/2); В — три электрона (максимальное значение спина 3/2; объяснение см. в тексте)

Наложим теперь на образец помимо постоянного \mathbf{H}_0 и переменное магнитное поле с частотой ν , перпендикулярное постоянному полю. Тогда в системе будут индуцироваться вынужденные переходы между уровнями с вероятностью, одинаковой для переходов $N_1 \rightarrow N_2$ и $N_2 \rightarrow N_1$. Так как исходно $N_1 > N_2$, то число переходов в каждый момент времени с нижнего на верхний уровень $N_1 \rightarrow N_2$ превысит число обратных переходов $N_2 \rightarrow N_1$. При условии

$$h\nu = g\beta H_0 \quad (\text{X.2.12})$$

происходит резонансное поглощение энергии переменного поля. Это явление называется электронным парамагнитным резонансом (ЭПР).

Из (X.2.12) можно найти, что при $H_0 = 1$ Тл резонансная частота для свободного электрона равна $\nu_e = 2,8 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$, т. е. относится к области СВЧ-излучения. При увеличении мощности СВЧ-излучения, действующего на образец, первоначальная разность заселенностей уровней $n = N_1 - N_2$ должна, очевидно, убывать. В свою очередь, это приведет к исчезновению резонансного поглощения переменного поля, так как

$$n(t) = n(0) \exp(-2tp),$$

где $n(0)$ — разность заселенностей при $t = 0$; p — вероятность индуцированных переходов между уровнями.

Процессы релаксации в системе спинов. Увеличение СВЧ-мощности приводит сначала к увеличению амплитуды резонансного поглощения переменного магнитного поля (сигнал ЭПР), затем достигается некоторая стационарная величина и наступает насыщение. Причина этого связана с взаимодействием системы спинов с их окружением. Это взаимодействие вызывает переориентацию спина и приводит к передаче избыточной магнитной энергии другим степеням свободы, включающим в твердом теле колебания кристаллической решетки. Безызлучательные переходы между двумя состояниями спинов, сопровождающие взаимодействие с окружением, называют спин-решеточной релаксацией. Характеристикой этих процессов является так называемое время спин-решеточной релаксации T_1 , которое отражает среднее время жизни данного спинового состояния и является временем достижения теплового равновесия между системой спинов и тепловыми колебаниями решетки. Большие времена T_1 указывают на малую скорость спин-решеточного взаимодействия.

Учитывая наряду с влиянием радиочастотного поля и эффекты спин-решеточной релаксации, можно найти, что изменение заселенности уровней $n = N_1 - N_2$ описывается уравнением

$$dn/dt = -2pn - (n - n_0)/T_1. \quad (\text{X.2.13})$$

Здесь n_0 — разность заселенностей при тепловом равновесии системы спинов с решеткой:

$$n_0 = N \frac{W_{21} - W_{12}}{W_{21} + W_{12}},$$

где W_{21} и W_{12} — вероятности спонтанных тепловых переходов $N_2 \rightarrow N_1$ и $N_1 \rightarrow N_2$ соответственно. Существенно, что, поскольку решетка находится в тепловом равновесии, вероятности спонтанных спиновых переходов вверх и вниз не равны, как это наблюдалось для переходов, индуцированных радиочастотным полем: $W_{12} \neq W_{21}$, а следовательно, $n_0 \neq 0$.

Время спин-решеточной релаксации равно

$$T_1 = 1/(W_{12} + W_{21}). \quad (\text{X.2.14})$$

В стационарном состоянии при действии СВЧ-излучения $dn/dt = 0$, откуда из (X.2.18) следует, что

$$n = n_0/(1 + 2pT_1), \quad (\text{X.2.15})$$

где p — вероятность индуцированного перехода, пропорциональная квадрату амплитуды радиочастотного поля. Анализ показывает, что при увеличении p разность заселенностей n падает, достигая в пределе при $p \rightarrow \infty$ насыщения.

На рис. X.8 приведено изображение линии поглощения СВЧ-поля и ее первой производной, которая обычно регистрируется в ЭПР-спектрометрах и собственно является сигналом ЭПР.

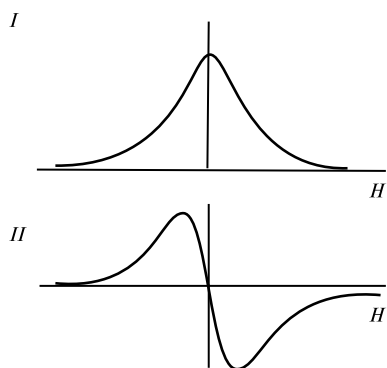


Рис. X.8

Сигнал ЭПР. I — линия поглощения СВЧ-поля; II — ее первая производная

Ось абсцисс — величина постоянного магнитного поля H , которая плавно меняется при постоянной частоте СВЧ-поля до достижения значений, соответствующих условию резонансного поглощения (X.2.17)

Спин-решеточная релаксация. Как связан характер взаимодействий в системе спинов с параметрами сигнала ЭПР? Из рис. X.8 видно, что сигнал ЭПР обладает шириной линии поглощения. Это обусловлено тем, что вследствие процессов релаксации состояние спина имеет определенное время жизни, что вызывает уширение резонансного сигнала из-за соотношения неопределенностей для энергии. Согласно этому соотношению, энергия E_0 способной к распаду системы, обладающей средним временем жизни τ , может быть определена лишь с точностью до величины порядка \hbar/τ (ее обычно называют шириной Γ энергетического уровня системы).

Таким образом (ср. (VIII.1.10)),

$$\Gamma\tau \sim \hbar. \quad (\text{X.2.16})$$

Этот и есть соотношение неопределенностей для энергии. Оно означает, что точное положение энергетических уровней E_0 спинового состояния электрона в системе, обладающей временем релаксации T_1 , может быть определено по положению линии резонанса с точностью до \hbar/T_1 ($E_0 \pm \hbar/T_1$), что и означает уширение линии резонанса E_0 до $\Delta H \sim \hbar/T_1$. \square

Величина T_1 сильно зависит от температуры, увеличиваясь при замораживании. Так, сигналы ЭПР парамагнитных ионов металлов часто не наблюдаются при комнатной температуре из-за малой величины T_1 и, как следствие, слишком большой ширины. Однако при температурах жидкого гелия сигналы регистрируются, так как увеличение T_1 приводит к сужению линии поглощения и росту ее амплитуды.

Спин-решеточная релаксация не единственный процесс, определяющий ширину линии. Существует много других процессов, вызывающих изменение относительных энергий спиновых состояний за счет обмена энергией в самой системе спинов.

Это так называемые процессы спин-спинового взаимодействия, которые характеризуются временем спин-спиновой релаксации T_2 . Для парамагнитных частиц T_2 практически не зависит от температуры и соответствует скорости установления равновесия между спинами электронов при их взаимодействии друг с другом. Вклад в общую ширину линии процессов спин-спинового взаимодействия описывается величиной порядка $1/T_2$. В общем случае ширина линии определяется как

$$\Gamma = \Delta H \sim \frac{1}{T_{\text{эксп}}} \sim \frac{1}{(2T_1)} + \frac{1}{T_2} \quad (\text{X.2.17})$$

где $T_{\text{эксп}}$ определяется в эксперименте.

Для свободных радикалов $T_1 \gg T_2$, поэтому для них в отсутствие насыщения ширина линии определяется в основном T_2 ($\Delta H \sim 1/T_2$), которое составляет $\sim 10^{-8}$ с. Большие величины T_1 (секунды, минуты) для органических свободных радикалов связаны с тем, что энергия спинов электронов передается колебаниям ядер решетки через спин-орбитальное взаимодействие, которое для легких ядер весьма мало. Это обуславливает относительно малую скорость процессов спин-решеточной релаксации свободных радикалов.

Физические механизмы спин-спинового обмена. В твердых телах и вязких растворах ширина линии связана с диполь-дипольными взаимодействиями спинов электронов. Магнитное поле, создаваемое магнитным моментом неспаренного электрона, вызывает дополнительное локальное поле $H_{\text{лок}}$ в месте расположения другого электрона, равное

$$H_{\text{лок}} \sim \mu \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{R^3}, \quad (\text{X.2.18})$$

где μ — компонент магнитного момента, направленный вдоль магнитного поля магнита; R — длина радиуса-вектора, соединяющего оба электрона; θ — угол между направлениями магнитного поля и радиуса-вектора. Сложение этого локального магнитного поля и внешнего магнитного поля H_0 нарушает условие резонанса (X.2.12), который теперь наблюдается при условии

$$h\nu = g\beta(H_0 + H_{\text{лок}}).$$

Вместо одной резонансной линии от H_0 теперь существует набор близко расположенных линий, являющихся результатом взаимного влияния спинов друг на друга посредством создания локальных полей. Это влияние сокращает время T_2 для всей системы спинов, уширяя линию в силу соотношения (X.2.16).

Результирующая уширенная линия резонанса является огибающей всех близких линий «локальных резонансов». Диполь-дипольное уширение примерно до 0,1 мТл проявляется на расстояниях между спинами 3–4 нм. В жидкостях, где вязкость мала, диполь-дипольные взаимодействия усредняются за счет быстрых молекулярных движений. В этом случае за время, обратное частоте резонанса $t \sim 1/\nu$, успевают произойти многократные флуктуации положения радикалов. В результате отдельные линии «локального резонанса» не удается разрешить и резонанс наблюдается при одной усредненной линии с уменьшенной шириной. Замораживание раствора и уменьшение вязкости вызывают вновь замедление молекулярных движений и

уменьшение T_2 спиновых состояний за счет действия локальных полей, что уширяет линию резонанса.

При обычных температурах в жидкостях источником уширения линии служат другие эффекты: химические реакции, перенос электрона, спиновый обмен, приводящие к изменению магнитного окружения неспаренного электрона. Так, обмен спиновыми состояниями при столкновении частиц в растворе уменьшает время жизни T_2 спинов, что увеличивает ширину линии в силу соотношения неопределенностей (Х.2.16). Магнитные моменты ядер, входящих в состав радикальной частицы,

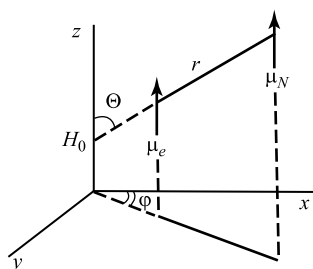


Рис. Х.9

Анизотропное взаимодействие ядерного и электронного магнитных моментов (по К. Н. Тимофееву, 1985):

μ_N — ядерный магнитный момент; μ_e — электронный магнитный момент; r — радиус-вектор; θ и φ — углы, составляемые радиусом вектором r с осями z и x ; H_0 — внешнее магнитное поле, направленное по оси z

создают локальные поля, которые складываются с внешним полем H_0 и тем самым влияют на линии ЭПР, вызывая их расщепление с появлением сверхтонкой структуры (СТС).

Существует два типа взаимодействия электронов и ядер: анизотропное и изотропное. Первое из них аналогично классическому взаимодействию двух магнитных диполей и описывается выражением, аналогичным (Х.2.18), в соответствии с которым локальное магнитное поле, создаваемое ядром, зависит от угла θ .

Если неспаренный электрон локализован на несимметричной орбитали p или d , то результат спин-ядерного взаимодействия будет зависеть от угла между направлением вектора, соединяющего электрон и ядро, и направлением магнитного поля.

Для симметричной s -орбитали дополнительное магнитное поле, создаваемое ядром и определяющееся выражением (Х.2.18), равно 0 вследствие усреднения по всем углам θ . В этом случае, как показывает теория, сверхтонкое расщепление определяется конечной вероятностью пребывания электрона в точке нахождения ядра. Такое взаимодействие называется контактным. СТС, возникающая из-за контактного взаимодействия ядра и электрона, не зависит от направления и называется изотропной.

Локальные ядерные поля влияют по-разному и на ширину линий ЭПР вследствие различных углов между линией ядро–электрон и направлением поля H_0 (рис. Х.9). Быстрое молекулярное движение радикалов в средах с небольшой вязкостью усредняет влияющие на них локальные поля и усредняет анизотропную составляющую, сужая тем самым линию ЭПР. Если взаимодействующие спины подвергаются одновременно действию этих локальных полей, дающих СТС, то картина усложняется. Наряду с уширением линии вследствие обменных взаимодействий между спинами будет, очевидно, происходить и усреднение действия разных

локальных полей, давая «смазывание» линий СТС, стягивание их к некоторому среднему значению и, следовательно, некоторое сужение линий ЭПР.

Вид спектра ЭПР зависит также от влияния несимметричного анизотропного окружения неспаренного электрона в радикальной частице на величину g -фактора, что определяет тонкую структуру спектра. Усреднение здесь также приводит к снятию анизотропии g -фактора при быстрых внутримолекулярных движениях. Таким образом, изменение определенных параметров спектра ЭПР может дать важную информацию о динамических свойствах микроокружения радикальной частицы.

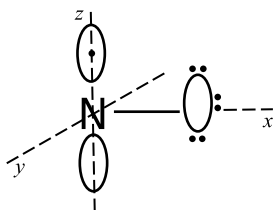


Рис. X.10

Схема парамагнитного фрагмента нитроксильного радикала

Неспаренный электрон, указанный точкой, локализован на R_z -орбитали атома азота. Эффективное магнитное поле, действующее на электрон, складывается из внешнего магнитного поля и поля, созданного ядром азота

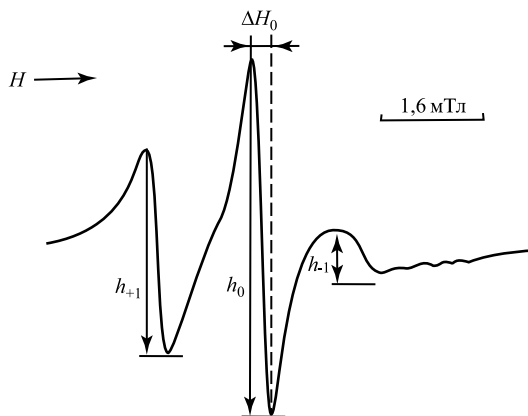


Рис. X.11

Спектр ЭПР парамагнитной метки, присоединенной к *guc*-15 лизоцима (рН 7,0; $t = 26^\circ\text{C}$) (по Г. И. Лихтенштейну, 1971):

h_{-1} , h_0 , h_{+1} — интенсивность компонентов, соответствующих $M = -1; 0; +1$; ΔH_0 — ширина центрального компонента

Метод спиновых меток. Основная идея метода состоит в присоединении к той или иной функциональной группе белка свободного радикала и изучению характеристик его сигналов ЭПР. Наиболее удобны в этом отношении нитроксильные радикалы, содержащие свободнорадикальную группу $\dot{\text{N}}\text{--O}$:

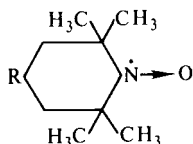


Схема электронного строения группы $\dot{\text{N}}\text{--O}$ приведена на рис. X.10. Неспаренный электрон принадлежит $2p$ -орбиталям азота и кислорода и фактически делокализован между атомами N и O, эффективно взаимодействуя по диполь-дипольному

механизму с магнитным моментом спина ядра атома азота. В силу этого происходит расщепление линии поглощения сигнала ЭПР (СТС) на три составляющие, соответствующее трем разным проекциям ядерного спина азота на направление H_0 . Вид спектра определяется главным образом анизотропным взаимодействием.

Вместе с тем существует и небольшая примесь изотропного взаимодействия. На рис. X.11 приведен спектр ЭПР парамагнитной метки на лизоциме. Так как СТС и g -фактор в спектрах ЭПР нитроксильных радикалов анизотропны, то броуновская диффузия влияет на форму спектра. Величина расщеплений СТС будет зависеть от углов между осями парамагнитного фрагмента и направлением поля. Вращение нитроксильного фрагмента относительно поля изменяет положение линий в поле. В случае предельно быстрых вращений $\nu_{\text{вр}} \geq 10^{11} \text{ с}^{-1}$ происходит усреднение всех ориентаций и спектр представляет собой три эквидистантные линии одинаковой интенсивности, что в данном случае обусловлено изотропным взаимодействием неспаренного электрона с ядром азота. Однако уже в области вращений с частотами $10^{11} \text{ с}^{-1} > \nu_{\text{вр}} \gg 10^9 \text{ с}^{-1}$ анизотропия СТС и g -фактора начинает проявляться, что изменяет симметричный характер спектра (высокопольный H_{-1} -компонент наиболее уширен и имеет наименьшую амплитуду). Таким образом, по параметрам спектра ЭПР можно оценить время корреляции движения радикала τ_c — время, за которое частица успевает «повернуться» на угол $\pi/2$. Величину $\nu = 1/\tau_c$ условно называют частотой вращения метки.

В области медленных движений методы определения τ_c основаны на измерении сдвигов линий. Нитроксильная группа $\dot{N} \rightarrow O$ входит в состав пяти- или шестичленного кольца, которое представляет собой гидрофобную «ножку» метки.

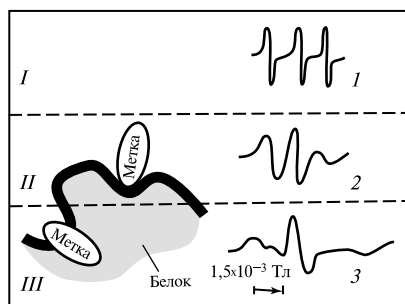


Рис. X.12

Подвижность различных слоев водно-белковой матрицы (по Г. И. Лихтенштейну, 1974):

I — внешний, водный слой матрицы ($\nu \simeq 10^{11} - 10^{10}$), II — глицириноподобный слой матрицы ($\nu \simeq 10^{10} - 10^8$); III — относительно твердый слой матрицы ($\nu \simeq 10^8 - 10^7$); ν — частота корреляций вращательной диффузии радикалов (с^{-1});

1, 2, 3 — типичные спектры ЭПР иминоксильных радикалов, погруженных в соответствующие слои матрицы

Движение метки и степень его анизотропии будет изменяться при взаимодействии метки с объемными группами белка, с которыми метка сталкивается в пространстве вращения. Так, присоединение радикалов к $\epsilon\text{-NH}_2$ -группам полилизина сопровождается уменьшением частоты вращения до $\nu = 10^9 \text{ с}^{-1}$ по сравнению с обратным временем корреляции вращения в воде ($\nu = 4 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$). Изменение частоты вращения метки (в 10–40 раз) происходит и при нарушении и «разрыхлении» вторичной структуры белков.

В целом, скорость вращения нитроксильной метки зависит от глубины ее расположения в слоях белковой глобулы (Г. И. Лихтенштейн).

При локализации метки в наружном водном слое значение τ_c составляет $\sim 10^{-11} \div 10^{-10}$ с (рис. X.12). Поверхностные слои, в которые входят боковые группы белков и вода в «щелях», характеризуются $\tau_c \sim 10^{-10} \div 10^{-8}$ с. В более глубоком слое глобулы, где включены внешние полипептидные цепи, «стиснутые» боковые группы и прочносвязанная вода, τ_c повышается до $10^{-8} - 10^{-7}$ с. Это ясно свидетельствует о замедлении скорости вращения метки по мере ее погружения, что соответствует существованию более плотного ядра глобулы по сравнению с рыхлой «опушкой» (см. § 2 гл. VII). В целом времена корреляции, поддающиеся определению методом спиновых меток, находятся в диапазоне 0,1–300 нс, хотя в последние годы интенсивно развиваются методы, позволяющие определять τ_c спиновых меток до $10^{-3} - 10^{-4}$ с.

∇ Анизотропный характер взаимодействия магнитных моментов ядра азота и неспаренного электрона приводит к тому, что спектр ЭПР нитроксильных радикалов оказывается чувствительным к скорости вращательной диффузии радикала. Дело в том, что величина локального поля, создаваемого ядром азота в месте нахождения неспаренного электрона, зависит в соответствии с (X.2.18) от ориентации радикала относительно внешнего поля. Если радикал ориентирован во внешнем поле таким образом, что ось z радикала ориентирована параллельно внешнему полю (θ в (X.2.18) равно 0, π), то расстояние между соседними линиями (константа СТС A_{zz}) оказывается равной 3,2 мТл. При перпендикулярной ориентации оси z по отношению к внешнему полю (т. е. когда либо ось x , либо ось y параллельны H и θ в X.2.18 равен $\pm\pi/2$) константа СТС (A_{xx} и A_{yy}) уменьшается до 0,5–0,6 мТл. Более того, и значения g -фактора зависят от ориентации радикала. Так, например, при параллельной ориентации оси z по отношению к внешнему полю значение g -фактора равно $g_{zz} = 2,0027$. При параллельности внешнему полю осей x и y g -факторы равны: $g_{xx} = 2,0089$ и $g_{yy} = 2,0061$ (рис. X.9). □

В порошках нитроксильных радикалов или замороженных растворах спектр ЭПР представляет собой суммарный спектр всех радикалов, оси которых хаотически распределены в пространстве. В подобных спектрах расстояние между крайними широкими пиками соответствует ориентации оси z параллельно внешнему полю, поскольку именно для этих радикалов значение константы СТС максимально. Радикалы, ось z которых ориентирована перпендикулярно полю, не вносят вклада в крайние широкие компоненты. В то же время вид суммарного спектра в центральной части определяется вкладов сигналов от радикалов, ориентированных не только перпендикулярно внешнему полю, но радикалов, для которых угол θ между осью z и внешним полем принимает промежуточные значения между 0 и $\pi/2$.

Приведенное описание относится к тому случаю, когда движение радикалов отсутствует (ориентация радикалов относительно внешнего поля не изменяется во времени).

∇ Ситуация однако изменяется, когда радикалы начинают вращаться. Это приводит к тому, что для отдельного радикала ориентация по отношению к внешнему полю будет случайным образом изменяться, что в свою очередь приведет к изменению положения линий в спектрах ЭПР отдельных радикалов и к изменению суммарного спектра ЭПР в целом. □

Экспериментальные данные и теоретические расчеты говорят о том, что вращение радикалов приводит к сдвигу линий, изменению их ширины и амплитуды. И, что очень важно, эти эффекты зависят от скорости и характера (изотропного и антиизотропного) вращения радикала. Расчеты показывают, что «порошковые» спектры характерны и для радикалов, вращающихся со скоростями меньшими, чем 10^6 с^{-1} . Это означает, что форма спектров ЭПР оказывается не чувствительной к медленному ($\nu < 10^6 \text{ с}^{-1}$) вращению радикала.

С другой стороны, предельно быстрое вращение радикала ($\nu > 10^{11} \text{ с}^{-1}$) приводит к полному усреднению анизотропии спектров ЭПР, и спектр ЭПР представляет три эквидистантные линии одинаковой интенсивности с усредненной константой СТС (1,6–1,7 мТл) и усредненным значением g -фактора (2,0059). Можно сказать, что в случае предельно быстрых вращений спектрометр ЭПР «не успевает» проследить за изменением ориентации радикала относительно внешнего поля и «видит» некую усредненную картину.

В области вращений с частотами $10^{11} \text{ с}^{-1} > \nu > 10^6 \text{ с}^{-1}$ анизотропия СТС и g -фактора начинают проявляться, что и изменяет симметричный характер спектра. В области быстрых вращений это проявляется в изменении соотношения амплитуд и ширин линий отдельных компонент спектра. Существуют модели для различных типов и частот движения нитроксильных радикалов, позволяющие найти τ_c .

Так в области быстрых вращений $5 \cdot 10^{-11} \text{ с} < \tau_c < 3 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ время τ_c находят по формуле:

$$\tau_c = 6,65 \cdot \Delta H_{+1} \left(\sqrt{\frac{J_{+1}}{J_{-1}}} - 1 \right) \cdot 10^{-9} \text{ с},$$

где ΔH_{+1} — ширина низкопольной линии спектра в мТл, J_{-1} , J_{+1} — амплитуды высокопольной и низкопольной компонент спектра.

В области более медленных движений методы определения основаны на измерении ширины линий и сдвигов линий по отношению к положению линий в спектрах предельно быстро вращающихся радикалов.

Следует сказать, что вышеупомянутые методы измерения относятся к случаю радикала, вращающегося в изотропной среде, т. е. к случаю изотропной диффузии. Однако, в реальных ситуациях спектры ЭПР спиновых меток следует анализировать, исходя из того, что подвижность метки складывается из двух составляющих: движения метки относительно молекулы биополимера и движения самой молекулы биополимера, несущего на себе метку. В случае, если метка жестко иммобилизована на поверхности биополимера, спектр ЭПР отражает подвижность только молекулы биополимера, поскольку движение метки будет определяться относительно медленным вращением белковой глобулы. Эффективное время корреляции можно определять, измеряя, например, расстояние между крайними широкими пиками и ширину линий в спектре (Кузнецов, 1976). Однако, случай, когда спиновая метка жестко связывается с молекулой биополимера, практически не реализуется. На самом деле, спин-метка, связанная с белком, принимает участие в двух типах движения. Во-первых, это быстрое вращение оси радикала и ее колебания относительно системы координат, связанной с глобулой. Это движение носит локальный характер. Во-вторых, это движение самой белковой глобулы, которое может носить изотропный характер (сферическая глобула) и замедляется с ростом вязкости окружающей среды.

Для характеристики анизотропии движения метки вводится так называемый параметр упорядоченности

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy})},$$

где A_{\parallel} и A_{\perp} определяются из спектра (рис. X.13, а), а A_{zz} , A_{xx} и A_{yy} берутся из данных для монокристаллов. \square

Параметр S характеризует степень усреднения анизотропии СТС и g -фактора за счет быстрого анизотропного движения.

Извлечение информации о динамике биополимеров из спектров ЭПР присоединенных к ним спин-меток представляет довольно сложную задачу, решаемую с помощью компьютерного моделирования спектров.

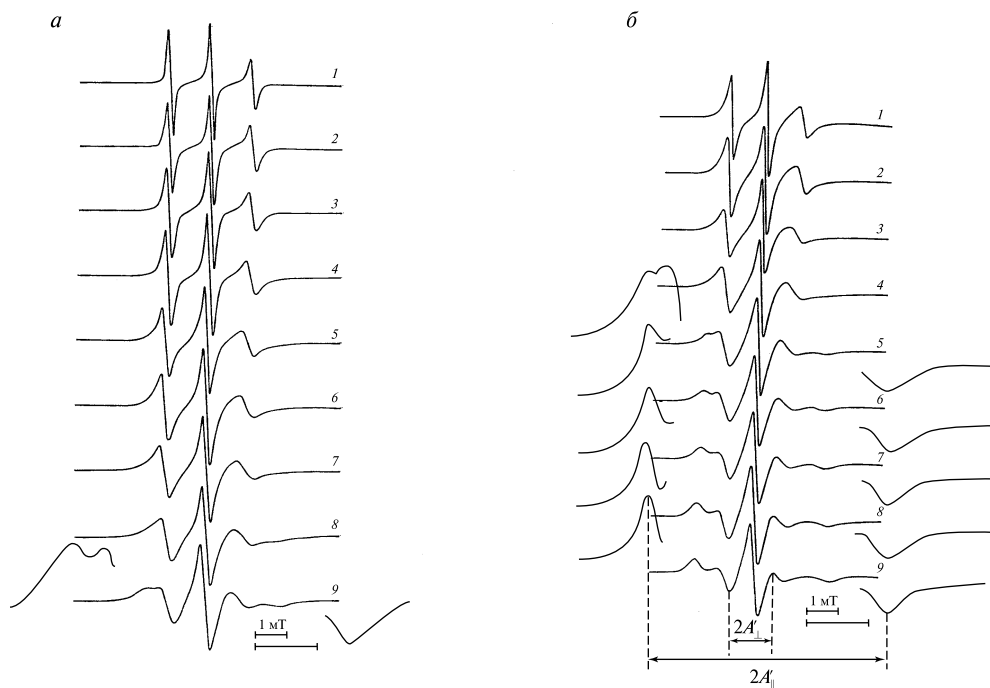


Рис. X.13

Спектры ЭПР спин-меченого поли(U) при 20°C и переменной вязкости, создаваемой сахарозой, при 20°C (а); 5°C (б) (Тимофеев В. П.)

Однако, во всех предлагаемых подходах (Кайвяряйнен, 1988; Исаев-Иванов и др., 1987; Тимофеев В. П., 1996) используется регистрация спектров ЭПР метки в зависимости от вязкости раствора и температуры. При этом предполагается, что

изменение вязкости раствора в большей степени влияет на подвижность белковой молекулы в целом, чем на подвижность связанной с белком спин-метки. Причина этого заключается в том, что подвижность метки в первую очередь зависит от микровязкости того участка белка, где находится метка. В то же время эта микровязкость существенно отличается от вязкости раствора. Вследствие этого и удается, изменяя в небольших пределах вязкость раствора, отдельно получить информацию о движении белковой молекулы и спин-метки. В зависимости от физической модели, предлагаемой для интерпретации спектров, в экспериментах регистрируются те или иные параметры. Так, предполагая, что движение спин-метки относительно биополимера изотропно или близко к изотропному, и само вращение молекулы белка тоже изотропно, можно, измеряя сдвиги крайних широких пиков в зависимости от вязкости, определить времена корреляции для движения белковой молекулы и спин-метки (Кяйвярйнен, 1988).

Учет анизотропии движения приводит к необходимости рассчитывать и значения S , причем анизотропия движения заключается в конусообразном вращении оси z радикала относительно молекулярной системы координат, либо осцилляции оси радикала внутри этого конуса (так называемый анизотропный волчок). Из полученных значений параметра S можно рассчитывать угол при вершине этого конуса (Тимофеев В. П., 1966).

Найденные экспериментально времена корреляции сравниваются с рассчитанными, что позволяет сделать выводы о сферичности или несферичности белковой молекулы, о наличии гибкости отдельных сегментов участков белка.

Измерение времен корреляции показало, что для молекул гемоглобина, альбумина, фосфорилазы, липазы, протеинкиназы движения соответствуют жесткой глобуле с различной степенью эллипсоидальности. Спектр молекулы лезоцима не содержит крайне широкие пики при нормальных условиях. Малая величина времени ($\tau_c = 2$ нс) определяется здесь не мономерной формой всей макромолекулы, а подвижностью фрагмента, содержащего *huc-15*, к которому присоединена спин-метка. Для молекул иммуноглобулинов, гликопротеидов, аспаратаминотрансферазы также установлено существование их внутренней гибкости.

Дальнейшим развитием метода спиновых меток явилась так называемая спектроскопия ЭПР с переносом насыщения, позволяющая исследовать вращения спин-меток, связанных с макромолекулами в диапазоне времен корреляции 10^{-7} с – 10^{-3} с.

Развитие этого метода позволило изучать динамику мембранных белков, белок-белковые и белок-липидные взаимодействия в биологических мембранах.

Так с помощью спектроскопии с переносом насыщения была исследована динамика Са-АТФазы в мембранах саркоплазматического ретикулума и протеолипосомах, что позволило выявить связь конформационной подвижности белка с его АТФазной активностью, показать, что внутримолекулярная подвижность и активность Са-АТФазы зависят от природы ассоциированных с этим белком липидов.

Исследования, проведенные на фоторецепторных мембранах, позволили обнаружить как необратимую агрегацию родопсина, возникающую при повреждении светом этих мембран, так и обратимую ассоциацию родопсина, связанную, по всей видимости, с функцией этого белка (гл. XXIX).

Метод ядерного магнитного резонанса

Ядерный магнитный резонанс (ЯМР). Одним из мощных методов изучения динамики биополимеров является метод ядерного магнитного резонанса. Сущность явления ЯМР сходна в основных чертах с электронным парамагнитным резонансом. Ядра (помимо ядер с четным числом протонов и нейтронов («четно-нечетные» ядра), к числу которых принадлежат основные изотопы углерода $^{12}_6\text{C}$ и кислорода $^{16}_8\text{O}$), имеют отличные от нуля значения спина I (принятое для ядер обозначение) и магнитного дипольного момента μ . При этом магнитные моменты разных ядер

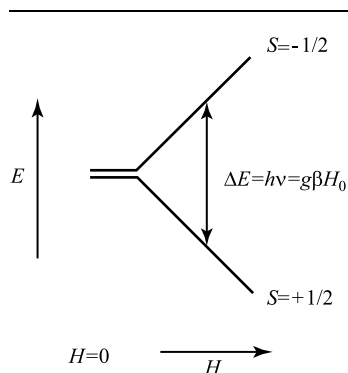


Рис. X.14

Условия резонанса ядерного спина при наличии внешнего магнитного поля (расщепление энергетических уровней ядра со спином $1/2$)

отличны друг от друга. Внешнее постоянное магнитное поле H_0 приводит к ориентации магнитных моментов и в случае спина $I = 1/2$ к расщеплению исходного уровня на два подуровня, соответственно (рис. X.14).

Условия резонанса при наложении переменного поля имеют вид (ср. (X.2.12))

$$h\nu_N = g_N\beta_N H_0, \quad (\text{X.2.19})$$

где g_N — ядерный g -фактор; $\beta_N = e\hbar/(2m_p c)$ — ядерный магнетон; m_p — масса протона, составляющая $1836 m_e$. Для протона $g_H = 5,58$, а ядерный магнетон $\beta_N = 0,0505 \cdot 10^{-26}$ Дж/Тл.

В случае ЯМР условия резонанса чаще записывают как

$$h\nu_0 = \gamma H_0,$$

где γ — так называемое гиромагнитное отношение или отношение магнитного момента μ к механическому — спину I . В поле $H_0 = 1$ Тл резонансная

частота для протонного ядерного резонанса составит $\nu_H = 4,26 \cdot 10^7$ Гц, что соответствует диапазону метровых радиоволн и намного меньше резонансной частоты ν_e для электрона. Условия резонанса для ядер, например протонов, входящих в состав молекул, будут отличаться от условий для свободного протона вследствие экранирования электронными оболочками и влияния ядер химического окружения протона. Поэтому резонансное магнитное поле в (X.2.19) должно быть заменено эффективным полем, учитывающим влияние окружения. Кроме того, магнитные моменты различных ядер взаимодействуют между собой и электронами в молекуле, причем характер этого взаимодействия также зависит от окружения ядра. Эти факторы влияют на параметры спектра ЯМР, давая тем самым информацию о химических свойствах и внутримолекулярной динамике образца.

Химический сдвиг. Магнитное поле у ядра зависит от его электронного окружения, которое изменяется при образовании химических связей. Это приводит к появлению химического сдвига, пропорционального приложенному постоянному магнитному полю. Физическая причина сдвига заключается в том, что во внешнем магнитном поле индуцируются циркуляция электронов и соответствующие электронные токи в молекуле. Направление этих электронных токов таково, что инду-

цированное ими дополнительное магнитное поле $H_{\text{инд}}$ на ядрах по величине пропорционально, а по направлению противоположно (в силу закона Ленца) внешнему полю H_0 ($H_{\text{инд}} = \sigma H_0$). Поэтому полное эффективное магнитное поле, которое действует на данный ядерный момент, имеет вид

$$H_{\text{эфф}} + H_0 - H_{\text{инд}} = (1 - \sigma)H_0, \quad (\text{X.2.20})$$

где σ — так называемая постоянная экранирования (безразмерная величина), по порядку равная 10^{-6} . Величина σ анизотропна, однако в жидкостях он усредняется. С учетом (X.2.20) условие резонанса выглядит следующим образом:

$$h\nu_N = g_N\beta_N(1 - \sigma)H_0.$$

Следовательно, резонанс теперь будет наблюдаться на другой частоте.

Рассмотрим два протона i и j с различными химическими окружениями и следовательно, с разными константами экранирования σ_i и σ_j . Можно измерить относительный химический сдвиг в спектрах их ЯМР, обусловленный их различным местоположением в химической структуре:

$$\nu = \nu_i - \nu_j = g_N\beta_N H_0(-\sigma_i + \sigma_j) = \nu_0(\sigma_j - \sigma_i),$$

или $\Delta\nu = \nu_0\Delta\sigma$, где $\Delta\nu$ — разница резонансных частот i -го и j -го протонов, а $\Delta\sigma$ — разница в константах экранирования этих же протонов.

Химические сдвиги обычно измеряют относительно некоторой эталонной линии стандартного инертного соединения (тетраметилсилан $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ для органических веществ, производное сульфоновой кислоты для водных растворов биополимеров). Химические сдвиги выражают в безразмерных единицах — миллионных долях (м. д.): $\delta(\text{м. д.}) = (\Delta\nu/\nu_0)10^6 = (\Delta H/H_0)10^6$, где $\Delta\nu$ (или ΔH) — разница в положении исследуемой линии и линии эталона; ν_0 — рабочая частота спектрометра; H_0 — приложенное к образцу поле. У биополимеров величины сдвигов варьируют для алифатических протонов от $-0,5$ до $-2,0$ м. д.

Для ароматических аминокислот за счет так называемых кольцевых токов химический сдвиг заметно больше, вплоть до $6-8$ м. д. Величина сдвига для определенной химической группы меняется в некоторых пределах в зависимости от взаимодействия с соседними химическими группами.

Для других ядер, атомы которых содержат большее число электронов, диапазон химических сдвигов значительно шире, достигая для ^{13}C $150-200$ м. д., что позволяет заметно повысить разрешение сложных спектров ЯМР для биополимеров.

Сверхтонкая структура (СТС) в спектрах ЯМР. Другая особенность спектров ЯМР — расщепление спектральных линий, обусловленное присутствием других ядер, обладающих собственным магнитным моментом, вследствие их взаимного влияния, передающегося через электронные связи.

На первой стадии спин-спинового взаимодействия ядро возмущает валентные электроны, которые ориентируются в результате этого воздействия, поляризуя определенным образом свои спины.

Электронная спиновая поляризация передается через химическую связь на второе ядро, приводя его к ориентации в соответствующем спиновом состоянии. В

результате у второго ядра ориентация спина коррелирует с ориентацией спина первого ядра-индуктора.

Таким образом, расщепление энергетических уровней валентного электрона вследствие взаимодействия его магнитного момента с магнитными моментами ядер данной группы проявляется в виде дополнительного расщепления уровней (СТС) ядер соседней группы, с которой этот электрон осуществляет химическую связь. Это так называемое косвенное спин-спиновое взаимодействие с участием валентных электронов, в отличие от прямого спин-спинового взаимодействия между соседними ядерными магнитными моментами, не усредняется при внутреннем движении. СТС в спектрах ЭПР определяется энергией внутримолекулярного взаимодействия и не зависит от величины постоянного магнитного поля, в отличие от химического сдвига. На рис. X.15 приведен спектр ЯМР ацетальдегида $\text{CH}_3\text{-CHO}$, на котором видны разделенные химическим сдвигом две группы линий разной интенсивности, обусловленные тремя протонами метильной и одним протоном альдегидной групп соответственно. Расщепление каждой из этих групп на отдельные линии образует СТС вследствие спин-спинового взаимодействия. Так, расщепление линии метильных протонов на два компонента равной интенсивности соответствует двум возможным ориентациям спина альдегидного протона. □

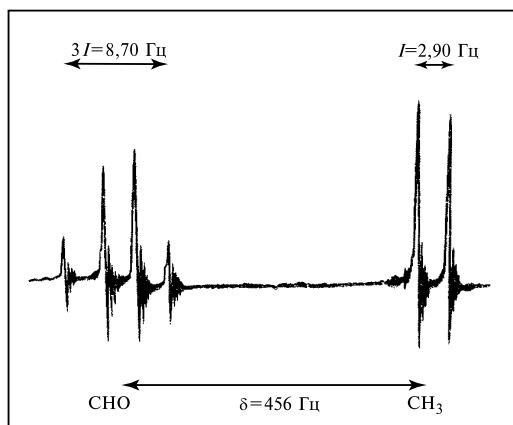


Рис. X.15
Спектр ЯМР ацетальдегида CH_3CHO
(по А. Керрингтону, Э. Мак-Лечлану, 1970):

I — величина сверхтонкого расщепления;
магнитное поле увеличивается слева направо

Четыре линии для альдегидного протона обусловлены суммарными эффектами взаимодействия с тремя протонами метильных групп. При этом суммарное значение спина $3/2$ для трех химически эквивалентных протонов достигается в одном варианте при одинаковом направлении всех трех спинов, $1/2$ — в трех, $-1/2$ — в трех и $-3/2$ — в одном варианте.

Изучение спектров ЯМР белковых молекул. Спектры ЯМР даже для небольших белков содержат несколько сот или тысяч линий, основная масса которых перекрывается между собой. До недавнего времени использовали лишь спектры ЯМР протонов, дающих более интенсивные сигналы по сравнению с ядрами изотопов ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P . Вследствие перекрывания основной массы резонансных линий от протонов

на фоне неразрешенной структуры удается выделить лишь относительно небольшое число линий. Это можно преодолеть за счет повышения разрешения, а также расширения спектра, если увеличивать резонансную частоту для протонов до 500–600 МГц и подавлять спин-спиновое взаимодействие дополнительным радиочастотным облучением на резонансной частоте для ядер, взаимодействующих с ядрами исследуемых групп. В результате становится возможным анализ спектров ЯМР для отдельных сравнительно небольших белков с выделением линий от метильных, метиленовых, SH-групп, остатков триптофана, тирозина, гистидина.

Заметно большее разрешение достигается в спектрах ЯМР для ^{13}C , имеющего более широкий диапазон химических сдвигов по сравнению с протонами. Здесь выделяют также отдельные линии карбонильных групп, остатков аланина, аргинина и ряда других. На основе использования двумерной ЯМР спектроскопии удается разделить эффекты, связанные с химическим сдвигом и с косвенным спин-спиновым взаимодействием. В структурных исследованиях применяют также ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО). Он основан на воздействии эффектов насыщения отдельных линий резонанса, например, для протонов на интенсивность резонанса для взаимодействующих с ними ядер ^{13}C . При этом величина эффекта зависит от их взаимной подвижности. Ряд структурно-динамических характеристик может быть получен на основе изучения процессов спиновой диффузии, связанной с тем, что переходы спинов при резонансе индуцируют такие же переходы для соседних спинов в случае частичного или полного перекрывания их резонансных линий и т. д. Все это сделало метод ЯМР одним из ведущих методов изучения структуры и динамики биополимеров непосредственно в растворе.

В последние годы спектры ЯМР наблюдают и непосредственно в живых клетках, в частности, для регистрации АТФ и других соединений по резонансу ^{31}P , для изучения строения мембран и т. д. (см. гл. XV, XVI).

Изучение динамики белковых структур методом ЯМР. Оно основано на измерении времен спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации магнитных моментов ядер и зависимости этих времен от характерного времени корреляции τ_c движения.

Физический смысл времен T_1 и T_2 был рассмотрен ранее (см. (X.2.17)). Причиной, определяющей ядерную спин-решеточную релаксацию, является движение молекул и возникающие при этом движении переменные магнитные поля. Возвращение системы ядерных спинов к тепловому равновесию происходит за счет передачи поглощенной от радиочастотного поля энергии своему окружению — «решетке». Для этого необходимо, чтобы в спектре внутреннего движения имелись частоты $\omega \sim 10^7$ Гц для ядер H^+ , равные частоте резонанса (и ее удвоенному значению). В то же время на T_2 влияют частоты внутреннего движения, превышающие выраженную в шкале частот ширину резонанса.

Хаотические изменения положения энергетических уровней спинов, не вызывающие переходов между ними и не влияющие на T_1 , дают, однако, вклад в ширину линий $1/T_2$ (см. (X.2.17)).

Для простого случая двух взаимодействующих протонов, которые расположены на расстоянии r друг от друга и вращаются изотропно, справедливы следующие зависимости T_1 и T_2 от частоты резонанса ω_0 и времен корреляции τ_c вращательного движения молекулярной группировки, включающей рассматриваемые протоны:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{5} \frac{\gamma^4 \hbar^2 I(I+1)}{r^6} \left[\frac{\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right],$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{1}{5} \frac{\gamma^4 \hbar^2 I(I+1)}{r^6} \left[\frac{5\tau_c}{1 + \omega_0^2 \tau_c^2} + 3\tau_c + \frac{2\tau_c}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right],$$
(X.2.21)

где γ — гиромагнитное отношение для протонов, I — спин ядра. Зависимости T_1 и T_2 от времени корреляции τ_c , рассчитанные из уравнений (X.2.21), можно представить графически (рис. X.16).

Для воды при комнатной температуре $\tau_c \sim 2,7 \cdot 10^{-12}$ с. В обычных спектрометрах протонного резонанса при частоте резонанса 60 МГц ω_0 равно $1,9 \cdot 10^8$ рад/с. Отсюда видно, что $\omega_0 \tau_c$ мало, и в (X.2.21) этой величиной можно пренебречь. Тогда для жидкости $T_1 \sim T_2$. При $\tau_c = 2,7 \cdot 10^{-12}$ с, $r = 0,158$ нм находим $T_1 = 6,7$ с. Из (X.2.25) видно, что T_2 линейно растет ($T_2 \sim 1/\tau_c$) при уменьшении времени корреляции τ_c от 10^{-5} с (твердое тело, жесткая решетка) до 10^{-12} с (жидкость).

Увеличение T_2 с ростом молекулярной подвижности есть результат усреднения влияния разных локальных полей на спины резонирующих ядер и, как следствие, приводит к увеличению времени T_2 их существования в данном спиновом состоянии. Такая же зависимость наблюдается и для T_1 в диапазоне значений от $\tau_c \sim 1/\omega_0$ до $\tau_c \sim 10^{-12}$ с. В этой области при малых τ_c как T_1 , так и T_2 пропорционально $1/\tau_c$. Однако при больших значениях τ_c ($\tau_c \gg 1/\omega_0$) кривые для T_1 и T_2 расходятся. В области $\tau_c = 1/\omega_0$ кривая для T_1 достигает минимума, после чего T_1 при больших временах релаксации становится пропорциональным τ_c , а не $1/\tau_c$ и начинает снова возрастать.

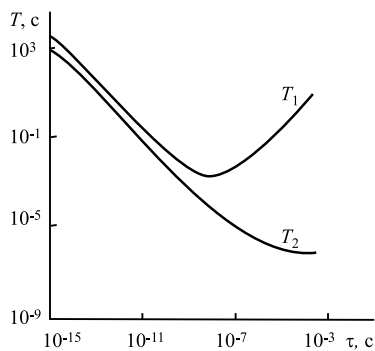


Рис. X.16

Теоретическая зависимость времен спин-решеточной T_1 и спин-спиновой T_2 релаксации от времени корреляции τ (зависимость рассчитана для протонов на резонансной частоте (X.2.24) (по А. Керрингтону, Э. Мак-Лечлану, 1970)

Падение T_1 при росте τ_c в процессе перехода от жидкости к твердому телу происходит за счет изменения спектра колебаний решетки и увеличения в нем доли колебаний с частотами, совпадающими с частотой резонанса ω_0 . Рост T_1 после достижения минимума T_1 при $\omega_0 \tau_c = 1$ связан с дальнейшим изменением спектра колебаний, уменьшением доли резонансных колебаний ω_0 в решетке твердого тела и соответственно с уменьшением спин-решеточной релаксации. Таким образом, минимум на кривой T_1 соответствует наличию в спектре времен релаксаций τ_c таких молекулярных движений, для которых значения $1/\tau_c$ совпадают с резонансной частотой ω_0 . □

Определение времен релаксации отдельных молекулярных групп белка по ширине полос спектров ЯМР ограничено возможностями разрешения полос резонанса, это же позволяет получать сведения о низких частотах внутреннего движения, практически недоступных для других методов. Так, изучение спектров высокого разрешения лизоцима и трипсина показало, что оба (пара- и мета-) протона каждого остатка тирозина имеют тем не менее одинаковые химические сдвиги. Это может указывать на вращение тирозиновых колец относительно пептидного остова со средними скоростями не ниже 10^4 с^{-1} .

В некоторых случаях удается активировать при повышении температуры обычно заторможенное движение остатков тирозина и фенилаланина. При этом спектр, характерный для медленного обмена, вначале уширяется, а затем при дальнейшем повышении температуры сужается и становится характерным для условий быстрого обмена между конформациями с разными ориентациями ароматического кольца. Определение T_1 по релаксации ^{13}C показало, что τ_c составляет для миоглобина 22 нс, для лизоцима — 13 нс, для гемоглобина — 47 нс. В этих случаях спин-решеточная релаксация определяется броуновским вращением всей макромолекулы в целом. Намного большие значения времени спин-решеточной релаксации имеют узкие резонансы углеводов алифатических боковых цепей на поверхности белка. В случае рибонуклеазы для C^β , C^γ , C^δ и C^ϵ значения τ_c соответственно равны 0,3; 0,2; 0,15; 0,08 нс. Это явно указывает на большую подвижность поверхностных слоев относительно белковой глобулы с частотами, превышающими частоту броуновского вращения глобулы. Изменение динамики отдельных групп белка в спектрах ЯМР в ходе различных процессов позволяет также выявить участки белковой глобулы, непосредственно взаимодействующие субстратом, лигандами или участвующие в изменении конформации белка. Но в целом в спектрах ЯМР можно выделить довольно ограниченное число линий из-за перекрывания основной их массы в сложных спектрах биополимеров.

Импульсные методы ЯМР. Для получения обобщенных характеристик внутреннего движения используют один из импульсных методов ЯМР — метод спинового эха. Импульсные методы основаны на том, что система спинов, ориентированных в постоянном внешнем магнитном поле, возбуждается импульсом радиочастотного поля и выводится тем самым из равновесия. Это приводит к отклонению вектора микроскопической намагниченности от его первоначальной ориентации вдоль направления поля H_0 . В результате система ядерных спинов начинает прецессировать вокруг H_0 , наводя ЭДС в приемной катушке, что регистрируется в виде сигнала свободной индукции после окончания радиочастотного импульса. Сигнал свободной индукции представляет фурье-отображение спектра, по которому может быть восстановлен и сам спектр после соответствующей обработки с помощью ЭВМ. Этот метод позволяет резко ускорить регистрацию спектров и его широко применяют в современных спектрометрах ЯМР.

В методе спинового эха используют 2 или более импульсов, один из которых выводит спиновую систему из состояния равновесия, а другой (или другие) устраняют нарушение когерентности в движении спинов из-за различия локальных полей, связанных с отличием химических сдвигов для разных групп или с неоднородностью постоянного магнитного поля в пределах образца. Применяя различные последовательности импульсов можно регистрировать, с одной стороны, процесс

возвращения спинов к исходной ориентации с восстановлением так называемой продольной намагниченности с характерным временем спин-решеточной релаксации T_1 , а с другой, спад поперечной намагниченности с характерным временем спин-спиновой релаксации T_2 , определяемым естественной шириной резонансных линий. В более сложных случаях должно наблюдаться распределение значений T_2 от групп с различной подвижностью, которое не зависит от их химического сдвига. Более быстрый спад должен соответствовать малоподвижным участкам белковой глобулы, а медленный — относительно подвижным. В результате метод спинового эха, не требующий введения каких-либо посторонних меток позволяет оценивать и распределение отдельных видов движения в макромолекулярной структуре.

Исследования показали, что величина T_1 для протонов белка зависит и от вращения белковой глобулы в целом, и от внутреннего движения. Так, увеличение молекулярной массы белка и замедление вращательного диффузионного движения приводят к ограниченному росту значений T_1 с достижением предельных значений порядка 150 мс. Время спин-решеточной релаксации белков уменьшается при увеличении температуры в интервале от 0 до 40 °С. Поскольку времена корреляции τ_c внутримолекулярных движений уменьшаются с ростом температуры, это однозначно свидетельствует о том, что обнаруженная температурная зависимость T_1 соответствует правой части кривой зависимости T_1 от τ_c на рис. X.16. Здесь выполняются условия $T_1 > T_2$ и $\omega_0 \tau_c > 1$, где ω_0 — частота резонанса, равная 10^8 с^{-1} .

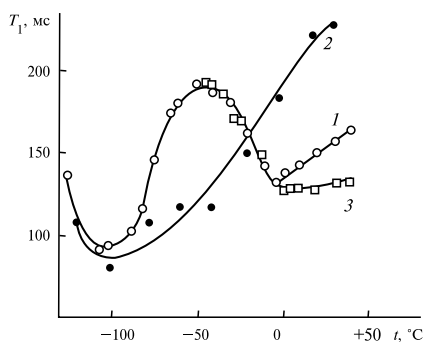


Рис. X.17

Температурная зависимость времени спин-решеточной релаксации протонов сывороточного альбумина человека (по С. И. Аксенову, 1978):

1 — 50%-ный раствор белка сывороточного альбумина в D_2O ; 2 — лиофилизированный из D_2O порошок сывороточного альбумина белка; 3 — 50%-ный раствор РНК-азы в D_2O .

Определение непосредственного вклада внутримолекулярных движений в спин-решеточную релаксацию проводили путем изучения температурной зависимости концентрированных вязких растворов белков, где диффузионное движение макромолекул достаточно замедленно ($\omega_0 \tau_c \gg 1$), так что оно уже не влияет на T_1 (С. И. Аксенов).

Оказалось, что температурные зависимости времени спин-решеточной релаксации протонов белка (сывороточный альбумин) обладают двумя минимумами: около -100°C и около 0°C (рис. X.17). В области низкотемпературного минимума, где $T_1 \simeq 90$ мс, из соотношения (X.2.17) при значении постоянного множителя $9,7 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ можно найти величину τ_c . Считая, что время корреляции экспоненциально зависит от температуры $\tau_c = \tau_0 \exp(E_{\text{акт}}/RT)$, находим $E_{\text{акт}} = 10,5 \text{ кДж/моль}$,

$\tau_0 = 2,9 \cdot 10^{-12}$ с. При комнатной температуре $\tau_c = 2,2 \cdot 10^{-10}$ с. Это хорошо соответствует значениям τ_0 и $E_{\text{акт}}$, полученным для вращения метильных групп в порошках полиаланина, поливалина и полилейцина. Другой минимум вблизи 0°C , зависящий от оводненности белков, соответствует другим видам внутреннего движения, причем его связь с внутренним движением непосредственно следует из совпадения кривых при отрицательных температурах для СА и РНКазы, отличающихся по молекулярному весу в 5 раз. Времена корреляции для этого движения в минимуме T_1 составляет около 10^{-8} с и оно, по-видимому, связано с осцилляциями боковых групп полипептидной цепи на углы более 30° .

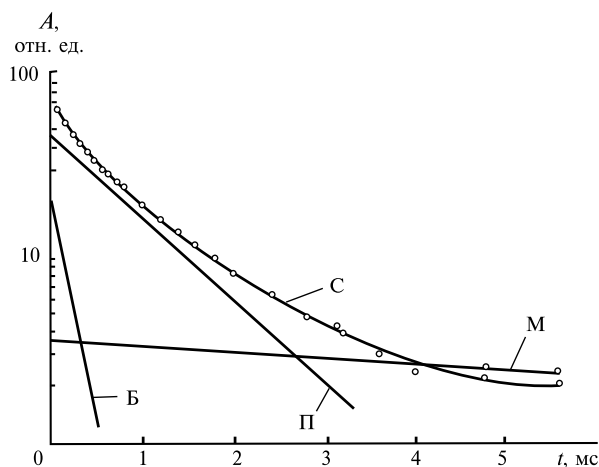


Рис. X.18

Кривая спада поперечной намагниченности протонов иммуноглобулина (4,5%-ный раствор в D_2O) и ее разложение на компоненты (по С. И. Аксенову, 1978):

С — суммарная кривая спада; М — медленный компонент; П — промежуточный компонент, полученный после вычитания медленного компонента из суммарной кривой; Б — быстрый компонент, полученный после вычитания медленного и промежуточного компонента из суммарной кривой. Б обусловлен вращением глобулы как целого; П соответствует относительно медленным внутренним движениям; М характеризует движение внешних, наиболее подвижных групп белка

В отличие от кривых восстановления продольной намагниченности (T_1), близких к одноэкспоненциальным, кривые спада сигнала спин-эха поперечной намагниченности от протонов обладают сложным многокомпонентным характером (см. рис. X.18). Сложный спад обусловлен различием расстояний между протонами в составе CH_3- , CH_2- , $\text{CH}-$ и ароматических групп, а также эффектами внутреннего движения. При этом в отличие от T_1 , которое чувствительно уже к осцилляциям химических групп, заметное влияние на T_2 оказывает поворотное движение отдельных групп или глобулы в целом. Здесь отчетливо выделяется движение боковых групп макромолекул, а у ряда белков также движения в значительной части объема белковой глобулы с частотами, превышающими частоту вращения белковой глобулы.

Таким образом, метод ЯМР позволяет идентифицировать определенные виды внутримолекулярного движения в молекуле белка. Все это дает возможность осуществлять прямые экспериментальные исследования связи между внутренней динамикой и функцией белковых молекул.

Метод гамма-резонансной спектроскопии

Физические основы метода. Этот метод также дает важную информацию о динамике белков. Он позволяет определять амплитуды смещений атомов в структуре белка на коротких временах (10^{-7} – 10^{-9} с). Он основан на том, что при поглощении γ -кванта происходит переход ядра из основного (E_1) в возбужденное состояние (E_2) согласно обычному закону $\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu$, где для ядерных уровней ΔE составляет 10^3 – 10^5 эВ. Поглощение γ -квантов наблюдается на ядрах тяжелых атомов Fe, Cu, Pb. Для изотопа ^{57}Fe , содержащегося в природных соединениях в количестве 2,2%, величина ΔE при резонансном поглощении составляет 14,4 КэВ, а время жизни ядра ^{57}Fe в возбужденном состоянии $\tau^* \sim 10^{-7}$ с. Отсюда согласно соотношению неопределенностей для энергии (X.2.16) можно найти, что естественная ширина резонансной линии поглощения γ -квантов составляет очень малую величину $\Gamma \sim 10^{-8}$ эВ.

Пусть время корреляции τ_c ненаправленного движения ядра в образце близко или меньше времени жизни его возбужденного состояния ($\tau_c \sim \tau^* \sim 10^{-7}$ с). Тогда в силу закона сохранения импульса при поглощении γ -кванта может произойти передача части энергии кванта в поступательное движение мёсбауэровского ядра. Следовательно, энергия γ -кванта, используемая для внутреннего возбуждения ядра, будет уменьшена на величину, равную энергии отдачи, а резонансная частота поглощения ν_γ теперь будет определяться соотношением

$$h\nu_\gamma = \Delta E - mv^2/2,$$

где $\Delta E = E_2 - E_1$ (равно 0,0144 МэВ для ^{57}Fe), m — масса мёсбауэровского ядра, v — скорость отдачи. Энергия отдачи ($E_{\text{отд}} = mv^2/2$) для свободного ядра ^{57}Fe составляет величину $\sim 0,002$ эВ, которая и определяет небольшое изменение частоты поглощенного γ -кванта. Так как естественная ширина линии $\Gamma \ll E_{\text{отд}}$, то сдвиг частоты поглощения ν_γ очень заметен.

На практике образец облучают γ -лучами, испускаемыми радиоактивным источником, в котором генерируются возбужденные ядра ^{57}Fe . Сообщая источнику небольшую скорость $\pm(0,1-10)$ см/с относительно образца вдоль соединяющей их оси и изменяя таким образом частоту излучения за счет эффекта Доплера, снимают спектры поглощения γ -квантов (рис. X.19). Различные скорости источника соответствуют разным энергиям отдачи, разброс значений которых отражает статистическое распределение числа атомов в образце по соответствующим скоростям.

Спектры ЯГР (ядерного гамма-резонанса) отражают химическую и физическую структуру окружения ядра и характеризуются химическим сдвигом, квадратным расщеплением, формой линии и сверхтонкой структурой. В настоящее время ЯГР становится мощным орудием в расшифровке атомной структуры активных центров.

Эффект Мёссбауэра. Основной источник информации о динамической структуре белков заключается в изучении формы спектра относительного уширения спектра ЯГР и вероятности f' резонансного поглощения γ -квантов без отдачи (максимум линии поглощения, рис. X.19). В твердом теле поглощение без отдачи означает, что импульс отдачи принимает на себя весь кристалл в целом, обладающий большой массой M . В этом случае энергия отдачи кристалла в M/t раз меньше, чем энергия отдачи одиночного ядра, т. е. пренебрежимо мала и намного меньше естественной ширины Γ . Иными словами, в спектрах появляются линии, не смещенные по энергии из-за отсутствия отдачи. Возбуждения колебаний отдельных атомов (фононов) в решетке не происходит, а импульс отдачи воспринимается всем кристаллом в целом. В этом, в сущности, и состоит эффект Мёссбауэра.

С ростом среднеквадратичного смещения $\langle x^2 \rangle$ мёссбауэровского ядра вероятность поглощения γ -кванта без отдачи f' падает. Наоборот, величина f' стремится к единице, когда $\langle x^2 \rangle$ мало по сравнению с λ — длиной волны γ -кванта. Случай малых $\langle x^2 \rangle$ соответствует жесткой связи атомов в решетке и соответственно большой

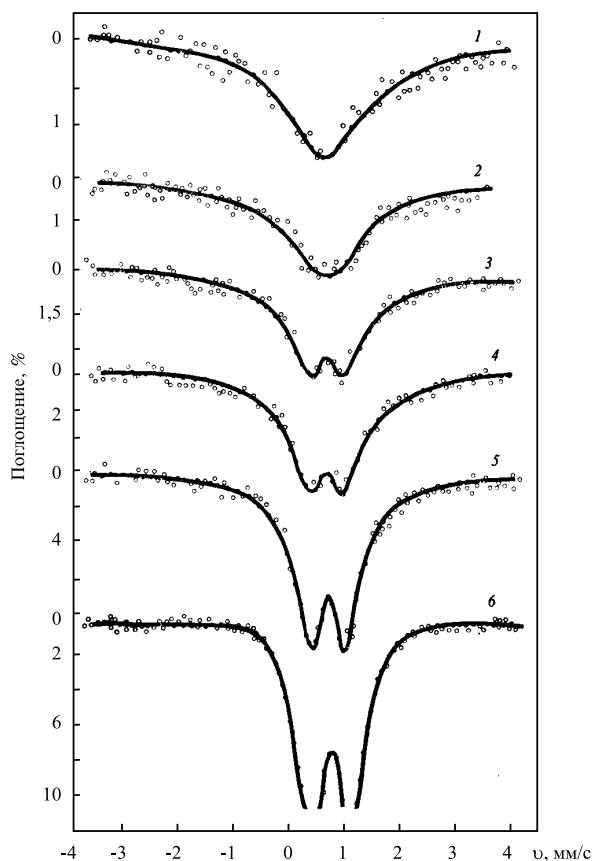


Рис. X.19

Мёссбауэровские спектры модифицированного ^{57}Fe сывороточного альбумина человека (в водном растворе глицерина, 100 мг/мл) (по Г. И. Лихтенштейну, 1974):

1–6 — температура, равная 13,5; –4; –11; –22; –190; –196 °C соответственно

Уширение спектра обусловлено диффузией молекул белка. Изменение частоты уширения пропорционально скорости источника (v)

величине колебательного кванта, которая существенно превосходит энергию отдачи. В этих условиях передачи энергии ядру не происходит. Зависимость f' от $\langle x^2 \rangle$ в случае твердых тел выражается формулой Дебая–Валлера (Лэмба–Мёссбауэра)

$$f' = \exp(-\langle x^2 \rangle / \lambda^2) \quad (\text{X.2.22})$$

где $\lambda = \lambda / (2\pi)$, λ — длина волны γ -кванта ($\lambda = 0,014$ нм для ^{57}Fe). Это соотношение справедливо, когда время релаксации ядра достаточно мало: $\tau_c \ll \tau^*$.

В твердых телах само движение мёссбауэровского атома обычно моделируется гармоническим осциллятором с малым затуханием, для которого зависимость среднего квадрата смещения имеет вид:

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - \exp(-\gamma t / 2m) \cos(\omega_0 t)), \quad (\text{X.2.23})$$

где x_a — амплитуда, ω_0 — частота, γ — эффективный коэффициент трения, m — масса осциллятора. Условие малости затухания состоит в $\gamma / m \ll \omega_0$. Важно подчеркнуть, что уменьшение вероятности f' при росте $\langle x^2 \rangle$ в твердых телах происходит без уширения линии поглощения при условии малости смещений атомов с сохранением их положений в узлах решетки. Энергию отдачи с вероятностью f' берет на себя весь кристалл в целом.

В противоположность твердому телу в жидкостях смещение мёссбауэровского атома носит характер неограниченной диффузии. Это вызывает доплеровское уширение линии, величина которого определяется выражением

$$\Delta\Gamma = 2k^2 D, \quad (\text{X.2.24})$$

где $k = 2\pi/\lambda$ — волновое число γ -кванта; D — коэффициент диффузии, равный

$$D = k_B T / (6\pi\eta a) \quad (\text{X.2.25})$$

(k_B — константа Больцмана, η — вязкость, a — радиус частицы). Здесь за время τ^* в результате диффузии успевает произойти передача части энергии γ -кванта окружающей среде, что приводит одновременно к уширению линии и падению вероятности поглощения без отдачи f' :

$$f' = \Gamma / (\Gamma + \Delta\Gamma). \quad (\text{X.2.26})$$

Среднеквадратичное смещение ядра за время t в жидкости пропорционально коэффициенту диффузии:

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \sim 2Dt. \quad (\text{X.2.27})$$

В общем случае ядро может участвовать одновременно в нескольких независимых движениях, включающих колебания атомов по химическим связям, колебания участка системы, с которым прочно связано мёссбауэровское ядро, диффузионное перемещение макромолекулы как целого. Если эти виды движения не зависят друг от друга, то общий разброс положения ядра $\langle x_{\text{общ}}^2 \rangle$ складывается из локальных

внутримолекулярных смещений $\langle x_{\text{лок}}^2 \rangle$ и общего диффузионного смещения $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle$ всей частицы, в которой находится мёссбауэровский атом:

$$\langle x_{\text{общ}}^2 \rangle = \langle x_{\text{лок}}^2 \rangle + \langle x_{\text{диф}}^2 \rangle.$$

В свою очередь, локальные смещения могут включать колебания ядер и смещения, связанные с переходами между различными конформационными подсостояниями (см. § 1 гл. IX):

$$\langle x_{\text{лок}}^2 \rangle = \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle + \langle x_{\text{конф}}^2 \rangle.$$

В тех случаях, когда в основном реализуется подвижность частиц как целого, падение f' всегда сопровождается уширением линии поглощения, как в случае жидкости. Наоборот, в системах, где смещение обусловлено внутримолекулярными движениями с малыми амплитудами целого участка с прочно фиксированным в нем мёссбауэровским ядром, падение f' не сопровождается уширением. Оно скорее отражает уменьшение связи этого участка с остальной системой (кристаллом), например из-за уменьшения вязкости в процессе локального плавления.

В модельных системах это явление наблюдается, например, в «рыхлых» частицах оловянных кислот, обладающих внутренней динамикой. Смещения мёссбауэровского атома зависят от внешних условий и могут увеличиваться с повышением температуры или уменьшением вязкости системы. Так, плавление твердых тел всегда связано с резким уширением спектра и исчезновением мёссбауэровской линии.

Температурные зависимости f' и ΔG . Их изучение дает информацию о характере подвижности мёссбауэровских ядер и свойствах их окружения. Важнейшее преимущество данного метода заключается в возможности определять также и амплитуды движений атомов. В этом состоит его отличие от других резонансных методов, где определяются лишь частотные характеристики движений. На рис. X.20 приведены кривые температурной зависимости $f'(T)$ для препаратов белков, меченных изотопом ^{57}Fe . Для увлажненных белков вероятность эффекта f' слабо меняется в области низких температур, однако резко падает при температурах, превышающих $-(60-30)^\circ\text{C}$, без уширения ГР-линии. Уширение мёссбауэровских спектров наблюдается только при температурах выше -20°C на конечных участках кривой $f'(T)$, где вероятность эффекта уже мала (см. рис. X.19). Сухой белок характеризуется слабой температурной зависимостью фактора f' и постоянной шириной ГР-линии, что характерно для колебаний ионов ^{57}Fe в твердой матрице. Зависимость f' от относительной влажности образца (P/P_s) носит пороговый характер, что свидетельствует о кооперативном характере конформационной подвижности водно-белкового комплекса при степени гидратации $P/P_s \geq 0,4$ (см. § 4 гл. IX).

Таким образом, гидратированные белки при температурах 77–200 К не отличаются по своей динамике от твердых тел. Мёссбауэровские ядра совершают в этих условиях высокочастотные колебания с малой амплитудой $A < 0,01$ нм. В диапазоне температур 200–260 К растормаживается движение со средней частотой $\omega > 10^7$ с $^{-1}$ и амплитудой смещений $A \sim 0,03 \div 0,06$ нм, а также наблюдается небольшое уширение ГР-линий. Следовательно, белок отличается по своему динамическому поведению как от твердых тел, так и от жидкостей. Температурная зависимость $f'(T)$ и увеличение эффективного значения $\langle x^2 \rangle$ с ростом T для белка имеют довольно резкий излом (рис. X.21, 1), что нехарактерно для колебаний

атомов в твердых телах (рис. X.21, 2). Кроме того, в этом случае при повышении температуры в отличие от жидкостей не происходит большого уширения ГР-линии. Последнее обстоятельство напоминает свойства твердотельной матрицы.

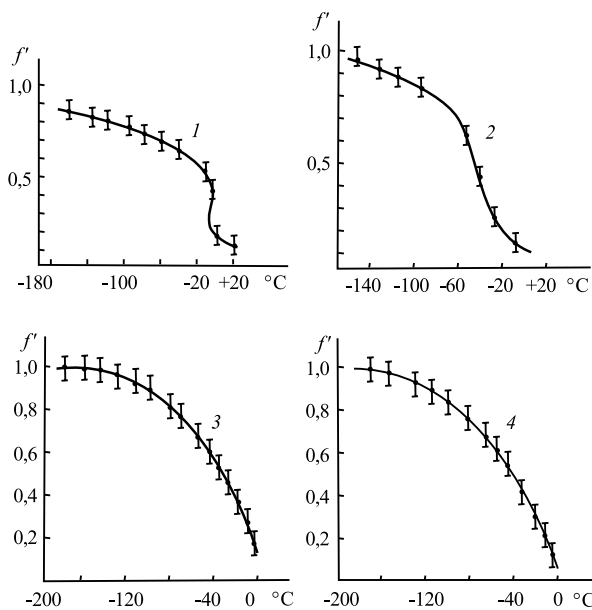


Рис. X.20

Зависимость $f'(T)$ для порошков (по Е. Н. Фролову, 1985):

1 — коллагена при степени гидратации $P/P_s = 0,97$, 2 — лизоцима при степени гидратации $h = 0,16$ г H_2O /г белка, 3, 4 — для α -химотрипсина сыvorоточного альбумина человека при степени гидратации $P/P_s = 0,95$ соответственно

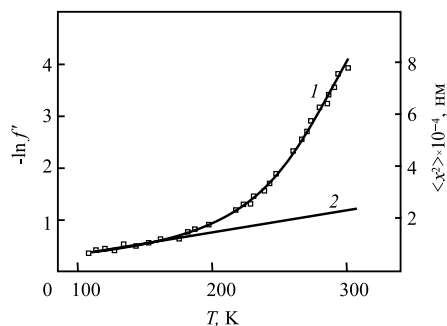


Рис. X.21

Температурная зависимость эффективного среднеквадратичного смещения ядер ^{57}Fe для метмиоглобина (Met Mb) (по Bauming et al., 1983):

1 — Met Mb, 2 — $\langle x^2 \rangle_v$;
 $\langle x^2 \rangle \sim -\lambda^2 \ln f'$; $\langle x^2 \rangle = \langle x^2 \rangle_c + \langle x^2 \rangle_v$;
 $\langle x^2 \rangle_c$ — вклад конформационных степеней свободы, $\langle x^2 \rangle_v$ — вклад колебаний ядра, $\langle x^2 \rangle_v = k_B T/K$;
 K — константа жесткости для колебаний атома ^{57}Fe

Изменение во времени среднего квадрата смещения ядра $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ в белках отличается от такового для твердого тела (X.2.23) и жидкости (X.2.27) и имеет вид

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - \exp(-t/\tau_c)), \quad (\text{X.2.28})$$

где $\tau_c = \tau_c^0 \exp(\varepsilon/(k_B T))$, τ_c и ε — время корреляции и энергия активации движения мёссбауэровского ядра,

$$\sqrt{\langle x^2 \rangle} = 0,1 \text{ нм.}$$

На рис. X.22 представлены графики характерных зависимостей квадрата эффективной амплитуды смещения мёссбауэровского ядра от времени в твердом теле, жидкости и белке. Видно, что на коротких временах динамика смещения ядра ато-

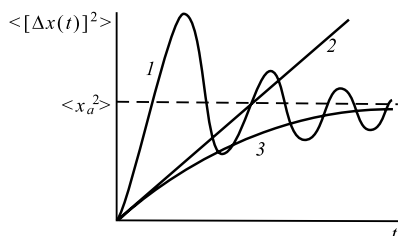


Рис. X.22

Характер зависимостей для колебаний смещения мессбауэровского ядра от времени (по К. В. Шайтану, 1982):

1 — колебания атомов в кристалле, 2 — диффузия в жидкости, 3 — конформационные движения в белке

ма в белке напоминает диффузию в жидкости. Однако в белке диффузия носит ограниченный характер, поскольку среднеквадратичное смещение $\langle [x(t)]^2 \rangle$ не превышает некоторых предельных значений, что аналогично смещению в твердом теле. Временное разрешение в ГР-спектроскопии лимитируется временем возбужденного состояния τ^* ядра ($\sim 10^{-7}$ с для ^{57}Fe). Рекордное энергетическое разрешение ($\sim 10^{-9}$ Эв) позволяет измерять времена корреляции от 10^{-6} до 10^{-8} с. Вклад в вероятность эффекта дают все движения со средними частотами больше 10^6 с $^{-1}$.

Пусть при некоей характеристической температуре T_k время перехода ядра $\tau_k(T_k)$ между конформационными подсостояниями совпадает с τ^* , т. е. $\tau_k(T_k) = \tau^*$. Очевидно, при $T \ll T_k$, τ_k намного больше τ^* и метод ГР-спектроскопии будет чувствителен только к смещениям ядер в процессе их колебаний: $\langle x^2 \rangle_{T \ll T_k} = \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle$.

Наоборот, при $T \gg T_k$ τ_k становится короче τ^* и в общем смещение ядра за время τ^* успевают дать вклад переходы между конформационными подсостояниями $\langle x_{\text{конф}}^2 \rangle$ и диффузия $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle$. В белках обычно можно принять, что $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle = 0$ за время τ^* .

Изучение внутренних движений. Для изучения движения различных участков белковой глобулы применение метода ЯГР естественно ограничено из-за сравнительно небольшого числа мёссбауэровских атомов (^{57}Fe) в белке. Этот недостаток в известной степени компенсируется применением метода ГР-спектроскопии в сочетании с рентгенодинамическим анализом (РДА), основанным на дифракции рентгеновских лучей на различных атомах. По сравнению с характеристическими частотами движения в белке дифракция рентгеновских лучей есть мгновенный процесс ($\tau \sim 10^{-15}$ с), и поэтому метод РДА практически позволяет определять только статистический беспорядок (дефекты решетки, неупорядоченность в кристалле белка). Фактически здесь определяют не частоты движения, а величины $\langle x_{\text{общ}}^2 \rangle$, обусловленные как статистическим беспорядком, так и реальными движениями атомов при переходах между конформационными подсостояниями:

$$\langle x_{\text{общ}}^2 \rangle = \langle x_{\text{конф}}^2 \rangle + \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle + \langle x_{\text{стат}}^2 \rangle,$$

где для белка принято $\langle x_{\text{диф}}^2 \rangle = 0$, а $\langle x_{\text{стат}}^2 \rangle$ считается одинаковым для всех атомов.

Величина $\langle x_{\text{стат}}^2 \rangle$ определяется для атома железа ^{57}Fe как разность величины $\langle x_{\text{общ}}^2 \rangle$, полученной методом РДА, и величины $(\langle x_{\text{конф}}^2 \rangle + \langle x_{\text{кол}}^2 \rangle)$, определенной методом ГР-спектроскопии, при $T > T_k$.

С помощью ГР-спектроскопии учет $\langle x_{\text{стат}}^2 \rangle$ позволяет выделить лишь реальные движения в величинах смещений $\langle x_{\text{общ}}^2 \rangle$, полученных методом РДА для всех атомов белка. Таким образом была получена общая картина подвижности всех 1261 атомов в молекуле метмиоглобина (Г. Фрауенфельдер, Ф. Парак). Оказалось, что 44 аминокислотных остатка, имеющие максимальную амплитуду смещений боковых цепей больше чем 0,04 нм, лежат на поверхности белка. Смещения внутри глобулы меньше ($A < 0,03$ нм). Заряженные и полярные группы обладают большими смещениями по сравнению с неполярными. Интересно отметить, что для остатков, ограничивающих доступ к атому железа, величины A составляют примерно 0,02 нм, что несколько больше, чем для твердого тела. Это меньше амплитуд смещения атомов в проксимальном конце около *гис-93* и в области F -спирали, где происходят динамические изменения (см. рис. X.1) с амплитудами $A \sim 0,03 \div 0,04$ нм. Для самого атома Fe характерны спонтанные движения $A \sim 0,03 \div 0,04$ нм в направлении, перпендикулярном плоскости гема, что существенно меньше, чем направленное смещение Fe в плоскость гема ($A \sim 0,05 \div 0,07$ нм) при оксигенации гемоглобина (см. § 1 гл. X).

Общая картина динамической организации белка метмиоглобина на основе метода РДА включает «твердотельное» ядро ($A \lesssim 0,02$ нм) и «жидкообразную» внешнюю оболочку ($A \gtrsim 0,03 \div 0,04$ нм). Размеры последней при комнатной температуре намного больше, чем размеры «твердотельного» ядра (см. § 2 гл. VII). Величины амплитуд смещений в «жидкообразной» области, превышающие 0,03 нм даже при 80 К, свидетельствуют о том, что эти движения атомов соответствуют переходам между различными конформационными подсостояниями. В «твердотельной» области, где $A \lesssim 0,02$ нм, конформационные степени свободы практически отсутствуют. Размер «твердотельной» области, как правило, составляет несколько процентов от объема глобулярного белка, причем даже жесткие α -спиральные участки, очевидно, постоянно находятся в движении, испытывая деформационные смещения, колебания, или диффундируют в вязком окружении.

Белок обладает уникальными динамическими свойствами, которые отличают его от твердых и жидких тел, так что термины «твердотельный» и «жидкообразный» носят условный характер. Ниже приведена классификация подвижности структуры белков по характеристическим временам отдельных видов движения (Демченко А. П.). Здесь включены также данные о внутримолекулярной подвижности нуклеиновых кислот и компонентов биомембран. \square

Белки

Первичные события в фотосинтезе и зрении	$10^{-13} - 10^{-12}$ с
Локальная динамика атомов и малых групп	$10^{-12} - 10^{-11}$ с
боковых цепей и сегментов полипептидных цепей	$10^{-11} - 10^{-7}$ с
Релаксация участков полипептидной цепи	$\sim 10^{-9}$ с
Движения доменов и субъединиц	$10^{-8} - 10^{-5}$ с
Реакция переноса протона ионизируемых групп	$10^{-9} - 10^{-7}$ с

Развертывание участков α -спирали	$10^{-8} - 10^{-6}$ с
Высвобождение связанных молекул лигандов	$10^{-6} - 10^{-3}$ с
Кинетика сворачивания-разворачивания	$10^{-4} - 10^2$ с
Обмен прочно связанных ионов Са	$10^{-3} - 10^{-2}$ с

Нуклеиновые кислоты

Колебания двойной спирали ДНК	$10^{-13} - 10^{-11}$ с
Локальные движения основных пар	$10^{-10} - 10^{-9}$ с
В-А переходы в ДНК	10^{-9} с
Кинетика интеркаляции	$10^{-4} - 10^{-3}$ с
Распаривание пар оснований	$10^{-3} - 10^{-1}$ с
Диссоциация и образование двойной спирали	$10^{-3} - 10$ с

Биомембраны

Релаксация фосфолипидных головок	$10^{-11} - 10^{-9}$ с
Время транслокации ионов через каналы	$10^{-9} - 10^{-8}$ с
Фазовые переходы в фосфолипидных бислоях	$10^{-2} - 10^{-1}$ с
Флип-флоп переходы в липидах	10^4 с

Вода

Релаксация объемной воды	$10^{-12} - 10^{-11}$ с
Релаксация гидратированных слоев	$10^{-11} - 10^{-10}$ с
Времена жизни молекул связанной воды	$10^{-8} - 10^{-2}$ с