

**МЕЖДИСЦИПЛИНАРНЫЕ ВОПРОСЫ БИОЛОГИИ,
МАТЕМАТИКИ, ФИЗИКИ, ХИМИИ И МЕДИЦИНЫ**

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

**Редакционный совет
по изданию серии монографий
по междисциплинарным вопросам
биологии, математики, физики, химии и медицины**

Председатель Редакционного совета:
академик В. А. Садовничий

Заместитель Председателя:
академик А. Б. Рубин

Члены совета:
академик М. П. Кирпичников
академик В. А. Ткачук
академик В. П. Скулачев
член-корреспондент Е. А. Гудилин
профессор Н. Н. Сысоев
профессор В. Н. Чубариков

ГОРИЗОНТЫ БИОФИЗИКИ

ТОМ 1

Под редакцией академика А. Б. Рубина



Москва ♦ Ижевск

2022

УДК 576.3:51
ББК 28.057в641
Г50

Г50 Горизонты биофизики. Т. 1 / Под ред. А. Б. Рубина. — М.–Ижевск :
Институт компьютерных исследований, 2022. — 456 с.

ISBN 978-5-4344-0963-6

Биофизика — междисциплинарная область науки, быстро развивающаяся на стыке биологии, физики, химии, математики. Представленные в книге материалы отражают перспективы развития основных разделов этой науки: молекулярной биофизики, биофизики мембран, биофизики фотобиологических процессов, биоэнергетики, биофизики клеточных процессов, а также экологической и медицинской биофизики. Рассматриваются результаты, полученные в последние годы биофизиками Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова и Академии наук России. Представленные данные касаются теоретических основ современной биофизики и их применения для решения фундаментальных и прикладных задач современной биологии.

Книга предназначена для широкого круга ученых и практиков, аспирантов и магистров, специализирующихся в областях, где биофизический подход может быть полезным в изучении живых систем и в решении задач медицины, биотехнологии, экологии, альтернативной энергетики.

ISBN 978-5-4344-0950-6

ISBN 978-5-4344-0963-6 (Т. 1)

© Ижевский институт компьютерных
исследований, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Кирпичников М. П.</i> Предисловие.....	7
<i>Рубин А. Б.</i> Введение	9

Молекулярная биофизика

<i>Бинги В. Н.</i> Перспективы магнитобиологии	17
<i>Гарбузинский С. А., Финкельштейн А. В.</i> Решение загадки самоорганизации белка.....	31
<i>Ефремов Р. Г.</i> «Динамический молекулярный портрет» клеточной мембраны с наноразмерным разрешением.....	62
<i>Комаров В. М., Самченко А. А.</i> Особенности структурно-функциональной организации геномной ДНК.....	100
<i>Красильников П. М.</i> Теория переноса электрона в биосистемах: проблемы и перспективы	125
<i>Лихачев И. В., Лахно В. Д.</i> Исследование денатурации ДНК при помощи модифицированной модели Пейрарда–Бишопа–Доксуа методом молекулярной динамики: влияние ограничений на доступный объем, сравнение с методом Монте-Карло.....	169
<i>Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б.</i> Проблемы математического моделирования процессов в живой клетке на примере моделей первичных процессов фотосинтеза	186
<i>Твердислов В. А., Малышко Е. В.</i> Симметрии, хиральность, молекулярные машины.....	212
<i>Шайтан А. К.</i> Методы интегративного моделирования в изучении структуры и динамики биомакромолекул	227
<i>Крупянский Ю. Ф.</i> Архитектура конденсированной ДНК в бактериях	250
<i>Шайтан К. В.</i> Многомерная геометрия расширяет горизонты биофизики. Почему линейные полимеры смогли стать молекулярной основой жизни?	271

Медицинская биофизика

<i>Иваницкий Г. Р.</i> Рельеф новой коры мозга: почему образуются извилины и какой биофизический смысл они имеют?	343
<i>Максимов Г. В.</i> Биофизика миелина.....	371
<i>Постнов Д. Э.</i> Математические модели калий-связанных нейронов	391
<i>Соболев А. С.</i> Размышления о возможном будущем (куда и как идем?)	415
<i>Фрайкин Г. Я., Рубин А. Б.</i> Флавопротеиновые сенсорные фоторецепторы в живых системах: биофизические аспекты	426

ПРЕДИСЛОВИЕ

Академик М. П. Кирпичников

Биофизика является важной дисциплиной в области физико-химической биологии. Экспериментальные и теоретические результаты, полученные в биофизической науке, вносят важный вклад в понимание физико-химических взаимодействий наноразмерных макромолекулярных комплексов, лежащих в основе биологических процессов. Это относится к процессам трансформации энергии из одного вида в другой, трансмембранному транспорту веществ и ионов, переносу электронов в редокс-реакциях в фотосинтетической и дыхательной цепи переносчиков, первичным фотобиологическим процессам, действию физико-химических факторов на клеточные структуры.

Особое значение приобретают исследования механизмов белок-белковых взаимодействий, фолдинга белков, образования белковых комплексов и внутримолекулярных электронно-конформационных взаимодействий как движущей силы в функционировании белков. Не менее важно изучение динамики и регуляции сложных метаболических процессов методами математического моделирования.

Само по себе дальнейшее развитие фундаментальных и прикладных работ в биофизике связано с решением ряда принципиальных проблем. Они возникли в результате огромного количества новых данных о структурных особенностях наноразмерных биополимеров, о динамике их взаимодействий в гетерогенной клеточной среде.

Это требует новых подходов и направленного изучения динамики и механизмов регулирования сложных многокомпонентных систем. Наряду с внедрением новых неинвазивных физических методов индикации состояния клеток полученные результаты, несомненно, найдут полезное применение в медицине и экологии.

Успешное развитие структурной и синтетической биологии требует не только знания элементов равновесных структур, но и понимания механизмов их внутри- и межмолекулярных взаимодействий. Созданные методами биоинженерии биосистемы обладают целостным биологически значимым функциональным поведением и собственной динамикой. Понимание законов и способов регуляции динамического поведения искусственных биологических и гибридных биотехнических систем является одной из важных задач современной биофизики.

Настоящий сборник содержит полученные биофизиками МГУ и РАН результаты, которые иллюстрируют современное положение в отдельных важных разделах биофизики. Мы надеемся, что книга вызовет интерес в научной среде и может положить начало обсуждению перспектив развития отдельных областей биологии, в особенности имеющих явно выраженный междисциплинарный характер.

ВВЕДЕНИЕ

Академик А. Б. Рубин

Начало формирования биофизики и изучения физических свойств биологических объектов обычно связывают с работами Г. Галилея и Р. Декарта (XVII в.), заложивших основы физической науки — механики, на принципах которой и делались тогда первые попытки объяснить некоторые процессы жизнедеятельности. Р. Декарт, например, считал, что организм человека подобен сложной машине, состоящей из тех же взаимодействующих механических элементов, что и тела неорганического происхождения. Дж. Борелли применил принципы механики в описании механизмов движения животных. В 1628 г. У. Гарвей на основе законов гидравлики описал механизм кровообращения.

В XVIII в. важное значение в познании физико-химических явлений, протекающих в живом организме, имели открытия в области физики, совершенствование ее математического аппарата. Это дало толчок к введению в биологию экспериментальных методов и идей точных наук. Л. Эйлер математически описал движение крови по сосудам. М. В. Ломоносов высказал ряд общих суждений о природе вкусовых и зрительных ощущений, выдвинул одну из первых теорий цветового зрения. А. Лавуазье и П. Лаплас показали единство законов химических превращений неорганических и органических тел, установив, что процесс дыхания аналогичен медленному горению и является источником тепла для живых организмов. Творческая дискуссия между А. Вольтой и Л. Гальвани по поводу открытого последним «живого электричества» легла в основу электрофизиологии.

В XIX в. для развития биологии огромное значение имело создание электролитической теории растворов С. Аррениусом, ионной теории биоэлектрических явлений В. Нернстом. Были сформированы основные представления о природе и роли биопотенциала и механизме возникновения и распространения возбуждения по нерву (Г. Гельмгольц, Э. Дюбуа-Реймон и Ю. Бернштейн, Германия), значение осмотических и электрических явлений в жизни клеток и тканей было выяснено благодаря работам Ж. Леба (США), В. Нернста и Р. Герера (Германия). Все это позволило Э. Дюбуа-Реймону сделать принципиальный вывод о том, что в материальных частицах организмов не обнаруживается никаких новых сил, которые не могли бы действовать вне их. Это положило конец объяснениям процессов жизнедеятельности действием каких-то особых «живых факторов, не поддающихся физическим измерениям».

В работах И. М. Сеченова, В. Ю. Чаговца, К. А. Тимирязева идеи и методы физики и физической химии использовались при исследовании движения, орга-

нов слуха и зрения, фотосинтеза, механизма генерации электродвижущей силы в нерве и мышце, роли ионной среды для жизнедеятельности клеток и тканей.

Начиная со второй половины XX в. успехи в биофизике непосредственно связаны с развитием и совершенствованием современных физических и химических исследований и теоретических подходов, применением электронно-вычислительной техники. Широкое освоение атомной энергии стимулировало интерес к исследованиям в области радиобиологии. Была раскрыта роль радикалов в живых системах и их значение в поражающем действии ионизирующей радиации (Н. М. Эмануэль, Б. Н. Тарусов).

К достижениям современной теоретической биофизики, имеющим общебиологическое значение, относится понимание общих свойств биологических систем как открытых систем, анализ критериев эволюции открытой системы к стационарному состоянию (И. Р. Пригожин), раскрытие общих кинетических механизмов колебательных процессов, протекающих на разных уровнях самоорганизации, установление условий самопроизвольного возникновения диссипативных структур в открытых гомогенных системах.

Активно разрабатываются проблемы возникновения и природы биологической информации и ее связи с энтропией, хаотизации и образования фрактальных самоподобных структур в сложных биологических системах, самосборки биополимеров и работы биологических моторов.

В области теоретической молекулярной биофизики представления об электронно-конформационных взаимодействиях (Л. А. Блюменфельд, М. В. Волькенштейн, Д. С. Чернавский), стохастических свойствах белка (О. Б. Птицын) легли в основу принципов функционирования биологических макромолекул.

В настоящее время развитие биофизики также тесно связано с применением ее результатов в медицине и экологии. Ранняя диагностика начальных стадий заболеваний основана на регистрации спектральных изменений, биолюминисценции, электрической проводимости образцов крови и тканей, сопровождающих заболевание и патологические нарушения. В экологии находит широкое применение анализ механизмов влияния абиотических факторов (температура, свет, электромагнитные поля, антропогенные загрязнения и др.) на биологические структуры, их жизнеспособность и устойчивость организмов.

Одной из важнейших задач биофизики в этих областях является развитие неинвазивных экспресс-методов диагностики состояния метаболизма и клеточных структур на ранних стадиях их изменений при внешних воздействиях и развитии патологических процессов.

В целом развитие и становление биофизики всегда проходило в тесном взаимодействии со смежными точными науками и уже исходно носило междисциплинарный характер. Это означает не только использование в биологии «готовых» теоретических представлений точных наук, но одновременно и их твор-

ческую модификацию вследствие специфических особенностей биологических объектов. В этом отношении биофизика призвана не только решать свои собственные задачи. Она является форпостом внедрения методов и идей точных наук в различные области биологии.

Здесь достаточно назвать методы математического моделирования, квантовой химии, молекулярной физики и физики твердого тела, которые используются не только в области современной физико-химической биологии, но и в ряде других, в том числе прикладных областях биологии.

В современной биофизике как самостоятельной науке сформирована собственная теоретическая база, позволяющая с единых позиций интерпретировать физико-химическую природу фундаментальных взаимодействий, динамику и механизмы регуляции процессов, протекающих на молекулярном уровне живой материи. Теоретическая основа биофизики включает разделы:

- биофизика сложных систем, где рассматриваются кинетика и динамическое поведение, термодинамика, механизмы самоорганизации сложных систем, природа биологической информации;
- молекулярная биофизика, где рассматриваются физическая природа устойчивости и динамической конформационной подвижности биополимеров и их комплексов, механизмы переноса электронов и трансформации энергии в биоструктурах, включая энергию электронного возбуждения, общие физико-химические принципы ферментативного катализа.

В целом эти представления и составляют единую теоретическую базу при анализе конкретных биологических процессов, которые протекают на разных уровнях структурной организации живой материи и изучаются в биофизике на разнообразных объектах. Сюда относятся разделы:

- биофизика мембранных процессов, трансмембранный транспорт веществ, природа биопотенциалов, трансформация энергии в биомембранах;
- физика мышечного сокращения;
- биофизика внутриклеточной сигнализации;
- биофизика первичных фотобиологических энергоинформационных процессов;
- механизмы действия физико-химических факторов на экологические системы.

Отдельного внимания заслуживает вопрос об определении биофизики как самостоятельной науки, соответственно, имеющей свой предмет, свои объекты исследования, свою теоретическую базу. В литературе существуют разные определения биофизики как науки. Мы считаем, что биофизика — это наука о фундаментальных физических и физико-химических механизмах взаимодействий, лежащих в основе биологических процессов. Это значит, что предметом биофизики, так же как и физики, являются механизмы взаимодействий, в данном слу-

чае, между элементами живой материи. На разных уровнях ее структурной организации (макромолекулярном, клеточном, популяционном) объектами биофизического исследования являются, естественно, живые системы и их компоненты, а также гибридные биофизические системы.

В отличие от физики, где набор объектов практически неограничен, биофизика изучает объекты, так или иначе принадлежащие живой природе. Основной упор делается на изучение фундаментальных взаимодействий и их физических механизмов, лежащих в основе трансформации энергии из одного вида в другой, факторов внутримолекулярной динамики и направленной трансформации клеточных структур.

Приведем типичный пример, иллюстрирующий вышесказанное. Структура АТФ-синтазы хорошо известна. Но каков конкретный механизм трансформации энергии трансмембранного электрохимического потенциала в механическую энергию движения структурных элементов молекулярного мотора АТФ-синтазы и энергию макроэргической связи при образовании АТФ.

Другие примеры. Какова природа сил взаимодействий при докинге белков и образовании белок-белковых комплексов? В чем механизм направленного сворачивания при фолдинге белков? В чем механизм направленного изменения конформации белков при переносе электрона по дыхательной и фотосинтетической цепи белков-переносчиков электрона. Хотя эти и другие вопросы интенсивно и успешно изучаются в биофизике, тем не менее, здесь мы сталкиваемся с «драматической» ситуацией.

Дело в том, что общее решение этих проблем имеет, конечно, значение, выходящее за рамки биофизики, и относится к широкой области физико-химической биологии. А теоретические представления и основные понятия, которыми мы оперируем при решении такого рода проблем в физико-химической биологии, были сформулированы в физической химии в конце XIX – начале XX в. в основном для химических реакций в гомогенных средах — в растворах или газовой фазе. Таковы основы теории химических реакций Аррениуса, химической термодинамики, где установлена известная связь между суммарными изменениями свободной энергии, тепловым эффектом химической реакции и значениями равновесных концентраций реагентов. Энергия активации здесь соответствует величине кинетической энергии «горячих молекул», способных преодолеть энергетический барьер отталкивания реагентов.

Ключевое условие заключается в равномерном распределении реагентов и продуктов реакции по всему реакционному объему в каждый момент реакции. Это означает сохранение справедливости самого понятия концентрации в ходе реакции и одновременно в каждой точке реакционного объема и, следовательно, справедливость закона действующих масс химической кинетики.

Однако многочисленные данные о гетерогенном характере структурной организации клеточного интерьера говорят о том, что это может выполняться только для отдельных клеточных компартментов, но не для клетки в целом. Условие наличия «горячих молекул», способных преодолеть энергетический барьер за счет своей кинетической энергии и тем самым обеспечить химические превращения, также не выполняется в силу большой вязкости внутриклеточной среды и больших размеров взаимодействующих белков.

Таким образом, характер структурной организации конденсированной клеточной среды в целом далек от классического гомогенного распределения веществ и свободного перемещения молекул в растворах. Уместно вспомнить слова молекулярного клеточного биолога Брюса Альбертса из его статьи в журнале «Cell» в 1998 г. Он писал, что клетка содержит в себе «поточные линии, состоящие из белковых машин». Для понимания того, как они работают, недостаточно знать только их равновесную концентрацию, а необходимо привлекать понятия из физики и математики. Эти мысли, высказанные молекулярным биологом, вполне созвучны концепции «белок-машина» и представлениям об электронно-конформационных взаимодействиях в белке как движущей силе процесса, выдвинутыми в отечественной биофизике в 60–70 гг. XX в. Л. А. Блюменфельдом, М. В. Волькенштейном, Д. С. Чернавским.

И здесь встают основные проблемы:

Какова динамика взаимного сближения реагентов белковой природы и механизм образования между ними продуктивных комплексов?

В чем состоит механизм взаимодействия внутри комплексов и образования продуктов реакции?

Ясно, что если «столкновительный» механизм реакции по закону действующих масс в гетерогенной системе не работает, то требуется привлечение других адекватных понятий и подходов. Именно эти обстоятельства наряду с увеличением мощности современных компьютеров привели к развитию новых методов в области математического моделирования сложных биологических систем.

Основную роль здесь играет получение экспериментальных данных, характеризующих свойства и динамику поведения наноразмерных участников метаболических процессов. В результате этого обеспечено развитие методов прямого моделирования динамического поведения отдельных компонентов и появление так называемых агентных динамических моделей. В сочетании с привлечением необходимых экспериментальных исследований это вызвало формирование направления интегративного моделирования. В этой области привлекается различный математический аппарат, адекватный механизмам реальных процессов, например, методы броуновской динамики, методы Монте-Карло, моделирование методами молекулярной динамики внутримолекулярных взаимодействий при образовании продуктивных комплексов.

На этом пути возможно решение многих проблем, ждущих строгих количественных формулировок для дальнейшей разработки. Например, в биофизике давно высказывались мнения о наличии в клетке неких дальних взаимодействий, придающих направленный векторный характер диффузионным перемещениям белков под действием случайных хаотических толчков ближайшего окружения. Появились данные о том, что здесь играют роль электростатические кулоновские взаимодействия между заряженными поверхностями белков, взаимно ориентирующие «нужным образом» белки уже на относительно больших расстояниях. Обращает на себя внимание и высокая направленность перемещения сигнальных молекул в клетке под действием стохастических броуновских сил. Возможно, здесь имеет значение и конкретная форма белковой молекулы в формировании преимущественного направления ее диффузионного перемещения под действием случайных хаотических толчков.

Особо следует отметить, что вычислительный ресурс в современных компьютерах позволяет моделировать конформационную и броуновскую динамику с шагом по времени, соответствующим частоте стохастических случайных толчков со стороны ближайшего окружения белковой молекулы. Это говорит о реальном воспроизведении внутри- и межмолекулярной динамики наноразмерных структурных элементов живой материи математическими методами.

Представленные в настоящем сборнике статьи распределены по четырем разделам согласно оглавлению.

В разделе молекулярной биофизики обсуждаются проблемы механизмов переноса электрона, фолдинга белка, особенности структуры биомакромолекул ДНК, биополимеров, перспективы магнитобиологии, принципы математического моделирования реакций переноса электрона, роль хиральности в работе молекулярных машин.

Проблемы медицинской биофизики включают возможные пути ее дальнейшего развития, особенности работы мозга человека, математические модели нейронов, структуру миелина, сенсорные фоторецепторы живых систем.

В разделе биофизики клеточных процессов обсуждаются различные теоретические и прикладные аспекты фотосинтеза, транспорта метаболитов в клетке, фемтосекундной спектроскопии, фотобиологических процессов, воздействие слабых факторов на клетку.

Материалы раздела «Экологическая биофизика» содержат математические модели экологических систем и популяционной динамики, материалы по биоиндикации и биотестированию водных экосистем оптическими методами, перспективы экологической биофизики.

Представленные в сборнике материалы не исчерпывают, конечно, всех проблем биофизики в этих разделах, что мы надеемся восполнить в последующих выпусках в серии книг «Горизонты биофизики».

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

ПЕРСПЕКТИВЫ МАГНИТОБИОЛОГИИ

*В. Н. Бинги*¹

Представлены различные аспекты магнитной биологии как направления исследований в биофизике. Приведены сведения о формировании магнитобиологии как научного направления. Перечислены основные наблюдаемые свойства магнитобиологических эффектов, показана вовлеченность магнитобиологии в жизнь человека и общества. Даны начальные сведения о микроскопическом механизме действия магнитного поля на организмы. Обсуждается, что могло бы ожидать магнитобиологию в ближайшем и отдаленном будущем.

Ключевые слова: биологическое действие магнитного поля, неспецифический эффект, случайный эффект, молекулярный механизм, проблема kT .

Введение

Изучение магнитных полей (МП) первоначально связано с медициной. Известно, например, что уже в 1750-х гг. немецкие врачи изучали терапевтический потенциал МП [Schott, 1996]. В литературе имеется много разрозненных свидетельств того, что в XIX и первой половине XX вв. десятки врачей, в том числе и отечественные исследователи С. П. Боткин, А. В. Селезнев, В. И. Кармилов и др., пытались использовать МП в физиотерапевтических целях. Однако зарождение именно научных исследований в магнитобиологии, — исследований, направленных на выяснение молекулярной природы явления, — было связано с разработкой и созданием в СССР в 1960 гг. излучателей электромагнитных волн миллиметрового диапазона.

Эвристические работы показали, что миллиметровые волны способны оказывать биологическое действие на растения и микроорганизмы [Девятков, 1973]. При этом мощность излучения была настолько малой, что какой-либо существенный тепловой эффект исключался. В то же время и энергия фотонов этой области электромагнитного спектра была на два порядка меньше характерной энергии активации химических превращений. Кроме того, на нетепловую природу эффектов указывала и частотная селективность, т. е. резонансный характер действия. Другими словами, биологическое действие миллиметровых волн выглядело парадоксальным. Многие физики и биофизики посчитали экспериментальные наблюдения артефактами, что заметно затормозило развитие магнитобиологических исследований.

¹ ФИЦ Институт общей физики им. А. М. Прохорова РАН, Москва, РФ.
E-mail: vnbin@mail.ru

Оказалось, что появление эффектов миллиметровых волн зависело также и от частоты низкочастотной модуляции миллиметровых волн. Поэтому уже в 1970–80 гг. были надежно зафиксированы биологические эффекты, инициированные самими модулирующими сигналами — слабыми низкочастотными МП [Пресман, 1968; Холодов, 1970]. Одновременно широкие исследования были развернуты в зарубежных странах. Первые же работы, в которых наблюдалось изменение скорости роста опухолей под действием МП частотой 60 Гц, поставили важный вопрос: не являются ли фоновые поля, возникающие при генерации, передаче и использовании электроэнергии, опасными для здоровья? В 1983 г. была создана Проблемная комиссия Министерства здравоохранения СССР «Магнитобиология и магнитотерапия в медицине» для координации исследований механизмов явления и разработки лечебных методов [Аникин, 2016]. В США, начиная с 1970-х гг., такие опасения привели к многочисленным научным исследованиям. В 1992 г. Конгрессом США была утверждена пятилетняя Программа исследований магнитобиологических эффектов стоимостью более 40 млн долларов [Moulder, 2000]. Существенно, что ко времени завершения программы в 1998 г. вопрос о том, влияет ли воздействие электрических и магнитных полей на здоровье человека, не был решен однозначно. Лишь последующие 20 лет коллективных усилий исследователей во всем мире позволили установить приблизительную степень опасности фоновых МП. Фоновые низкочастотные МП, превышающие уровень 350 нТл, считаются возможным канцерогеном [IARC, 2002]. На сегодня надежно установлено, что такие поля и даже на порядки меньшие — вплоть до десятков нТл — способны вызывать наблюдаемые эффекты в различных организмах [Кудряшов, Рубин, 2014].

В магнитобиологии различают специфические и неспецифические магнитные эффекты [Binhi, Prato, 2017a]. Первые обусловлены специальными рецепторами, а вторые развиваются в отсутствие рецепторов. Специальный рецептор, например, у некоторых перелетных птиц, совмещен со зрением так, что птица способна «видеть» изменения МП величиной порядка 1/1000 от геоМП и, таким образом, ориентироваться по магнитному рельефу Земли [Hore, Motrisen, 2016]. Однако основной интерес сегодня связан с неспецифическими магнитными эффектами, которые наблюдаются у множества организмов от простейших и грибов до насекомых, растений, рыб, животных и человека [Бреус и др., 2016]. Интерес к неспецифическим эффектам вызван разнообразием свойств, которые меняются в ответ на изменение МП. Это указывает на фундаментальный характер действия МП на живые системы. Особенно интересно то, что под действием МП меняется экспрессия генов. Другими словами, МП есть один из факторов управления производством белков, что могло бы найти применение в медицине, фармакологии и производстве продуктов питания. Име-

ются, однако, трудности с реализацией этой программы. Трудности обусловлены неясностью молекулярных механизмов, обеспечивающих неспецифический магнитный отклик.

Теоретическое объяснение неспецифического действия МП на организмы опирается на информацию, полученную из экспериментов и наблюдений, — теория должна объяснять эксперимент. Поэтому экспликация того, что именно наблюдается в эксперименте, — перечень наблюдаемых свойств магнитных неспецифических эффектов — является началом любого обсуждения возможных молекулярных процессов. Оказывается, что фиксация свойств неспецифических эффектов кардинально сужает область поиска возможных объяснений.

Свойства неспецифических магнитобиологических явлений

Во-первых, магнитобиологические явления имеют место в МП порядка геомагнитного поля — около 50 мкТл — и на частотах, по порядку величины, до 100 Гц. Столь малые поля, — вспомним закон электромагнитной индукции Фарадея, — исключают сколько-нибудь существенные вихревые токи в ткани организма. Поэтому медицинские эффекты при использовании большинства аппаратов для магнитотерапии не имеют отношения к магнитобиологии. В этих аппаратах используются импульсные МП порядка нескольких мТл, индуцирующие вихревые токи, намного превосходящие естественные физиологические токи, что сопровождается активацией метаболизма в области экспозиции и, соответственно, возникновением общего неспецифического отклика. Отклик на слабые поля геомагнитного уровня в отсутствие индуцированных токов, — в том числе и на постоянное МП, — тем не менее, возникает.

Во-вторых, в слабом МП, инициирующем биологический отклик, чрезвычайно мала энергия магнитных моментов — первичных «мишеней». Энергия, например, электронного магнитного момента в геомагнитном поле на 8–9 порядков ниже характерной энергии активации химических реакций — от единиц до десятков kT , где k — это постоянная Больцмана, а T — абсолютная температура. Это несоответствие породило так называемую проблему kT , которая долго вызывала неприятие магнитобиологических эффектов в среде физиков. На сегодня проблема kT может считаться решенной только в отношении специфических эффектов. Она не возникает, например, в отношении магнитной навигации некоторых животных и магнитотаксиса некоторых бактерий. В отношении неспецифических эффектов проблема остается нерешенной. Проблема kT указывает на нетепловую природу эффектов. На это же указывают эффекты, похожие на резонанс при варьировании параметров МП. Действительно, тепловой эффект мало зависит от частоты и не может уменьшаться с ростом величины МП, но

это часто наблюдаемые эффекты. К тому же отклик на МП иногда противоположен тому, который возник бы при нагреве.

Далее, неспецифические эффекты существенно нелинейны. Проявляется это по-разному. С одной стороны, отсутствует пропорциональность эффекта интенсивности или другой характеристике МП: если удастся измерить зависимость, то она может содержать экстремумы. С другой стороны, биологический отклик на сумму магнитных стимулов не равен сумме откликов на каждый из стимулов по отдельности.

Наконец, неспецифические эффекты обладают сниженной воспроизводимостью, что связано с их во многом случайным характером. Природа такой случайности обсуждается ниже.

Все эти свойства вместе указывают на то, что неспецифические эффекты очень неудобны для научных исследований. С другой стороны, эти эффекты, очевидно, требуют дальнейшего пристального изучения, — объяснения их природы, — поскольку они влияют на жизнь значительной части населения.

О микроскопическом механизме действия МП на организм

Первое, о чем надо знать, рассматривая механизмы биологических эффектов слабого МП, — это то, что взаимодействие микроскопических магнитных моментов с внешним МП является основой любого молекулярного механизма магнитных эффектов в организмах. Так же, как гравитационное поле взаимодействует с массами, а электрическое с зарядами, МП взаимодействует с магнитными моментами.

Далее, действие МП на организм подразумевает действие на химические реакции. В химическом процессе имеется обычно две стадии: стадия сближения реагентов до расстояния порядка длин химических связей и стадия перестройки электронных оболочек реагентов. Повлиять на процесс сближения реагентов, часто диффузионный, МП не в состоянии в силу несопоставимости магнитных сил и случайных сил, обеспечивающих диффузию. Речь могла бы идти только о влиянии МП на акт перестройки электронных оболочек реагентов.

Следовательно, МП оказывает влияние на организмы, действуя на магнитные моменты, влияющие на перестройку электронных оболочек. О каких магнитных моментах идет речь? Прежде всего, это магнитные моменты электронов — их спиновые моменты и моменты орбитального движения. Нельзя заранее исключить и влияние МП на магнитные моменты ядер — протонов, например. Действие МП на моменты орбитального движения электронов сводится к эффектам квантовой интерференции, — они проявляются в том, что волновые функции электронов приобретают неоднородную пространственную структуру, что является стерическим ограничением на вероятность задействованных химических реакций.

Имеются и общие физические соображения, позволяющие отсеять некоторые молекулярные механизмы, которые первоначально кажутся возможными. Проблема kT , о которой говорилось выше, имеет простой вид: $H\mu \ll kT$, где H и μ — это напряженность МП и величина магнитного момента, а T есть абсолютная температура ближайшего окружения магнитного момента. Ввиду этого соотношения магнитная энергия, например, свободных ионов в ткани организма — ионов, испытывающих действие силы Лоренца перпендикулярно их скорости и вектору МП, — чрезвычайно мала и не в состоянии объяснить наблюдаемое действие МП. Этого, очевидно, нельзя сказать о магнитных моментах нетермализованных частиц, таких как электроны спин-коррелированных радикальных пар в некоторых белках. К ним не применимо понятие температуры, а значит и ограничение, накладываемое проблемой kT . Ограничение также не применимо в отношении больших магнитных моментов наночастиц, естественно присутствующих в некоторых организмах. Соответственно, исследователи часто считают возможными два типа механизмов: молекулярные механизмы и действие с помощью магнитных наночастиц. Поскольку, однако, неспецифические эффекты наблюдаются и в микроскопических организмах — заведомо без магнитных наночастиц, — интерес, главным образом, сосредоточен вокруг молекулярных механизмов.

О случайности неспецифических эффектов

До сих пор не удалось выявить биофизическую структуру, состояние которой меняется на самой первой стадии взаимодействия с МП — т. е. первичную «мишень МП». Это связано с невысокой, по научным меркам, воспроизводимостью неспецифических эффектов.

Значения контролируемых факторов в лабораториях никогда не бывают строго постоянными. Они могут колебаться по многим причинам. Например, диапазон колебаний МП в офисах и лабораториях может достигать нескольких сотен нТл (см., например, [Sarimov, Binhi, 2020]). Неоднородность МП в биологических термостатах может достигать десятков мкТл, хотя известно [Johnsen, Lohmann, 2005; Prato et al., 2013], что некоторые животные могут обнаруживать изменения локального геомагнитного поля величиной 15–30 нТл. Высокая чувствительность могла бы иметь место и для других контролируемых факторов, например, температуры. Отсюда возможна случайность результатов измерений, а значит и сниженная воспроизводимость.

Как неоднократно отмечалось в литературе, неспецифические эффекты в магнитобиологии зависят от многих факторов разной природы, не все из которых поддаются контролю (см., например, [Makinistian et al., 2018]). Факторов много: только их типов несколько — физические, химические, физиологические

и генотипические. Поскольку невозможно контролировать все условия при попытке репликации, результаты не воспроизводятся и, таким образом, оказываются случайными.

Даже если бы неконтролируемые факторы гипотетически отсутствовали, была бы и другая причина случайности — из-за сильной зависимости неспецифических эффектов от контролируемых факторов. В литературе имеется довольно много сообщений о том, что даже незначительные изменения МП или других контролируемых факторов могут вызвать хорошо заметный отклик. Примером являются отклики организмов на геомагнитную возмущенность, амплитуда которой обычно не превышает сотой части величины геомагнитного поля (см., например, [Бреус и др., 2016]). Причина значительного ответа, включая изменение знака, при слегка изменяющихся условиях, скорее всего, связана с молекулярным механизмом эффектов МП в организмах.

Случайность фундаментально присутствует на всех уровнях организации живого вещества, начиная с молекулярного уровня. Она играет важную роль в масштабе времени всех жизненных процессов, от быстрых химических реакций до эволюционных изменений. Одна из легко видимых общих физических причин случайности — тепловые флуктуации. Химическая причина случайности заключается в том, что химический процесс на молекулярном уровне является, по сути, вероятностным процессом: он зависит от вероятности контакта, которая зависит от концентраций реагентов. Биохимическая причина, связанная с экспрессией генов, состоит в том, что диффузионного типа флуктуации вероятностей расположения, активности и стерической ориентации молекул, таких как регуляторные белки и полимеразы, приводят к случайным изменениям в продукции генов. Результирующие колебания концентрации белков создают случайный вклад во внутренние условия функционирования множества биофизических структур, включая те из них, которые отвечают за магнитный отклик. Другими словами, наблюдаемая низкая воспроизводимость неспецифических эффектов имеет причиной также и случайность, возникающую уже на молекулярном уровне. Это связано с зависимостью параметров биофизических сенсоров МП от внутренних условий.

Поясним удобный термин «биофизический сенсор МП». Он удобен для анализа процессов, происходящих на молекулярном уровне при взаимодействии МП с магнитными моментами. Это удобно и для понимания того, почему это взаимодействие сопровождают случайные наблюдаемые. Биофизический сенсор МП представляет собой молекулярную или биофизическую структуру, которая, не являясь рецептором, несет магнитные моменты и которая может изменяться в зависимости от состояния моментов. Изменение состояния магнитных моментов, вызванное МП, генерирует физический сигнал, изменяющий состояние биофизического сенсора. В свою очередь, изменение состояния сенсора обеспе-

чивает биохимический сигнал с последующим преобразованием в измеримый биологический результат. Таким образом сенсор преобразует физический сигнал МП в сигнал химический. В простейшем примере биофизическим сенсором является пара (см., например, [Hoge, Mouritsen, 2016]) или тройка (см., например, [Binhi, 2019]) спин-коррелированных радикалов, преобразующих изменение МП в изменение продуктов соответствующей химической реакции.

Биофизические сенсоры в биологических тканях, не являясь специализированными рецепторами МП, обладают многими характеристиками, которые могут изменяться. Нелинейные изменения параметров сенсоров происходят, даже если непосредственными первичными мишенями МП являются магнитные моменты одного типа, например, моменты электронов [Binhi, Prato, 2018]. Следовательно, сама чувствительность сенсоров к МП зависит как от величины магнитного сигнала, так и от внутренних условий. При определенных фиксированных внутренних условиях группа сенсоров, связанных с биофизическими структурами одного типа, будет реагировать на изменения МП, и только на изменения этой величины. Другая группа сенсоров, относящихся к биофизическим структурам другого типа, будет чувствительна при других изменениях внутренних условий или величины изменения МП. Еще одна группа окажется чувствительной в иных других условиях и т. д. Естественно, активация или деактивация определенных групп молекулярных сенсоров МП неоднозначно проявляется в измеряемых величинах, что приводит к наблюдаемой случайности и снижению воспроизводимости.

Внутренние условия включают состояния локальных биофизических структур, которые окружают или несут сенсоры МП. Это флуктуирующие на микроуровне концентрации, активности и стерические ограничения белковых агентов, а также и состояния молекулярных вращений [Binhi, Prato, 2018]. Внутренние условия соответствуют спектру биологических ритмов и внешних условий через множество рецепторных систем и обратных связей в организме. Температура, влажность, давление, освещение, запахи, скорость их изменения, наряду с другими внешними физико-химическими условиями, являются факторами, влияющими на магнитную восприимчивость организмов. Все это означает, что даже при фиксированных контролируемых внешних условиях биологическая реакция на изменение МП в значительной степени случайна из-за флуктуации внутренних условий, вызванных ритмами и неконтролируемыми внешними случайными факторами. Действительно, меняющиеся внутренние условия постоянно включают и выключают различные группы сенсоров. Следовательно, результаты измерений, полученные с разными группами «включенных» сенсоров, будут формировать даже не просто случайную величину, а совокупность реализаций разных случайных величин, т. е. гетерогенный случайный эффект.

Видно, что природа низкой воспроизводимости связана и с тем, что молекулярные сенсоры МП проявляют себя случайным образом на уровне наблюдаемых переменных вследствие пространственной и временной вариабельности внутренних условий.

Подобная случайность может иметь место не только в серии независимых исследований, которые необходимо обобщить, но и в серии измерений одной переменной в одном организме — из-за тех же причин, связанных с вариациями неконтролируемых факторов и внутренних молекулярных условий. Таким образом, последовательные измерения могут не принадлежать одной и той же родительской популяции. Последовательные измерения могут принадлежать популяциям с разными статистическими параметрами, в частности, с разными знаками их теоретических или популяционных средних. Другими словами, в одном исследовании одного организма последовательные измерения могут быть «неповторимыми» или невоспроизводимыми.

Таким образом, величина и знак неспецифических эффектов во многих независимых исследованиях, а иногда и во многих измерениях в одном эксперименте, связаны со случайными эффектами [Binhi, 2021]. Наборы таких исследований или измерений существенно разнородны — гетерогенны. Это означает, что надежность имеющихся знаний о неспецифических магнитных эффектах, скорее всего, недостаточна и требует специального обобщения там, где это возможно.

О высокой магнитной чувствительности организмов

На сегодня надежно установлено, что некоторые организмы откликаются на чрезвычайно малые изменения МП — на уровне десятков нТл [Johnsen, Lohmann, 2005; Engels et al., 2014]. Объяснима ли столь высокая чувствительность? Да, объяснима, но лишь в отношении специфических эффектов.

У некоторых птиц рецептор представляет собой «пиксель» в сетчатке глаза, который включает белки с магниточувствительными парами радикалов. Эти «пиксели» используются зрительной системой, так что за миллиарды лет фоторецепторы стали также и магниторецепторами. Несмотря на то, что многие подробности еще не известны, сам факт подтвержден некоторыми публикациями в высокоцитируемых журналах. Для объяснения давно предложен известный в спиновой химии механизм. Он состоит в том, что реакционная способность пары спин-коррелированных радикалов зависит от МП. В применении к магнитным биологическим эффектам механизм называется механизмом радикальных пар [Hore, Mouritsen, 2016]. Сам по себе этот механизм, однако, обладает низкой чувствительностью к МП. Сигналы величиной порядка геомагнитного поля, около 50 мкТл, вызывают эффекты, не превышающие единиц процентов.

Эта трудность, по-видимому, преодолима с учетом анатомических особенностей расположения белков, несущих радикальные пары в сетчатке птичьего глаза. Криптохромы, несущие радикальные пары флавин–триптофан, расположены в сетчатке глаза упорядоченно, так что радикальные пары передают свои сигналы когерентно, каждая примерно в один нерв из миллионов в глазу. В этом случае гипотетически возможно статистическое увеличение отношения сигнал/шум, и мозг птицы получает 1000-кратное усиление магнитной чувствительности в сравнении с отдельным точечным рецептором, что было бы достаточно для объяснения магнитной навигации у животных.

Если механизм радикальных пар справляется с объяснением наблюдаемой специфической чувствительности на уровне десятков нТл, то почему его трудно использовать для неспецифических откликов на изменения МП того же уровня? Дело в том, что неспецифические эффекты, — например, в растениях и бактериях, — имеют место в отсутствие эволюционно закреплённого специфического механизма усиления, связанного с рецепторами и когнитивными функциями мозга. Есть и другие особенности механизма радикальных пар, которые делают его неподходящим для объяснения неспецифических магнитных эффектов. Это, например, симметрия его эффектов по отношению к изменению направления МП на противоположное, а также и отсутствие частотной селективности, что не согласуется с данными многих экспериментов по неспецифическим эффектам.

Поэтому для объяснения неспецифических эффектов, в которых каждый биофизический сенсор работает отдельно, надо, чтобы этот сенсор реагировал бы на изменение знака МП и сам по себе обладал высокой чувствительностью. Эти требования подсказывают путь, следуя которому можно было бы понять молекулярное устройство сенсора.

Во-первых, чем обусловлена нечувствительность механизма радикальных пар к изменению знака МП? В конечном счете тем, что в этом сценарии МП меняет динамику пары спин-коррелированных моментов относительно друг друга [Binhi, Prato, 2018]. Следовательно, имеет смысл рассмотреть другой сценарий, в котором внешнее МП меняло бы динамику одиночного магнитного момента относительно выделенного направления, заданного его локальным биофизическим окружением. Это обеспечило бы требуемую реакцию на изменение знака МП.

Во-вторых, чем обусловлена низкая чувствительность механизма радикальных пар к изменению величины МП? В конечном счете тем, что коррелированное состояние пары спинов — состояние, чувствительное к МП, — сохраняется в условиях тепловых возмущений недолго, обычно 10^{-9} с и в редких случаях 10^{-7} с. Это время тепловой релаксации спинов. За это очень малое время МП должно успеть заметно изменить состояние спинов относительно друг дру-

га. Характерной переменной, управляющей величиной МП, начиная с которой можно наблюдать заметные магнитные эффекты, является комбинация $1/\gamma\tau$ [Бинги, 2016], где γ и τ — это, соответственно, гиромагнитное отношение магнитного момента и время его тепловой релаксации. Для электронов с временем релаксации $\tau = 10^{-9}$ с, как в радикальных парах ферментных комплексов, эта величина составляет 5 мТл. Поэтому для достижения чувствительности хотя бы на уровне 5 мкТл время релаксации магнитного момента должно быть около микросекунды. Это, на сегодня, нерешенная проблема, вполне эквивалентная проблеме kT : неясно, где могли бы и могли бы вообще в живой ткани существовать условия, обеспечивающие столь большое время тепловой релаксации электрона.

В то же время сценарий, в котором МП меняет динамику одиночного магнитного момента относительно локального выделенного направления, в значительной мере свободен от недостатков механизма радикальных пар и способен объяснить, пока качественно, существенные особенности неспецифических эффектов [Binhi, Prato, 2018]. Формально этот механизм следует рассматривать как возможный механизм. Однако он является предельно абстрактным и общим, так что альтернатив попросту не может быть. В частности, его выводы не зависят от природы магнитных моментов, которые первыми взаимодействуют с МП. На основе этого механизма легко разработать схему экспериментов, направленных на выявление природы биофизического сенсора неспецифических эффектов.

Так, в [Бинги, 2016; Binhi, Prato, 2017b] показано, что в рамках сценария с одиночным магнитным моментом наиболее существенные изменения в динамике происходят в «нулевом» МП, когда зазор $\hbar\gamma H$ между расщепленными зеемановскими подуровнями моментов становится сравним с шириной $\hbar/\tau$ самих уровней, где $\hbar$ — это постоянная Планка. Как видно из рис. 1, произведение $\gamma H \tau$ является аргументом вероятности ΔP первичной реакции на МП, что позволяет по полученной из эксперимента величине H^* , отвечающей перегибу функции, определить произведение $\gamma\tau \sim 1/H^*$. Это, в свою очередь, позволяет сделать обоснованное предположение о природе первичной магнитной мишени неспецифических эффектов. Действительно, возможных мишеней мало, — электрон, протон, магнитное ядро, орбитальный момент электрона, — а гиромагнитное отношение и время жизни у всех существенно разные и часто известны по порядку величины для разных молекулярных окружений.

Кроме того, как утверждает в [Binhi, Prato, 2018], часть первичных сенсоров МП находятся на вращающихся молекулах, так как отклики на слабое постоянное МП по имеющимся литературным данным наиболее выразительны в тех организмах, в которых так или иначе интенсифицированы процессы

экспрессии генов. Расчеты показывают, что отклик вращающегося магнитного сенсора на МП сдвинут относительно $H=0$, чего не бывает в механизме радикальных пар. При этом МП H^* , теперь соответствующее максимуму отклика, связано со скоростью молекулярного вращения Λ соотношением $|\gamma H^* - \Lambda| \tau \sim 1$. Отсюда видно, что экспериментальное определение биологического отклика на ослабление МП способно принести большое количество информации о природе молекулярных процессов, определяющих отклики организмов на слабые МП.

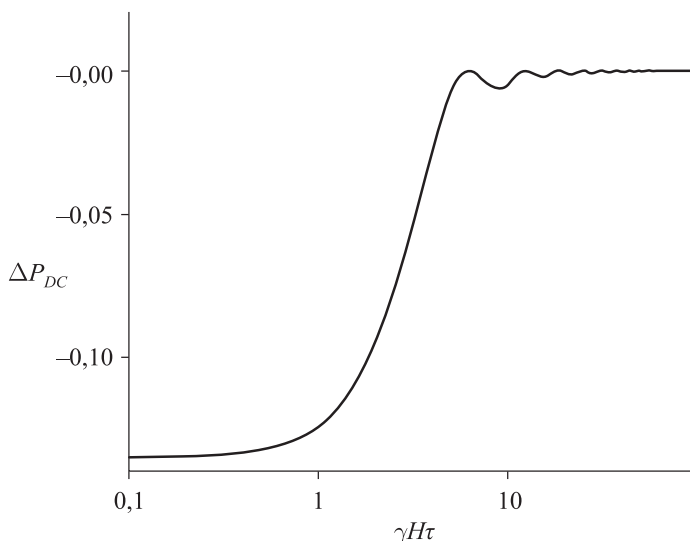


Рис. 1. Изменение вероятности ΔP реакции неподвижного биофизического сенсора при варьировании величины МП H

Заметим, что высокая магнитная чувствительность организмов вовсе не означает, что эффекты велики и их легко наблюдать. Напротив, обсуждавшаяся выше случайность неспецифических эффектов приводит к их гетерогенности — к тому, что они замаскированы относительно большим разбросом измерений. Исследование механизма неспецифических эффектов требует специальных статистических методов; механизм еще только предстоит установить.

Магнитобиологические явления в жизни

Поскольку МП является одним из факторов окружающей среды, оно непосредственно вовлечено в жизнь человека. МП, окружающее человека, состоит из различных по природе составляющих. Это, во-первых, геомагнитное поле и, во-

вторых, искусственное МП. Если геомагнитное поле сопровождало эволюцию человека, то искусственное МП появилось около 200 лет назад вместе с началом практического использования электричества. На сегодня фоновый уровень МП промышленной частоты в жилых помещениях составляет около 10–100 нТ, а в производственных условиях может быть на несколько порядков больше.

Кроме дискретных компонент, искусственное МП содержит и спектральные составляющие непрерывного спектра от тысячных и менее долей Гц до нескольких сотен Гц. Природа этих компонент связана со случайными включениями и выключениями электроустройств, таких как автомобильный и электро-транспорт, производственное и бытовое оборудование. Возможное действие искусственных и естественных МП регулируется различными нормами электромагнитной безопасности. Часть из них относится к МП того диапазона, который соответствует магнитобиологическим эффектам. На сегодня эти нормы учитывают только тепловое действие переменного МП, и поэтому остаются несовершенными.

Важность контроля за уровнем хронической экспозиции в МП следует из эпидемиологических исследований неспецифических эффектов, доказывающих потенциальную опасность фоновых МП для здоровья людей [IARC, 2002].

Разработка более совершенных стандартов магнитной безопасности требует объяснения физической природы неспецифических эффектов МП. Общепризнанного теоретического объяснения пока нет. Экспериментальные результаты магнитобиологии представляют, по существу, огромный банк разрозненных сведений с продолжающимися попытками их структурирования. Применение магнитобиологических эффектов на практике сдерживается отсутствием объяснения природы эффектов на молекулярном уровне и, следовательно, невозможностью адресного воздействия на те или иные молекулярные процессы. В будущем, однако, эта ситуация изменится.

Рано или поздно проблема механизма неспецифических эффектов в магнитобиологии будет решена. Быстрый прогресс в области детектирования генов, связанных с наличием магнитного отклика, позволяет надеяться на решение проблемы уже в этом десятилетии.

На сегодня термин «неспецифические эффекты» порожден тем фактом, что в отсутствие специализированных рецепторов, первичные «мишени» МП распределены по всему организму и вызывают, как показано выше, преимущественно случайный магнитный отклик. Если природа биофизического сенсора МП станет известна, то, подбирая параметры МП, можно будет целенаправленно управлять экспрессией тех или иных генов. Очевидны многообещающие перспективы использования такого дополнительного фактора управления молекулярными процессами жизни.

Литература

- Аникин В. М. Магнитобиология и магнитотерапия: «Кармиловский» период // Гетеромагнитная микроэлектроника. — 2016. — № 21. — С. 131–140.
- Бинги В. Н. Первичный физический механизм биологических эффектов слабых магнитных полей // Биофизика. — 2016. — Т. 61, № 1. — С. 201–208.
- Бреус Т. К., Бинги В. Н., Петрукович А. А. Магнитный фактор солнечно-земных связей и его влияние на человека: физические проблемы и перспективы // Успехи физических наук. — 2016. — Т. 186, № 5. — С. 568–576.
- Девятков Н. Д. Влияние электромагнитного излучения миллиметрового диапазона длин волн на биологические объекты // Успехи физических наук. — 1973. — Т. 110, № 7. — С. 453–454.
- Кудряшов Ю. Б., Рубин А. Б. Радиационная биофизика: Сверхнизкочастотные электромагнитные излучения. — М.: Физматлит, 2014.
- Пресман А. С. Электромагнитные поля и живая природа. — М.: Наука, 1968.
- Холодов Ю. А. Магнетизм в биологии. — М.: Наука, 1970.
- Binhi V. N., Prato F. S. Biological effects of the hypomagnetic field: An analytical review of experiments and theories // PLoS ONE. — 2017a. — Vol. 12, № 6. — P. e0179340.
- Binhi V. N., Prato F. S. A physical mechanism of magnetoreception: Extension and analysis // Bioelectromagnetics. — 2017b. — Vol. 38, № 1. — P. 41–52.
- Binhi V. N., Prato F. S. Rotations of macromolecules affect nonspecific biological responses to magnetic fields // Scientific Reports. — 2018. — Vol. 8, № 1. — P. 13495.
- Binhi V. N. Nonspecific magnetic biological effects: A model assuming the spin-orbit coupling // The Journal of Chemical Physics. — 2019. — Vol. 151, № 20. — P. 204101.
- Binhi V. N. Random effects in magnetobiology and a way to summarize them // Bioelectromagnetics. — 2021. — Vol. 42, № 6. — P. 501–515.
- Engels S., Schneider N.-L., Lefeldt N., Hein C. M., Zapka M., Michalik A., Elbers D., Kittel A., Hore P. J., Mouritsen H. Anthropogenic electromagnetic noise disrupts magnetic compass orientation in a migratory bird // Nature. — 2014. — Vol. 509, № 7500. — P. 353–356.
- Hore P. J., Mouritsen H. The radical-pair mechanism of magnetoreception // Annual Review of Biophysics. — 2016. — Vol. 45, № 1. — P. 299–344.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Non-Ionizing Radiation, Part 1: Static and Extremely Low-Frequency Electric and Magnetic Fields. — Vol. 80. — Geneva, World Health Organization, 2002.
- Johnsen S., Lohmann K. J. The physics and neurobiology of magnetoreception // Nature Reviews. Neuroscience. — 2005. — Vol. 6, № 9. — P. 703–712.
- Makinistian L., Muehsam D. J., Bersani F., Belyaev I. Some recommendations for experimental work in magnetobiology, revisited // Bioelectromagnetics. — 2018. — Vol. 39, № 7. — P. 556–564.

- Moulder J. The electric and magnetic fields research and public information dissemination (EMF-RAPID) program // *Radiation Research*. — 2000. — Vol. 153, № 5. Pt 2. — P. 613–616.
- Prato F. S., Desjardins-Holmes D., Keenlside L. D., DeMoor J. M., Robertson J. A., Thomas A. W. Magnetoreception in laboratory mice: Sensitivity to extremely low frequency fields exceeds 33 nT at 30 Hz // *Journal of the Royal Society Interface*. — 2013. — Vol. 10, № 20121046.
- Sarimov R. M., Binhi V. N. Low-frequency magnetic fields in cars and office premises and the geomagnetic field variations // *Bioelectromagnetics*. — 2020. — Vol. 41, № 5. — P. 360–368.
- Schott H. Zur Geschichte der Elektrotherapie und ihrer Beziehung zum Heilmagnetismus // *Naturheilverfahren und unkonventionelle medizinische Richtungen* / M. Wiesenauer und andere (eds.). — Berlin, Heidelberg: Springer, 1996.

Prospects for magnetobiology

V. N. Binhi

FRC Prokhorov General Physics Institute
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, RF
E-mail: vnbin@mail.ru

Various aspects of magnetic biology as a direction of research in biophysics are presented. Knowledge about the formation of magnetobiology as a scientific direction is given. The basic observed properties of magnetobiological effects are listed, and the involvement of magnetobiology in the life of a human being and society is shown. The initial information on the microscopic mechanism of the action of the magnetic field on organisms is given. It is discussed what kind of findings in magnetobiology might be expected in the nearest and distant future.

Keywords: biological action of a magnetic field, nonspecific effect, random effect, molecular mechanism, kT problem.

РЕШЕНИЕ ЗАГАДКИ САМООРГАНИЗАЦИИ БЕЛКА

С. А. Гарбузинский¹, А. В. Финкельштейн^{1,2,3,*}

Способность белковых цепей самопроизвольно формировать свои пространственные структуры — давняя загадка молекулярной биологии. Измеренное на опыте время сворачивания белков варьирует от микросекунд до часов: разница (10–11 порядков величины) такая же, как между жизнью комара и возрастом Вселенной. В этом обзоре описаны физические теории скоростей сворачивания. Особую роль здесь играет точка термодинамического (и кинетического) равновесия между нативным и развернутым состояниями цепи; здесь теория принимает наиболее простой вид. Теория очерчивает диапазон скоростей сворачивания белков в хорошем согласии с экспериментом. Анализ, выполненный на уровне образования и сборки элементов вторичных структур белка в белковую глобулу, очерчивает верхний предел времени сворачивания белка (т. е. времени поиска наиболее стабильной укладки). Обе теории приводят по существу к одним и тем же результатам, которые согласуются с экспериментом. Кроме того, они предсказывают максимальный размер белковых доменов, которые сворачиваются исключительно под термодинамическим (а не кинетическим) контролем, диапазон размеров белковых доменов, сворачивающихся под кинетическим «контролем их сложности», и объясняют наблюдаемый максимальный размер «способных к сворачиванию» белковых доменов.

Ключевые слова: сворачивание белка, парадокс Левинталя, воронка сворачивания, разделение фаз, ландшафт свободной энергии, сборка элементов вторичной структуры белка.

1. Введение

Термин «проблема сворачивания белка» сейчас используется в двух значениях. Одно из них подчеркивает процесс, другое — результат. В первом случае (порой называемом «проблемой сворачивания белка 1-го рода») загадка в том, *как* белковая цепь может за небольшое время выбрать свою уникальную структуру среди огромнейшего количества других? Во втором случае (порой называемом «проблемой сворачивания белка 2-го рода») загадка в том, *какую* структуру будет иметь белковая цепь с данной аминокислотной последовательностью?

Долгое время эти две проблемы считались одной, потому что была уверенность, что если решить вопрос «*как*», то вопрос «*что*» будет решен сразу же.

¹ Институт белка Российской академии наук, 142290 Пущино, Московская обл., Россия.

² Биологический факультет МГУ им. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1-12, Россия.

³ Биотехнологический факультет МГУ им. Ломоносова, 142290 Пущино, Московская обл., Россия.

* E-mail: afinkel@vega.protres.ru

Однако теперь стало ясно, что это — две разные проблемы, потому что они были решены двумя совершенно разными методами.

Проблема «что» была недавно решена биоинформатикой с помощью нейронных сетей и искусственного интеллекта, натренированного на распознавании образов, речи и т. д. [Senior et al., 2019, 2020; Yang et al., 2020]. Эта тема нуждается в отдельном рассмотрении.

Проблема «как» была решена физикой. Цель данной статьи — обрисовать основные аспекты этого решения.

Способность белков спонтанно сворачиваться озадачивала ученых долгое время (см., например, [Anfinsen, Scheraga, 1975; Jackson, 1998; Fersht, 2000; Grantcharova et al., 2001; Robson, Vaithilingam, 2008; Dill, MacCallum, 2012; Wang et al., 2012; Wolynes, 2015; Finkelstein, Ptitsyn, 2016; Финкельштейн, 2018]).

Как известно, в живых клетках белковые цепи, кодируемые генами, синтезируются специальными молекулярными машинами, называемыми рибосомами. Для выполнения своей уникальной биологической функции белковая цепь (имеющая уникальную аминокислотную последовательность) должна получить свою уникальную («нативную») трехмерную (3D) структуру. Это явление называется «сворачиванием белка».

Важность этого явления для функции белка была показана в 1950-х годах [Anfinsen, 1959], а затем было обнаружено, что сворачивание белка может происходить не только *in vivo*, но и *in vitro* [Anfinsen et al., 1961].

2. Экспериментальное изучение сворачивания белков

Поскольку довольно сложно проследить изменение структуры «новорожденной» белковой цепи на фоне многих других молекул *in vivo*, в живой клетке — исследование процесса сворачивания белка началось с исследований сворачивания водорастворимых молекул глобулярных белков *in vitro*.

Однако имеет смысл начать с краткого обзора сравнительно недавних результатов исследований сворачивания, которое происходит в процессе биосинтеза белка на рибосомах. Первые эксперименты проводились на больших, многодоменных белках. Они показали, что эти белки начинают сворачиваться еще до того, как завершается их биосинтез. Так, первым синтезированный (N-концевой) домен иммуноглобулина сворачивается, когда вся цепь еще не синтезирована [Isenman et al., 1979]; белок люцифераза начинает работать сразу после окончания биосинтеза цепи [Kolb et al., 1994]; глобиновая цепь может связаться с гемом, как только чуть более половины этой цепи синтезировано рибосомой [Komar et al., 1997] (хотя невозможно сказать, была ли эта наполовину синтезированная цепь уже структурирована до связывания гема, или ее структура индуцируется связыванием гема). Как бы то ни было, это привело к предполо-

жению, что сворачивание белковой цепи *in vivo* начинается именно на рибосоме, и что этот котрансляционный процесс сильно отличается от рассматриваемого ниже сворачивания *in vitro* («ренатурации») всей белковой цепи.

Однако более современные эксперименты по ко-трансляционному образованию структуры в синтезируемых на рибосоме небольших белках (отслеживаемой с помощью ядерного магнитного резонанса (^{15}N , ^{13}C ЯМР) и Фёрстеровского переноса энергии (FRET)) показали, что «полипептиды [на рибосоме] остаются неструктурированными во время элонгации, и сворачиваются в компактные нативоподобные структуры, когда доступна вся последовательность» [Eichmann et al., 2010]; «... сворачивание происходит сразу после появления полной последовательности домена» [Han et al., 2012]; «...ко-трансляционное сворачивание... идет через компактную, ненативную конформацию [т. е. нечто подобное расплавленной глобуле] и перестраивается в нативную структуру сразу после того, как полная последовательность домена вышла из рибосомы» [Holtkamp et al., 2015].

Таким образом, оказывается, что нет принципиальной разницы между сворачиванием *in vivo* и *in vitro*, по крайней мере, для небольших белков (хотя некоторые детали путей сворачивания на рибосоме и *in vitro* могут различаться): в обоих случаях нативные структуры возникают только тогда, когда доступна вся последовательность белкового домена (следует отметить, что обрезанные белковые цепи также не ренатурируют и остаются *in vitro* компактными, но не упорядоченными [Flanagan et al., 1992]).

Открытие шаперонов [Ellis, Hartl, 1999] снова привело к многочисленным предположениям о том, что сворачивание белков *in vivo* и *in vitro* может сильно различаться, поскольку шапероны могут катализировать сворачивание и разворачивание белка (см., например, [Libich et al., 2015] и приведенную там литературу). Однако анализ данных, представленных в [Libich et al., 2015], показывает, что наиболее изученный шаперон (GroEL) не ускоряет суммарный процесс сворачивания [Marchenko et al., 2015]. Это коррелирует с выводом о том, что роль GroEL — служить «временной ловушкой», связывающей развернутые белковые цепи, предотвращая их необратимую агрегацию [Марченков и др., 2004; Марченко и др., 2009].

Итак, самоорганизация белковых структур *in vitro* (которая, в случае водорастворимых глобулярных белков, происходит без какой-либо помощи других биомолекул) отражает и основные особенности феномена сворачивания белков *in vivo*. Это означает, что вся информация, необходимая для построения трехмерной структуры белка, записана в его аминокислотной последовательности («термодинамическая гипотеза Анфинсена»).

Изучение самоорганизации показало, что развернутая белковая цепь может спонтанно, «сама по себе» сворачиваться в свою уникальную нативную трех-

мерную структуру [Anfinsen et al., 1961; Anfinsen, 1973]. В экспериментах Анфинсена фермент рибонуклеаза А разворачивался в присутствии мочевины и тиолового реагента, а когда эти агенты удалялись — он спонтанно восстанавливал свою структуру (как показано правильным воссозданием всех четырех SS-связей в нем) и ферментативную функцию. Однако, как недавно было обнаружено Дэвидом Айзенбергом [Eisenberg, 2018], «по сути тот же эксперимент был проведен ранее студенткой-медиком [Л. Штайнер] в Йельском университете, но ни [она, ни] ее научный руководитель, ни руководитель ее отдела не сочли это особенно значимым, и ее работа не была опубликована». Как написал Айзенберг [Eisenberg, 2018]: «У нее был ответ на чрезвычайно важный вопрос, но этот вопрос *еще не был задан*», потому что в то время (в середине 1950-х гг.) еще не было выяснено, «как биологическая информация передается от генома к белкам»...

3. Проблема сворачивания белка

В процессе самоорганизации белковая цепь должна сама найти свою нативную (и, по-видимому, наиболее стабильную) укладку среди огромного множества других (рис. 1) за ограниченное, «биологически-разумное» время (не более нескольких минут).

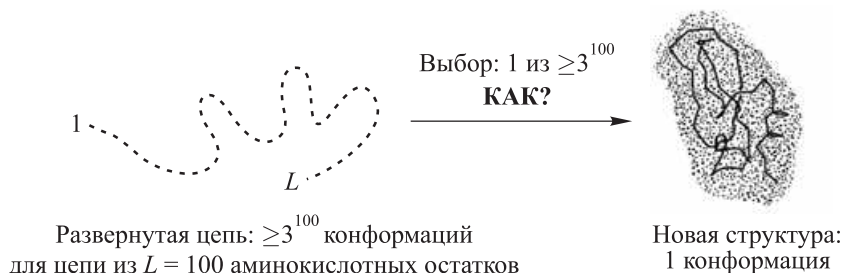


Рис. 1. Проблема выбора нативной структуры; выбор может определяться либо *процессом* сворачивания («кинетическая гипотеза» Левинталя), либо *стабильностью* нативной укладки («термодинамическая гипотеза» Анфинсена)

Число же альтернатив действительно огромно [Levinthal, 1968; 1969]: не менее $\sim 2^{100}$, но вероятнее $\sim 3^{100}$ или даже $\sim 10^{100}$ (или $\sim 100^{100}$) для цепи из 100 аминокислотных остатков, потому что для каждого аминокислотного остатка возможны по крайней мере 2 («правильная» и «неправильная»), но скорее 3 (α , β , «клубок») или ~ 10 (экспериментальная оценка Привалова [Privalov, 1979]), или даже ~ 100 [Levinthal, 1969] конформаций.

Поскольку цепь не может переходить из одной конформации в другую быстрее, чем за пикосекунду (время теплового колебания), исчерпывающий поиск

нативной структуры займет не менее $\sim 2^{100}$ (но, скорее, $\sim 3^{100}$, или даже $\sim 10^{100}$, или $\sim 100^{100}$) пикосекунд, т. е. $\sim 10^{10}$ (или $\sim 10^{25}$, или даже $\sim 10^{80}$, или $\sim 10^{180}$) лет. И, похоже, перебор конформаций должен быть действительно исчерпывающим, потому что белок может «чувствовать», что он пришел к стабильной структуре, только когда он точно попадает в нее, в то время как отклонение даже на 1 Å может сильно увеличить энергию цепи в плотно упакованной глобуле.

Основной вопрос — в том, почему сворачивание нативного белка происходит за несколько минут, а не за «Левинталевские» $\sim 10^{10}$ или более лет (т. е. не за $\sim 10^{16}$ или более минут)? Это сокращение процесса сворачивания в 10 000 000 000 000 000 (!) раз (по сравнению с перебором всех структур) нужно всегда иметь в виду, и не следует отвлекаться на тупиковые соображения, обещающие ускорение процесса, например, в 1000 или в 1 000 000 раз...

Сам Левинталь [1968; 1969] отвечал на поставленный им же впервые вопрос так: похоже, что сворачивание белка происходит по какому-то «быстрому» пути, а нативная укладка — это просто конец этого пути, независимо от того, является ли она наиболее стабильной укладкой цепи или нет (это — кинетическая гипотеза Левинталя). Другими словами, Левинталь предположил, что структура нативного белка определяется кинетикой, а не стабильностью, и соответствует легко и быстро достижимому *локальному* минимуму свободной энергии, а не *глобальному*.

Однако компьютерные эксперименты с решеточными моделями белковых цепей показали, что цепи сворачиваются в свою наиболее стабильную структуру, т. е. что «нативная белковая структура» имеет наименьшую энергию, а сворачивание белка находится под термодинамическим, а не кинетическим контролем [Šali et al., 1994; Abkevich et al., 1994].

Тем не менее большинство из предложенных и широко обсуждаемых гипотез о сворачивании белков было основано на «предположении кинетического контроля».

Еще до Левинталя, Филлипс [1966] предположил, что ядро сворачивания белка формируется N-концом растущей цепи, и на это ядро наворачивается остальная цепь. Однако успешное сворачивание многих однодоменных белков и белковых доменов *in vitro* не начинается с N-конца [Goldenberg, Creighton, 1983; Grantcharova et al., 1998; Lappalainen et al., 2008].

Ветлауфер [1973] предположил, что ядро сворачивания образуется соседними остатками цепи; но опыты *in vitro* показали, что это не всегда так [Fulton et al., 1999; Wensley et al., 2009].

Птицын [1973] предложил модель иерархического сворачивания, т. е. поэтапного образования различных типов промежуточных состояний при сворачивании белка.

Позже, для иллюстрации и описания причины большой скорости процессов сворачивания стали популярны различные модели «воронки сворачивания» [Leopold et al., 1992; Wolynes et al., 1995; Dill, Chan, 1997; Bicout, Szabo, 2000; Wang et al., 2012], см. ниже.

Сложность проблемы «кинетика против стабильности» в том, что ее не решить прямым опытом... Предположим, что белок имеет структуру, более стабильную, чем нативная. Как мы можем ее найти, если сам белок этого не делает? Ждать ли нам $\sim 10^{10}$ (или даже $\sim 10^{180}$) лет?

С другой стороны, вопрос о том, контролируется ли структура белка кинетикой или стабильностью, возникает снова и снова, когда приходится решать практические задачи физики, инженерии и дизайна белков. Например, что нам следует искать при предсказании структуры белка по его последовательности: самую стабильную или самую быстро сворачивающуюся структуру? Должны ли мы при конструировании белка *de novo* максимизировать стабильность желаемой укладки или создавать быстрый путь к этой укладке?

Однако реально ли противоречие между «самой стабильной» и «быстро сворачивающейся» структурой? Может быть, стабильная структура *автоматически* образует центр «быстрых» путей сворачивания, а значит, *автоматически* способна к быстрому сворачиванию?

4. Главные термодинамические и кинетические особенности сворачивания белка

Прежде чем рассматривать эти вопросы, т. е. прежде чем рассматривать *кинетические* аспекты сворачивания белков, напомним некоторые основные экспериментальные факты, касающиеся *термодинамики* белков (как обычно [Finkelstein et al., 2017], мы будем рассматривать только однодоменные водорастворимые глобулярные белки из ~ 30 –500 остатков). Эти факты помогут нам понять, какие цепи и какие условия сворачивания нужно учитывать. Факты таковы:

1. Почти все наблюдения показывают, что нативные состояния однодоменных водорастворимых глобулярных белков ведут себя как укладки с наименьшей свободной энергией [Tanford, 1968; Privalov, 1979; Fersht, 1999]. Однако есть как минимум одно исключение: большой (≈ 400 аминокислотных остатков) белок серпин сначала принимает «нативную» (т. е. «работающую») структуру, работает полчаса, а затем приобретает другую, неработающую, но более стабильную структуру [Tsutsui et al., 2012].
2. Денатурированное состояние белков, по крайней мере, небольших белков, обработанных сильным денатурантом, обычно представляет собой развернутый случайный клубок (в то время как денатурация с помощью повыше-

ния температуры может приводить к появлению компактной расплавленной глобулы) [Tanford, 1968; Ptitsyn, 1995].

3. Разворачивание белков обратимо [Anfinsen, 1973]; более того, денатурированное и нативное состояния белка могут находиться в динамическом равновесии [Creighton, 1978; Segava, Sugihara, 1984]; и между ними существует переход «всё-или-ничего» [Privalov, 1979]. Последнее означает, что только два состояния белковой молекулы, нативное и денатурированное, присутствуют (вблизи от точки середины перехода, т. е. равновесия процессов сворачивания и разворачивания) в видимом количестве, в то время как все остальные, «частично развернутые» или неправильно свернутые, практически отсутствуют. (Примечания: (i) переход «всё-или-ничего» делает функцию белка надежной: подобно лампочке, белок либо работает, либо нет; (ii) физическая теория показывает, что этот переход требует такой аминокислотной последовательности, которая обеспечивает большую «энергетическую щель» между наиболее устойчивой структурой и основной массой неправильно свернутых [Shakhnovich, Gutin, 1990; Gutin, Shakhnovich, 1993; Šali et al., 1994; Galzitskaya, Finkelstein, 1995; Shakhnovich, 2006]).
4. Даже в нормальных физиологических условиях нативное (т. е. с наименьшей энергией) состояние белка лишь на несколько килокалорий на моль [Privalov, 1979] более стабильно, чем его развернутое (т. е. с наивысшей энтропией) состояние (и, естественно, в середине перехода эти два состояния имеют одинаковую стабильность).

(Для приведенного ниже теоретического анализа необходимо отметить, что: (i) как принято в литературе по этому вопросу, термин «энтропия» применительно к сворачиванию белка означает только конформационную энтропию цепи, без учета энтропии растворителя; (ii) соответственно, термин «энергия» на самом деле означает «свободную энергию взаимодействий» (часто называемую «потенциалом средней силы»), так что гидрофобные и другие опосредованные растворителем взаимодействия, со всей их энтропией растворителя [Tanford, 1968], входят в «энергию». Эта терминология обычно используется, чтобы сконцентрироваться на основной проблеме выбора конформаций белковой цепи.)

Вышеупомянутый переход «всё-или-ничего» означает, что нативное (N) и денатурированное (U) состояния разделены высоким барьером свободной энергии. Высота этого барьера ограничивает скорость этого перехода, и именно эта высота должна быть оценена, чтобы разрешить парадокс Левинтала.

Гипотеза «кинетического контроля» инициировала очень интенсивные исследования промежуточных состояний (интермедиатов) сворачивания белков.

Фактически, с самого начала было ясно, что стабильные интермедиаты *не* обязательны для сворачивания, так как белок может сворачиваться около точки

равновесия между нативным и денатурированным состояниями (рис. 2) [Segava, Sugihara, 1984], где переход относится к типу «всё-или-ничего» [Privalov, 1979], что исключает любые стабильные интермедиаты.

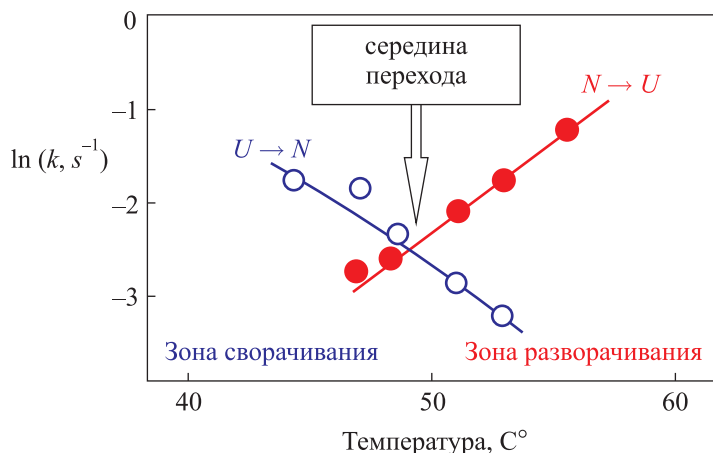


Рис. 2. Скорости (k) ре- и денатурации лизоцима в зависимости от температуры. Середина перехода — точка, где скорости ренатурации ($U \rightarrow N$) и денатурации ($N \rightarrow U$) равны; там кривые пересекаются (адаптировано из [Segava, Sugihara, 1984]). Отметим, что сворачивание при физиологической температуре $\approx 40^\circ\text{C}$ происходит всего раз в 10 быстрее, чем сворачивание в середине перехода. Сходные по величине, но противоположные наклоны линий $U \rightarrow N$ и $N \rightarrow U$ указывают на то, что переходное состояние является промежуточным по энтропии (связанной с наклоном линий $U \rightarrow N$ и $N \rightarrow U$) между нативным и денатурированным состояниями

Основные экспериментальные данные о кинетике сворачивания белков — следующие:

1. Единица сворачивания белка — домен. Это было продемонстрировано двумя группами опытов: (i) домены, отделенные от остального белка, обычно способны сворачиваться в правильную структуру [Petsko, Ringe, 2004]; (ii) однодоменные белки обычно не могут сворачиваться, когда удалено всего лишь 10 их C- (или N-) концевых аминокислотных остатков [Flanagan et al., 1992; Neira, Fersht, 1999a; 1999b].
2. Сворачивание некоторых белков протекает в одну стадию, как процесс перехода между двумя состояниями без каких-либо накапливающихся промежуточных состояний (когда наблюдаются только два состояния: нативная укладка и клубок [Matouschek et al., 1990; Fersht, 1999]), в то время как сворачивание других однодоменных белков, в основном более крупных (и происходящее далеко от точки середины перехода), демонстрирует кинетику в несколько стадий, где расплавленные и/или предрасплавленные

глобулы служат промежуточными состояниями [Dolgikh et al., 1984; Ptitsyn, 1995; Fersht, 1999].

3. Когда процесс сворачивания протекает через промежуточные состояния, этап, ограничивающий скорость всего процесса, непосредственно предшествует формированию нативного состояния и соответствует переходу от довольно плотной расплавленной глобулы к нативной структуре [Dolgikh et al., 1984].

5. Оценка времени сворачивания белка

Здесь уместно задуматься о том, действительно ли парадокс Левинталя является парадоксом. Bryngelson и Wolynes [1989] заметили, что этот парадокс основан на совсем плоской (и потому нереалистичной) модели поверхности потенциальной энергии белка («поле для гольфа»: рис. 3, а), а немного позже Leopold et al. [1992], следуя линии Go и Abe [1981], рассмотрели более реалистичные (наклоненные к нативной структуре белка) энергетические поверхности, предложив «воронки сворачивания» (рис. 3, б), которые, казалось бы, устранили «парадокс».

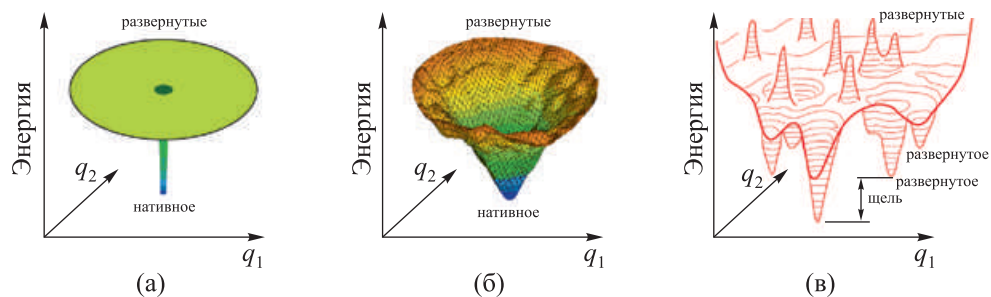


Рис. 3. Схематическое изображение основных моделей энергетических ландшафтов белковых цепей. (а) Модель «поля для гольфа» Левинталя. (б) Модель «воронки сворачивания» с центром в структуре с наименьшей энергией («нативной»). (в) Более детальный энергетический ландшафт белковой цепи, с «энергетическими скалами» и ямами, самая глубокая из коих («нативная») на ширину щели $\text{GAP} \gg k_B T_{\text{melt}}$ (k_B — постоянная Больцмана, T_{melt} — температура плавления белка) глубже, чем другие: эта разница между глобальным и другими минимумами энергии обеспечивает разворачивание стабильной белковой структуры по типу «всё-или-ничего» [Shakhnovich, Gutin, 1990]. На рисунках могут быть показаны только две координаты (q_1 и q_2), в то время как конформация белковой цепи определяется сотнями координат

Различные модели «воронок сворачивания» стали популярны для объяснения и иллюстрации сворачивания белков [Wolynes et al., 1995; Karplus, 1997; Nölting, 2010; Wolynes, 2015]. В центре воронки — структура с самой низкой

(благодаря набору наиболее мощных взаимодействий) энергией; этот центр окружен структурами с несколько более высокими энергиями, содержащими только часть этих мощных взаимодействий. «Энергетические воронки» могут быть не идеально гладкими из-за некоторых «фрустраций», т. е. противоречий между оптимальными взаимодействиями для различных звеньев гетерополимера, образующего белковую глобулу, но стабильная структура белка отличается минимальными фрустрациями (т. е. большинство ее элементов повышают стабильность нативной укладки) [Bryngelson, Wolynes, 1987, 1989; Bryngelson et al., 1995; Finkelstein et al., 1995].

«Энергетическая воронка» могла бы, в принципе, направить, без «Левинталева» перебора всех конформаций, движение цепи к структуре с наименьшей энергией. Но — *только* если была бы *лишь* энергия, и не играла бы свою роль энтропия, которая (если температура >0 °K) мешает движению к единой структуре, даже соответствующей глобальному минимуму энергии. Но сворачивание белка происходит в жидкой воде, при температурах >273 °K, где энтропийный член велик, и, более того, сворачивание происходит вблизи точки середины перехода (рис. 2), где энтропийный член полностью компенсирует энергию сворачивания!

Эта точка середины перехода — наилучшее место для анализа парадокса Левинтала. И хотя в условиях, где нативное состояние намного стабильнее развернутого, сворачивание может быть, скажем, в 10 000 раз быстрее — это ничто по сравнению с загадочным 10 000 000 000 000 000-кратным ускорением процесса сворачивания по сравнению с перебором всех структур...

В точке середины перехода белковая цепь имеет два одинаково стабильных состояния с низкой свободной энергией (денатурированное, часто до случайного клубка — и нативное, свернутое), которые разделены барьером свободной энергии, обеспечивающим переход «всё-или-ничего» между ними [Privalov, 1979], и, значит, ландшафт свободной энергии имеет не «воронкообразную», а «вулканоподобную» [Rollins, Dill, 2014] форму (рис. 4).

Таким образом, любой путь от развернутого состояния к нативному сначала идет вверх по свободной энергии, и только затем, вблизи нативного состояния, после прохождения барьера свободной энергии (т. е. края кратера вулкана), «свободноэнергетическая воронка» начинает работать и тянет цепь вниз, к нативному состоянию.

Для быстрого перехода от клубка к нативному состоянию создаваемый вулканом барьер свободной энергии должен быть невысок: согласно теории переходных состояний [Eyring, 1935; Полинг, 1974; Эмануэль, Кнорре, 1984], время преодоления барьера оценивается как

$$ВРЕМЯ \approx \tau \times \exp(+\Delta F^\ddagger/k_B T), \quad (1)$$

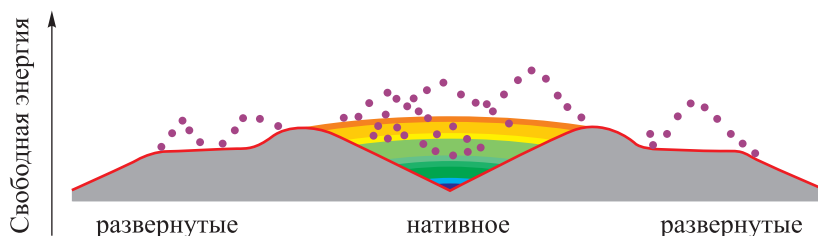


Рис. 4. Этот чисто иллюстративный рисунок показывает, как энтропия преобразует энергетическую воронку (рис. 3, б) в свободноэнергетический ландшафт в форме «вулкана» с барьером на любом пути, ведущем от развернутых конформаций к нативной укладке. Гладкий свободноэнергетический ландшафт соответствует компактным частично свернутым промежуточным структурам; «скалы» (обозначены пунктирными линиями) представляют собой некомпактные промежуточные структуры, а также промежуточные структуры с высокой (из-за столкновений звеньев цепи) энергией (см. рис. 3, в). Более точная, но менее красивая схема ландшафта свободной энергии показана на рис. 2 в [Galzitskaya, Finkelstein, 1999]

где τ — время элементарного шага ухода с барьера, а $\Delta F^\#$ — высота барьера свободной энергии (т. е. свободной энергии переходного состояния).

Следует отметить, что сворачивание белка — многошаговый процесс [Finkelstein, Ptitsyn, 2002], а классическая теория переходных состояний не очень точна в применении к многошаговым процессам, включая сворачивание белка [Djikaev, Ruckenstein, 2016] и фазовые переходы в целом [Ruckenstein, Berim, 2016]. Однако при этом погрешность, относительно небольшая, в основном касается [Finkelstein, 2015; Ruckenstein, Berim, 2016] оценки предэкспоненциального множителя (τ в уравнении (1)), который имеет второстепенное значение по сравнению с главным, экспоненциальным членом в уравнении (1), который учитывает свободную энергию переходного состояния.

Не всякая энергетическая воронка может обеспечить низкую высоту «вулкана», и, следовательно, не любая энергетическая воронка сама по себе может разрешить парадокс Левинтала. Строгий анализ [Bogatyreva, Finkelstein, 2001] ясно представленных моделей воронок [Zwanzig et al., 1992; Bicout, Szabo, 2000], соответствующих однородной конденсации цепи (ранее рассмотренной Шахновичем и Финкельштейном [1989]), показывает, что вблизи середины перехода такие воронки не могут одновременно объяснить обе основные особенности, наблюдаемые при сворачивании белка: (i) неастрономическое время сворачивания, и (ii) переход «всё-или-ничего». Кстати, механизм стадийного сворачивания [Птицын, 1973] также не может [Finkelstein, 2002] одновременно объяснить обе эти основные особенности сворачивания белков и, следовательно, также не может разрешить парадокс Левинтала.

Решение парадокса обеспечивает особый вид воронок — воронок с преходящим разделением свернутой и развернутой фаз [Финкельштейн, Бадретдинов, 1997; Finkelstein, Badretdinov, 1997] при сворачивании цепи (см. обзор [Wolynes, 1997]), ясно видимым в более поздних работах по компьютерному моделированию сворачивания белков [Shaw et al., 2010].

Оптимальный путь сворачивания может быть намечен, используя оптимальный путь *разворачивания* (который очертить много проще, чем путь сворачивания [Finkelstein et al., 2017; Финкельштейн, 2020]); поскольку, согласно хорошо известному в физике закону детального равновесия [Ландау, Лифшиц, 1964], прямая и обратная реакции идут по одному и тому же пути и имеют равные скорости, когда оба конечных состояния имеют одинаковую стабильность. (В противном случае, т. е. если бы пути для реакций $A \rightarrow B$ и $A \leftarrow B$ были бы разными, можно было бы получить *постоянный* круговой поток $A \rightleftharpoons B$, а с ним и вечный двигатель второго рода, что противоречило бы второму началу термодинамики.)

Что касается хорошего пути *разворачивания*, то легко понять, что это может быть путь последовательного (рис. 5) разворачивания, проходящий через наименее нестабильные частично развернутые состояния, т. е. те, в которых компактная глобулярная фаза отделена от развернутой относительно небольшой границей [Финкельштейн, Бадретдинов, 1997; Galzitskaya, Finkelstein, 1999; Garbuzynskiy et al., 2013]. (Чтобы решить парадокс Левинталя, необязательно доказывать, что это *наилучший* из возможных путей; достаточно доказать, что этот путь решает парадокс, потому что любой дополнительный путь только ускоряет процесс — представьте себе воду, вытекающую из бассейна через трещины в стене: если трещины не могут поглотить всю воду, каждая дополнительная трещина лишь ускоряет процесс.)

В упрощенном виде (подробнее см. [Финкельштейн, Бадретдинов, 1997; Finkelstein, Badretdinov, 1997, 1998; Garbuzynskiy et al., 2013]) барьер свободной энергии оценивается следующим образом.

Когда свободные энергии свернутой и развернутой фаз равны (т. е. в условиях середины перехода), свободная энергия частично свернутой структуры зависит только от границы раздела двух фаз. Самая большая неизбежная граница раздела соответствует состоянию, которое выглядит как половина нативной глобулы (рис. 5); она имеет $\approx L^{2/3}$ аминокислотных остатков на границе раздела (в случае наиболее компактной сферической формы глобулы; для сплюснутой или вытянутой глобулы наибольшая граница раздела может быть немного меньше).

Таким образом, свободная энергия переходного состояния пропорциональна не количеству L аминокислотных остатков цепи (как то следует из оценки Левинталя), а только $L^{2/3}$.

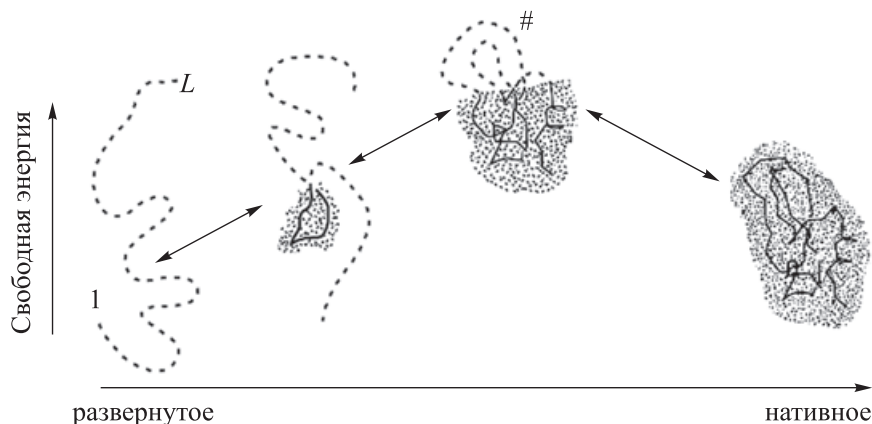


Рис. 5. Схематическое изображение последовательного пути сворачивания/разворачивания глобулы с компактными частично свернутыми состояниями. На каждом этапе последовательного разворачивания один остаток выходит из нативоподобной части глобулы (заштрихована) и превращается в клубок (показан пунктирной линией). Состояние с самой высокой свободной энергией (ядро сворачивания, соответствующее переходному состоянию, отмеченное знаком #) имеет наибольшую (на этом пути) поверхность раздела глобулярной и развернутой фаз. Его глобулярная часть составляет примерно половину цепи. По материалам [Финкельштейн, Бадретдинов, 1997; Finkelstein, Badretdinov, 1997]

Энергетический член $\Delta E^\#$ свободной энергии барьера $\Delta F^\#$ возникает из-за взаимодействий, потерянных остатками на поверхности раздела; это примерно $(L^{2/3}) \cdot \frac{\varepsilon}{4}$, где $\varepsilon \approx 1,3$ ккал/моль $\approx 2k_B T_{\text{mel}}$ — средняя скрытая теплота плавления белка в расчёте на остаток [Privalov, 1979] (ε — первый эмпирический параметр, используемый в этой теории), а $\approx 1/4$ — это, приблизительно, доля взаимодействий, теряемых остатком на границе раздела. Таким образом,

$$\Delta E^\# / k_B T_{\text{melt}} \approx 0,5 L^{2/3}. \quad (2)$$

Энтропийный член $\Delta S^\#$ свободной энергии барьера обусловлен потерями энтропии замкнутыми петлями, выступающими из глобулярной в развернутую фазу (как видно на рис. 5, вторая справа частично свернутая структура, обозначенная #, содержит две замкнутые петли, а первая слева частично свернутая структура не содержит замкнутых петель).

Когда форма укладки нативного белка и особенно форма укладки его цепи в переходном состоянии неизвестны, для значения $\Delta S^\#$, связанного с замкнутыми петлями (причем $\Delta S^\# \leq 0$), можно оценить только верхний и нижний преде-

лы. Верхний предел $\Delta S^\#$ равен нулю (когда поверхность раздела не содержит замкнутых петель). Нижний предел $\Delta S^\#$ составляет примерно

$$(\Delta S^\#)_{\text{ниж}} \approx \frac{1}{6}(L^{2/3}) \cdot \left[-\frac{5}{2} k_B \ln(3L^{1/3}) \right]. \quad (3)$$

Здесь $\frac{1}{6}(L^{2/3})$ — максимальное ожидаемое количество петель, выходящих из максимальной (содержащей $\approx L^{2/3}$ остатков) неизбежной границы раздела фаз. Фактически, $\frac{1}{6}(L^{2/3})$ — это среднее количество петель, выходящих из интерфейса размером в $L^{2/3}$ остатков. Множитель $\frac{1}{6}$ обусловлен тем, что, упрощенно, цепь может иметь 6 направлений в каждом остатке интерфейса (4 — вдоль границы раздела, 1 — идущее внутрь свернутой фазы, и только 1 направление — наружу, давая начало петле). Из множества возможных поверхностей раздела (поперечных сечений, разделяющих глобулу на две половины), интерфейс с самой низкой свободной энергией должен соответствовать переходному состоянию на пути сворачивания/разворачивания. Следовательно, этот «оптимальный» интерфейс должен иметь не более чем $\frac{1}{6}(L^{2/3})$, но, возможно, — меньшее количество петель.

Значение $3L^{1/3} \equiv \frac{L}{2} / \left(\frac{1}{6} L^{2/3} \right)$ — это среднее количество остатков в замкнутой петле в переходном состоянии $\left(\frac{L}{2} \right.$ — число развернутых остатков в переходном состоянии, а $\frac{1}{6} L^{2/3}$ — максимальное число петель в нем). Значение $-\frac{5}{2} k_B \ln(3L^{1/3})$ — это энтропия, теряемая $3L^{1/3}$ -остаточной замкнутой петлей на границе раздела (такая петля не может пересекать плоскость интерфейса; это ограничение превращает $\frac{3}{2}$, обычный коэффициент Флори для энтропии замкнутой петли, в $\frac{5}{2}$ [Финкельштейн, Бадретдинов, 1997; Finkelstein, Badretdinov, 1997]). При $L \sim e^3 - e^6$ имеем $-\frac{5}{2} k_B \ln(3L^{1/3}) = -5k_B \div 7,5k_B$, так что

$$(\Delta S^\#)_{\text{ниж}} \approx -k_B L^{2/3}. \quad (3a)$$

В середине перехода свободная энергия переходного состояния $\Delta F_0^\# = \Delta E^\# - T_{\text{melt}}\Delta S^\#$. Значение $\Delta F_0^\#$ составляет не менее чем $\Delta E^\# - 0$ (при $\Delta S^\# = 0$) и не более чем $\Delta E^\# - T_{\text{melt}}(\Delta S^\#)_{\text{ниж}}$, т. е.

$$\Delta E^\# \leq \Delta F_0^\# \leq \Delta E^\# - T_{\text{melt}}(\Delta S^\#)_{\text{ниж}}. \quad (4)$$

Таким образом, когда разность свободной энергии ΔF между нативным (наиболее стабильным) и развернутым состояниями цепи равна нулю, время как сворачивания, так и разворачивания цепи из L аминокислотных остатков оценивается как

$$ВРЕМЯ_{\Delta F=0} \approx \tau \times \exp\left[+\Delta F_0^\# / k_B T_{\text{melt}}\right] \sim \tau \times \exp\left[+(0,5 \div 1,5)L^{2/3}\right], \quad (5)$$

где $\tau \approx 10$ нс — время роста структуры на один остаток [Zana, 1975] (τ — это второй и последний эмпирический параметр, используемый в теории [Финкельштейн, Бадретдинов, 1997; Finkelstein, Badretdinov, 1997]).

Следует добавить, что перебор укладок цепи с различными узлами, в принципе, может быть ограничивающим скорость «квази-Левинталевским» фактором, поскольку узел нельзя убрать без распада глобулы. Однако, так как компьютерные эксперименты показывают, что один узел образуется десятками остатков цепи, то поиск правильного заузливания может ограничить скорость сворачивания лишь очень длинных ($L \gg 1000$) цепей [Finkelstein, Badretdinov, 1998], которые (согласно уравнению (5)) в любом случае не могут сворачиваться за разумное время.

Вышеприведенное уравнение (5) показывает, что белковая цепь из 100 аминокислотных остатков в условиях середины перехода (где $\Delta F = 0$) должна достигнуть своей наиболее стабильной укладки в течение миллисекунд или дней, но не лет.

Если нативная укладка стабильнее, чем развернутая цепь (т. е., если $\Delta F < 0$), сворачивание происходит быстрее. Поскольку ядро сворачивания составляет примерно половину цепи (более подробные расчеты [Garbuzynskiy et al., 2013] дают $\approx 40\%$), его свободная энергия уменьшается с $\Delta F_0^\#$ (которая была при $\Delta F = 0$) до примерно $\Delta F_0^\# + 0,4\Delta F$, так что, при $\Delta F < 0$,

$$ВРЕМЯ_{\Delta F<0} \sim ВРЕМЯ_{\Delta F=0} \times \exp\left[+0,4\Delta F / k_B T\right], \quad (6)$$

то есть

$$ВРЕМЯ_{\Delta F<0} \sim 10 \text{ нс} \times \exp\left[+(0,5 \div 1,5) \times (L^{2/3} + 0,4\Delta F / k_B T)\right] \quad (6a)$$

[Garbuzynskiy et al., 2013]. Так как, в среднем, $\Delta F \approx 10$ ккал/моль для белка из ≈ 100 остатков при физиологических условиях [Privalov, 1979], то время сво-

рачивания белков в таких условиях уменьшается в ~ 1000 раз — т. е. оно составляет от долей миллисекунды до часа.

Следует отметить, что все вышеизложенные соображения относятся к случаю невысокой стабильности нативной укладки (которое имеет место вблизи середины перехода, см. рис. 2). Для случая очень высокой стабильности нативной укладки, $-\Delta F \gg k_B T$, другая, но похожая на даваемую уравнением (5) зависимость от L , $\ln(BPEMY) \sim L^{1/2}$, был получен Thirumalai [1995].

В заключение можно сказать, что, хотя проблема сворачивания белка является так называемой «NP-сложной» задачей [Ngo, Marks, 1992; Unger, Moulton, 1993] (что, грубо говоря, подразумевает экспоненциально долгое время, требуемое на ее решение и белковой цепью, и компьютером), — и действительно, это время является своего рода экспоненциальной функцией длины цепи L (см. уравнения (5), (6a) и более поздние строгие математические статьи [Fu, Wang, 2004; Steinhofel et al., 2006]), — это еще вовсе не означает, что это время невозможно велико для нормального белкового домена.

6. Время сворачивания белков: теория и эксперимент

Наблюдаемые времена сворачивания белков (см. рис. 6) покрывают 11 порядков величины (что сродни разнице между продолжительностью жизни комара и возрастом Вселенной).

Рисунок 6 показывает, что область, «разрешенная», согласно теории, для времен сворачивания белковых глобул уравнениями (5)–(6a) (и полученная с лишь двумя эмпирическими, и вовсе без подгоночных параметров), хорошо описывает наблюдаемые времена сворачивания всех изученных однодоменных глобулярных белков любого размера и с любой стабильностью их нативного состояния [Garbuzynskiy et al., 2013].

Рисунок 6 также показывает, что цепь из $L \lesssim 80$ –90 аминокислотных остатков найдет свою наиболее стабильную укладку за несколько минут (или быстрее) даже в «небиологических» условиях середины перехода, где, как известно [Creighton, 1978; Fersht, 1999], сворачивание происходит медленнее всего (см. также рис. 2). Нативные структуры таких относительно небольших белков находятся под полным термодинамическим контролем: они являются наиболее стабильными среди всех структур этих цепей.

Нативные же структуры более крупных белков (из ≈ 100 –400 аминокислотных остатков) находятся еще и под кинетическим «контролем сложности структуры»: слишком «запутанные» укладки (в «полуразвернутом» виде содержащие много замкнутых развернутых петель, так что им соответствует значительный член $(\Delta S^\ddagger)_{\text{ниж}}$) не могут свернуться за дни и недели, даже если они термодинамически стабильны. И действительно, большие глобулярные домены

с сильно запутанными укладками не наблюдаются [Garbuzynskiy et al., 2013]: они, видимо, исключаются из репертуара существующих белковых структур. (Отметим, что нативная структура по крайней мере одного белка (серпина), состоящего из ≈ 400 аминокислотных остатков, является не самой стабильной, а долгоживущей метастабильной укладкой [Tsutsui et al., 2012].)

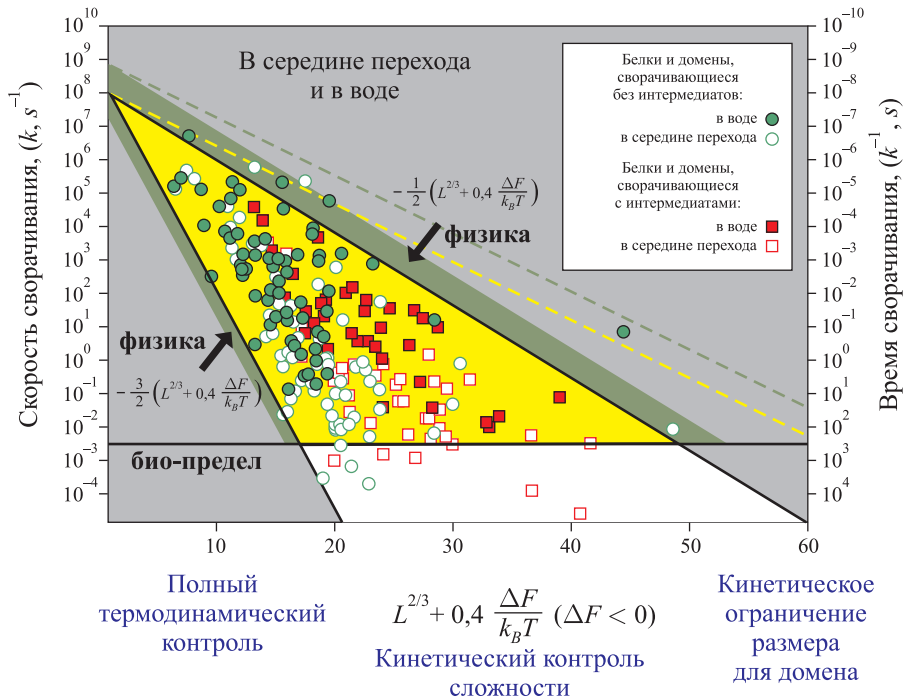


Рис. 6. Скорости и времена сворачивания белков. Экспериментальные измерения *in vitro* были выполнены как «в воде» (при приблизительно в «биологических» условиях, когда $\Delta F < 0$), так и в середине перехода (когда $\Delta F = 0$) для 107 однодоменных белков (или отдельных доменов) без ковалентно связанных лигандов и SS-связей (хотя скорости сворачивания белков с SS-связями и без не отличаются принципиально [Galzitskaya et al., 2001]). Золотисто-белый треугольник: область, теоретически разрешенная физикой в середине перехода. Его золотая часть соответствует биологически приемлемому времени сворачивания (≤ 10 мин), бронзовые полосы — дополнительная область, разрешенная в «биологических» условиях. Белая зона: большее, чем «биологически-приемлемое», время сворачивания, наблюдаемое (для некоторых белков) только в «небиологических» условиях середины перехода. Желтая пунктирная линия ограничивает дополнительную область, разрешенную для сплюснутых (1:2) и вытянутых (2:1) глобул в середине перехода; бронзовая пунктирная линия означает то же для «биологических» условий. L — количество аминокислотных остатков в белковой цепи. ΔF — разность свободных энергий нативного и развернутого состояний цепи в условиях эксперимента; T — температура проведения эксперимента. Адаптировано из [Garbuzynskiy et al., 2013]

Кинетический контроль также объясняет, почему более крупные (с $L \gtrsim 450$ остатков) белки должны быть далеки от сферической формы или состоять из отдельно сворачивающихся доменов: иначе цепи из более чем 450 остатков сворачивались бы слишком медленно. Это — кинетическое «ограничение размера» сворачивающихся доменов.

Такой эффект в некотором смысле напоминает «кинетический контроль» Левинталя, но на другом уровне и только для очень больших белков. Приведенные выше оценки (≈ 100 и ≈ 400 остатков) несколько (но не принципиально, на 30–50 %) увеличиваются, когда свободная энергия нативной укладки существенно ниже, чем развернутой цепи [Garbuzynskiy et al., 2013].

Уравнения (5)–(6а) только очерчивают диапазон времен сворачивания в зависимости от размера белка и стабильности его нативной структуры при заданных внешних условиях. Чтобы предсказать время сворачивания белка более точно, необходимо принять во внимание форму его ядра сворачивания или, из-за отсутствия такой информации, форму его нативной укладки. Это было сделано Плаксо и др. [1998], введшими «порядок контактов» («Contact Order», или CO) — среднее расстояние по цепи между остатками, контактирующими в нативном белке, деленное на длину цепи — в качестве феноменологической меры сложности нативной укладки (правда, только для небольших белков, которые сворачиваются без промежуточных состояний). Позже этот CO был «скрещен» с уже разработанной [Finkelstein, Badretdinov, 1997] теорией зависимости времен сворачивания от длины цепей, и полученный метод [Ivankov et al., 2003] показал неплохие результаты, теперь уже для всех белков; а более позднее развитие этого метода [Finkelstein et al., 2013] дало еще более точные результаты [Ivankov, Finkelstein, 2020].

Следует добавить, что во всех этих работах внимание уделялось не структуре ядер сворачивания, а их общим характеристикам — размеру, нестабильности и «сложности». Причина в том, что ядра сворачивания хорошо очерчены в одних случаях (см. [Fersht, 1999, 2000; Garbuzynskiy, Kondratova, 2008; Shaw et al., 2010]) и плохо («диффузные ядра») — в других (см. [Grantcharova et al., 2001; Finkelstein et al., 2007, 2014] и цитируемую там литературу). Это, вместе с наблюдаемой чувствительностью положения и формы «ядер» к мутациям [Grantcharova et al., 2001], привело к выводу, что «ядро» — это не одна определенная структура, а ансамбль структур, и что «ядро» и путь сворачивания много менее устойчивы к мутациям аминокислотной последовательности и изменению условий среды, чем структура нативного белка.

Надо также отметить, что во всем нашем рассказе основное внимание уделялось стабильности (точнее, нестабильности) переходных состояний (т. е. ядер сворачивания), и мы почти не касались метастабильных промежуточных со-

стояний, так как они, в отличие от ядер сворачивания, не определяют скорость образования нативных структур [Fersht, 1999, 2000].

7. Зависимость числа компактных укладок цепи от размера белка

Как уже говорилось, общий объем конформационного пространства белка, оцениваемый на уровне аминокислотных остатков, огромен: $\gtrsim 3^{100}$ конформаций для цепи из 100 остатков.

Однако должна ли цепь перебирать все эти конформации в поисках наиболее стабильной укладки? Нет: подавляющее большинство из них некомпактны (т. е. высокоэнергетичны); но конформационное пространство покрыто локальными энергетическими минимумами, каждый из которых окружен локальной энергетической воронкой (рис. 7), обеспечивающей быстрый спуск до этого локального минимума. Так что, на самом деле, сворачивающаяся белковая цепь должна перебирать лишь различные способы упаковки цепи в компактную белковую глобулу.

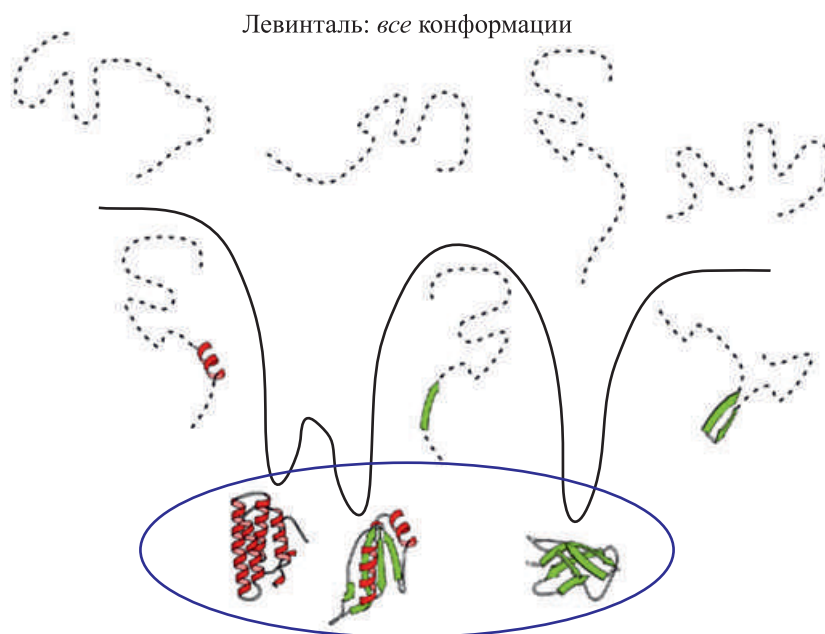


Рис. 7. Сравнение огромного поиска среди *всех*, в основном некомпактных конформаций, и гораздо меньшего поиска среди компактных, хорошо структурированных глобул, отвечающих глубоким минимумам энергии, окруженных энергетическими воронками. По [Finkelstein, 2017]

Чтобы оценить объем такого перебора, надо оценить количество этих локальных минимумов энергии. Это похоже на идею перечисления возможных «топомеров», которые может образовывать белковая цепь [Debe et al., 1999; Makarov, Plaxco, 2003; Wallin, Chan, 2005].

Обзор белковых структур показывает, что взаимодействия в их цепях связаны, в основном, со вторичными структурами [Levitt, Chothia, 1976; Chothia, Finkelstein, 1990; Финкельштейн, Птицын, 2002]. Итак — возникает вопрос: как велико общее количество минимумов энергии, если рассматривать это на уровне образования и укладки вторичных структур в глобулу, т. е. на уровне, который рассматривал Птицын [1973] в его модели стадийного сворачивания белков.

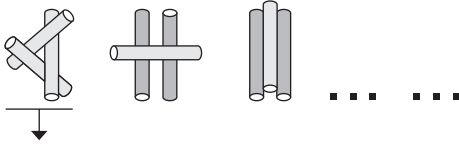
Нас будут интересовать в основном белки, которые сворачиваются под термодинамическим контролем, т. е. цепи из $L \sim 100$ остатков или менее (см. выше). Такие белки содержат не более $N \approx 10$ α - и β -структурных элементов [Ptitsyn, Finkelstein, 1980; Rollins, Dill, 2014].

Компактных глобулярных упаковок цепи на много порядков меньше, чем конформаций аминокислотных остатков [Finkelstein, Garbuzynskiy, 2015; Финкельштейн, Гарбузинский, 2016]. Последнее, согласно Левинталю, масштабируется (с числом L остатков в цепи) как нечто вроде 100^L , 10^L или 3^L , в то время как первое растет не быстрее (см. ниже), чем $\sim L^N$ с длиной цепи L и количеством элементов вторичной структуры N . N много меньше, чем L ($N < L/10$, согласно [Rollins, Dill, 2014]), и это резкое уменьшение показателя степени N по сравнению с L является основной причиной резкого уменьшения конформационного пространства. Число компактных глобулярных упаковок цепи с заданными вторичными структурами представимо [Finkelstein, Garbuzynskiy, 2015] как произведение следующих сомножителей (см. рис. 8).

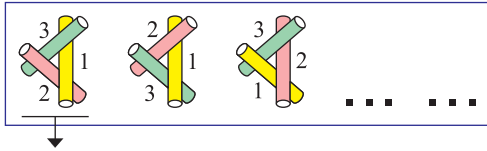
M_A — число архитектур, т. е. типов плотных упаковок данных вторичных структур. Это число невелико (ср. [Levitt, Chothia, 1976; Murzin, Finkelstein, 1988; Chothia, Finkelstein, 1990]). Обычно (при $L \lesssim 100$ и $N \leq 10$) оно составляет ~ 10 или меньше (рис. 8, *a*) для данного набора вторичных структур, поскольку архитектуры представляют собой упаковки из нескольких слоев вторичной структуры (каждый из которых содержит несколько вторичных структур), и поэтому комбинаторика таких слоев очень мала по сравнению с комбинаторикой гораздо более многочисленных элементов вторичной структуры, описанной ниже. Итак: $M_A \lesssim 10$.

M_P — число всех возможных комбинаций положений N структурных элементов в пределах данной белковой архитектуры, которое не может превышать $N! \equiv N \times (N-1) \times \dots \times 2 \times 1$ (рис. 8, *b*), т. е., используя приближение Стирлинга, $N! \approx (N/e)^N$: $M_P \lesssim (N/e)^N$.

(а) архитектуры: $M_A \lesssim 10$
(при $L \lesssim 100$ и $N \lesssim 100$)



(б) упаковки: $M_P = N! \equiv N \times (N-1) \times \dots \times 2 \times 1$
 $(L/N)^N$



(в) топологии:
 $M_T = 2^N$

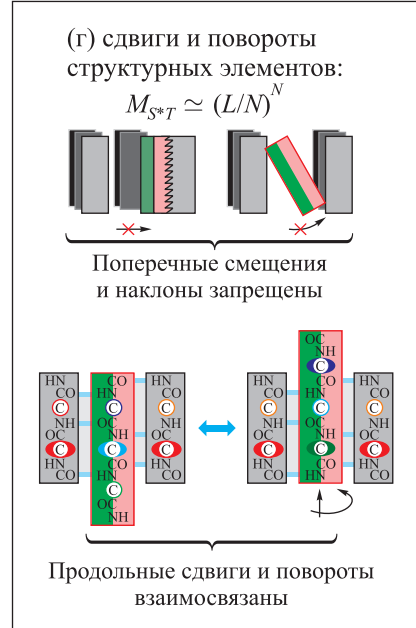
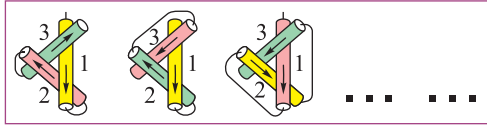


Рис. 8. Схема оценки объема конформационного пространства на уровне упаковки элементов вторичной структуры (по [Finkelstein, Garbuzynskiy, 2015]). Пояснения в тексте

M_T — число всех возможных топологий, т. е. всех комбинаций направлений этих структурных элементов, которое не может превышать 2^N (рис. 8, в). Итак: $M_T \lesssim 2^N$.

Значит, число компактных упаковок из N структурных элементов есть $M_A \times M_P \times M_T \sim 10 \times (N/e)^N \times 2^N \sim [10 \times (2/e)^N] \times N^N \sim N^N$ в главном члене (если $N \gg 1$), так как $[10 \times (2/e)^N] \sim 1$ при $N \sim 10$.

M_{S*T} — число возможных сдвигов и поворотов (рис. 8, г) структурных элементов внутри плотной глобулы. Здесь поперечные смещения и наклоны запрещены плотной упаковкой, а продольные сдвиги и повороты структурных элементов взаимосвязаны (на рис. 8, г это показано на примере β -листа, но то же верно для α -спиралей — вспомним плотные упаковки по принципу «выступы-во-впадины» Крика [1953]). В результате, в глобуле, образованной N элементами вторичной структуры в цепи из L аминокислотных остатков, каждый α - или β -элемент может иметь примерно L/N возможных сдвиг/поворотов (соответственно среднему числу остатков цепи в расчете на элемент). Значит, $M_{S*T} \approx (L/N)^N$.

Итак, в каждой из $\sim N^N$ компактных упаковок из N структурных элементов $M_{S^*T} \approx (L/N)^N$ локальных энергетических минимумов, и, значит [Finkelstein, Garbuzynskiy, 2015],

$$M_A \times M_P \times M_T \times M_{S^*T} \sim 10 \times (N/e)^N \times 2^N \times (L/N)^N \sim [10 \times (2/e)^N] \times L^N \sim L^N \quad (7)$$

(в главном члене) есть число глубоких минимумов энергии в конформационном пространстве.

Это число может быть несколько уменьшено симметрией глобулы, малой длиной некоторых петель, невозможностью иметь α -спирали внутри β -листов и т. д., но это не важно для нашей цели: оценить верхний предел числа конформаций [Finkelstein, Garbuzynskiy, 2015].

Что касается вопроса о том, откуда цепь «знает», где и какой вторичной структуре быть, ответ — в том, что большинство вторичных структур определяется локальной первичной структурой [Птицын, Финкельштейн, 1970; Птицын, 1973; Lim, 1974a, 1774б; Chou, Fasman, 1974; Schulz et al., 1974; Ptitsyn, Finkelstein, 1983; Finkelstein et al., 1990; Jones, 1999; и др.].

Поскольку в цепи из $L \approx 20$ остатков одна ($N=1$) α -спираль образуется за $\approx 0,2$ микросекунд [Mukherjee et al., 2008], а β -шпилька из $N=2$ β -тяжей образуется за ≈ 6 микросекунд [Muñoz et al., 1997], время, необходимое для $\sim L^N$ возможных сборок вторичных структур может быть оценено (ср. с уравнением (6a)) как

$$ВРЕМЯ \sim 10 \text{ нс} \times L^N. \quad (7a)$$

В компактной глобуле длина элемента вторичной структуры должна быть пропорциональна ее диаметру, т. е. $\sim L^{1/3}$. Конкретнее: диаметр глобулы из L остатков равен $\approx 5L^{1/3} \text{ \AA}$, так что в среднем α -спираль состоит из $\approx 3L^{1/3}$ остатков, а β -тяж, как и петля, из $\approx 1,5L^{1/3}$ остатков. Таким образом, глобула из α -спиралей, соединенных петлями, содержит $\approx L/[L^{1/3}(3+1,5)] = L^{2/3}/4,5$ спиралей, а глобула из β -тяжей, соединенных петлями, содержит $\approx L/[L^{1/3}(1,5+1,5)] = L^{2/3}/3$ β -тяжей [Finkelstein, Garbuzynskiy, 2015]. Это значит, что число элементов вторичной структуры

$$N = \frac{L^{2/3}}{4,5} \text{ [для } \alpha\text{-белков]} \div \frac{L^{2/3}}{3} \text{ [для } \beta\text{-белков]}. \quad (8)$$

Итак, ожидаемое число L^N возможных конфигураций глобулы будет находиться в пределах

$$L^{L^{2/3}/4,5} \equiv \exp([\ln(L)/4,5] \times L^{2/3}) \text{ [для } \alpha\text{-белков]} \div L^{L^{2/3}/3} \equiv \exp([\ln(L)/3] \times L^{2/3}) \text{ [для } \beta\text{-белков]}. \quad (9)$$

Поскольку $\ln(L = 50 \div 150) = 4 \div 5$, означенный диапазон числа возможных конфигураций близок к

$$\approx \exp(L^{2/3}) \div \approx \exp(1,5L^{2/3}), \quad (9a)$$

т. е. число L^N возможных конфигураций глобулы меняется с длиной цепи L приблизительно как верхняя граница диапазона времен сворачивания, описываемого уравнением (6a).

Нелишним будет упомянуть, что полученное нами выражение L^N сходно с полученными Fu, Wang [2004] и Steinhofel et al. [2006] исходя из математического рассмотрения сложности задачи, а не из физических соображений.

Благодарности

Авторы благодарны О. Б. Птицыну, А. М. Гутину, Е. И. Шахновичу, А. Я. Бадретдинову, О. В. Галзитской, Д. Н. Иванкову, Н. С. Богатырёвой за многолетние плодотворные обсуждения.

Первая часть этой работы была поддержана Программой «Молекулярная и клеточная биология» Президиума Российской академии наук (гранты № 01200957492, № 01201358029), а вторая часть — Российским научным фондом (гранты № 14-24-00157, № 21-14-00268).

Литература

- Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М. Статистическая физика. §§ 7, 8, 150. — М.: Наука, 1964.
- Марченков В. В., Соколовский И. В., Котова Н. В., Галзитская О. В., Бочкарева Е. С., Гиршович А. С., Семисотнов Г. В. Взаимодействие шаперона GroEL с ранними кинетическими промежуточными состояниями ренатурирующих белков ингибирует формирование их нативной структуры // Биофизика. — 2004. — Т. 49. — С. 987–994.
- Полинг Л. Общая химия. Гл. 16. — М.: Мир, 1974.
- Птицын О. Б. Стадийный механизм организации белковых молекул // Докл. Акад. наук СССР. — 1973. — Т. 210. — С. 1213–1215.
- Птицын О. Б., Финкельштейн А. В. Связь вторичной структуры глобулярных белков с их первичной структурой // Биофизика. — 1970. — Т. 15. — С. 757–767.
- Финкельштейн А. В. 50+ лет самоорганизации белков // Усп. биол. хим. — 2018. — Т. 58, № 1. — С. 7–40.
- Финкельштейн А. В. Озвученный курс лекций «Физика белка». 2020. [Лекции в видео формате .avi для студентов МГУ.] URL: <https://yadi.sk/d/hBOaPER4bNX4mw> (Дата обращения: 14.04.2021).
- Финкельштейн А. В., Бадретдинов А. Я. Физические причины быстрой самоорганизации стабильной пространственной структуры белков: Решение парадокса Левинтала // Мол. биол. — 1997. — Т. 31. — С. 469–477.

- Финкельштейн А. В., Гарбузинский С. А. Решение парадокса Левинталя возможно на уровне формирования и упаковки вторичных структур белков // *Биофизика*. — 2016. — Т. 61. — С. 5–10.
- Финкельштейн А. В., Птицын О. Б. Физика белка. Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями. — Изд. 2-е. Лекции 19–21. — М.: Книжный дом «Университет», 2002.
- Эмануэль Н. М., Кнорре Д. Г. Курс химической кинетики. — Изд. 4-е. Гл. II, III, V (§§ 2, 3). — М.: Высшая школа, 1984.
- Abkevich V. I., Gutin A. M., Shakhnovich E. I. Specific nucleus as a transition state for protein folding: evidence from the lattice model // *Biochemistry*. — 1994. — Vol. 3. — P. 10026–10031.
- Anfinsen C. B. The molecular basis of evolution. — Chapters 5, 6. — NY.: John Wiley, 1959.
- Anfinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains // *Science*. — 1973. — Vol. 181. — P. 223–230.
- Anfinsen C. B., Scheraga H. A. Experimental and theoretical aspects of protein folding // *Adv. Protein Chem.* — 1975. — Vol. 29. — P. 205–300.
- Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H., Jr. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1961. — Vol. 47. — P. 1309–1314.
- Bicout D. J., Szabo A. Entropic barriers, transition states, funnels, and exponential protein folding kinetics: A simple model // *Protein Sci.* — 2000. — Vol. 9. — P. 452–465.
- Bogatyreva N. S., Finkelstein A. V. Cunning simplicity of protein folding landscapes // *Protein Eng.* — 2001. — Vol. 14. — P. 521–523.
- Bryngelson J. D., Wolynes P. G. Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1987. — Vol. 84. — P. 7524–7528.
- Bryngelson J. D., Wolynes P. G. Intermediates and barrier crossing in a random energy model (with applications to protein folding) // *J. Phys. Chem.* — 1989. — Vol. 93. — P. 6902–6915.
- Bryngelson J. D., Onuchic J. N., Socci N. D., Wolynes P. G. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis // *Proteins*. — 1995. — Vol. 21. — P. 167–195.
- Chothia C., Finkelstein A. V. The classification and origins of protein folding patterns // *Ann. Rev. Biochem.* — 1990. — Vol. 59. — P. 1007–1039.
- Chou P. Y., Fasman G. D. Prediction of protein conformation // *Biochemistry*. — 1974. — Vol. 13. — P. 222–245.
- Creighton T. E. Experimental studies of protein folding and unfolding // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 1978. — Vol. 33. — P. 231–297.
- Crick F. H. C. The packing of α -helices: Simple coiled coils // *Acta Crystallogr.* — 1953. — Vol. 6. — P. 689–697.
- Debe D. A., Carlson M. J., Goddard W. A., 3rd. The topomer-sampling model of protein folding // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96. — P. 2596–2601.

- Dill K. A., Chan H. S. From Levinthal to pathways to funnels // *Nat. Struct. Biol.* — 1997. — Vol. 4. — P. 10–19.
- Dill K. A., MacCallum J. L. The protein-folding problem, 50 years on // *Science.* — 2012. — Vol. 338. — P. 1042–1046.
- Djikaev Y., Ruckenstein E. Model for the nucleation mechanism of protein folding // Ruckenstein E., Berim G. *Kinetic theory of nucleation.* — Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016. — P. 231–250.
- Dolgikh D. A., Kolomiets A. P., Bolotina I. A., Ptitsyn O. B. «Molten globule» state accumulates in carbonic anhydrase folding // *FEBS Lett.* — 1984. — Vol. 164. — P. 88–92.
- Eichmann C., Preissler S., Riek R., Deuerling E. Cotranslational structure acquisition of nascent polypeptides monitored by NMR spectroscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2010. — Vol. 107. — P. 9111–9116.
- Eisenberg D. S. How hard it is seeing what is in front of your eyes // *Cell.* — 2018. — Vol. 174. — P. 8–11.
- Ellis R. J., Hartl F. U. Principles of protein folding in the cellular environment // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 1999. — Vol. 9. — P. 102–110.
- Eyring H. The activated complex in chemical reactions // *J. Chem. Phys.* — 1935. — Vol. 3. — P. 107–115.
- Fersht A. R. *Structure and mechanism in protein science: A guide to enzyme catalysis and protein folding.* — Chapters 2, 15, 18, 19. — NY.: W. H. Freeman & Co., 1999.
- Fersht A. R. Transition-state structure as a unifying basis in protein-folding mechanisms: Contact order, chain topology, stability, and the extended nucleus mechanism // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — Vol. 97. — P. 1525–1529.
- Finkelstein A. V. Cunning simplicity of a hierarchical folding // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 2002. — Vol. 20. — P. 311–313.
- Finkelstein A. V. Time to overcome the high, long and bumpy free-energy barrier in a multi-stage process: The generalized steady-state approach // *J. Phys. Chem. B.* — 2015. — Vol. 119. — P. 158–163.
- Finkelstein A. V. Some additional remarks to the solution of the protein folding puzzle: Reply to comments on «There and back again: Two views on the protein folding puzzle» // *Phys. Life Rev.* — 2017. — Vol. 21. — P. 77–79.
- Finkelstein A. V., Badretdinov A. Ya. Rate of protein folding near the point of thermodynamic equilibrium between the coil and the most stable chain fold // *Fold. Des.* — 1997. — Vol. 2. — P. 115–121.
- Finkelstein A. V., Badretdinov A. Ya. Influence of chain knotting on the rate of folding. ADDENDUM to Rate of protein folding near the point of thermodynamic equilibrium between the coil and the most stable chain fold // *Fold. Des.* — 1998. — Vol. 3. — P. 67–68.
- Finkelstein A. V., Garbuzynskiy S. O. Reduction of the search space for the folding of proteins at the level of formation and assembly of secondary structures: A new view on solution of Levinthal's paradox // *Chem. Phys. Chem.* — 2015. — Vol. 16. — P. 3373–3378.

- Finkelstein A. V., Ptitsyn O. B. Protein physics. 2-nd edn. — Amsterdam – Boston – Heidelberg – London – New York – Oxford – Paris – San Diego – San Francisco – Singapore – Sydney – Tokyo: Academic Press, An Imprint of Elsevier Science, 2016.
- Finkelstein A. V., Badretdinov A. Ya., Gutin A. M. Why do protein architectures have a Boltzmann-like statistics? // *Proteins*. — 1995. — Vol. 23. — P. 142–150.
- Finkelstein A. V., Badretdinov A. Ya., Ptitsyn O. B. Short alpha-helix stability // *Nature*. — 1990. — Vol. 345. — P. 300–300.
- Finkelstein A. V., Bogatyreva N. S., Garbuzynskiy S. O. Restrictions to protein folding determined by the protein size // *FEBS Lett.* — 2013. — Vol. 587. — P. 1884–1890.
- Finkelstein A. V., Ivankov D. N., Garbuzynskiy S. O., Galzitskaya O. V. Understanding the folding rates and folding nuclei of globular proteins // *Current Prot. & Pept. Sci.* — 2007. — Vol. 8. — P. 521–536.
- Finkelstein A. V., Ivankov D. N., Garbuzynskiy S. O., Galzitskaya O. V. Understanding the folding rates and folding nuclei of globular proteins // eBook series «Frontiers in protein and peptide sciences» / B. M. Dunn (ed.), Vol. 1, chapter 5, pp. 91–138. — Sharjah, UAE: Bentham Science, 2014.
- Finkelstein A. V., Badretdin A. J., Galzitskaya O. V., Ivankov D. N., Bogatyreva N. S., Garbuzynskiy S. O. There and back again: Two views on the protein folding puzzle // *Phys. Life Rev.* — 2017. — Vol. 21. — P. 56–71.
- Flanagan J. M., Kataoka M., Shortle D., Engelman D. M. Truncated staphylococcal nuclease is compact but disordered // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1992. — Vol. 89. — P. 748–752.
- Flory P. J. Statistical mechanics of chain molecules. Chap. 3. — NY.: Interscience Publishers, 1969.
- Fu B., Wang W. A $2^{O(n^{1-1/d} \cdot \log(n))}$ time algorithm for d-dimensional protein folding in the HP-model // *Lecture Notes in Computer Science*. — 2004. — Vol. 3142. — P. 630–644.
- Fulton K. F., Main E. R. G., Dagett V., Jackson S. E. Mapping the interactions present in the transition state for unfolding/folding of FKBP12 // *J. Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 291. — P. 445–461.
- Galzitskaya O. V., Finkelstein A. V. Folding of chains with random and edited sequences: similarities and differences // *Protein Eng.* — 1995. — Vol. 8. — P. 883–892.
- Galzitskaya O. V., Finkelstein A. V. A theoretical search for folding/unfolding nuclei in three-dimensional protein structures // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — Vol. 96. — P. 11299–11304.
- Galzitskaya O. V., Ivankov D. N., Finkelstein A. V. Folding nuclei in proteins // *FEBS Lett.* — 2001. — Vol. 489. — P. 113–118.
- Galzitskaya O. V., Garbuzynskiy S. O., Ivankov D. N., Finkelstein A. V. Chain length is the main determinant of the folding rate for proteins with three-state folding kinetics // *Proteins*. — 2003. — Vol. 51. — P. 162–166.
- Garbuzynskiy S. O., Kondratova M. S. Structural features of protein folding nuclei // *FEBS Lett.* — 2008. — Vol. 582. — P. 768–772.

- Garbuzynskiy S. O., Ivankov D. N., Bogatyreva N. S., Finkelstein A. V. Golden triangle for folding rates of globular proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2013. — Vol. 110. — P. 147–150.
- Go N., Abe H. Noninteracting local-structure model of folding and unfolding transition in globular proteins. I. Formulation // *Biopolymers*. — 1981. — Vol. 20. — P. 991–1011.
- Goldenberg D. P., Creighton T. E. Circular and circularly permuted forms of bovine pancreatic trypsin inhibitor // *J. Mol. Biol.* — 1983. — Vol. 165. — P. 407–413.
- Grantcharova V. P., Riddle D. S., Santiago J. V., Baker D. Important role of hydrogen bonds in the structurally polarized transition state for folding of the src SH3 domain // *Nat. Struct. Biol.* — 1998. — Vol. 5. — P. 714–720.
- Grantcharova V., Alm E., Baker D., Horwich A. L. Mechanism of protein folding // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 2001. — Vol. 11. — P. 70–82.
- Gutin A. M., Shakhnovich E. I. Ground state of random copolymers and the discrete random energy model // *J. Chem. Phys.* — 1993. — Vol. 98. — P. 8174–8177.
- Han Y., David A., Liu B., Magadan J. G., Bennink J. R., Yewdell J. W., Qian S. B. Monitoring cotranslational protein folding in mammalian cells at codon resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2012. — Vol. 109. — P. 12467–12472.
- Holtkamp W., Kokic G., Jäger M., Mittelstaet J., Komar A. A., Rodnina M. V. Cotranslational protein folding on the ribosome monitored in real time // *Science*. — 2015. — Vol. 350. — P. 1104–1107.
- Ivankov D. N., Finkelstein A. V. Solution of the Levinthal's paradox and a physical theory of protein folding times // *Biomolecules*. — 2020. — Vol. 10, № 2. — P. E250.
- Ivankov D. N., Garbuzynskiy S. O., Alm E., Plaxco K. W., Baker D., Finkelstein A. V. Contact order revisited: Influence of protein size on the folding rate // *Protein Sci.* — 2003. — Vol. 12. — P. 2057–2062.
- Isenman D. E., Lancet D., Pecht I. Folding pathways of immunoglobulin domains. The folding kinetics of the C_γ3 domain of human IgG1 // *Biochemistry*. — 1979. — Vol. 18. — P. 3327–3336.
- Jackson S. E. How do small single-domain proteins fold? // *Fold. Des.* — 1998. — Vol. 3. — P. R81–R91.
- Jacobson H., Stockmayer W. Intramolecular reaction in polycondensations. I. The theory of linear systems // *J. Chem. Phys.* — 1950. — Vol. 18. — P. 1600–1606.
- Jones D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices // *J. Mol. Biol.* — 1999. — Vol. 292. — P. 195–202. — Current version of the program: <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> (Дата обращения: 14.04.2021).
- Karplus M. The Levinthal paradox: yesterday and today // *Fold. Des.* — 1997. — Vol. 2, Suppl. 1. — P. S69–S75.
- Kolb V. A., Makeev E. V., Spirin A. S. Folding of firefly luciferase during translation in a cell-free system // *EMBO J.* — 1994. — Vol. 13. — P. 3631–3637.
- Komar A. A., Kommer A., Krashennnikov I. A., Spirin A. S. Cotranslational folding of globin // *J. Biol. Chem.* — 1997. — Vol. 272. — P. 10646–10651.

- Lappalainen I., Hurley M. G., Clarke J. Plasticity within the obligatory folding nucleus of an immunoglobulin-like domain // *J. Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 375. — P. 547–559.
- Leopold P. E., Montal M., Onuchic J. N. Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — Vol. 89. — P. 8721–8725.
- Levinthal C. Are there pathways for protein folding? // *J. Chim. Phys. Chim. Biol.* — 1968. — Vol. 65. — P. 44–45.
- Levinthal C. How to fold graciously // *Mössbauer spectroscopy in biological systems: Proceedings of a meeting held at Allerton House, Monticello, Illinois* / P. Debrunner, J. C. M. Tsibris, E. Munck (eds.), pp. 22–24. — Urbana-Champaign, IL: University of Illinois Press, 1976.
- Levitt M., Chothia C. Structural patterns in globular proteins // *Nature.* — 1976. — Vol. 261. — P. 552–558.
- Libich D. S., Tugarinov V., Clore G. M. Intrinsic unfoldase/foldase activity of the chaperonin GroEL directly demonstrated using multinuclear relaxation-based NMR // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Vol. 112. — P. 8817–8823.
- Lim V. I. Structural principles of the globular organization of protein chains. A stereochemical theory of globular protein secondary structure // *J. Mol. Biol.* — 1974a. — Vol. 88. — P. 857–872.
- Lim V. I. Algorithm for prediction of α -helices and β -structural regions in globular proteins // *J. Mol. Biol.* — 1974b. — Vol. 88. — P. 873–894.
- Makarov D. E., Plaxco K. W. The topomer search model: A simple, quantitative theory of two-state protein folding kinetics // *Protein Sci.* — 2003. — Vol. 12. — P. 17–26.
- Marchenko N. Y., Garbuzynskiy S. O., Semisotnov G. V. Molecular chaperones under normal and pathological conditions // «Molecular pathology of proteins» / D. I. Zabolotny (ed.), pp. 57–89. — NY.: Nova Science Publishers, 2009.
- Marchenko N. Y., Marchenkov V. V., Semisotnov G. V., Finkelstein A. V. Strict experimental evidence that apo-chaperonin GroEL does not accelerate protein folding, although it does accelerate one of its steps // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Vol. 112. — P. E6831–6832.
- Matouschek A., Kellis J. T., Serrano L., Fersht A. R. Transient folding intermediates characterized by protein engineering // *Nature.* — 1990. — Vol. 346. — P. 440–445.
- Mukherjee S., Chowdhury P., Bunagan M. R., Gai F. Folding kinetics of a naturally occurring helical peptide: implication of the folding speed limit of helical proteins // *J. Phys. Chem. B.* — 2008. — Vol. 112. — P. 9146–9150.
- Muñoz V., Thompson P. A., Hofrichter J., Eaton W. A. Folding dynamics and mechanism of beta-hairpin formation // *Nature.* — 1997. — Vol. 390. — P. 196–199.
- Murzin A. G., Finkelstein A. V. General architecture of α -helical globule // *J. Mol. Biol.* — 1988. — Vol. 204. — P. 749–770.
- Ngo J. T., Marks J. Computational complexity of a problem in molecular structure prediction // *Protein Eng.* — 1992. — Vol. 5. — P. 313–321.

- Nölting B. Protein folding kinetics: Biophysical methods. Chap. 10, 11, 12. — NY.: Springer, 2010.
- Neira J. L., Fersht A. R. Exploring the folding funnel of a polypeptide chain by biophysical studies on protein fragments // *J. Mol. Biol.* — 1999a. — Vol. 285. — P. 1309–1333.
- Neira J. L., Fersht A. R. Acquisition of native-like interactions in C-terminal fragments of barnase // *J. Mol. Biol.* — 1999b. — Vol. 287. — P. 421–432.
- Petsko G. A., Ringe D. Protein structure and function. Chap. 1. — London: New Science Press, 2004.
- Phillips D. C. The three-dimensional structure of an enzyme molecule // *Sci. Am.* — 1966. — Vol. 215. — P. 78–90.
- Plaxco K. W., Simons K. T., Baker D. Contact order, transition state placement and the refolding rates of single domain proteins // *J. Mol. Biol.* — 1998. — Vol. 277. — P. 985–994.
- Privalov P. L. Stability of proteins: small globular proteins // *Adv. Protein Chem.* — 1979. — Vol. 33. — P. 167–241.
- Ptitsyn O. B. Molten globule and protein folding // *Adv. Protein Chem.* — 1995. — Vol. 47. — P. 83–229.
- Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V. Similarities of protein topologies: evolutionary divergence, functional convergence or principles of folding? // *Quart. Rev. Biophys.* — 1980. — Vol. 13. — P. 339–386.
- Ptitsyn O. B., Finkelstein A. V. Theory of protein secondary structure and algorithm of its prediction // *Biopolymers.* — 1983. — Vol. 22. — P. 15–25.
- Robson B., Vaithilingam A. Protein folding revisited // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* — 2008. — Vol. 84. — P. 161–202.
- Rollins G. C., Dill K. A. General mechanism of two-state protein folding kinetics // *J. Am. Chem. Soc.* — 2014. — Vol. 136. — P. 11420–11427.
- Ruckenstein E., Berim G. Kinetic Theory of nucleation. — Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016. — P. 231–250.
- Šali A., Shakhnovich E., Karplus M. Kinetics of protein folding. A lattice model study of the requirements for folding to the native state // *J. Mol. Biol.* — 1994. — Vol. 235. — P. 1614–1636.
- Segava S., Sugihara M. Characterization of the transition state of lysozyme unfolding. I. Effect of protein-solvent interactions on the transition state // *Biochemistry.* — 1984. — Vol. 23. — P. 2473–2488.
- Senior A. W., Evans R., Jumper J., Kirkpatrick J., Sifre L., Green T., Qin C., Židek A., Nelson A. W. R., Bridgland A., Penadones H., Petersen S., Simonyan K., Crossan S., Kohli P., Jones D. T., Silver D., Kavukcuoglu K., Hassabis D. Protein structure prediction using multiple deep neural networks in the 13th Critical Assessment of Protein Structure Prediction (CASP13) // *Proteins.* — 2019. — Vol. 87. — P. 1141–1148.
- Senior A. W., Evans R., Jumper J., Kirkpatrick J., Sifre L., Green T., Qin C., Židek A., Nelson A. W. R., Bridgland A., Penadones H., Petersen S., Simonyan K., Crossan S., Kohli P., Jones D. T., Silver D., Kavukcuoglu K., Hassabis D. Improved protein struc-

- ture prediction using potentials from deep learning // *Nature*. — 2020. — Vol. 577. — P. 706–710.
- Schulz G. E., Barry C. D., Friedman J., Chou P. Y., Fasman G. D., Finkelstein A. V., Lim V. I., Ptitsyn O. B., Kabat E. A., Wu T. T., Levitt M., Robson B., Nagano K. Comparison of predicted and experimentally determined secondary structure of adenyl kinase // *Nature*. — 1974. — Vol. 250. — P. 140–142.
- Shakhnovich E. I., Finkelstein A. V. Theory of cooperative transitions in protein molecules. I. Why denaturation of globular protein is the first order phase transition // *Biopolymers*. — 1989. — Vol. 28. — P. 1667–1680.
- Shakhnovich E. I., Gutin A. M. Implications of thermodynamics of protein folding for evolution of primary sequences // *Nature*. — 1990. — Vol. 346. — P. 773–775.
- Shakhnovich E. I. Protein folding thermodynamics and dynamics: where physics, chemistry, and biology meet // *Chem. Rev.* — 2006. — Vol. 106. — P. 1559–1588.
- Shaw D. E., Maragakis P., Lindorff-Larsen K., Piana S., Dror R. O., Eastwood M. P., Bank J. A., Jumper J. M., Salmon J. K., Shah Y., Wriggers W. Atom-level characterization of structural dynamics of proteins // *Science*. — 2010. — Vol. 330. — P. 341–346.
- Steinhofel K., Skaliotis A., Albrecht A. A. Landscape analysis for protein folding simulation in the H-P model // *Lecture Notes in Computer Science*. — 2006. — Vol. 4175. — P. 252–261.
- Thirumalai D. From minimal models to real proteins: time scales for protein folding kinetics // *J. Phys. I. (Orsay, Fr.)*. — 1995. — Vol. 5. — P. 1457–1469.
- Tanford C. Protein denaturation // *Adv. Protein Chem.* — 1968. — Vol. 23. — P. 121–282.
- Tsutsui Y., Cruz R. D., Wintrode P. L. Folding mechanism of the metastable serpin α 1-antitrypsin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2012. — Vol. 109. — P. 4467–4472.
- Unger R., Moult J. Finding the lowest free energy conformation of a protein is an NP-hard problem: proof and implications // *Bull. Math. Biol.* — 1993. — Vol. 55. — P. 1183–1198.
- Wallin S., Chan H. S. A critical assessment of the topomer search model of protein folding using a continuum explicit-chain model with extensive conformational sampling // *Protein Sci.* — 2005. — Vol. 14. — P. 1643–1660.
- Wang J., Oliveira R. J., Chu X., Whitford P. C., Chahine J., Han W., Wang E., Onuchic J. N., Leite V. B. Topography of funneled landscapes determines the thermodynamics and kinetics of protein folding // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2012. — Vol. 109. — P. 15763–15768.
- Wensley B. G., Gärtner M., Choo W. X., Batey S., Clarke J. Different members of a simple three-helix bundle protein family have very different folding rate constants and fold by different mechanisms // *J. Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 390. — P. 1074–1085.
- Wetlaufer D. B. Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1973. — Vol. 70. — P. 697–701.
- Wolynes P. G. Folding funnels and energy landscapes of larger proteins within the capillarity approximation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94. — P. 6170–6175.

- Wolynes P. G. Evolution, energy landscapes and the paradoxes of protein folding // *Biochimie*. — 2015. — Vol. 119. — P. 218–230.
- Wolynes P. G., Onuchic J. N., Thirumalai D. Navigating the folding routes // *Science*. — 1995. — Vol. 267. — P. 1619–1620.
- Yang J., Anishchenko I., Park H., Peng Z., Ovchinnikov S., Baker D. Improved protein structure prediction using predicted interresidue orientations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2020. — Vol. 117. — P. 1496–1503.
- Zana R. On the rate determining step for helix propagation in the helix-coil transition of polypeptides in solution // *Biopolymers*. — 1975. — Vol. 14. — P. 2425–2428.
- Zwanzig R., Szabo A., Bagchi B. Levinthal's paradox // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1992. — Vol. 89. — P. 20–22.

Solution of the protein folding enigma

Sergiy O. Garbuzynskiy¹, Alexei V. Finkelstein^{1,2,3,}*

¹ Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

² Biology Department, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, 1-12 Leninskie Gory 1-12, Russia

³ Biotechnology Department, Lomonosov Moscow State University,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia

*E-mail: afinkel@vega.protres.ru

The ability of protein chains to spontaneously form their spatial structures is a long-standing puzzle in molecular biology. Experimentally measured times of protein folding range from microseconds to hours: the difference (10–11 orders of magnitude) is the same as that between the life span of a mosquito and the age of the Universe. This review describes physical theories of folding rates. Here, a special role is played by the point of thermodynamic (and kinetic) equilibrium between the native and unfolded states of the chain; here, the theory obtains the simplest form. Theory outlines the range of protein folding rates in a good agreement with experiment. An analysis performed at the level of formation and assembly of protein secondary structures outlines the upper limit of protein folding times (i. e., of the time of search for the most stable fold). Both theories come to essentially the same results, which agree with experiment. In addition, they predict the maximal size of protein domains that fold under solely thermodynamic (rather than kinetic) control, the range sizes of protein domains folding under a kinetic «control of their complexity», and explain the observed maximal size of the «foldable» protein domains.

Keywords: protein folding, Levinthal's paradox, folding funnel, phase separation, free-energy landscape, assembly of the protein secondary structure elements.

«ДИНАМИЧЕСКИЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПОРТРЕТ» КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ С НАНОРАЗМЕРНЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

Р. Г. Ефремов^{1,2,3,*}

В обзоре рассмотрены атомистические аспекты структурной организации и динамического поведения биомембран — от модельных гидратированных липидных бислоев до природных клеточных мембран. Основное внимание уделено описанию свойств интерфейса липидный бислой/вода в рамках концепции так называемого «динамического молекулярного портрета» (ДМП). Этот термин обозначает совокупность распределений на поверхности раздела фаз зависящих от времени различных физико-химических свойств, присущих как модельным, так и природным мембранам. Одной из важнейших особенностей биомембран является их мозаичность, которая выражается в постоянном присутствии латеральных неоднородностей, размеры и время жизни которых варьируют в широком диапазоне — от 1 до 10^3 нм и от 0,1 нс до миллисекунд. В дополнение к относительно хорошо изученным макроскопическим доменам (так называемым «рафтам») все больший интерес вызывает анализ микро- и нанокластеров (или доменов), которые формируют мгновенную картину распределения структурных, динамических, гидрофобных, электрических и др. свойств на границе раздела мембрана–вода. Это связано с тем, что такие нанокластеры (НК) играют ключевую роль в функционировании клеточных мембран. Поэтому требуется понимание атомистических аспектов явлений, связанных с НК. Физические механизмы, обуславливающие подобную картину в таких мезоскопических надмолекулярных системах, какими являются биомембраны, до сих пор детально не описаны. Поскольку анализ в экспериментах указанных явлений с требуемым пространственно-временным разрешением чрезвычайно затруднен, в настоящее время все большее значение приобретают методы вычислительного эксперимента. В обзоре описаны результаты экспериментальных и теоретических исследований НК, спонтанно образующихся в липидных мембранах. Основное внимание уделено методам обнаружения подобных доменов, установлению их пространственно-временных параметров и молекулярных механизмов образования. Кратко обсуждается биологическая роль НК в клеточных мембранах. Понимание таких эффектов создает основу для рационального проектирования новых перспективных лекарственных средств, терапевтических подходов и искусственных мембранных материалов с заданными свойствами.

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия.

² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия.

³ Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия.

* E-mail: efremov@nmr.ru

Ключевые слова: липидный бислой, биомембрана, динамический молекулярный портрет, латеральная неоднородность, нанокластер.

1. Введение

Работа посвящена анализу состояния исследований в области молекулярной биофизики клеточных мембран. Учитывая название настоящего сборника: «Горизонты биофизики», автор видит свою задачу в кратком изложении современного состояния дел, в прогнозировании развития предметной области в пределах горизонта, т. е. «видимого вокруг автора-наблюдателя пространства» (предстоящие ~2–3 года), и, наконец, в попытке немного «заглянуть за горизонт» — с временным охватом до 5 лет. Говоря о «горизонте» в какой-либо области науки, необходимо учитывать имеющийся на текущий момент уровень развития данной предметной сферы и динамику ее развития. По определению термина «горизонт», именно от этих факторов зависит, на каком «расстоянии» от наблюдателя (автора) находятся те или иные явления природы, которые предстоит открыть в ходе приближения к «линии горизонта», и как быстро ее можно достичь, учитывая текущую скорость движения. Исходя из этих предпосылок, план настоящего мини-обзора выглядит следующим образом: 1) характеристики латеральных неоднородностей в липидных бислоях; 2) молекулярные механизмы формирования нанокластеров (НК); 3) согласие между экспериментальными и расчетными данными; 4) представление НК путем картирования свойств поверхности мембраны.

Необходимо отметить, что в обзоре будут рассмотрены лишь мембранные объекты и явления с размерами до ~ 10 нм (что соответствует нескольким молекулам липидов в бислое) и с временами жизни ~0,1÷100 нс. Отметим, что в таком случае за рамками рассмотрения остаются объекты и физические явления с пространственно-временными характеристиками в других диапазонах. Например, фазовые переходы, формирование/распад «рафтов», слияние мембран, явления глобального «мембранного ответа» при встраивании пептидов, белков и других внешних агентов.

Помимо барьерной функции, заключающейся в отделении содержимого клеток или клеточных органелл от внешней среды, липидный бислой биологических мембран играет важную роль во многих биохимических процессах в живых организмах. До 80 % массы клеточных мембран составляют белки, углеводы, стероиды и другие нелипидные компоненты, которые определяют специфичность и широкий спектр биологической активности мембран: молекулярный и ионный транспорт, клеточную коммуникацию и сигнализацию, слияние мембран и т. д. [1, 2]. В то же время согласованное функционирование таких слож-

ных супрамолекулярных ансамблей должно строго регулироваться, чтобы обеспечить быструю, надежную и адекватную реакцию мембран на внешние/внутренние сигналы и патологические угрозы [3, 4]. Тонкие молекулярные детали этого удивительного механизма работы клеточных мембран еще далеки от понимания, хотя уже ясно, что мембранные липиды представляют собой очень важный элемент «головоломки». Вместо того, чтобы служить неким пассивным континуумом с полярными поверхностями и гидрофобным ядром, в котором различные белки и другие молекулы могут осуществлять свои функции, многокомпонентные липидные бислои клеточных мембран представляют собой высокоактивную, динамичную, тонко настраиваемую и самоорганизующуюся среду [5].

К настоящему времени достоверно показано, что упомянутые аспекты функционирования клеточных мембран во многом обусловлены неоднородностью характеристик их липидного «скелета», проявляющейся на различных пространственно-временных масштабах. Это — фундаментальное свойство, которое требует глубокого анализа. Очевидно, что гетерогенная организация липидных мембран определяется физической и химической природой составляющих их молекул, в первую очередь амфифильных липидов, а также их многообразием — помимо белков, природные мембраны содержат сотни типов липидов и других соединений. Отличия в полярных головках и/или ацильных цепях молекул липидов приводят к большому разнообразию межмолекулярных взаимодействий и, следовательно, к неидеальному смешиванию липидов в бислоях [6, 7].

Часто, говоря о гетерогенной природе клеточных мембран, имеют в виду их «слоистую» структуру — зоны с сильно отличающимися физико-химическими свойствами представляют собой параллельные слои, чередующиеся вдоль нормали к плоскости липидного бислоя. Именно такая организация биомембран создает надежный барьер, защищающий содержимое клетки от внешней среды, обеспечивает правильное встраивание, сворачивание и функционирование многочисленных мембранных белков, мембраноактивных пептидов и других молекул. Однако не менее важна картина латерального распределения свойств этих слоев. Известно, что они также неоднородны по ряду ключевых параметров — плотности компонентов мембраны (липидов, малых молекул, воды, ионов и др.), распределению электрических и полярных свойств и т. д. Наиболее значимыми среди этих областей (слоев) являются границы раздела мембрана–вода. Особенности организации этих поверхностей во многом определяют механизмы распознавания клеточных мембран и моделирующих их миметиков внешними агентами, такими как белки, пептиды и их надмолекулярные комплексы, включая вирусы и др.

Следует также иметь в виду, что картина латеральных неоднородностей меняется во времени, в том числе и в состояниях равновесия или квазиравновесия (насколько о них вообще можно говорить в живой клетке). Как будет показано ниже, пространственно-временные масштабы неоднородностей (доменов, кластеров) варьируют в широком диапазоне — от 1 до 10^3 нм и от 0,1 нс до миллисекунд. Каковы свойства границы раздела мембрана–вода, которые проявляют неоднородность их латерального распределения? Наиболее важными являются: (1) структурные характеристики, выраженные в терминах плотности молекул и отдельных атомов, а также описывающие рельеф молекулярной поверхности липидного бислоя; (2) поверхностное распределение гидрофобных/гидрофильных и/или электрических свойств; (3) динамические параметры компонентов мембраны, обусловленные их латеральной диффузией в различных пространственных масштабах — от интегральных макроскопических средних до траекторий отдельных молекул и входящих в них групп.

Всю совокупность рассмотренных типов динамических неоднородностей удобно обсуждать в рамках концепции так называемой «мозаичной картины» границы раздела мембрана–вода. Иными словами, это своего рода «динамический молекулярный портрет» (ДМП) поверхности мембраны, параметры которого уникальны для липидного бислоя определенного состава, находящегося в конкретных условиях (фазовое состояние, степень гидратации, наличие ионов и «внешних агентов», включая интегральные и периферические мембранные белки, пептиды и другие молекулы, взаимодействующие с клеточной мембраной). Учитывая специфику организации мембран, обе их поверхности могут быть достаточно точно аппроксимированы плоскостью (по крайней мере, в молекулярных масштабах). Это позволяет представить соответствующие ДМП в виде двумерных (2D) карт латерального распределения свойств, которые эволюционируют с течением времени. В отличие от трехмерных (3D) объектов, гораздо удобнее и эффективнее работать с 2D-распределениями в виде ДМП, так как их можно детально проанализировать с помощью численных методов: рассчитать их средние характеристики и соответствующие стандартные отклонения; подвергнуть цифровой фильтрации и наглядно визуализировать; карты различных состояний одной и той же системы или разных систем можно сравнивать между собой и т. д. (подробнее см. раздел 5 ниже). Отметим, что аналогичные технологии работы с ДМП используют также и для анализа неплоских биологических молекулярных объектов, в частности, глобулярных белков и/или их отдельных структурных элементов, например, альфа-спиралей и т. д. [8]. В таких случаях ДМП создают путем проецирования свойств молекулярной поверхности на поверхность сферы [9] или цилиндра [10] соответственно.

Учитывая тот факт, что клеточные мембраны буквально «нашпигованы» белками и другими молекулами [11], изучение эффектов латеральной гетерогенности

сильно затруднено из-за небольших площадей «свободного» липидного бислоя. Поэтому такие работы обычно проводят на модельных системах, имитирующих клеточные мембраны, — липидных бислоях, состоящих из одного или нескольких типов липидов. Еще одной особенностью исследования ДМП биомембран является диапазон анализируемых пространственно-временных характеристик. Наиболее изученными являются долгоживущие домены (кластеры) относительно больших размеров, превышающих 100 нм, — липидные «рафты» и микродомены. В то же время, по понятным причинам, более мелкие неоднородности — так называемые «нанодомены» или нанокластеры (НК) — гораздо менее изучены ввиду технических ограничений современных экспериментальных методов. Характерный размер НК составляет менее 10 нм, что соответствует только нескольким плотно упакованным липидам. Кроме того, время жизни НК часто не превышает нескольких наносекунд. Поэтому такие системы все еще находятся за пределами разрешения, позволяющего напрямую регистрировать их в экспериментах. Обстоятельные современные обзоры [12–15] дают исчерпывающую картину текущего состояния исследований в этой области.

Поскольку речь идет о быстро меняющихся распределениях наноразмерных объектов, может возникнуть ощущение, что из-за усреднения по большому числу состояний (например, полученных в ходе молекулярной динамики (МД) или измеренных в эксперименте) связанные с НК явления не способны существенно повлиять на макроскопические свойства липидного бислоя. Но это совсем не так! В частности, роль микроскопических неоднородностей в мембранах вытекает из того факта, что самоорганизация и функционирование наиболее важных классов мембранных белков — рецепторов, ионных каналов, ферментов и т. д. — могут критическим образом зависеть от свойств так называемых «кольцевых» липидов, образующих один-два ближайших молекулярных слоя (например, [13, 16, 17]). Часто характеристики последних сильно отличаются от параметров «свободного» липидного бислоя мембраны. Другим примером является то, что локальные (порядка 10 нм) дефекты кривизны на поверхности мембраны могут определять связывание в этих областях ряда важных мембраноактивных пептидов [18], влияют на процессы слияния мембран [19] и др. Таким образом, необходимо понять атомистические аспекты формирования и эволюции ДМП клеточных мембран. Этот подход основан на детальном анализе поведения НК: их идентификации, характеристике и определении соответствующих атомистических механизмов формирования/диссипации. Некоторые аспекты проблемы обсуждаются во всесторонних обзорах последних лет [12–15, 20], однако в настоящей работе автор хотел бы изложить свое видение проблемы описания природы латеральной гетерогенности поверхности мембран. В его основе лежат результаты его собственных многолетних исследований в области вычислительной молекулярной биофизики мембран.

2. Характеристики латеральных неоднородностей в липидных бислоях

Латеральные неоднородности наноразмерного масштаба (нанокластеры, НК) в липидом бислое клеточных и модельных мембран можно разделить на две большие группы: возникающие спонтанно и в результате воздействия внешних (по отношению к компонентам липидного бислоя) факторов — других молекул (например, пептидов и белков), изменения параметров среды (температуры, степени гидратации, присутствия ионов и пр.), искривления мембран и пр. Несомненно, эти процессы взаимосвязаны, поскольку для того, чтобы в мембране под действием сторонних влияний на базе НК возник тот или иной тип ДМП, необходимо, чтобы сам невозмущенный липидный бислой (включая молекулы воды и ионы) был в принципе способен подобные наноразмерные структуры формировать спонтанно. Здесь мы рассмотрим только подобные латеральные НК и их характеристики, в то время как индуцированные внешними факторами неоднородности, которые в гораздо большей степени участвуют в биологическом действии мембран, требуют отдельного рассмотрения.

Разделы ниже организованы следующим образом: во-первых, мы обсудим имеющиеся данные по обнаружению и характеристике НК в экспериментах с модельными липидными бислоями, а также продемонстрируем возможности наблюдения наноразмерных объектов в мембранах живых клеток. Затем мы сосредоточимся на критическом рассмотрении латеральных неоднородностей атомного масштаба в мембранах с использованием всего арсенала доступных современных методов. Наконец, мы обратимся к результатам анализа НК с помощью вычислительных подходов.

2.1. Регистрация НК в прямых экспериментах

2.1.1. Модельные липидные мембраны

Простейшими системами, имитирующими клеточную мембрану, являются липидные бислои, состоящие из различных типов липидов. Понимание на молекулярном уровне основных тенденций в их структурной и динамической организации в различных условиях может пролить свет на поведение реальных мембран. Поэтому исследования смешанных липидных бислоев уже давно вызывают значительный интерес [21]. Наиболее подходящей системой, позволяющей охарактеризовать «микродомены» в жидкокристаллическом состоянии, является бислой, состоящий из двух типов фосфолипидов — в таких условиях многие из них демонстрируют неидеальное смешивание [22–25]. Однако гораздо больше экспериментов было проведено для более сложных систем — липидных бислоев из смеси фосфатидилхолинов (ФХ), сфингомиелина (СМ) и холестерина (ХС). Этот выбор во многом обусловлен тем, что такое сочетание мем-

бранных компонентов характерно для формирования хорошо изученных макроскопических липидных доменов высокой плотности — так называемых «рафтов», или «плотов» (см. обзор [13]).

Одно из первых упоминаний о наноразмерных молекулярных кластерах можно найти в работе [26]. Этот термин использовали для обозначения аномалий ряда физических свойств органических жидкостей, наблюдаемых вблизи точки замерзания. Подобные кластеры были описаны как короткоживущие образования из соседних молекул, демонстрирующих скоординированные движения. Было высказано предположение, что средняя молекулярная плотность внутри кластера выше, чем в свободном растворе, причем для молекул в кластерах наблюдается заторможенность внутреннего вращения. Таким образом, когда образуется динамический кластер, его участники движутся как единое целое в течение времени существования группы, и, в частности, коэффициент вязкости для кластеризованных молекул жидкости больше, чем для остальных. Доля кластеров, присутствующих в алканах чуть выше температуры плавления, составила около 10 %, а средний размер кластеров — 3–4 молекулы. Наличие кластеров также использовали для объяснения аномалий в данных по теплоемкости для ряда *n*-алканов [27].

Первые экспериментальные указания на то, что в модельных липидных мембранах присутствуют неоднородности атомарного масштаба начали получать еще с 1970-х гг. на основе данных рассеяния рентгеновского излучения [28], использования спиновых зондов в ЭПР-спектроскопии [29] и малоугловой дифракции нейтронов [30]. В этих работах обсуждали неоднородности в области ацильных цепей, включая области, граничащие с полярными головками липидов. Было высказано предположение, что такие кластеры представляют собой динамические, более плотно упакованные образования в липидном бислое [29]. Позже было установлено (например, [31]), что граница раздела мембрана-вода также обладает подобной неоднородностью свойств. Именно об этом далее и пойдет речь.

Важная информация о динамических НК была получена с помощью различных биофизических методов, таких как фёрстеровский резонансный перенос энергии (ФРПЭ) [32, 33], интерферометрическая микроскопия рассеяния (iSCAT, от «interferometric scattering microscopy») [34], микроскопия на основе подавления спонтанного испускания (STED-микроскопия, от «stimulated emission depletion microscopy») [35], дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) [32] и их комбинации. Размеры наблюдаемых НК находились в диапазоне 5–60 нм. В частности, Yano и др. [36] изучили детали их образования с помощью стеарил-СМ (ССМ), используя измерения ФРПЭ в липидных бислоях, содержащих ССМ и его энантиомер (энт-ССМ), диолеилфосфатидилхолин (ДОФХ) и ХС. В отличие от однородных доменов, наблюдаемых с использованием микроско-

пии, анализ с применением флуоресцентно меченых ССМ — доноров и акцепторов ФРПЭ — продемонстрировал отчетливые различия в солокализации ССМ и энт-ССМ на расстояниях ~ 1 нм. Показано, что в жидкоупорядоченном состоянии (L_o) существуют отдельные наносубдомены. Их средний размер уменьшался с повышением температуры, и в физиологических условиях было обнаружено, что субдомены имеют радиус 1–10 нм и время жизни менее 10 мкс. G. de Wit и соавт. [34] удалось добиться динамической визуализации наноскопических липидных доменов без каких-либо меток. Используя эффекты разделения фаз в бислоях на границе раздела капель, они зарегистрировали диффузию доменов радиусом до 50 нм и наблюдали образование НК, разрушение и динамическую коалесценцию со временем жизни домена 220 ± 60 мс.

Следует отметить, что для характеристики динамических НК в липидных бислоях необходимо, чтобы вышеупомянутые экспериментальные методы работали почти на пределе своих разрешающих возможностей. Например, для оптических методов размеры НК уже лежат за дифракционным пределом. В некоторых случаях эффективный способ повышения разрешающей способности заключается в совместном использовании методов с различной пространственной чувствительностью. Например, последовательное использование ФРПЭ и малоуглового рассеяния нейтронов (МРН) позволило значительно снизить неопределенность в оценках размера нанодоменов для смесей ДОФХ и пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (ПОФХ) с СМ/ХС [32]. Данные ФРПЭ позволили обнаружить сосуществующие домены для обеих смесей, в то время как измерения МРН не выявили образования доменов для СМ/ПОФХ/ХС. Вместе эти результаты показывают, что жидкие домены в таких системах имеют радиус от 2 до 7 нм при 25 °С. Еще один способ повышения разрешающей способности стандартных биофизических методов был представлен в работе [37]. Для оценки динамической наноразмерной организации модельных биологических мембран авторы применили корреляционную флуоресцентную спектроскопию на плоских плазмонных антенных решетках с различными размерами наноструктур. Используя преимущества сильно сфокусированного возбуждающего излучения большой мощности, обеспечиваемого наноантеннами, а также их строгую планарность, они смогли исследовать области мембраны размером до 10 нм с микросекундным временным разрешением. В результате полученные данные по диффузии согласовались с сосуществованием переходных НК как в жидкоупорядоченных (L_o), так и в жидконеупорядоченных (L_d) микроскопических фазах многокомпонентных липидных бислоев. Эти результаты позволили заключить, что характерное время жизни НК лежит в диапазоне от 30 до 150 мкс, а их размеры составляют около 10 нм. Сосуществование микромасштабного разделения фаз с наноскопическими доменами привело к предположению, что такие переходные образования в модельных бислоях могут быть аналогичны

тем, которые присущи и живым клеткам. Вместе с тем, в отсутствие рафт-стабилизирующих белков они являются короткоживущими.

В отличие от ситуации с НК, существующими внутри более крупных L_o -доменов, обычные экспериментальные методы (например, оптическая спектроскопия) часто не позволяют обнаружить большие домены в водно-липидных смесях. Однако латеральные неоднородности, тем не менее, регистрируют, используя методы с пространственным разрешением в нанометровом масштабе. Т. Enoki и соавт. [38] предложили простой и доступный подход к регистрации доменов, размеры которых лежат за пределами оптического разрешения (< 200 нм). Так, в бислоях дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ)/ПОФХ/ХС и СМ/ПОФХ/ХС размеры нанодоменов были измерены путем объединения данных ФРПЭ и результатов расчетов методом Монте-Карло (МК). Указанный радиус НК составлял 7,5–10 нм и ~ 5 нм для двух смесей, соответственно. Существование НК в более крупных фазовых доменах L_o было обнаружено в экспериментах по флуоресценции и ^2H ЯМР [39]. Например, анализ методом КР-микроскопии с использованием диин-замещенных СМ показали, что богатые СМ субдомены с большой вероятностью встречаются в центральной области домена L_o [40]. Тот факт, что субдомены нанометрового размера часто существуют внутри гораздо более крупных доменов L_o , затрудняет прямое обнаружение НК. Чтобы различить эффекты НК в экспериментах, Р. Pathak и соавт. [33] предложили использовать детергент Triton X-100 для индуцирования образования L_o -доменов в смесях СМ/ПОФХ/ХС. Основанные на использовании ФРПЭ методы тушения флуоресценции нитроксидов с Тритоном X-100 и без него при различных температурах показали существование НК в этой смеси, и их радиус постепенно уменьшался с ≥ 15 нм до < 4 нм по мере повышения температуры с 10 до 45 °C.

Последние достижения в области технологий регистрации одиночных молекул (SPT, от «single particle technology») позволили обнаружить со сверхвысоким пространственно-временным разрешением НК в модельных мембранах. Так, Н. Wu и др. исследовали организацию и динамику одиночных молекул в рафтах, наблюдая за их латеральной диффузией в мембранах, нанесенных на подложки из слюды [41]. Используя метод iSCAT и наночастицы золота в качестве меток, движение отдельных липидов регистрировали с помощью SPT-технологии с точностью до 1 нм и микросекундным временным разрешением. Процессы попадания отдельных молекул в рафт-имитирующие домены (фаза L_o) и выхода из них визуализировали с помощью непрерывной съемки сверхвысокой четкости. В результате наличие НК в фазе L_o было доказано в микросекундном временном диапазоне. Их характерный размер составлял около 10 нм. Приведенные выше результаты являются собой прямые экспериментальные доказательства неоднородной молекулярной организации фазы L_o , демонстрируя

таким образом новый взгляд на то, как рафты захватывают и удерживают молекулы липидов клеточных мембран. Чтобы преодолеть предел пространственного разрешения, присущий обычным приложениям ФРПЭ, который определяется фёрстеровским радиусом (R_0) хромофоров, Р. Pathak и др. [42] предложили использовать метод двойной ФРПЭ-пары, в котором только один из хромофоров имел значение R_0 , которое было достаточно мало для регистрации НК. Используя этот подход, авторы измерили температурную зависимость образования доменов и ультра-нанодоменов для везикул, состоящих из различных смесей, содержащих липиды с высокими (СМ или дипальмитоилфосфатидилхолин, ДПФХ) либо низкими (ДОФХ или ПОФХ) значениями температуры плавления (T_m), причем при различной концентрации холестерина. Полученные результаты позволили предположить, что природные липиды клеток млекопитающих способны усиливать процесс формирования НК на фоне образования более крупных доменов. Тот факт, что размер домена более чувствителен к составу мембраны, чем сам процесс формирования домена, важен для понимания регуляции свойств мембранных неоднородностей *in vivo*.

2.1.2. Нанодомены в клеточных мембранах

В отличие от модельных липидных мембран, которые обычно состоят из нескольких типов липидов и часто включают ХС или его аналоги, гораздо меньше экспериментальных работ посвящено изучению НК в природных клеточных мембранах. Во-первых, это связано с техническими трудностями подготовки образцов и изучения их доменной организации на пределе пространственно-временного разрешения существующих современных методов. Во-вторых, природные мембраны предъявляют строгие требования к инструментальным измерениям — последние должны быть неинвазивными, чтобы не влиять на жизнеспособность клеток. Наиболее эффективными на сегодняшний день являются методы оптической спектроскопии. Так, С. Eggeling и соавт. [43] продемонстрировали способность флуоресцентной STED-наноскопии дальнего поля детектировать диффузию одиночных молекул липидов в наноразмерных областях плазматической мембраны живых клеток. Достигнутое пространственное разрешение было примерно в 70 раз ниже дифракционного предела. Это позволило обнаружить мембрано-связанные белки, которые были временно (на ~ 10–20 мс) иммобилизованы в НК диаметром < 20 нм, причем свойства этих доменов зависели от присутствия холестерина. Был сделан вывод, что предложенный подход имеет большие перспективы в изучении динамики биомолекул в живых клетках. Сходные результаты для молекул СМ, находящихся в НК, обогащенных ХС, были получены методом корреляционной флуоресцентной спектроскопии при изучении клеточных мембран, адсорбированных на наноан-

тенных с различными параметрами зазоров [44]: характерные размеры и время жизни НК составили 10 нм и 100 мкс, соответственно.

Биологически значимый и потенциально перспективный подход к изучению биомолекулярных нанообъектов *in vivo* был недавно описан в работе [45]. Авторы разработали мультимодальную платформу визуализации без искусственно введенных меток для измерения внутри клеток структуры и динамики макромолекул с разрешением ~ 20 нм/ ~ 1 мс. В то же время, эффективность подхода была продемонстрирована на хроматине, а к клеточным мембранам пока не применялась. Последние слишком малы, чтобы их можно было изучать напрямую стандартными биофизическими методами, такими как оптическая микроскопия. Как следствие, исследование мембран в наномасштабе проводят *ex vivo* или в присутствии экзогенных меток, используемых для усиления контраста и придания специфичности регистрируемым сигналам. Чтобы преодолеть это ограничение, была предложена стратегия изотопного мечения грамположительной бактерии *Bacillus subtilis* для исследования с наноразмерным разрешением структурной организации ее плазматической мембраны *in vivo* [46]. Авторы независимо метили клетку и ее мембрану определенными количествами водорода (H) и дейтерия (D), которые обладают различными свойствами рассеяния нейтронов. Важно, что при этом не происходило изменения химического состава клеток мембраны. Создавая нейтронный контраст в плоскости клеточных мембран, содержащих смесь H- и D-жирных кислот, удалось обнаружить латеральные неоднородности размером менее 40 нм.

Хотя данные *in vivo* экспериментов о НК гораздо менее детализированы, чем информация, полученная на модельных липидных бислоях, предлагаемые методы полностью биосовместимы и, таким образом, предоставляют различные новые возможности для исследований мембран живых клеток биофизическими методами. Это позволяет выявлять атомистические детали, которые в принципе не могут быть исследованы при измерениях на чрезмерно упрощенных смесях липидов.

2.1.3. Некоторые уроки изучения нанокластеров в экспериментах

Суммируя полученные в экспериментах данные о НК в модельных и природных мембранах, следует отметить, что наиболее надежные методы регистрации наноразмерных неоднородностей получены путем либо совместного применения взаимодополняющих методов, либо за счет существенных модификаций уже существующих подходов со сверхвысоким разрешением. Как уже отмечалось, сама природа НК в динамических жидких водно-липидных смесях требует работы экспериментаторов на грани возможностей. Однако, помимо возникающих технических трудностей, сложившаяся ситуация имеет и положительную сторону, поскольку способствует быстрому развитию инст-

рументальных технологий, внедрению новых методов пробоподготовки, анализа данных и пр.

Важно, что, помимо уже ставших традиционными систем, содержащих СМ, ХС и ряд других компонентов, в значительной степени индуцирующих спонтанное формирование НК (и, следовательно, наиболее удобных для проведения экспериментов), все чаще изучают и модельные мембраны из липидов, не склонных к образованию рафтов (см. обзор [13]). Поскольку параметры мозаичности границы раздела липиды/вода могут сильно варьировать при изменении условий среды, последние часто меняют для достижения наиболее четкой картины. В совокупности с отмеченными выше модификациями методов детекции, это дает желаемый результат, повышая качество экспериментальных данных о спонтанных НК.

Наиболее важным выводом, который следует из результатов довольно многочисленных независимых экспериментальных исследований латеральных неоднородностей как в модельных липидных бислоях, так и в природных клеточных мембранах, является то, что НК реально существуют. Их характерные размеры могут составлять менее 10 нм, а время жизни — до миллисекунд. Кроме того, с помощью экспериментов удалось установить, что НК могут спонтанно формироваться как в уже существующих более крупных L_o -доменах, так и за их пределами. Получены важные оценки параметров их диффузии, а в некоторых случаях определены факторы, вызывающие образование НК и влияющие на их размер, стабильность и т. д. Это обеспечивает надежную основу для атомистического анализа НК в мембранах с использованием методов компьютерного моделирования. Необходимо отметить, что первые результаты, свидетельствующие о спонтанном появлении нанокластеров в липидных бислоях, появились задолго до их наблюдения в прямых экспериментах. По-видимому, О. Mouritsen и соавт. [47] были первыми, кто предсказал образование метастабильных нанодоменов в мембранах ДОФХ. Важно, что авторы пришли к выводу, что континуальные модели недостаточны для корректного описания НК и требуется применение подходов атомистического моделирования (в данном случае метода Монте-Карло (МК)). Позже аналогичные результаты по обнаружению НК были достигнуты в исследованиях других однокомпонентных и многокомпонентных смесей липидов (на базе ФХ) с различной длиной ацильной цепи [48, 49]. Начиная примерно с 2004 года, применение методов атомистического моделирования к изучению НК в различных липидных бислоях стало довольно распространенным (например, [13, 50, 51]).

Поскольку существование НК изначально было предположено лишь теоретически, на протяжении долгого времени подобные расчетные работы о свойствах НК вызывали естественный скептицизм, учитывая число и характер приближений, присущих методам *in silico*. Поэтому именно сейчас, в связи

с экспериментальным подтверждением НК-эффектов, появилась прекрасная возможность не только обобщить накопленные расчетные данные и соотнести их с наблюдаемыми в экспериментах, но и начать совместные согласованные исследования по рассматриваемой теме. Такие исследования уже ведутся (см. ниже). Исчерпывающее описание выполненных к настоящему времени вычислительных работ по теме дано в обзорах [13, 52, 53]. Поэтому здесь мы не будем в деталях повторять сказанное ранее, а основное внимание уделим вопросам, которые сравнительно мало были описаны в литературе. А именно, речь пойдет о проблемах кластеризации при выявлении НК и описания их динамики, а также о картировании и наглядной визуализации мозаичной картины поверхности мембран. Наконец, большой интерес представляет анализ изменений ДМП в зависимости от состава мембран и других факторов.

2.2. Компьютерное моделирование НК в мембранах

На основании результатов, полученных с помощью вычислительных методов, можно сформулировать следующие выводы относительно условий существования и пространственно-временных характеристик НК в модельных мембранах:

1. Компьютерное моделирование однозначно свидетельствует о существовании на поверхности липидного бислоя наноразмерных кластеров (НК). Более того, как уже упоминалось, подобные объекты были сначала открыты «на кончике пера» (т. е. *in silico*) и лишь позднее зарегистрированы в описанных выше и других прямых экспериментах. Характерные размеры и времена жизни НК составляют от ~ 1 нм и от ~ 1 нс, соответственно, что хорошо согласуется с результатами наблюдений. Важно, что получаемые в ходе расчетов данные о НК, механизмах их формирования и влиянии на них различных факторов (условия среды и пр.) воспроизводятся для одних и тех же систем при использовании различных технологий расчета: силовых полей, применяемого уровня приближений (полноатомное, тяжелоатомное, крупнозернистое (КЗ) и др.), вычислительных протоколов исследования фазового пространства и пр. параметров моделирования. Это свидетельствует о том, что НК не являются неким артефактом, обусловленным выбором расчетных методов получения данных и их обработки.
2. В компьютерных экспериментах удастся корректно воспроизвести влияние на ДМП модельных липидных бислоев таких факторов, как температура, химическая природа липидов в мембране, определенный ионный состав, роль противоположного монослоя, наличие внедренных «чужеродных» объектов с отличающимися параметрами подвижности и т. д.

Таким образом, есть все основания полагать, что современные методы моделирования теперь могут быть использованы для предсказания таких свойств НК, которые пока еще не могут быть исследованы в экспериментах. Еще раз отметим, что это — принципиальный момент, поскольку до четкого экспериментального подтверждения рассматриваемых явлений любые *in silico* попытки усовершенствования жидко-мозаичной модели мембран путем ее согласования с концепцией НК были лишь гипотетическими и, следовательно, вызвали здоровый скептицизм. Теперь же применение компьютерного моделирования позволяет изучать следующие НК-опосредованные явления и делать прогнозы, которые в дальнейшем могут быть проверены экспериментально:

- Детально анализировать все типы взаимодействий в мембране, причем как на уровне отдельных молекул, так и ансамбля в целом, оценивать их вклад в характеристики ДМП. Это позволит установить, каков в каждом конкретном случае баланс сил, вызывающих формирование НК с наблюдаемыми свойствами.
- Возможность наглядной визуализации ДМП. Они могут быть представлены как в виде иллюстративных 3D-изображений, так и в виде гораздо более информативных 2D-карт поверхности мембраны (см., например, [8, 54]). В обоих случаях широко применяется анимация, позволяющая представить динамику изучаемых сложнейших систем. Важно, что систему можно изобразить как целиком, так и сфокусироваться на поведении ее отдельных компонент, например, НК, областей свободного объема, одиночных молекул/групп. Кроме того, используя численные методы картирования, есть возможность представить в графическом виде большое разнообразие физико-химических характеристик, связанных с НК. К ним относятся: гидрофобные/гидрофильные и электрические свойства (например, молекулярный гидрофобный потенциал (МНР), электростатический потенциал (ЕР), плотность заряда и т. д.); рельеф поверхности и ее степень гидратации; подвижность молекул и их отдельных групп (в частности, рассчитанная в ходе МД); характеристики различных типов взаимодействий, в которых участвуют компоненты мембраны (например, плотность Н-связей, солевых мостов и пр.). На такие карты полезно наносить информацию о расположении конкретных атомов и молекул, области контакта с внешними агентами — например, связывающимися пептидами, белками и т. д. Важно, что представленные свойства поверхности могут относиться как к отдельным состояниям системы, так и к их средним величинам, разностным значениям и т. д.
- Рассчитывать со сверхвысоким пространственно-временным разрешением характеристики движения всех компонентов мембраны, вплоть до отдельных атомов и групп, выявлять коллективные движения в бислое, количест-

венно оценивать их вклад в интегральную картину, прогнозировать влияние на них задаваемых внешних факторов.

- Помимо латеральных НК, изучать подобные неоднородности и вдоль нормали к плоскости мембраны (первые попытки уже были сделаны [55]). В совокупности, полученная информация позволит создать беспрецедентно подробную 3-мерную динамическую картину модельных клеточных мембран в наноразмерном масштабе.
- Рассматривать в расчетах широкий диапазон систем — от модельных гидратированных бислоев, состоящих из одного или нескольких типов липидов, до мембран, максимально напоминающих природные. Конечно, огромное большинство результатов пока получены именно для первого случая, хотя дело не столько в меньшей вычислительной сложности моделирования таких систем (это, разумеется, важный фактор, но он не является критическим). Ключевым моментом является необходимость постоянной калибровки результатов расчетов по экспериментальным данным, а последние доступны сейчас лишь для таких простых систем. Кроме того, поскольку детальные физические механизмы формирования и существования доменов разного масштаба (включая НК) до сих пор не установлены, моделирование сравнительно простых систем позволяет гораздо лучше контролировать вклад отдельных факторов (например, липидного состава, присутствия ионов и пр.) в наблюдаемые явления. Для сложнейших многокомпонентных мембран такой анализ невозможен. Причина заключается в отсутствии достоверных экспериментальных структурных данных и других свойств для них, на основе которых можно было бы проводить параметризацию и верификацию силовых полей и протоколов моделирования.

С методологической точки зрения богатый опыт применения методов компьютерного моделирования в изучении мембран с наноразмерным разрешением можно обобщить следующим образом:

- Наиболее часто используемым является метод МД, причем в разных реализациях: классическая и ланжевеновская МД, направленная МД, управляемая МД и т. д. По-прежнему используют и метод Монте-Карло, хотя уже и в значительно меньшей степени, чем ранее. Кроме того, известны примеры совместного применения методов МД и МК. Применительно к задачам исследования ДМП мембран методы МД, по-видимому, являются оптимальным выбором, поскольку динамические аспекты НК крайне важны — без их учета нельзя выявить механизмы явления и составить его полную атомистическую картину (см. далее). Большую роль в популярности МД сыграла также доступность нескольких хорошо отработанных и постоянно поддерживаемых программ моделирования (GROMACS [56], NAMD [57], CHARMM [58] и др.), а также применяемая при их внедрении практика от-

крытого кода, что дает возможность пользователям активно использовать свои разработки в рамках этих программных продуктов.

- Адекватные и согласующиеся как с экспериментом, так и с результатами независимых методов моделирования результаты получают с помощью как минимум нескольких современных силовых полей: GROMOS96 (с моделью липидов Бергера (так называемые «Berger lipids»)) [59], CHARMM36 [60], SLipids [61], MARTINI [62] и др. Важно, что эти функции энергии были специально адаптированы к расчетам систем, содержащих все основные компоненты клеточной мембраны — молекулы липидов, воды и белка, а также физиологически значимые ионы. Это позволило (по крайней мере в основном) избавиться от часто встречавшихся ранее проблем несогласованного совместного применения параметров силовых полей, например, для липидов и белков. В отличие от задач, рассматривающих лишь интегральные параметры мембраны, и, следовательно, во многих случаях не слишком чувствительных к таким деталям, данный вопрос играет чрезвычайно важную (подчас — критическую!) роль, когда дело касается анализа взаимодействий отдельных молекул, что приводит к формированию/распаду НК, их диффузии и пр.
- Говоря о силовых полях, следует также отметить, что в анализе НК используют разный уровень приближений: полноатомные, тяжелоатомные и КЗ-модели, а также, конечно, их комбинации. В отличие от «обычных» (т. е. не связанных с анализом в наномасштабах) расчетов МД, не применяют континуальные модели, поскольку в изучаемых процессах молекулы окружения (вода, липиды, ионы) играют ключевую роль. В ряде случаев моделирование сложных по составу систем (например, белок, встраивающийся в мембрану) начинают с применения континуальных моделей мембраны, чтобы найти стартовые состояния для дальнейших расчетов в явно заданном растворителе.
- В зависимости от уровня приближений, длительность траекторий МД, которые сейчас получают на доступных высокопроизводительных кластерах (включая персональные компьютеры с дополнительными GPU-картами), достигает 10–100 мкс для полноатомных моделей и миллисекунд в случае КЗ-приближения. При этом, как правило, для одной и той же системы требуется несколько независимых запусков МД.

Совместный анализ всего набора экспериментальных и *in silico* результатов идентификации НК, спонтанно образующихся в модельных липидных бислоях и в нативных мембранах, указывает на хорошее согласие наблюдаемой картины латеральной гетерогенности границы раздела мембрана–вода. Это относится как к размеру НК, так и к их временам жизни, составу и другим характеристикам. Какие факторы определяют эту картину? Это обсуждается ниже.

3. Молекулярные механизмы формирования нанокластеров

3.1. Свободная энергия взаимодействий липид–липид

В бинарных смесях, находящихся в состоянии термодинамического равновесия, пространственное распределение липидов в плоскости мембраны и образование идеального/неидеального раствора определяются значениями свободной энергии взаимодействия соседних липидов (ω_{AB}) [21, 63]. Взаимодействия между двумя типами липидов А и В могут быть отталкивающими ($\omega_{AB} > 0$), что означает, что липиды, вероятно, вступают в контакты с аналогичными. Сильное отталкивание приводит к образованию доменов. Если взаимодействия слегка отталкивающие, то в системе существуют микронеоднородности, которые не разрастаются до доменов. Идеальное смешивание возникает только в том случае, если липиды не имеют каких-либо предпочтений среди ближайших соседей ($\omega_{AB} = 0$). Липиды смешиваются еще более равномерно, чем в случайной смеси, если они предпочитают ближайших соседей, отличных от них самих ($\omega_{AB} < 0$). В экспериментах значения ω_{AB} могут быть оценены, например, с помощью изотермической титрационной калориметрии, дифференциальной сканирующей калориметрии, ЯМР, ФРПЭ. Подобные данные для ряда бинарных смесей липид–липид и липид–холестерин приведены в работе [21]. Помимо значений ω_{AB} , эксперименты могут дать ответ на вопрос, состоят ли НК из сходных или разных типов липидов, образуя таким образом гомо- или гетерокластеры. Например, исследование смесей СМ/энт-СМ/ХС с помощью конфокальной микроскопии показало [64], что гомофильные взаимодействия СМ, обусловленные стереоспецифическими особенностями межмолекулярных взаимодействий, индуцируют образование нанодоменов в фазе L_o бислоев на основе СМ. Также было обнаружено, что этот эффект опосредован ХС, который оказывает сильное упорядочивающее влияние на молекулы СМ [65] и формирование НК [64]. Однако такая информация о типе ближайших соседей взаимодействия является интегральной — она не дает достоверного указания на атомистические физические механизмы этих явлений.

Следовательно, необходим анализ межмолекулярных контактов между всеми компонентами мембраны (липидами, водой, ионами и т. д.). К ним относятся в основном Н-связи, ван-дер-ваальсовы и ионные взаимодействия. Установлено, что первые играют особо важную роль в формировании НК. Эти вопросы рассматриваются в следующем разделе.

3.2. Роль водородных связей в формировании нанокластеров

В настоящее время хорошо установлено, что свободная энергия Н-связи сильно зависит от локальных диэлектрических свойств среды (например, [66]). Таким образом, прочность Н-связи возрастает при погружении взаимодейст-

вующих групп в неполярную область мембраны, где значения диэлектрической проницаемости (ϵ) существенно ниже, чем в воде [67]. Наиболее весомый вклад в межлипидные Н-связи вносят NH-группы СМ и карбонильные группы фосфолипидов [68, 69]. Это связано с тем, что среди всех доноров/акцепторов Н-связей в распространенных липидах эти группы расположены в наиболее неполярной области бислоя. Кроме того, важную роль играют взаимодействия с участием фосфатных групп. Несмотря на то, что многие липиды (например, ФХ) не имеют доноров Н-связей, сильные взаимодействия между ними осуществляются посредством молекул воды и ионов (например, [70]).

С точки зрения образования НК большое значение имеет как пространственное расположение доноров/акцепторов Н-связей в соседних липидах и возможность их гидратации, так и распределение заряженных групп (последние очень важны для связывания ионов). Таким образом, итоговая картина расположения полярных головок молекул липидов в плоскости мембраны будет определяться балансом большого числа межмолекулярных взаимодействий, которые вносят вклад с различными весами. Однако, помимо прямых контактов на границе раздела мембрана–вода, необходимо учитывать влияние ацильных цепей липидов на степень мозаичности поверхности. Показано, что характер их упаковки и движения может оказывать сильное влияние. Таким образом, латеральная гетерогенность в нанометровом масштабе характерна не только для области полярных головок липидов, но и для внутренних неполярных областей мембраны [55].

В последнее время были получены важные результаты о параметрах Н-связей липидов, входящих и не входящих в состав НК. Кроме того, были выявлены некоторые факторы, влияющие на структуру Н-связей в пределах НК и на их границах. В дополнение к химической природе донорных/акцепторных групп и степени полярности их локальной среды (ϵ) как в самих этих липидах, так и в их соседях, структурные и динамические характеристики молекул, их способность образовывать стерически плотные контакты, играют важную роль в анализе липидов, группирующихся в НК. Часто своеобразным «инициатором» формирования НК является холестерин. В частности, Y. Yano и др. показали [36], что в смесях с СМ ХС усиливает образование Н-связей между молекулами СМ, ограничивая конформационную подвижность их ацильных цепей в неполярной области бислоя [71, 72]. В свою очередь, это способствует образованию НК внутри фазы L_o мембраны. Интересно, что сами молекулы ХС могут и не быть частью НК. Сходные эффекты индуцирования кластеризации определенных типов липидов их соседями в бислое определяют особенности молекулярного состава НК. Часто они преимущественно включают липиды одного типа (гомокластеры) [64] или, наоборот, липиды разных типов (гетерокластеры) [73]. Для получения подобной информации используют как экспериментальные методы (например, ФРПЭ со специально подобранными парами хромофоров), так

и вычислительные подходы. В обоих случаях мощным инструментом для расшифровки природы межмолекулярных взаимодействий является использование искусственных липидов с селективными модификациями, влияющими на состав доноров/акцепторов Н-связей. Таким способом, например, было показано, что N- и O-метилование сфингомиелина заметно влияет на его поведение в мембране и взаимодействие с холестерином. В частности, указанная блокада донорных и акцепторных групп Н-связей в СМ нарушает образование упорядоченных доменов [74]. Это свидетельствует о важной роли аминокруппы СМ в процессе появления НК, специфичном для данного типа липидов. Эта идея получила дальнейшее развитие в осуществленной нами разработке искусственного липида на основе ДОФХ с измененным паттерном Н-связей. Предполагалось, что эта молекула потенциально может повлиять на свойства бислоя ДОФХ. Цель состояла в том, чтобы ввести донор Н-связи (ОН-группу) в молекулу ДОФХ на глубине С=О-групп немодифицированного липида (рис. 1, а). Полученный липид (sn-1-β-гидроксидолеоилфосфатидилхолин) далее обозначается как ДОФХ-oh. По нашим оценкам [69], основанным на расчетах методом МК в средах различной полярности (с различными значениями ϵ), именно в области расположения С=О-групп ДОФХ — т. е. в неполярной среде ($\epsilon \sim 3$) — будет наблюдаться наиболее сильный эффект образования дополнительных Н-связей с участием молекул ДОФХ-oh (рис. 1, б). МД-моделирование липидных бислоев, содержащих ДОФХ-oh, показало, что добавление этого соединения к мембране ДОФХ приводит к значительным изменениям ряда наиболее важных структурных и динамических свойств бислоя, определяющих его ДМП: сильное увеличение «контрастности» латерального распределения гидрофобных/гидрофильных свойств границы раздела мембрана/вода, изменение его доменной структуры (параметры НК), паттерны Н-связей и характеристики подвижности (готовится к печати). Важно отметить, что такие «репортерные» молекулы искусственных липидов могут существенно изменять макроскопические средние свойства поверхности бислоя. Это хорошо видно на рис. 1, в, г, где показаны усредненные карты распределения гидрофобных/гидрофильных свойств (выраженных в терминах МНР) на поверхности бислоя ДОФХ и бислоя, содержащего ДОФХ-oh. Такие эффекты описаны впервые, и это открывает новые возможности в рациональном проектировании искусственных мембран с заданными свойствами.

3.3. Флуктуации

Интересной и важной особенностью наблюдаемых в мембранах НК является отличие их поведения от крупных неоднородностей, в том числе рафтов. Так, повышение температуры приводит к подавлению эффектов макроскопического

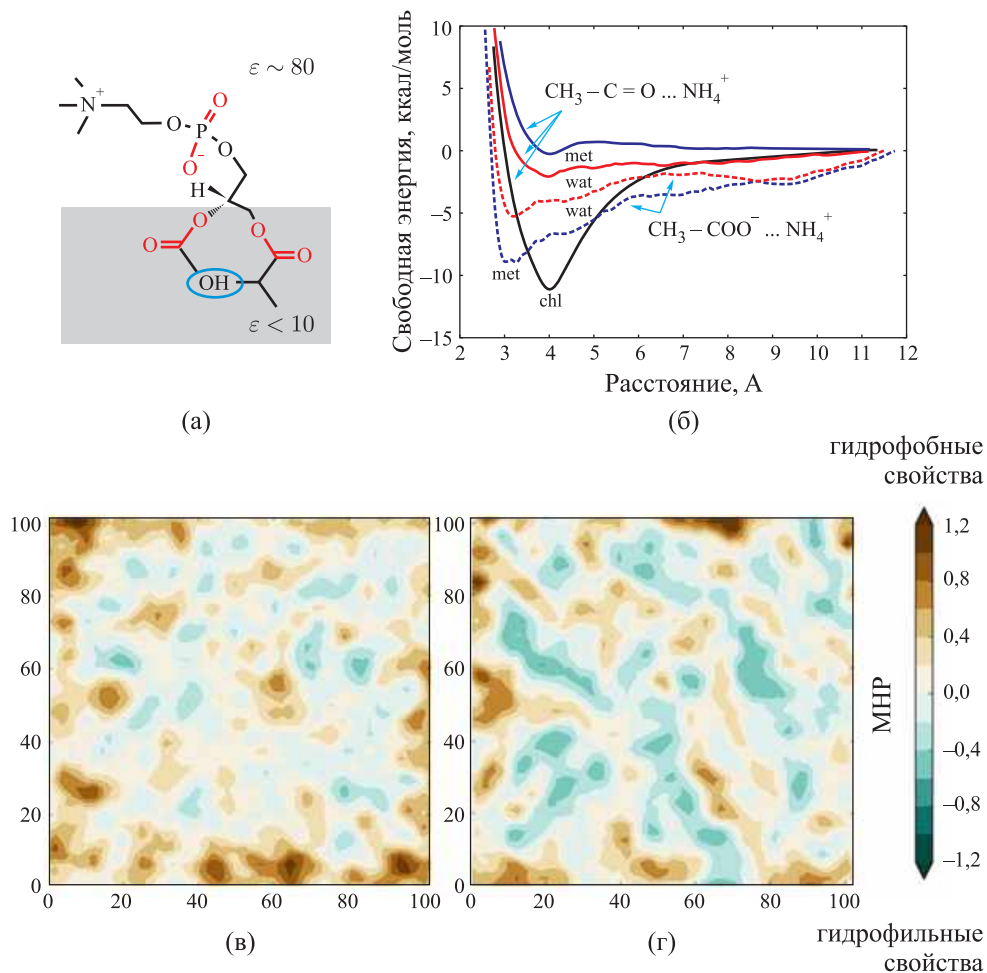


Рис. 1. (а) Схематичное изображение расположения молекулы sn-1-β-гидрокси-диолеилфосфатидилхолина (ДОФХ-oh) относительно мембраны. Серым цветом изображена область мембраны с низкими значениями диэлектрической проницаемости (ϵ). Показана только полярная головка ДОФХ-oh. Донор Н-связи обведен синим кружком. Акцепторы Н-связей выделены красным цветом. (б) Профили потенциала средней силы, описывающие свободную энергию образования Н-связей $\text{NH}_4^+/\text{O}=\text{C}$ и $\text{NH}_4^+/\text{O}=\text{C}$ в зависимости от расстояния между донором и акцептором Н-связи. Результаты расчетов методом Монте-Карло в окружении различной полярности: воде (wat), метаноле (met), хлороформе (chl) (по данным из [69]). (в, г) Гидрофобная/гидрофильная организация поверхности бислоев ДОФХ (в) и ДОФХ-oh (г) (по данным из [51, 75]). Проекция значений молекулярного гидрофобного потенциала (МНР), рассчитанные в точках поверхности липидного бислоя, доступной растворителю, на плоскость мембраны (2D-карты МНР). Карты даны для одного липидного монослоя. Конфигурации системы взяты из МД-траекторий бислоев. Схема окраски для МНР показана справа. Значения МНР приведены в единицах коэффициента распределения ($\log P$) в системе октанол–вода

разделения фаз L_d и L_o в липидном бислое за счет более эффективного смешивания липидов. В то же время усиливается образование короткоживущих наноразмерных структур (т. е. НК) [75]. Эти явления особенно выражены вблизи температуры фазового перехода (T_m) участвующих липидов. Действительно, такие процессы наблюдали как для гигантских везикул, полученных из плазматических мембран [76], так и для синтетических липосом [77], что лишний раз свидетельствует о пользе применения модельных систем для понимания гетерогенности природных мембран. Принято считать, что основную роль в этих явлениях играют так называемые «критические флуктуации» — стохастические тепловые движения компонентов бислоя (липидов, воды, ионов и т. д.), приводящие к появлению зон свободного объема, коллективным движениям нанометрового масштаба, аномальной диффузии липидов и воды и т. д. Показано, что искусственно созданная иммобилизация отдельных компонентов бислоя (например, наложение ограничений на подвижность определенных молекул липидов [78]) может значительно снизить амплитуду флуктуаций, что в конечном итоге приводит к подавлению процессов образования НК. Эти аспекты обсуждаются ниже.

3.4. Эффекты «чужеродных» молекул

Описанный выше способ воздействия на распределение НК на поверхности липидного бислоя — введение молекул с измененным рисунком доноров/акцепторов Н-связей — не является единственным. Существуют и другие причины, по которым «чужеродный» объект, внедренный в мембрану (например, искусственно созданная молекула, представляющая собой гибрид различных липидов), способствует латеральной кластеризации в наномасштабе. В частности, важную роль играет природа ацильных цепей таких добавленных молекул: «гибридные» липиды с одной ненасыщенной и одной насыщенной цепью могут способствовать образованию нанодоменов: они могут распределяться на границах фаз (к примеру, рафта и L_d , соответственно) и действовать как линквант. Последний является двумерной аналогией поверхностно-активного вещества (сурфактанта) и, следовательно, молекулой, которая уменьшает линейное натяжение на границе раздела мембранных фаз, тем самым препятствуя слиянию небольших доменов в более крупные, вплоть до микроскопических фаз. Таким образом, гибридные липиды эффективно распределяются между фазами, уменьшая их структурное различие [79]. Однако эта картина была поставлена под сомнение в некоторых экспериментах [80]. Наконец, известны эффекты стимуляции образования НК молекулами, которые отличаются по подвижности и/или гидрофобности от липидов бислоя.

В частности, установлено, что неподвижные объекты, такие как иммобилизованные липиды или, например, сегменты трансмембранного белка, по видимому, сильно дестабилизируют разделение фаз, в то время как свободно диффундирующие объекты, такие как мембрано-связанные пептиды, могут способствовать разделению фаз за счет эффекта так называемого «гидрофобного соответствия». Что касается первого случая, Т. Fischer и др. методами моделирования в КЗ-приближении изучали смесь дилиноилфосфатидилхолина (ДЛФХ/ДПФХ/ХС) и исследовали роль неподвижных молекулярных объектов в разделении фаз [78]. Было показано, что удержание за счет наложенных ограничений липидов ДПФХ либо в плоскости мембраны в обоих монослоях, либо во всех измерениях, но лишь в одном монослое, инициировало или подавляло волнообразные движения, перпендикулярные плоскости мембраны соответственно. Иммобилизованные липиды предотвращали полное разделение фаз, которое в противном случае наблюдалось. Второе явление (добавление ТМ-сегментов белка) подчеркивает важность рассмотрения влияния белков на поведение липидной компоненты мембран. Поскольку в настоящей работе мы рассматриваем лишь спонтанно формируемые НК, эта тема выходит за рамки настоящего обзора.

3.5. Диффузия, коллективные движения, области свободного объема в мембранах

В дополнение к пространственно-временным параметрам НК, при рассмотрении факторов, определяющих ДМП (мозаичность) поверхности мембраны, большое значение имеет диффузия компонентов бислоя. Проблема становится особенно актуальной в связи с тем, что в рассматриваемом масштабе характер движения компонентов бислоя отличается от броуновского движения, наблюдаемого для макроскопических систем. Возникают эффекты аномальной диффузии липидов, ионов и воды. Кроме того, были зарегистрированы наномасштабные коллективные движения и т. д. [81–83]. Более подробную информацию можно найти в обзорах [12, 15]. Параметры локальной диффузии липидов, воды и ионов в поверхностном слое и в системе в целом напрямую связаны со спонтанным образованием НК. Так, давно показано [13, 15, 84], что на наноуровне, т. е. на уровне отдельных молекул и групп из нескольких молекул липидов, латеральная диффузия в модельных мембранах (о реальных данных пока просто нет) имеет неброуновский характер. На поверхности мембран постоянно формируются и исчезают микропотоки, вихри и т. д. Характерные времена жизни подобных явлений составляют от 1 нс. Несомненно, формирование НК и такие коллективные движения обусловлены общим физическим механизмом,

детали которого до сих пор до конца не изучены. В то же время показано [81, 82], что в некоторых случаях липиды внутри НК движутся согласованно, но медленнее, чем некластеризованные молекулы бислоя. Хорошо известно (см., например, обзор [13] и ссылки в нем), что процессы диффузии в мембранах и, следовательно, характер латеральной кластеризации в наномасштабе в значительной степени определяются наличием зон свободного объема в липидном бислое, возникающих из-за флуктуаций. В частности, было установлено, что они определяют аномально быструю диффузию одиночных молекул воды в мембране, степень гидратации отдельных молекул липидов, что приводит к образованию НК. Необходимо отметить, что эти эффекты обычно изучают с помощью атомистического моделирования, поскольку чрезвычайно важно наблюдать за поведением отдельных молекул и их небольших групп (например, из 3–5 липидов).

3.6. Нанокластеры и взаимное проникновение ацильных цепей липидов противоположных монослоев

Насколько сильно картина НК в одном из монослоев липидной мембраны зависит от присутствия второго монослоя? Одна из причин, позволяющая ответить на этот вопрос утвердительно, является чисто механической. Дело в том, что в модельных липидных мембранах часто наблюдается (как в экспериментах, так и в расчетах) взаимное проникновение ацильных цепей липидов противоположных монослоев друг в друга. Однако роль этого явления в поведении НК плохо изучена. Прямых экспериментальных данных пока нет, но на основе моделирования некоторые выводы все же можно сделать. Так, с помощью КЗ-МД было установлено, что ДМП монослоев коррелируют друг с другом [53]. Например, показано, что образование домена в одном монослое может вызвать появление неоднородностей в противоположном монослое, который сам по себе не претерпевает разделения фаз. Кроме того, при наличии флуктуаций в мембране образовывалось несколько доменов, и они не сливались друг с другом. Подавление флуктуаций и внедрение иммобилизованных липидов в одном монослое приводило к промежуточному поведению между макроскопическим разделением фаз и образованием нанодоменов. Эти эффекты более подробно обсуждаются в обзоре [13].

Для мембран живых клеток таких сведений просто еще нет. За исключением первых успешных попыток зарегистрировать НК в таких системах и оценить их размер/время жизни, подробные данные в атомарном масштабе все еще недоступны, и выводы о роли рассмотренных выше факторов пока нельзя сделать ввиду чрезвычайной сложности подобных систем.

4. Согласие между экспериментальными и расчетными данными

Как отмечалось выше, и экспериментальные, и вычислительные методы вносят значительный вклад в наше понимание физической природы латеральных НК в мембранах, их динамики и биологической роли. Совместное использование этих подходов позволяет получать наиболее адекватную информацию о НК из независимых источников. Кроме того, такой самосогласованный анализ способствует взаимному обогащению компьютерных и так называемых «мокрых» биофизических экспериментов, обеспечивая тем самым быстрый прогресс в этой области. В то же время сопоставление и согласование результатов моделирования и эксперимента не всегда является простой задачей (см. обзор [53]).

Выделим наиболее существенные проблемы: (1) Очень трудно применить точно такие же условия для наблюдения НК в обоих подходах. Это необходимо для того, чтобы сравнить результаты расчетов с экспериментальными данными и внести взаимные коррективы в случае расхождений. Речь идет, в частности, о молекулярном/ионном составе среды, окружающей липидный бислой; времени наблюдения (в полноатомной МД они по-прежнему ограничены микросекундами). Кроме того, в расчетах возникают трудности с параметризацией силовых полей для молекул, используемых в эксперименте, но для которых нет надежных структурных данных для создания, например, топологий, необходимых для расчета энергии. Особенно трудным является правильный учет состояний ионизации молекул, включая локальные значения pH. В экспериментальных условиях можно контролировать только интегральные значения этих параметров (включая данные, полученные с помощью молекулярных pH-сенсоров), хотя зарядовые состояния отдельных компонентов мембраны могут изменяться. (2) Как уже упоминалось выше, в экспериментальных исследованиях НК часто используют специальные репортерные группы — зонды различной природы (флуоресцентные, спиновые и т. д.), которые могут искажать тонко регулируемые взаимодействия в мембране. (3) Качество исследования конфигурационного фазового пространства при расчетах наиболее сложных мембранных систем, содержащих до 10^8 частиц, не гарантирует накопления представительной выборки состояний — со всеми вытекающими последствиями. Это также связано с ограниченным размером объектов, доступных для анализа, что во многих случаях не позволяет в расчетах корректно воспроизвести ряд фундаментальных свойств мембран, таких как форма всей поверхности, включая и шероховатости различного масштаба, которые возникают на ней (так называемые эффекты кривизны). (4) Как экспериментальные, так и вычислительные подходы имеют свои собственные погрешности и ограничения, некоторые из которых чрезвычайно трудно (иногда невозможно!) контролировать, что может существенно затруднить прямое сопоставление результатов. (5). Хотя сегодня мы изо всех

сил пытаемся понять на молекулярном уровне структуру простых модельных мембран, современные экспериментальные технологии идут гораздо дальше, позволяя *in vivo* изучать биологические аспекты функционирования все более сложных мембранных систем, в которых и происходят наиболее интересные явления в клетке. Это создает значительный разрыв между реальными потребностями биомедицины и возможностями строгих традиционных физических методов, которые до сих пор эффективны лишь применительно к простым моделям. К таковым относятся и все используемые в настоящее время компьютерные подходы. Поэтому многие результаты экспериментов на мембранах живых клеток все еще не могут быть воспроизведены методами моделирования.

5. Представление нанокластеров путем картирования свойств поверхности мембраны

При анализе ДМП важно правильно и четко отображать информацию о динамической природе НК и других областей на границе раздела мембрана–вода. Существуют различные форматы описания НК — они могут быть представлены как в виде сгустков плотности, так и в виде участков поверхности липидного бислоя с определенными физико-химическими свойствами, находящимися в заданном диапазоне значений. В первом случае кластеризация атомов и/или молекул в мембране выполняется в соответствии с геометрическим критерием, т. е. с учетом расстояний между участниками НК. Отметим, что эта процедура не является тривиальной — выбор численных критериев алгоритма кластеризации играет важную роль. В частности, кластеры можно выявлять на уровне полноразмерных молекул липидов (например, [73]), но картина НК может быть искажена из-за конформационной гибкости липидов. Кроме того, распределение НК сильно варьирует вдоль нормали к плоскости мембраны. Таким образом, на интерфейсе мембрана–вода, как правило, наблюдаются сильные взаимодействия полярных липидных головок друг с другом, с водой и ионами. В результате подвижность в этой части бислоя значительно меньше, чем в области ацильных цепей. Следовательно, НК, определенные в соответствии с геометрическим критерием и включающие полноразмерные молекулы липидов, могут быть слишком неоднородными по своей упаковке: они будут иметь области высокой плотности на границе раздела фаз и разрежения в зоне ацильных цепей [55]. Поэтому во многих случаях правильнее проводить кластеризацию с учетом не всех молекул, а только их отдельных атомов/групп, которые соответствуют критерию расстояния, независимо от того, к каким молекулам липидов они относятся. Это дает физически более релевантную картину — пространственно-временное распределение плотности атомов/групп определенного

типа в мембране. Наконец, помимо областей высокой плотности, важную информацию дает локализация и визуализация областей низкой плотности — так называемых зон свободного объема, которые играют ключевую роль в процессах диффузии мембранных компонентов, белок-мембранных и белок-белковых взаимодействий в липидном бислое. Еще одна трудность в описании НК связана с количественной характеристикой их продолжительности жизни. Дело в том, что в ходе своего существования (зарегистрированного, в частности, в МД) состав НК постепенно меняется — одни члены группы покидают его, появляются другие. Возникает вопрос о том, как корректно оценить продолжительность жизни таких динамических групп. Для решения задачи используют отсчеты по времени нахождения отдельных компонентов в НК: например, если один из них присутствует в кластере более 90 % времени наблюдения, то он считается членом группы. Кроме того, используют понятия «ядро» и «периферия» кластера, вводя для них различные пороговые значения времени жизни.

Во втором подходе вычисляют распределение свойств (например, МНР, ЕР, ландшафт, подвижность, число/плотность Н-связей определенного типа и т. д.) в точках поверхности мембраны, а затем анализируют полученную картину, выявляя группы точек поверхности с аналогичными характеристиками. В этом случае кластеризацию по свойствам можно выполнить как путем работы с трехмерным распределением данных, так и проецируя параметры свойств на плоскость, параллельную поверхности мембраны. Переход от трехмерного изображения к двумерному представлению — к так называемым картам физико-химических свойств поверхности мембраны — предоставляет ряд полезных возможностей для анализа ДМП. Во-первых, такие карты могут быть созданы в одном и том же формате для разных систем (например, липидных бислоев разного состава, рис. 2, а), а также для набора состояний одной и той же системы, но в разных условиях (например, полученных в ходе МД). Это позволяет легко сравнивать карты друг с другом — выполнять их усреднение и рассчитывать стандартные отклонения, создавать разностные карты и т. д. Так, численный анализ двумерных карт распределения МНР на поверхности липидных бислоев с различным соотношением ДОФХ/ДОФС (рис. 2, а) позволил установить, что при содержании анионного липида (ДОФС) около 20–30 % наблюдается скачкообразное изменение гидрофобных/гидрофильных свойств поверхности мембраны. Это выражается, в частности, в росте числа гидрофобных кластеров на поверхности и среднего размера гидрофобных кластеров (рис. 2, б). Во-вторых, в дополнение к самим НК-опосредованным характеристикам на картах можно отображать широкий спектр вспомогательной информации, например, обозначать различные типы молекул, изображать области определенной степени гидратации и конформационной лабильности и т. д.

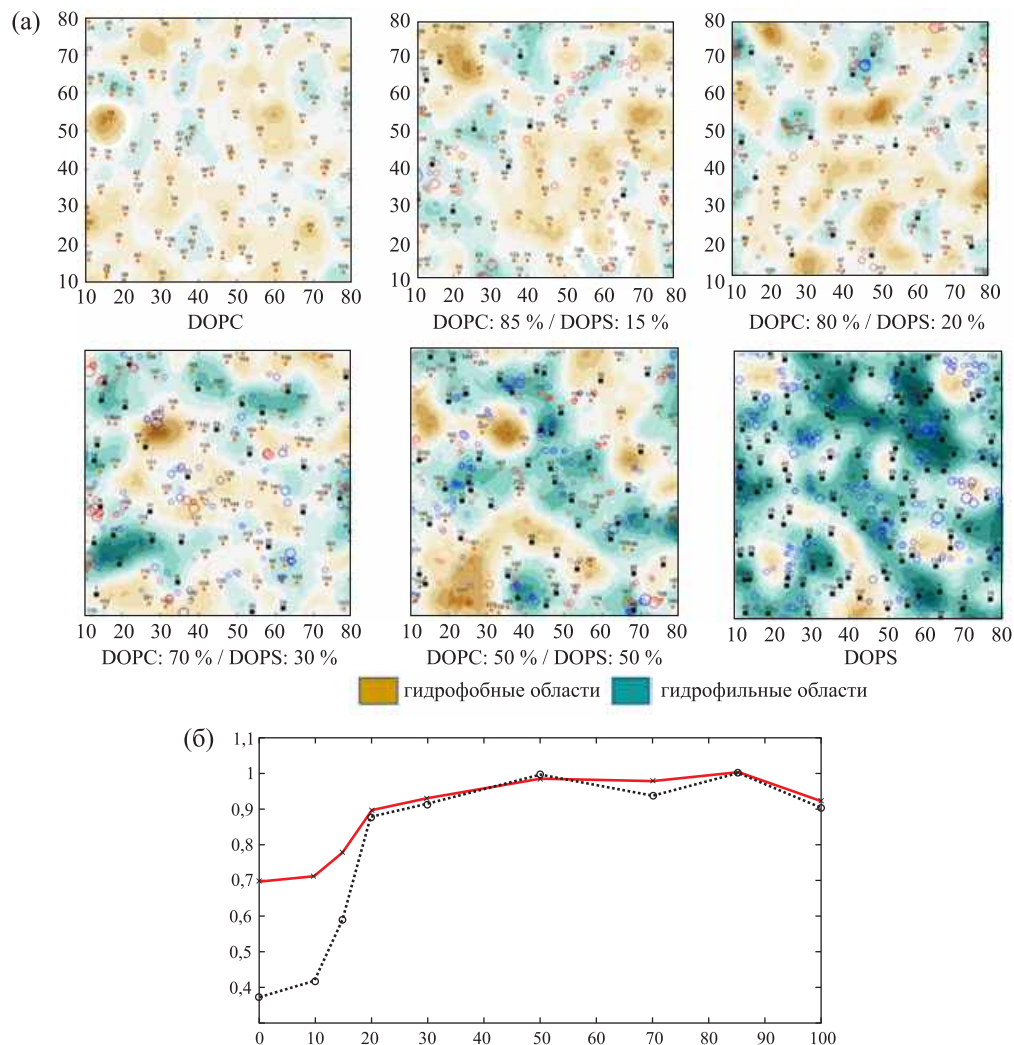


Рис. 2. (а) Зависимость «динамического молекулярного портрета» (ДМП) липидных бислоев ДОФХ/ДОФС от соотношения ДОФХ:ДОФС. Результаты моделирования МД в полноатомном представлении. ДМП приведены в виде 2D-карт распределения МНР на поверхности бислоя (см. условные обозначения на рис. 1), усредненных по траектории МД. Под каждой панелью указан состав липидного бислоя. Проекция на плоскость мембраны средних значений координат центров масс молекул липидов показаны маленькими кружками. Другие детали протокола МД описаны в [73]. (б) Зависимость числа гидрофобных кластеров на поверхности мембраны (сплошная линия) и среднего размера гидрофобных кластеров (пунктирная линия) от соотношения ДОФХ:ДОФС. Кривые нормированы на максимальные значения. Гидрофобными кластерами считали связанные области точек поверхности, для которых значения МНР, создаваемого молекулами липидов, были не менее 0,5 ед. $\log P$, где P — коэффициент распределения в системе октанол-1/вода

6. Заключительные замечания

Завершая рассказ о нанодоменах и связанных с ними явлениях спонтанной латеральной кластеризации в липидных бислоях, следует отметить, что представленные ДМП специфичны для каждой мембраны заданного состава и конкретных условий наблюдения (температура, давление, степень гидратации и т. д.). Наглядные и информативные инструменты картирования и визуализации поверхностных свойств модельных липидных бислоев позволяют быстро и надежно делать выводы как об интегральных характеристиках мембраны (например, «размытым» или, наоборот, контрастным является распределение МНР или ЕР), так и о наноразмерных параметрах системы, выраженных, например, в распределениях НК по размеру, времени жизни, химическому составу, типам внутри- и межмолекулярных взаимодействий и т. д. (например, [54]). Уникальность ДМП позволяет не только на рациональной основе объяснить различия в свойствах липидных бислоев (что само по себе имеет фундаментальное значение), но и разрабатывать новые мембранные материалы с заданными свойствами, в частности, путем варьирования их состава и/или внешних условий.

Вышеупомянутая особенность модельных липидных бислоев изменять параметры присущих им ДМП (выраженных в терминах латерального распределения НК), по-видимому, является одним из важнейших фундаментальных свойств мембран, поскольку позволяет им очень плавно и в широких пределах регулировать свои поверхностные свойства, реагируя на меняющиеся внешние условия и параметры микроокружения. Если в случае спонтанно возникающих НК, которые мы рассматриваем, речь идет о таких факторах, как температура, липидный состав, ионный профиль и т. д., то в природных мембранах появляется ряд дополнительных обстоятельств, которые способны сильно повлиять на картину ДМП. Среди них, конечно, главную роль играют интегральные белки, уже присутствующие в мембране, а также пептиды, белки и другие молекулы, связывающиеся на поверхности и т. д. Известно, что в таких процессах локальные участки мембраны (в первую очередь те, которые контактируют с подобными внешними агентами) испытывают значительные возмущения, адаптируясь к «чужеродным» молекулярным объектам (например, [85, 86]). Механизмы этих процессов напрямую связаны с формированием/перестройкой паттерна НК. Однако это предмет отдельного рассмотрения. Некоторые важные аспекты биологической значимости явлений, связанных с НК, обсуждаются в превосходных современных обзорах [12, 13, 15, 53].

Что дальше? Свойства НК «на горизонте» и за ним

Возвращаясь к основной идее сборника «Горизонты биофизики», можно сформулировать проблемы, которые, как представляется автору, будут решены

при достижении видимой сегодня линии горизонта, т. е. через 2–3 года. В первую очередь, есть надежда в деталях понять, какие именно физические взаимодействия и в какой степени определяют процессы спонтанного формирования НК в модельных липидных бислоях различного состава. В частности, необходимо количественно оценить плотность Н-связей липид–липид, липид–вода и вода–вода на границе раздела фаз. Как было сказано выше, именно Н-связи вносят значительный вклад в энергию межмолекулярных взаимодействий и определяют суммарный баланс сил в изучаемых системах. Полученные паттерны взаимодействий будут сопоставлены с пространственно-временными параметрами НК для каждого заданного момента времени (например, в ходе МД). В результате можно будет судить о том, как соотносятся между собой плотность упаковки компонентов мембраны и свободная энергия их взаимодействия. Есть основания полагать (см. выше), что существенным в этих процессах является энтропийный фактор. Так, формирование упорядоченных структур высокой плотности (НК и др.) может сопровождаться уменьшением времени жизни вызывающих их Н-связей. Об этом свидетельствуют пока лишь первые результаты расчетов, поэтому требуется их тщательная калибровка, проверка (в том числе экспериментальная) и применение к системам с варьируемым составом, наблюдаемым при разных условиях. Только в этом случае можно будет систематически количественно оценить роль вышеперечисленных факторов в возникновении соответствующих ДМП липидных мембран в наномасштабе.

«За линией горизонта» (т. е. примерно через 3–5 лет) можно ожидать добавления к описанной картине организации биомембран важной информации о реализующихся в них коллективных явлениях — колебательных модах, динамических микропотоках, вихрях и т. д. Это относится как к самим липидным бислоям, так и к белок-мембранным системам. С точки зрения биомедицинских приложений (например, направленной регуляции работы сигнальных рецепторов за счет воздействия на окружающие их области мембраны) именно такие данные будут наиболее ценными, поскольку на их основе можно будет проектировать искусственные компоненты липидного бислоя, добавление которых к клеточным мембранам даст возможность модулировать функциональный ответ рецепторов, ионных каналов, мембранных ферментов и т. д. Открывающиеся в указанном направлении перспективы поистине захватывающие и многообещающие. По мнению автора, все рассмотренные выше сложнейшие проблемы вполне возможно решить, учитывая накопленный в последние годы значительный научный потенциал — адекватные физические модели, экспериментальные методы, программное обеспечение, базы данных и пр. Немаловажно, что уже получен и успешный опыт совместного (главное, самосогласованного!) применения указанных подходов, дающий картину изучаемых явлений в наномасштабе, т. е. на уровне отдельных молекул.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 18-14-00375). Суперкомпьютерные вычисления проводили в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

Обозначения

2D	Двумерный
3D	Трёхмерный
L _d	Жидко-неупорядоченная фаза в липидном бислое
L _o	Жидко-упорядоченная фаза в липидном бислое
ДЛФХ	Дилиноилфосфатидилхолин
ДМП	Динамический молекулярный портрет
ДОФС	Диолеоилфосфатидилсерин
ДОФХ	Диолеоилфосфатидилхолин
ДОФХ-oh	sn-1-β-гидрокси-диолеоилфосфатидилхолин
ДПФХ	Дипальмитоилфосфатидилхолин
ДСФХ	Дистеароилфосфатидилхолин
КЗ	Крупнозернистый
МНР	Молекулярный гидрофобный потенциал
МД	Молекулярная динамика
МК	Метод Монте-Карло
НК	Нанокластер
ПОФХ	Пальмитоилолеоилфосфатидилхолин
СМ	Сфингомиелин
ССМ	Стеароил-сфингомиелин
ФРПЭ	Ферстеровский резонансный перенос энергии
ФХ	Фосфатидилхолин
ХС	Холестерин
энт-ССМ	Энантиомер стеароил-сфингомиелина
ЕР	Электростатический потенциал
ЭПР	Электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс

Литература

1. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран. — М.: Наука, 1982. — 224 с.
2. Gennis R. B. Biomembranes: Molecular Structure and Function. Springer Advanced Text in Chemistry. — New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1988. — 533 p.

3. Jorgensen K., Mouritsen O. G. Phase separation dynamics and lateral organization of two-component lipid membranes // *Biophys. J.* — 1995. — Vol. 95. — P. 942–954. — DOI: 10.1016/S0006-3495(95)79968-4.
4. Brown D. A., London E. Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes // *J. Membrane Biol.* — 1998. — Vol. 164. — P. 103–114. — DOI: 10.1007/s002329900397.
5. Lingwood D., Kaiser H.-J., Levental I., and Simons K. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes // *Biochem. Soc. Trans.* — 2009. — Vol. 37. — P. 955–960. — DOI: 10.1042/BST0370955.
6. Freire E., Snyder B. Estimation of the lateral distribution of molecules in two-component lipid bilayers // *Biochemistry.* — 1980. — Vol. 19. — P. 88–94. — DOI: 10.1021/bi00542a014.
7. Curatolo W., Sears B., Neuringer L. J. A calorimetry and deuterium NMR study of mixed model membranes of 1-palmitoyl-2-oleylphosphatidylcholine and saturated phosphatidylcholines // *Biochim. Biophys. Acta. Biomemb.* — 1985. — Vol. 817. — P. 261–270. — DOI: 10.1016/0005-2736(85)90027-6.
8. Efremov R. G., Chugunov A. O., Pyrkov T. V., Priestle J. P., Arseniev A. S., Jacoby E. Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design // *Curr. Med. Chem.* — 2007. — Vol. 14. — P. 393–415. — DOI: 10.2174/092986707779941050.
9. Koromyslova A. D., Chugunov A. O., Efremov R. G. Deciphering Fine Molecular Details of Proteins' Structure and Function with a Protein Surface Topography (PST) Method // *J. Chem. Inf. Mod.* — 2014. — Vol. 54. — P. 1189–1199. — DOI: 10.1021/ci500158y.
10. Efremov R. G., Gulyaev D. I., Vergoten G., Modyanov N. N. Application of 3D molecular hydrophobicity potential to the analysis of spatial organization of membrane domains in proteins. I. Hydrophobic properties of transmembrane segments of Na,K-ATPase // *J. Protein Chemistry.* — 1992. — Vol. 11. — P. 665–675. — DOI: 10.1007/BF01026035.
11. Engelman D. M. Membranes are more mosaic than fluid // *Nature.* — 2005. — Vol. 438. — P. 578–580. DOI: 10.1038/nature04394.
12. Cebecauer M., Amaro M., Jurkiewicz P., Sarmiento M. J., Šachl R., Cwiklik L., Hof M. Membrane lipid nanodomains // *Chem. Rev.* — 2018. — Vol. 118. — P. 11259. — DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00322.
13. Enkavi G., Javanainen M., Kulig W., Róg T., Vattulainen I. Multiscale simulations of biological membranes: The challenge to understand biological phenomena in a living substance // *Chem. Rev.* — 2019. — Vol. 119. — P. 5607–5774. — DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00538.
14. Kinnun J. J., Bolmatov D., Lavrentovich M. O., Katsaras J. Lateral heterogeneity and domain formation in cellular membranes // *Chem. Phys. Lipids.* — 2020. — Vol. 232. — P. 104976. — DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2020.104976.
15. Kure J. L., Andersen C. A., Mortensen K. I., Wiseman P. W., Arnspang E. C. Revealing plasma membrane nano-domains with diffusion analysis methods // *Membranes (Basel).* — 2020. — Vol. 10. — P. 314. — DOI: 10.3390/membranes10110314.

16. Phillips R., Ursell T., Wiggins P., Sens P. Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function // *Nature*. — 2009. — Vol. 459. — P. 379–385. — DOI: 10.1038/nature08147.
17. Bocharov E. V., Mineev K. S., Pavlov K. V., Akimov S. A., Kuznetsov A. S., Efremov R. G., Arseniev A. S. Helix-helix interactions in membrane domains of bitopic proteins: specificity and role of lipid environment // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2017. — Vol. 1859. — P. 561–576. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.10.024.
18. Vanni S., Hirose H., Barelli H., Antonny B., Gautier R. A sub-nanometre view of how membrane curvature and composition modulate lipid packing and protein recruitment // *Nat. Commun.* — 2014. — Vol. 5. — P. 4916. — DOI: 10.1038/ncomms5916.
19. Sharma S., Lindau M. t-SNARE Transmembrane domain clustering modulates lipid organization and membrane curvature // *J. Am. Chem. Soc.* — 2017. — Vol. 139. — P. 18440–18443. — DOI: 10.1021/jacs.7b10677.
20. Schmid F. Physical mechanisms of micro- and nanodomain formation in multicomponent lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta. Biomemb.* — 2017. — Vol. 1859. — P. 509–528. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.10.021.
21. Almeida P. F. F. Thermodynamics of lipid interactions in complex bilayers // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2009. — Vol. 1788. — P. 72–85. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.08.007.
22. Spaar A., Salditt T. Short range order of hydrocarbon chains in fluid phospholipid bilayers studied by X-ray diffraction from highly oriented membranes // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 85. — P. 1576–1584. — DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74589-5.
23. de Joannis J., Jiang Y., Yin F., Kindt J. T. Equilibrium distributions of dipalmitoyl phosphatidylcholine and dilauroyl phosphatidylcholine in a mixed lipid bilayer: atomistic semigrand canonical ensemble simulations // *J. Phys. Chem. B*. — 2006. — Vol. 110. — P. 25875–25882. — DOI: 10.1021/jp065734y.
24. Dewa T., Vigmond S. J., Regen S. L. Lateral heterogeneity in fluid bilayers composed of saturated and unsaturated phospholipids // *J. Am. Chem. Soc.* — 1996. — Vol. 118. — P. 3435–3440. — DOI: 10.1021/ja953905z.
25. Risselada H. J., Marrink S. J. The molecular face of lipid rafts in model membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2008. — Vol. 105. — P. 17367–17372. — DOI: 10.1073/pnas.0807527105.
26. Ubbelohde A. R. *Melting and Crystal Structure*. — Oxford: Clarendon Press, 1965. — 325 p.
27. Davies D. B., Matheson A. J. Influence of molecular rotation on some physical properties of liquids // *Discuss. Faraday Soc.* — 1967. — Vol. 43. — P. 216–222. — DOI: 10.1039/d9674300216.
28. Levine Y. K. Physical studies of membrane structure // *Progr. Biophys. Membr. Struct.* — 1972. — Vol. 24. — P. 1–74. — DOI: 10.1016/0079-6107(72)90003-x.
29. Lee A. G., Birdsall N. J. M., Metcalfe J. C., Toon P. A., Warren G. B. Clusters in lipid bilayers and the interpretation of thermal effects in biological membranes // *Biochemistry*. — 1974. — Vol. 13. — P. 3699–3705. — DOI: 10.1021/bi00715a013.

30. Gordeliy V. I., Ivkov V. G., Ostanevich Yu. M., Yaguzhinskij L. S. Detection of structural defects in phosphatidylcholine membranes by small-angle neutron scattering. The cluster model of a lipid bilayer // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1991. — Vol. 1061. — P. 39–48. — DOI: 10.1016/0005-2736(91)90266-b.
31. Niemela P. S., Ollila S., Hyvönen M. T., Karttunen M., Vattulainen I. Assessing the nature of lipid raft membranes // *PLoS Comput. Biol.* — 2007. — Vol. 3. — P. e34. — DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030034.
32. Petruzielo R. S., Heberle F. A., Feigenson G. W. Phase behavior and domain size in sphingomyelin-containing lipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2013. — Vol. 1828. — P. 1302–1313. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.01.007.
33. Pathak P., London E. Measurement of lipid nanodomain (raft) formation and size in sphingomyelin/POPC/cholesterol vesicles shows TX-100 and transmembrane helices increase domain size by coalescing preexisting nanodomains but do not induce domain formation // *Biophys. J.* — 2011. — Vol. 101. — P. 2417–2425. — DOI: 10.1016/j.bpj.2011.08.059.
34. de Wit G., Danial J. S. H., Wallace M. I. Dynamic label-free imaging of lipid nanodomains // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Vol. 112. — P. 12299–12303. — DOI: 10.1073/pnas.1508483112.
35. Honigsmann A., Mueller V., Eggeling C. STED microscopy detects and quantifies liquid phase separation in lipid membranes using a new far-red emitting fluorescent phosphoglycerolipid analogue // *Faraday Discuss.* — 2013. — Vol. 161. — P. 77–89, discussion p. 113–150. — DOI: 10.1039/c2fd20107k.
36. Yano Y., Hanashima S., Hiroshi T., Slotte J. P., London E., Murata M. Sphingomyelins and ent-Sphingomyelins Form Homophilic Nano-Subdomains within Liquid Ordered Domains // *Biophys. J.* — 2020. — Vol. 119. — P. 539–552. — DOI: 10.1016/j.bpj.2020.06.028.
37. Winkler P. M., Regmi R., García-Parajo M. F. Transient nanoscopic phase separation in biological lipid membranes resolved by planar plasmonic antennas // *ACS Nano.* 2017. Vol. 11. P. 7241–7250. — DOI: 10.1021/acsnano.7b03177.
38. Enoki T. A., Heberle F. A., Feigenson G. W. FRET detects the size of nanodomains for coexisting liquid-disordered and liquid-ordered phases // *Biophys. J.* — 2018. — Vol. 114. — P. 1921–1935. — DOI: 10.1016/j.bpj.2018.03.014.
39. Yasuda T., Matsumori N., Murata M. Formation of gel-like nanodomains in cholesterol-containing sphingomyelin or phosphatidylcholine binary membrane as examined by fluorescence lifetimes and ^2H NMR spectra // *Langmuir.* — 2015. — Vol. 31. — P. 13783–13792. — DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03566.
40. Ando J., Kinoshita M., Sodeoka M. Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Vol. 112. — P. 4558–4563. — DOI: 10.1073/pnas.1418088112.
41. Wu H. M., Lin Y. H., Hsieh C. L. Nanoscopic substructures of raft-mimetic liquid-ordered membrane domains revealed by highspeed single-particle tracking // *Sci. Rep.* 2016. — Vol. 6. — P. 20542. — DOI: 10.1038/srep20542.

42. Pathak P., London E. The effect of membrane lipid composition on the formation of lipid ultrananodomains // *Biophys. J.* — 2015. — Vol. 109. — P. 1630–1638. — DOI: 10.1016/j.bpj.2015.08.029.
43. Eggeling C., Ringemann C., Medda R., Schwarzmann G., Sandhoff K., Polyakova S., Belov V. N., Hein B., von Middendorff C., Schönle A., Hell S. W. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell // *Nature.* — 2009. — Vol. 457. — P. 1159–1162. — DOI: 10.1038/nature07596.
44. Regmi R., Winkler P. M., Flauraud V., Borgman K. J. E., Manzo C., Brugger J., Rigneault H., Wenger J., García-Parajo M. F. Planar optical nanoantennas resolve cholesterol-dependent nanoscale heterogeneities in the plasma membrane of living cells // *Nano Lett.* — 2017. — Vol. 17. — P. 6295–6302. — DOI: 10.1021/acs.nanolett.7b02973.
45. Gladstein S., Almossalha L. M., Cherkezyan L., Chandler J. E., Eshein A., Eid A., Zhang D., Wu W., Bauer G. M., Stephens A. D., Morochnik S., Subramanian H., Marko J. F., Ameer G. A., Szleifer I., Backman V. Multimodal interference-based imaging of nanoscale structure and macromolecular motion uncovers UV induced cellular paroxysm // *Nat. Commun.* — 2019. — Vol. 10. — P. 1652. — DOI: 10.1038/s41467-019-09717-6.
46. Nickels J. D., Chatterjee S., Stanley C. B., Qian S., Cheng X., Myles D. A. A., Standaert R. F., Elkins J. G., Katsaras J. The in vivo structure of biological membranes and evidence for lipid domains // *PLoS Biol.* — 2017. — Vol. 15. — P. e2002214. — DOI: 10.1371/journal.pbio.2002214.
47. Mouritsen O. G., Boothroyd A., Harris R., Jan N., Lookman T., MacDonald L., Pink D. A., Zuckermann M. J. Computer simulation of the main gel–fluid phase transition of lipid bilayers // *J. Chem. Phys.* — 1983. — Vol. 79. — P. 2027–2041. — DOI: 10.1063/1.445987.
48. Jørgensen K., Sperotto M. M., Mouritsen O. G., Ipsen J. H., Zuckermann M. J. Phase equilibria and local structure in binary lipid bilayers // *Biochim. Biophys. Acta. Biomemb.* — 1993. — Vol. 1152. — P. 135–145. — DOI: 10.1016/0005-2736(93)90240-z.
49. Sugár I. P., Thompson T. E., Biltonen R. L. Monte Carlo simulation of two-component bilayers: DMPC/DSPC mixtures // *Biophys. J.* — 1999. — Vol. 76. — P. 2099–2110. — DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77366-2.
50. Pandit S. A., Jakobsson E., Scott H. L. Simulation of the early stages of nano-domain formation in mixed bilayers of sphingomyelin, cholesterol, and dioleoylphosphatidylcholine // *Biophys. J.* — 2004. — Vol. 87. — P. 3312–3322. — DOI: 10.1529/biophysj.104.046078.
51. Polyansky A. A., Volynsky P. E., Arseniev A. S., Efremov R. G. Adaptation of a membrane active peptide to heterogeneous environment. II. The role of mosaic nature of the membrane surface // *J. Phys. Chem. B.* — 2009. — Vol. 113. — P. 1120–1126. — DOI: 10.1021/jp803641x.
52. Bennett W. F. D., Tieleman D. P. Computer simulations of lipid membrane domains // *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* — 2013. — Vol. 1828. — P. 1765–1776. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.03.004.

53. Marrink S. J., Corradi V., Souza P. C. T., Ingólfsson H. I., Tieleman D. P., Sansom M. S. P. Computational modeling of realistic cell membranes // *Chem. Rev.* — 2019. — Vol. 119. — P. 6184–6226. — DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00460.
54. Gapsys V., de Groot B. L., Briones R. Computational analysis of local membrane properties // *J. Comput. Aid. Mol. Des.* — 2013. — Vol. 27. — P. 845–858. — DOI: 10.1007/s10822-013-9684-0.
55. Pyrkova D. V., Tarasova N. K., Pyrkov T. V., Krylov N. A., Efremov R. G. Atomic-scale lateral heterogeneity and dynamics of two-component lipid bilayers composed of saturated and unsaturated phosphatidylcholines // *Soft Matter*. — 2011. — Vol. 7. — P. 2569–2579. — DOI: 10.1039/c0sm00701c.
56. Berendsen H. J. C., Van Der Spoel D., Van Drunen R. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation // *Comput. Phys. Commun.* — 1995. — Vol. 91. — P. 43–56. — DOI: 10.1016/0010-4655(95)00042-E.
57. Phillips J. C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R. D., Kalé L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD // *J. Comput. Chem.* — 2005. — Vol. 26. — P. 1781–1802. — DOI: 10.1002/jcc.20289.
58. Brooks B. R., Brooks C. L. III, Mackerell A. D., Nilsson L., Petrella R. J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caflisch A., Caves L., Cui Q., Dinner A. R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoseck H., Im W., Kuczera K., Lazaridis T., Ma T., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R. W., Post C. B., Pu J. Z., Schaefer M., Tidor B., Venable R. M., Woodcock H. L., Wu X., Yang W., York D. M., Karplus M. CHARMM: The biomolecular simulation program // *J. Comput. Chem.* — 2009. — Vol. 30. — P. 1545–1615. — DOI: 10.1002/jcc.21287.
59. Berger O., Edholm O., Jähnig F. Molecular dynamics simulations of a fluid bilayer of dipalmitoylphosphatidylcholine at full hydration, constant pressure, and constant temperature // *Biophys. J.* — 1997. — Vol. 72. — P. 2002–2013. — DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78845-3.
60. Klauda J. B., Venable R. M., Freites J. A., O'Connor J. W., Tobias D. J., Mondragon-Ramirez C., Vorobyov I., MacKerell A. D., Pastor R. W. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types // *J. Phys. Chem. B.* — 2010. — Vol. 114. — P. 7830–7843. — DOI: 10.1021/jp101759q.
61. Jämbeck J. P. M., Lyubartsev A. P. Another piece of the membrane puzzle: extending Slipids further // *J. Chem. Theory Comput.* — 2013. — Vol. 9. — P. 774–784. — DOI: 10.1021/ct300777p.
62. Marrink S. J., Risselada H. J., Yefimov S., Tieleman D. P., De Vries A. H. The MARTINI forcefield: Coarse grained model for biomolecular simulations // *J. Phys. Chem. B.* — 2007. — Vol. 111. — P. 7812–7824. — DOI: 10.1021/jp071097f.
63. Von Dreele P. H. Estimation of lateral species separation from phase transitions in nonideal two-dimensional lipid mixtures // *Biochemistry*. — 1978. — Vol. 17. — P. 3939–3943. — DOI: 10.1021/bi00612a009.

64. Yano Y., Hanashima S., Murata M. Sphingomyelin stereoisomers reveal that homophilic interactions cause nanodomain formation // *Biophys. J.* — 2018. — Vol. 115. — P. 1530–1540. — DOI: 10.1016/j.bpj.2018.08.042.
65. Estep T. N., Freire E., Thompson T. E. Thermal behavior of stearyl sphingomyelin-cholesterol dispersions // *Biochemistry.* — 1981. — Vol. 20. — P. 7115–7118. — DOI: 10.1021/bi00528a010
66. Boggs J. M. Intermolecular hydrogen bonding between lipids: influence on organization and function of lipids in membranes // *Can. J. Biochem.* — 1986. — Vol. 58. — P. 755–770. — DOI: 10.1139/o80-107.
67. Nymeyer H., Zhou H.-X. A method to determine dielectric constants in nonhomogeneous systems: application to biological membranes // *Biophys. J.* — 2008. — Vol. 94. — P. 1185–1193. — DOI: 10.1529/biophysj.107.117770.
68. Mombelli E., Morris R., Taylor W., Fraternali F. Hydrogen-bonding propensities of sphingomyelin in solution and in a bilayer assembly: a molecular dynamics study // *Biophys. J.* — 2003. — Vol. 84. — P. 1507–1517. — DOI: 10.1016/S0006-3495(03)74963-7.
69. Efremov R. G. Dielectric-dependent strength of interlipid H-bonding in biomembranes: Model case study // *J. Chem. Inf. & Mod.* — 2019. — Vol. 59. — P. 2765–2775. — DOI: 10.1021/acs.jcim.9b00193.
70. Pyrkova D. V., Tarasova N. K., Krylov N. A., Nolde D. E., Efremov R. G. Lateral clustering of lipids in hydrated bilayers composed of dioleoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine // *Biochemistry (Moscow) Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology.* — 2011. — Vol. 5. — P. 278–285. — DOI: 10.1134/S1990747811040106.
71. Matsumori N., Yamaguchi T., Murata M. Orientation and order of the amide group of sphingomyelin in bilayers determined by solid-state NMR // *Biophys. J.* — 2015. — Vol. 108. — P. 2816–2824. — DOI: 10.1016/j.bpj.2015.05.011.
72. Yasuda T., Kinoshita M., Matsumori N. Detailed comparison of deuterium quadrupole profiles between sphingomyelin and phosphatidylcholine bilayers // *Biophys. J.* — 2014. — Vol. 106. — P. 631–638. — DOI: 10.1016/j.bpj.2013.12.034.
73. Pyrkova D. V., Tarasova N. K., Krylov N. A., Nolde D. E., Pentkovsky V. M., Efremov R. G. Dynamic clustering of lipids in hydrated two-component membranes: results of computer modeling and putative biological impact // *J. Biomol. Struct. & Dyn.* 2013. — Vol. 31. — P. 87–95. — DOI: 10.1080/07391102.2012.691365.
74. Björkbohm A., Róg T., Kankaanpää P., Lindroos D., Kaszuba K., Kurita M., Yamaguchi S., Yamamoto T., Jaikishan S., Paavolainen L., Päivärinne J., Nyholm T. K. N., Katsumura S., Vattulainen I., Slotte J. P. N- and O-methylation of sphingomyelin markedly affects its membrane properties and interactions with cholesterol // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2011. — Vol. 1808. — P. 1179–1186. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.01.009
75. Honerkamp-Smith A. R., Veatch S. L., Keller S. L. An introduction to critical points for biophysicists; observations of compositional heterogeneity in lipid membranes //

- Biochim. Biophys. Acta. Biomemb. — 2009. — Vol. 1788. — P. 53–63. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.09.010
76. Veatch S. L., Cicuta P., Sengupta P., Honerkamp-Smith A., Holowka D., Baird B. Critical fluctuations in plasma membrane vesicles // ACS Chem. Biol. — 2008. — Vol. 3. — P. 287–293. — DOI: 10.1021/cb800012x.
77. Veatch S. L., Soubias O., Keller S. L., Gawrisch K. Critical fluctuations in domain-forming lipid mixtures // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2007. — Vol. 104. — P. 17650–17655. — DOI: 10.1073/pnas.0703513104.
78. Fischer T., Jelger Risselada H., Vink R. L. C. Membrane lateral structure: The influence of immobilized particles on domain size // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2012. — Vol. 14. — P. 14500. — DOI: 10.1039/c2cp41417a.
79. Palmieri B., Grant M., Safran S. A. Prediction of the dependence of the line tension on the composition of linactants and the temperature in phase separated membranes // Langmuir. — 2014. — Vol. 30. — P. 11734–11745. — DOI: 10.1021/la502347a.
80. Heberle F. A., Doktorova M., Goh S. L., Standaert R. F., Katsaras J., Feigenson G. W. Hybrid and nonhybrid lipids exert common effects on membrane raft size and morphology // J. Am. Chem. Soc. — 2013. — Vol. 135. — P. 14932–14935. — DOI: 10.1021/ja407624c.
81. Falck E., Róg T., Karttunen M., Vattulainen I. Lateral diffusion in lipid membranes through collective flows // J. Am. Chem. Soc. — 2008. — Vol. 130. — P. 44–45. — DOI: 10.1021/ja7103558.
82. Apajalahti T., Niemelä P., Govindan P. N., Miettinen M. S., Salonen E., Marrink S.-J., Vattulainen I. Concerted diffusion of lipids in raft-like membranes // Faraday Discuss. — 2010. — Vol. 144. — P. 411–430. — DOI: 10.1039/b901487j.
83. Bolmatov D., Cai Y. O., Zav'yalov D., Zhernenkov M. Crossover from picosecond collective to single particle dynamics defines the mechanism of lateral lipid diffusion // Biochim. Biophys. Acta. Biomemb. — 2018. — Vol. 1860. — P. 2446–2455. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2018.07.004.
84. Metzler R., Jeon J.-H., Cherstvy A. G. Non-Brownian diffusion in lipid membranes: Experiments and simulations // Biochim. Biophys. Acta. Biomembr. — 2016. — Vol. 1858. — P. 2451–2467. — DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.01.022.
85. Dubovskii P. V., Efremov R. G. The role of hydrophobic /hydrophilic balance in the activity of structurally flexible vs rigid cytolytic polypeptides and analogues developed on their basis // Expert Rev. Proteomics. — 2018. — Vol. 15. — P. 873–886. — DOI: 10.1080/14789450.2018.1537786.
86. Konshina A. G., Dubovskii P. V., Efremov R. G. Stepwise insertion of cobra cardiotoxin CT2 into a lipid bilayer occurs as an interplay of protein and membrane «dynamic molecular portraits» // J. Chem. Inf. & Mod. — 2020. — Vol. 61. — P. 385–399. — DOI: 10.1021/acs.jcim.0c01137.

«Dynamic molecular portrait» of a cell membrane with nanoscale resolution

R. G. Efremov^{1,2,3}

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

²National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

³Moscow Institute of Physics and Technology (State University),
Dolgoprudny, Moscow, Russia

*E-mail: efremov@nmr.ru

The review examines the atomistic aspects of the structural organization and dynamic behavior of biomembranes — from model hydrated lipid bilayers to natural cell membranes. The main attention is paid to the description of the properties of the lipid bilayer/water interface within the framework of the concept of the so-called «dynamic molecular portrait» (DMP). This term denotes a set of time-dependent distributions on the phases interface of various physicochemical properties inherent in both model and cell membranes. One of the most important features of biomembranes is their mosaicity, which is expressed in the permanent presence of lateral inhomogeneities, the size and lifetime of which vary in a wide range — from 1 to 10³ nm and from 0,1 ns to milliseconds. In addition to the relatively well-studied macroscopic domains (the so-called «rafts»), the analysis of micro- and nanoclusters (or domains) is of increasing interest. These objects form an instantaneous picture of the distribution of structural, dynamic, hydrophobic, electrical and other properties at the membrane-water interface. This is due to the fact that such nanoclusters (NCs) play a key role in the functioning of cell membranes. Therefore, an understanding of the atomistic aspects of the phenomena associated with NCs is required. The physical mechanisms that cause such a picture in such mesoscopic supramolecular systems as biomembranes have not yet been described in detail. Since the analysis of these phenomena in experiments with the required spatiotemporal resolution is extremely difficult, methods of computational experiment are now becoming increasingly important. The review describes the results of experimental and theoretical studies of NCs spontaneously formed in lipid membranes. The main attention is paid to the methods of detecting such domains, delineation of their spatiotemporal parameters and molecular mechanisms of formation. The biological role of NCs in cell membranes is briefly described. Understanding such effects creates the basis for the rational design of new promising medicines, therapeutic tools and artificial membrane materials with predefined characteristics.

Keywords: lipid bilayer, biomembrane, dynamic molecular portrait, lateral heterogeneity, nanocluster.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМНОЙ ДНК

В. М. Комаров, А. А. Самченко¹

Цель данного сообщения проиллюстрировать, как исходная стабильность пирамидального строения валентных связей NH_2 -группы в молекулах азотистых оснований может рассматриваться в качестве физической первопричины формирования многих структурно-функциональных особенностей геномной ДНК.

Ключевые слова: аминогруппа, непланарность азотистых оснований, Уотсон-Криковские АТ- и GC-пары, полиморфизм водородного связывания, ДНК, нуклеотидные треки, геном, ген, кодоны.

Введение в проблему

В современной биофизике вопрос о нетривиальности физической природы инициирования ряда важных генетических процессов в клетке все больше и больше приобретает свои яркие очертания. Накоплены убедительные свидетельства того, что компактизация нуклеиновых кислот, инициация транскрипции, репарация, трансляция обуславливаются конкретными взаимодействиями ДНК–белок, ДНК–РНК, РНК–РНК, белок–РНК и контролируются конформационной лабильностью молекул. Имеющиеся структурные данные, а также стремительно растущий объем информации по полногеномному секвенированию различных видов организмов указывают, например, на необычность механизма уникальной упаковки Уотсон-Криковских АТ- и GC-пар в молекулах нуклеиновых кислот и на сложность понимания неравноправного участия последовательностей (треков) из АТ- и GC-пар в организации повторов геномной ДНК [1–7]. Фиксируется широкий диапазон конформационного полиморфизма структуры ДНК в реальных условиях с реализацией разнообразных форм двойной спирали (А-, А'-, В-, α -В'-, β -В'-, С-, С'-, С'-', D-, E- и Z-форм), причем с явным предпочтением в них деформаций типа «пропеллера», «ступеньки» и «излома» у водородно-связанных пар [8–11]. Обнаруживается стабильно повышенная частота встречаемости АТ-пар как в коротких, так и в протяженных нуклеотидных треках геномов разных видов про- и эукариот. Не ясна, также, первопричина наблюдаемого предпочтительного использования кодонов (*codon usage bias*) в белок-кодирующих генах живых организмов. Поэтому выявление физических

¹ Институт биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, Пущино, Институтская ул., д. 3.
E-mail: komarov_vm@mail.ru

факторов, определяющих в первую очередь возможно «скрытые» изначальные особенности строения самого комплементарного спаривания оснований, представляется нам весьма актуальным.

В данном сообщении, анализируя структурные данные по организации различных нуклеотидных комплексов вместе с нашими собственными квантово-химическими оценками, последовательно обсуждаются в весьма сжатой форме затронутые выше проблемы. Делается оценка ключевой роли имеющихся отличий структурного полиморфизма Уотсон-Криковских АТ- и GC-пар в инициировании отмеченных явлений.

О структуре двойной спирали ДНК

Предложенная Д. Уотсоном и Ф. Криком более 60 лет назад пространственная организация молекулы ДНК базируется на модели довольно жесткой структуры двойной спирали [12]. Согласно имевшимся на то время экспериментальным данным плоские пространственно изоморфные комплементарные аденин-тиминовые и гуанин-тиминовые пары азотистых оснований полагались находящимися в плотной параллельной укладке в молекуле ДНК и с некоторым своим поворотом относительно оси спирали. Считалось и продолжает считаться, что наблюдаемые искажения формы регулярной упаковки нуклеотидов обусловлены в основном воздействием стэкингových возмущений (межплоскостными взаимодействиями азотистых оснований), свойственным таким складчато-слоистым образованиям, а также влиянием молекул связанной воды и противоионов в реальных структурах (рис. 1). Наиболее емко все эти представления изложены в популярных изданиях [8, 9] (см. также работу [13]).

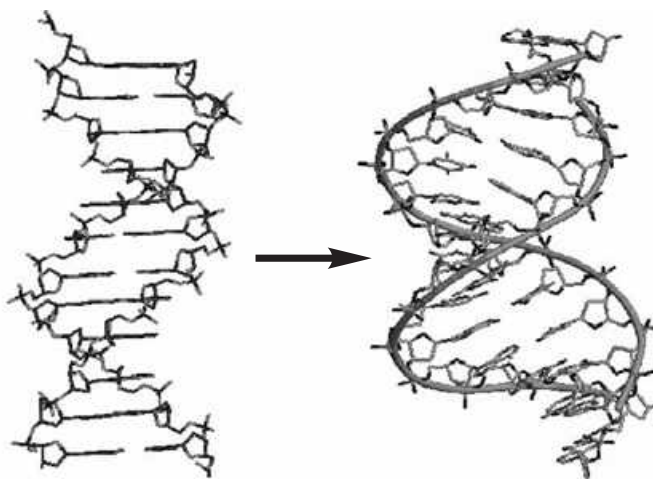


Рис. 1. Идеальная и наблюдаемая экспериментально структуры ДНК

Ранее нами уже отмечалось, что для адекватного описания пространственной организации ДНК крайне важен учет исходного, почти всегда пренебрегаемого, пирамидального строения экзоциклических аминогрупп цитозина, аденина, гуанина как в формировании непланарности самих этих молекул, так и в возникновении некопланарности структуры АТ- и GC-пар при водородном связывании оснований [14–16]. В качестве аргументов послужили обобщенные прецизионные данные микроволновой спектроскопии по газофазному строению различных молекул простейших ароматических и ненасыщенных аминов [17–19], аминзамещенных азотистых оснований [20–22], а также собственные квантово-химические оценки, выполненные на основе полуэмпирических схем расчета [14–16, 23].

Было показано, что изначальное пирамидальное, sp^3 -гибридное электронное строение валентной структуры атома азота аминогруппы всегда, несмотря на всю малость предпочтения в энергии (≤ 7 ккал/моль) по сравнению с геометрией sp^2 -состояния, остается иницирующим в организации неплоской формы такого типа замещенных соединений с сопряженными связями. (Для справки, энергия комнатных температур имеет порядок $kT \approx 0,5$ ккал/моль.) Наиболее простым и наглядным интегральным физическим параметром, характеризующим степень непланарности молекулы, можно рассматривать величину «инерционного дефекта» $\Delta' = I_c - (I_a + I_b)$ [24], где I_c — главный, а I_a, I_b — остальные ее моменты инерции. Спектроскопически регистрируемое значение инерционного дефекта для азотистых оснований с аминогруппой оказывается не столь малым и лежит в области $\Delta' = -0,2 \div -0,5 \mu \cdot A^2$, указывая, таким образом, на исходную устойчивость непланарности этих природных «асимметричных волчков». Квантово-химические расчеты удовлетворительно воспроизводят наблюдаемую величину [25–27].

Что касается возможности проявления некопланарного строения одиночных Уотсон-Криковских пар, вследствие участия в водородном связывании оснований неплоских аминогрупп, то в силу небольшой величины энергетического эффекта и отсутствия прямых экспериментальных доказательств о неплоской геометрии пар в изолированной фазе указанным эффектом просто пренебрегают [28, 29]. На данный момент такая ситуация скорее временная и обусловлена в значительной степени некоторыми общими лабораторными методическими сложностями, связанными со слабой химической устойчивостью азотистых оснований при возгонке их в газообразное состояние. В то же время имеющиеся рентгеноструктурные данные по геометрии водородно-связанных пар оснований в составе, например, монокристаллов, уже дают определенные основания предполагать (по мнению самих же авторов исследований), что регистрируемая иногда в кристаллических образцах необычная, «пропеллеровая» геометрия пар есть «вероятнее всего все же внутреннее свойство самих пар» [10, 11]. Более

убедительными в этом отношении выглядят недавно выполненные газофазные микроволновые исследования структуры синтетического аналога Уотсон-Криковской АТ-пары, 2-aminopyridine-2-pyridone [30]. Здесь в явном виде уже четко зафиксирована реализация «пропеллеровой» конформации этой одиночной пары при участии в Н-связывании NH_2 -группы аминопиридина. Поэтому считаем справедливым замечание авторов данной работы о «преждевременности» часто цитируемого в литературе заключения [29] об исходно плоском строении изолированных комплементарных АТ- и GC-пар.

Весьма содержательным моментом в обсуждаемом вопросе является, по нашему мнению, возможная реализация еще и скрытой неоднозначности формы водородного связывания азотистых оснований по таким аминогруппам. Инверсионная бистабильность пирамидального строения NH_2 -группы инициирует, согласно выполненным оценкам [25–27, 31, 32], очень важную отличительную особенность Уотсон-Криковских пар. У комплементарной АТ-пары в частности, в основном электронном состоянии, возникают две формы Н-связывания оснований, вырожденных по энергии. Это структуры с правым и левым «пропеллеровыми» разворотами плоскостей оснований. Для случая GC-пары характерным оказывается уже повышенный, 4-кратный структурный полиморфизм комплементарного Н-спаривания. Здесь, из-за наличия двух пирамидальных NH_2 -групп, появляются два «пропеллероподобных» (левого и правого разворота) и два «ступенькообразных» (ступенька вверх и ступенька вниз) варианта Уотсон-Криковского спаривания оснований в основном состоянии, как это показано на рис. 2.

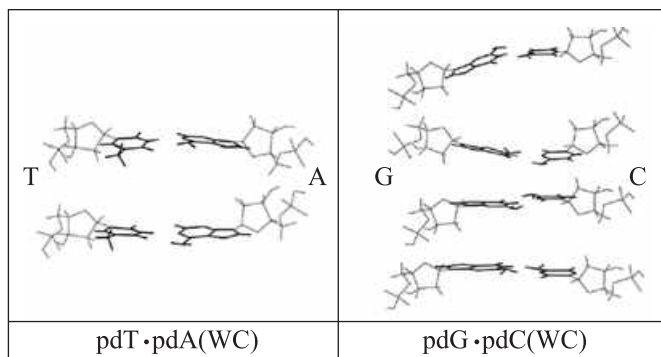


Рис. 2. Двукратный полиморфизм водородного связывания Уотсон-Криковской (WC) нуклеотидной пары pdT·pdA и четырехкратный полиморфизм пары pdG·pdC. Результаты [31] квантово-химического РМЗ-расчета [33, 34]

В качестве примера на рисунке 3 представлен один из возможных вариантов организации непланарной упаковки GC-пар в структуре одиночного тетра-

мерного дуплекса $d(\text{GpGpGpG}) \cdot d(\text{CpCpCpC})$, полученный с использованием квантово-химического РМЗ-метода [33, 34]. Просматривается явная некопланарность Н-связывания оснований по неплоским аминогруппам. Последующие оценки показали сохранение общей некопланарности Уотсон-Криковских пар и в условиях появления противоионов, а также молекул связанной воды в структуре нуклеотидного комплекса [35].

Вполне вероятно, что именно исходная множественность возможных конфигураций комплементарного Н-связывания азотистых оснований порождает наблюдаемую высокую гетерогенность и лабильность упорядочения АТ- и GC-пар в структуре полинуклеотидных двойных цепей с доминированием «пропеллеровых» и «ступенкообразных» деформаций пар. Наряду с известной подвижностью сахарофосфатного остова данное обстоятельство естественным образом вписывается в регистрируемую предрасположенность конформации ДНК к своему широкому структурному полиморфизму [8].

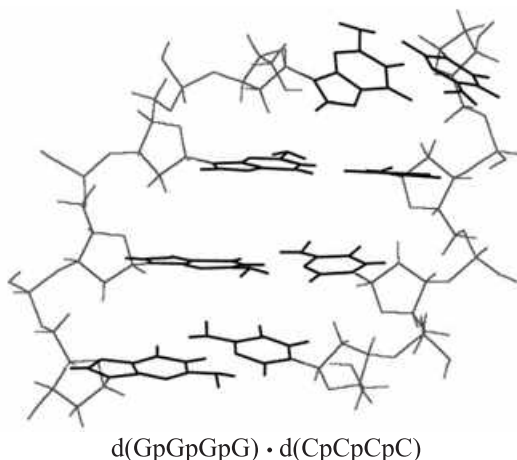


Рис. 3. РМЗ-рассчитанная структура тетрамерного ДНК дуплекса $d(\text{GpGpGpG}) \cdot d(\text{CpCpCpC})$ [31]

Повышенная встречаемость нуклеотидных АТ-треков в структуре геномов живых организмов

Как установлено, основу структурно-функциональной организации геномной ДНК живых организмов (в прокариотах — это хромосомы, а в эукариотах — помимо хромосом сюда входит еще и митохондриальная ДНК) составляют повторяющиеся нуклеотидные треки. Их доля может достигать иногда до 98 % во всей ДНК [6, 36]. Считается, что в формировании конкретного вида нуклеотидных треков [1–7, 36–41] определяющим параметром является GC-

состав [42]. В основе этого подхода лежит факт о повышенной термодинамической стабильности Уотсон-Криковской GC-пары, из-за наличия здесь трех водородных связей, а не двух, как это имеет место в случае пары AT. (Для сравнения, эксперимент дает значение энтальпии Н-связывания $\Delta H = 20,95$ ккал/моль для GC-пары и $\Delta H = 12,97$ ккал/моль для AT-пары [43].) В справедливости работы выбранного подхода обычно приводят данные о широком диапазоне GC-состава, от 16 до 75 %, наблюдаемого у живых организмов [42, 44, 45], а также часто цитируют корреляции GC-состава с термостабильностью ДНК [46], термоадаптацией организмов [47], устойчивостью организмов к УФ-радиации [48], размерами геномов [49], длиной кодирующей последовательности [50], активностью мутационного процесса [51], скоростью транскрипции [52], влиянием факторов окружающей среды [53].

Тем не менее, используемое приближение в определении лимитирующего момента в структурной организации геномов как про-, так и эукариот представляется нам весьма ограниченным и достаточно противоречивым.

Так, часто упоминаемый широкий диапазон GC-состава характерен лишь для геномов простейших микроорганизмов — прокариот [42, 44, 45]. В то же время реальная статистика результатов по 1700 прокариотическим хромосомам и плазмидам показывает, однако, что наиболее распространенными в природе оказываются все же те прокариоты, которым свойственен относительно высокий вклад не GC-пар, а AT-пар в составе своих хромосом [54]. Для геномов более сложных организмов — организмов эукариот и в особенности геномов высших растений, животных и человека это равновесие, как ни странно, исходно смещено в сторону AT-пар [55, 56]. Найдены даже представители эукариот с аномально высоким AT-составом ДНК, доходящим до 81 % [57]!

Помимо этого, в связи с быстрым развитием технологии секвенирования все больше и больше накапливается фактов, говорящих о необычных закономерностях состава самих повторяющихся нуклеотидных последовательностей в ДНК живых организмов. В организации генома чаще всего наблюдаются мононуклеотидные треки из AT-пар. Из последовательностей смешанного типа тоже часто обнаруживаются треки W(AT)-вида (W, «weak tracts») нежели треки вида S(G/C) (S, «strong tracts») [2, 7, 37, 58–60].

Из-за сложности формулировки на данный момент конкретного механизма о первопрочине возникающих структурных особенностей считается, что фиксируемая избыточность [1–7] A/T-нуклеотидных треков по сравнению с G/C-треками в составе геномной ДНК есть общее следствие естественного отбора [61–63]. В основе его лежит повышенная мутационная способность GC-пар к транзициям и трансверсиям ($G:C \rightarrow A:T$, $G:C \rightarrow T:A$) по сравнению с AT-парами ($A:T \rightarrow G:C$, $A:T \rightarrow C:G$).

С нашей точки зрения имеются, тем не менее, основания полагать, что и в формировании предпочтительного состава таких последовательностей значительную роль могут играть упомянутые выше исходные отличия в структурном полиморфизме комплементарных АТ- и GC-пар. В частности, повышенная неоднозначность формы комплементарного Н-связывания оснований в GC-паре определенным образом лимитирует наблюдаемые закономерности.

В качестве иллюстрации данному заключению на рис. 4 представлены результаты наших спектральных исследований [35], полученные с помощью методов сравнительной геномики, по частотам встречаемости нуклеотидных треков poly(A)_n , poly(T)_n , poly(G)_n , poly(C)_n , W(A/T)_n и S(G/C)_n всевозможной длины в геномах широкого ряда представителей эукариот с разным GC-составом. Были изучены геномы *Dictyostelium discoideum* (GC ~ 25,7 %), *Caenorhabditis elegans* (GC ~ 36,9 %), *Arabidopsis thaliana* (GC ~ 38 %), *Drosophila melanogaster* (GC ~ 38,8 %), *Homo sapiens* (GC ~ 42,0 %), *Gallus gallus* (GC ~ 50,0 %), *Leishmania major* (GC ~ 59,1 %). Полные аннотации геномов взяты из базы GenBank [64]. Спектральный анализ был сделан на основе разработанной собственной компьютерной программы с описанием алгоритма в [35].

Используемая здесь спецификация треков означает следующее: poly(A)_n — это двойные нуклеотидные последовательности длины n , состоящие только из Уотсон-Криковских АТ-пар; poly(T)_n — ДНК-последовательности длины n , состоящие из Уотсон-Криковских ТА-пар; poly(G)_n и poly(C)_n — ДНК-последовательности, состоящие только из Уотсон-Криковских GC- и CG-пар соответственно; смешанные W(A/T)_n -треки — это ДНК-последовательности длины n смешанных комбинаций из комплементарных АТ- и ТА-пар; S(G/C)_n — это ДНК-последовательности комбинаций из комплементарных GC- и CG-пар.

Как видно из рис. 4, во всех рассмотренных эукариотах частоты встречаемости f мононуклеотидных poly(A)_n -, poly(T)_n - и смешанных W(A/T)_n -треков в структуре геномной ДНК как функция длины трека практически всегда оказываются преобладающими над встречаемостью poly(G)_n -, poly(C)_n - и смешанных S(G/C)_n -треков. При этом, в случае треков W-типа можно обнаружить повторы длиной в сотню, а то и в несколько сотен пар нуклеотидов (пример геномов *D. discoideum* и *H. sapiens*, рис. 4, б1 и б5). Для треков же S-типа их предельная длина обычно заканчивается где-то в районе длин двух-трех десятков GC-пар. В случае одинаковых длин W- и S-треков, например в том же геноме *H. sapiens* (рис. 4, б5), конкретные различия в частотах их встречаемости могут достигать нескольких порядков!

Следует заметить, что все полученные результаты оказались в хорошем согласии с имеющимися наблюдениями [1–6, 36, 38, 39].

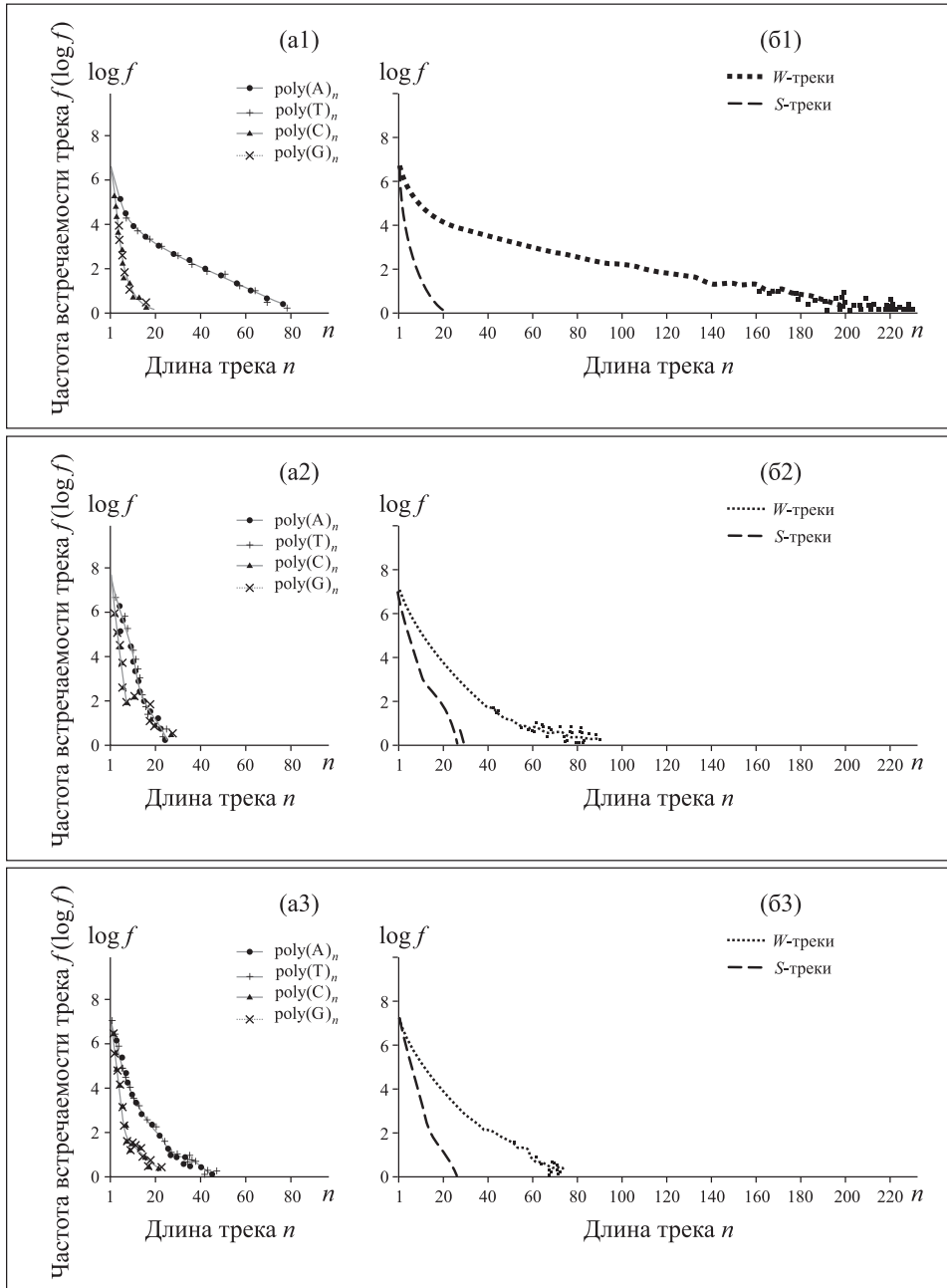


Рис. 4. Частоты встречаемости мононуклеотидных poly(A)_n -, poly(T)_n -, poly(G)_n -, poly(C)_n -треков (а) и смешанных $W(A/T)_n$ - и $S(G/C)_n$ -треков (б) в геномах: *Dictyostelium discoideum* (a1, б1); *Caenorhabditis elegans* (a2, б2); *Arabidopsis thaliana* (a3, б3); *Drosophila melanogaster* (a4, б4); *Homo sapiens* (a5, б5); *Gallus gallus* (a6, б6); *Leishmania major* (a7, б7)

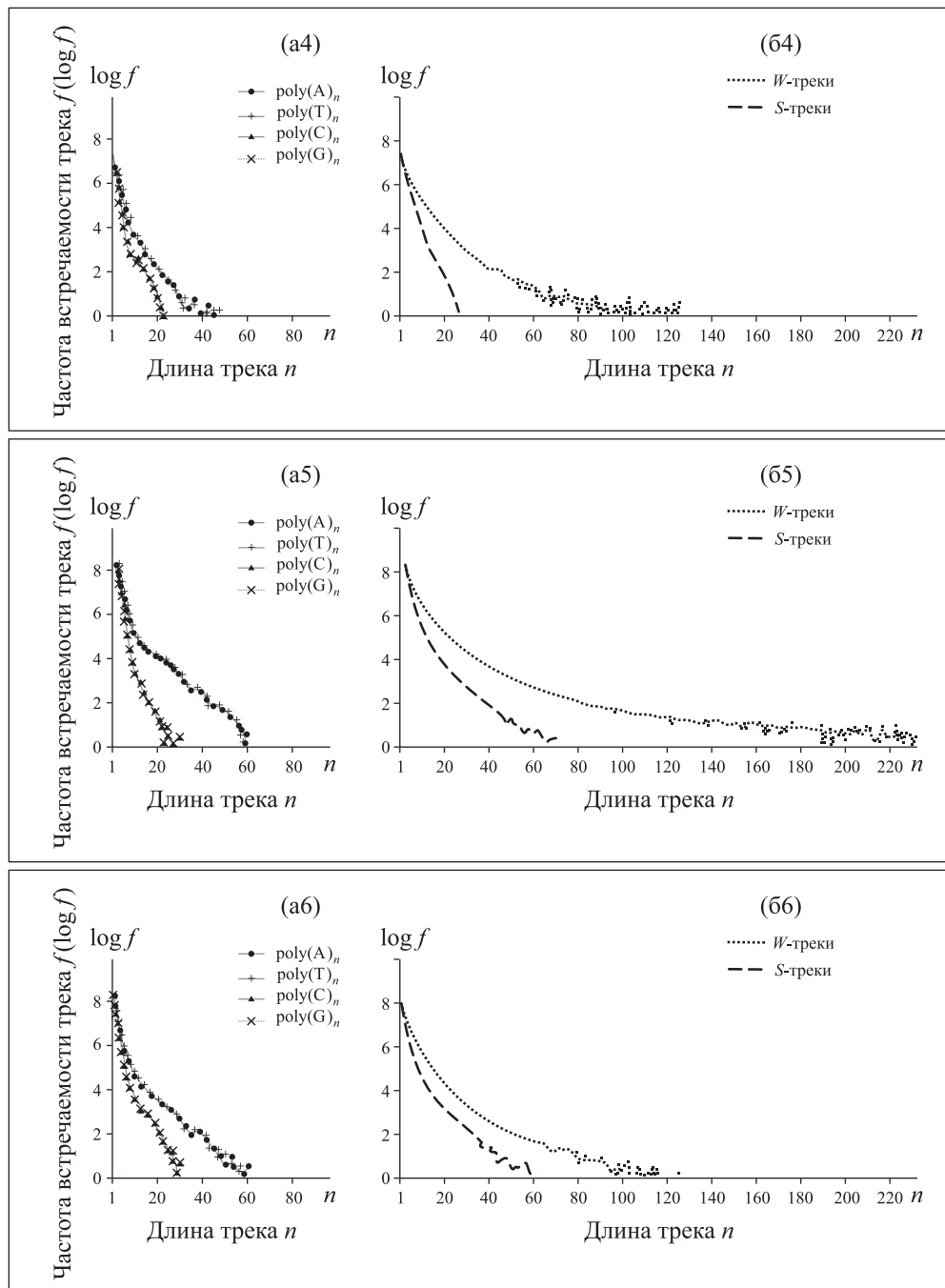


Рис. 4. Продолжение

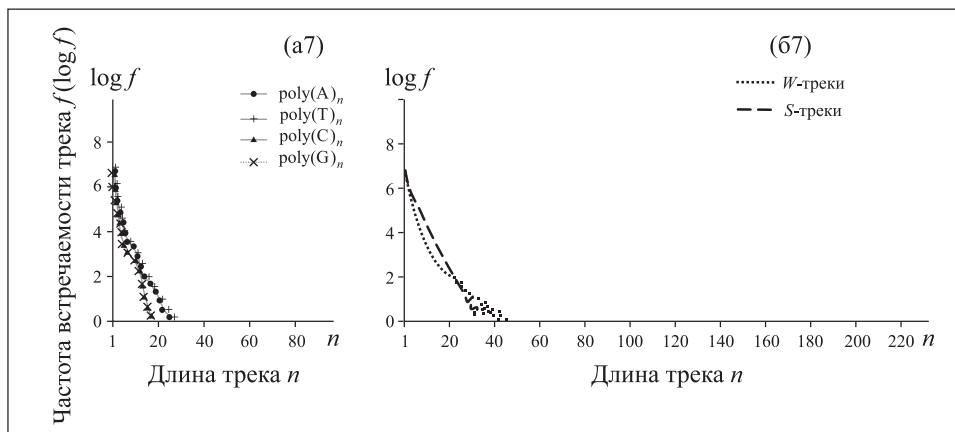


Рис. 4. Продолжение

Подобная картина нетривиального баланса между АТ- и GC-парами была выявлена нами ранее для структуры геномной ДНК простейших микроорганизмов [65]. Было показано, что у довольно большого ряда архейных и эубактериальных хромосом (порядка 400 представителей) в 75 % случаев также характерным оказалось преобладание oligo(A)_n- и oligo(T)_n-треков над oligo(G)_n- и oligo(C)_n-треками (где $n \geq 5$). Причем эта тенденция сохранялась даже для хромосом, GC-состав которых пар был явно больше 50 %.

Для прояснения вопроса о возможном влиянии так называемого «эволюционного фактора» в формировании доминирования АТ-пар в нуклеотидной организации геномной ДНК живых организмов мы выполнили сравнительный спектральный анализ для геномов реликтовых представителей эукариот — «мечехвоста» (*Limulus polyphemus*) и «тихоходки» (*Tardigrada*), появившихся на Земле около полумиллиарда лет тому назад. Геномные данные также были взяты из базы GenBank. Размеры геномов этих эукариот оказались, кстати, немалыми и составили, соответственно, у *Limulus polyphemus* 2 740 000 000 п. н. и у *Tardigrada* — 215 000 000 п. н.

Чтобы не загромождать статью новым дополнительным графическим материалом, отметим сразу, что полученные частотные характеристики для нуклеотидных poly(A)_n-, poly(T)_n-, poly(G)_n-, poly(C)_n-, W(A/T)_n- и S(G/C)_n-треков показали, как это ни странно, наличие данного эффекта доминирования АТ-пар в ДНК уже у обоих этих древних эукариот. Причем их частотные графики оказались весьма близкими по характеристикам к таковым, свойственным геномам дрозофилы (*Drosophila melanogaster*) и человека (*Homo sapiens*) (рис. 4, а4, б4, а5, б5). Вполне вероятно, что подобию зависимостей во многом способствовали примерно одинаковые (около 40 %) исходные значения GC-состава геномных ДНК у всех этих четырех эукариот.

Таким образом, из представленных результатов можно сделать вывод, что разным видам живых организмов присуща общая предпочтительность использования Уотсон-Криковских АТ-последовательностей в организации первичной структуры геномной ДНК. Она явно указывает на влияние отличительного качества строения АТ-пар в реализации такого масштабного эффекта.

На наш взгляд именно изначальная, с физической точки зрения, пирамидальная предпочтительность строения NH_2 -группы оснований с ее главным качеством — спонтанным характером инверсионной перестройки валентных связей при атоме азота (из-за малости активационной энергии перехода) формирует здесь естественное правило «отбора». Исходно пониженный, двукратный полиморфизм Н-связывания оснований в АТ-паре выступает фактором «наибольшей надежности» использования формы комплементарного спаривания, по сравнению с GC-парами, в обеспечении стабильности протекания в клетке процессов хранения и передачи генетической информации.

В качестве поясняющего примера реализации возможных путей спонтанных структурных перестроек аминокрупп оснований в комплементарной двойной спирали В-формы ДНК нами, с использованием методов молекулярной механики и полуэмпирического квантово-химического РМЗ-метода [33, 34], были смоделированы два варианта организации Н-спариваний в изолированном тетрамерном дуплексе $d(\text{AACC}) \cdot d(\text{GGTT})$ (рис. 5). Был рассмотрен нуклеотидный комплекс, где в роли матричной цепи выступала последовательность вида 5'-AACC-3', а в роли синтезированной *de novo* цепи — последовательность 5'-GGTT-3'.

Первый случай (рис. 5, а) моделировал структуру фрагмента двойной спирали с одной из возможных исходных геометрий комплементарного связывания у АТ- и GC-пар. В матричной цепи 5'-AACC-3' аминокруппы оснований рассматривались находящимися в состоянии с наклоном «вниз» (down) своих валентных N-H-связей относительно плоскости основания. В то время как в цепи 5'-GGTT-3' наклон N-H-связей аминокрупп обоих гуанинов брался в ориентации «вверх» (up) относительно плоскости основания. Моделировался таким образом вариант комплементарного сопряжения ДНК-цепочек с Уотсон-Криковскими парами (WC) в конфигурации $\text{AT}(\text{WCd})$, $\text{AT}(\text{WCd})$, $\text{CG}(\text{WCdu})$ и $\text{CG}(\text{WCdu})$.

Второй случай (рис. 5, б) симулировал другую ситуацию Н-связывания оснований в том же фрагменте ДНК. Предполагалось, что перед этим спариванием был реализован процесс расплетания цепочек. В каждой из них произошли спонтанные инверсионные перестройки пирамидальной структуры аминокрупп у некоторых из азотистых оснований. После этого две цепи опять были оптимизированы в структуру двойной спирали. Из рисунка видно, что в таком только лишь в одном из вариантов спонтанной перестройки ориентации валентных

связей NH_2 -групп сама укладка пар в двойной цепи реализовалась уже в довольно сложном виде. Прежде всего, оказался «выпавшим» из Уотсон-Криковского АТ-спаривания оснований один из тиминов. Кроме того, возникло бифуркационное водородное связывание обоих цитозинов из матричной цепи с одним из гуанинов во второй цепи. Но самое главное — произошла структурная мутация и образовалась новая пара, пара Хугстеновского типа AG. И этот вариант укладки нуклеотидов реализовался на той же самой комплементарной двойной последовательности d(AACC)-d(GGTT), что и в первом случае (рис. 5, а).

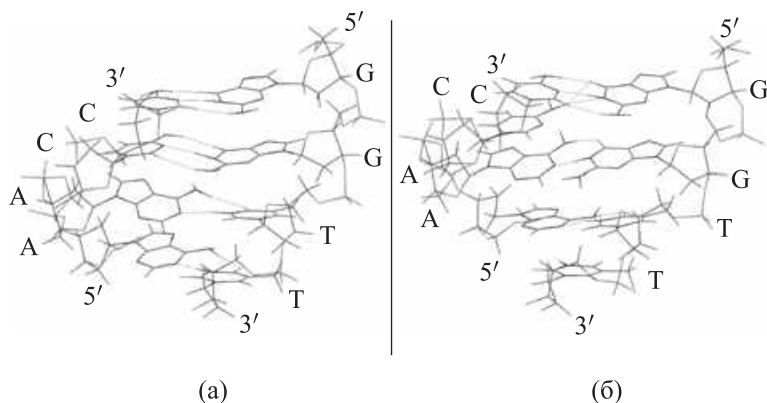


Рис. 5. Компьютерное моделирование вариантов водородного связывания азотистых оснований в структуре В-формы тетрамерного ДНК-дуплекса AACC: (а) вариант классического комплементарного Н-связывания оснований с участием неплоских форм AT(WCd), AT(WCd), CG(WCdu) и CG(WCdu) (см. текст); (б) вариант водородного связывания оснований после спонтанного изменения «вверх» (up) ориентации N-H-связей NH_2 -групп у обоих аденинов и у одного из цитозинов в цепи 5'-AACC-3'. При этом в цепи 5'-GGTT-3' реализована спонтанная ориентация «вниз» (down) N-H-связей NH_2 -группы только у второго гуанина

Достаточно очевидно, что подобным способом могут реализоваться и другие варианты возможных «спонтанных структурных мутаций» в указанном комплементарном фрагменте двойной спирали, которые мы здесь, однако, не приводим. Число таких вариантов оказывается немалым из-за четырехкратного структурного полиморфизма у участвующих здесь GC-пар.

В качестве экспериментального подтверждения гипотезы о фатальной роли Уотсон-Криковского GC-спаривания в подобного рода структурных мутационных процессах следует указать на недавнюю работу V. Schaibley с соавторами [66]. В ней на довольно большом экспериментальном материале была выявлена корреляция скорости точечных спонтанных мутаций в генах человека с содержанием там GC-пар. Эта скорость, как ни странно, действительно оказа-

лась возрастающей с ростом процентного GC-состава генов! Что и следовало ожидать, согласно приведенным нами выше аргументам.

Все это подчеркивает, что именно GC-пары как менее «предсказуемый» элемент в сохранении формы своего комплементарного Н-спаривания оснований, несмотря на повышенную энтальпию связывания, были попросту «минимизированы» природой в организации требуемых функциональных свойств двойной спирали ДНК. Достигалась таким способом более высокая надежность протекания в клетке процессов дуплицирования и транскрипции — где как раз крайне важна определенность геометрии спаривания азотистых оснований.

Особенности распределения GC-треков в структуре экзонов генома человека

Установленное общее доминирование АТ-пар в структуре нуклеотидных последовательностей ДНК живых организмов заставляет обратить внимание на обсуждение другого важного вопроса: каким образом реализуется там конкретный геномный GC-состав? Считают, что геномным областям ДНК свойственен повышенный GC-состав по сравнению со всем геномом. И он тем выше в гене, чем больше длина соответствующего экзона [67].

Рассмотрим пример генома человека, имеющего ~ 42 % GC-состав. Его диплоидный набор из 23 хромосом содержит, как известно, около $6,4 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов. Суммарная длина белок-кодирующих, экзонных областей здесь составляет всего лишь 1,5 % от всей ДНК. Поэтому основная часть генома, его интронные и межгенные области, вероятнее всего должны сохранить отмеченный выше доминирующий характер АТ-пар в своем составе.

Ниже, на рис. 6–10, в качестве примера приведены результаты частотного анализа встречаемости АТ- и GC-треков в нуклеотидной структуре 16-й хромосомы, одной из 23 хромосом человека. Показаны особенности распределения этих треков как в целой хромосоме, так и в отдельных ее составляющих — экзонах, интронах и межгенных областях. Ограничение здесь результатами лишь одной хромосомы во многом определяется примерно подобным характером полученных графиков для всех хромосом. Возникающие конкретные отличия будут оговорены особо.

Как видно из рис. 6–10, частотные распределения мононуклеотидных треков poly(A)_n , poly(T)_n , poly(G)_n , poly(C)_n , а также смешанных треков W(A/T)_n и S(G/C)_n в составе 16-й хромосомы в целом повторяют, как и следовало ожидать, общие черты доминирования АТ-последовательностей, свойственные всему геному человека (рис. 4). Выделяется лишь область экзонов (рис. 9), где образовалось локальное инвертирование частот встречаемости треков из АТ-

и GC-пар. Конкретные изменения вкладов этих треков (в %) в нуклеотидную структуру экзонов 16-й хромосомы показаны на рис. 11.

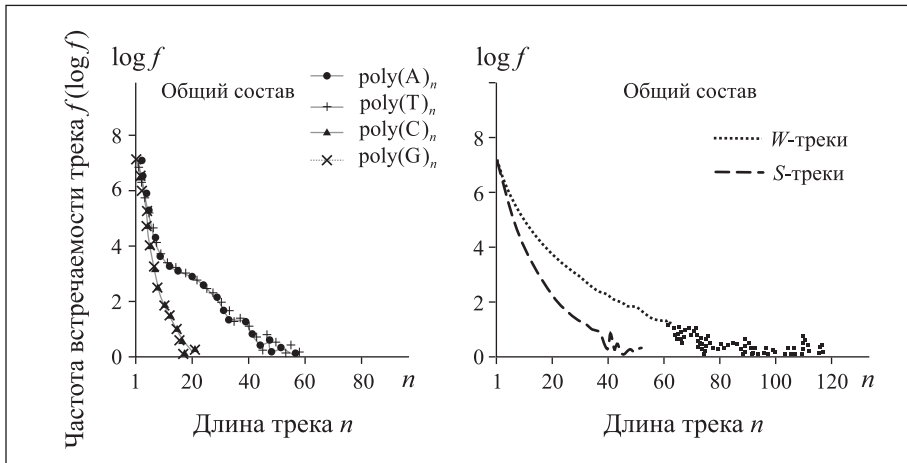


Рис. 6. Частоты встречаемости мононуклеотидных poly(A)_n -, poly(T)_n -, poly(G)_n -, poly(C)_n - и смешанных W(A/T)_n - и S(G/C)_n -треков в общем нуклеотидном составе 16-й хромосомы

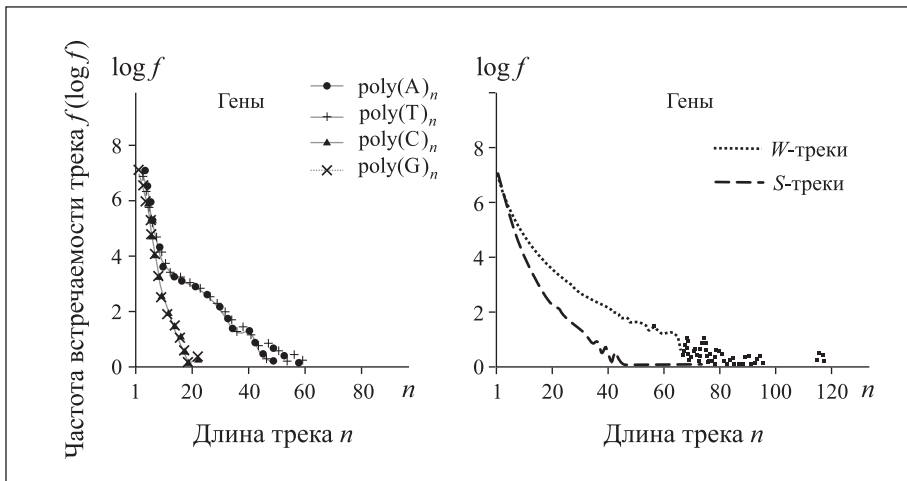


Рис. 7. Частоты встречаемости мононуклеотидных poly(A)_n -, poly(T)_n -, poly(G)_n -, poly(C)_n - и смешанных W(A/T)_n - и S(G/C)_n -треков в структуре белок-кодирующих генов 16-й хромосомы

Оценки зафиксировали повышенный GC-состав экзонов у всех хромосом, который может иногда достигать до 58 %. Фактически, таким способом действительно реализуется перераспределение по хромосомам общего GC-состава

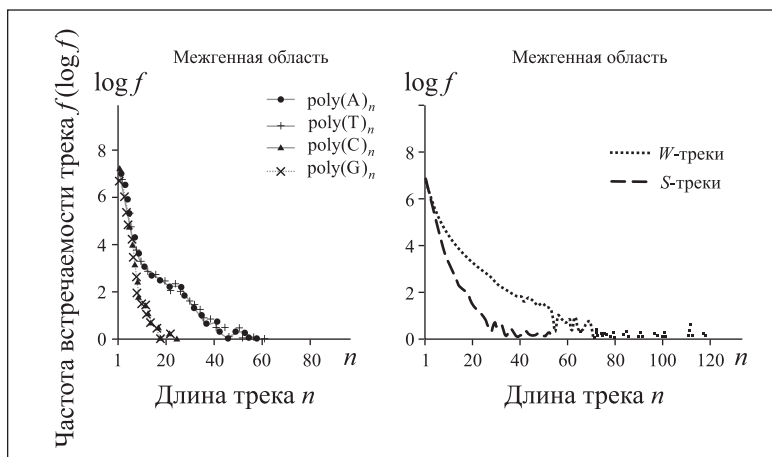


Рис. 8. Частоты встречаемости мононуклеотидных $\text{poly}(\text{A})_n$ -, $\text{poly}(\text{T})_n$ -, $\text{poly}(\text{G})_n$ -, $\text{poly}(\text{C})_n$ - и смешанных $\text{W}(\text{A/T})_n$ - и $\text{S}(\text{G/C})_n$ -треков в структуре межгенной области 16-й хромосомы

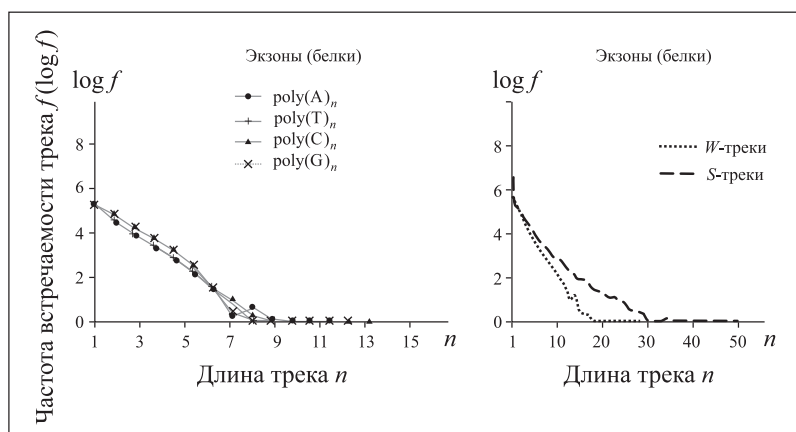


Рис. 9. Частоты встречаемости мононуклеотидных $\text{poly}(\text{A})_n$ -, $\text{poly}(\text{T})_n$ -, $\text{poly}(\text{G})_n$ -, $\text{poly}(\text{C})_n$ - и смешанных $\text{W}(\text{A/T})_n$ - и $\text{S}(\text{G/C})_n$ -треков в структуре экзонов 16-й хромосомы

генома человека, среднее значение которого находится, как известно, на уровне 42 %. Вместе с тем, неожиданно выявилась весьма необычная и интригующая особенность в дифференцировке хромосом. Обозначились группы хромосом с довольно близкими значениями GC-состава своих экзонов и, самое главное, с одинаковыми предельными длинами доминирующих в них коротких $\text{oligo}(\text{G})_n$ -, $\text{oligo}(\text{C})_n$ - и $\text{S}(\text{G/C})_n$ -треков. Если к этим наблюдениям привлечь сделанное нами ранее замечание об исходно «повышенной способности» GC-пар к своим спонтанным структурным перестройкам в системе водородного связывания комплементарных цепочек, то открывается возможность дополнительной

спецификации хромосом по найденным отличительным свойствам их экзонных областей (рис. 12, таблица 1).

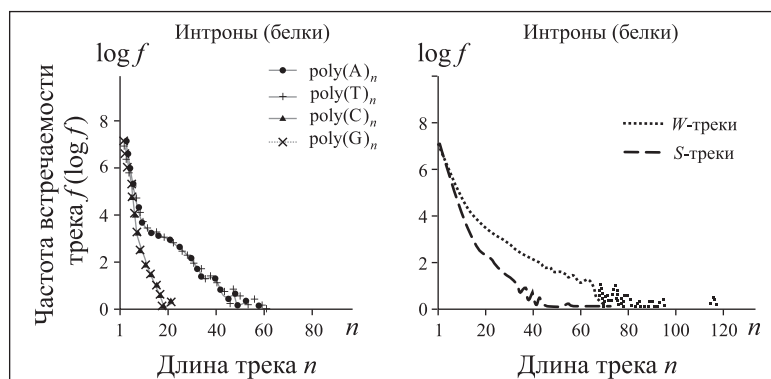


Рис. 10. Частоты встречаемости монуклеотидных $\text{poly}(\text{A})_n$ -, $\text{poly}(\text{T})_n$ -, $\text{poly}(\text{G})_n$ -, $\text{poly}(\text{C})_n$ - и смешанных $\text{W}(\text{A/T})_n$ - и $\text{S}(\text{G/C})_n$ -треков в структуре интронов 16-й хромосомы

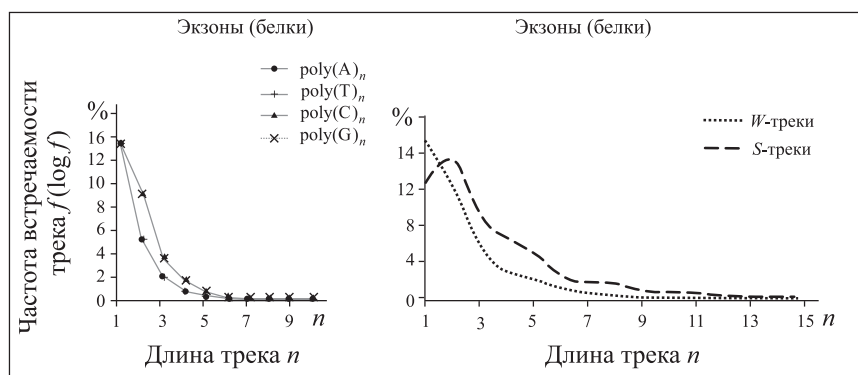


Рис. 11. Вклады (в %) треков из АТ- и GС-пар в нуклеотидную структуру экзонов 16-й хромосомы человека

Таблица 1. GС-состав и специфика структуры GС-треков экзонов у разных типов хромосом

Тип	I	II	III	IV	V
GС-состав экзонов, %	56–58	53–54	51–52	48–50	45
Локальное доминирование в экзонах треков					
$\text{S}(\text{G/C})_n$	$n \leq 8$	$n \leq 5$	$n \leq 3$	$n = 2$	—
$\text{oligo}(\text{G})_n$	$n \leq 5$	$n \leq 3$	$n = 2$	—	—
$\text{oligo}(\text{C})_n$	$n \leq 5$	$n \leq 3$	$n = 2$	—	—
над треками А/Т-типа					

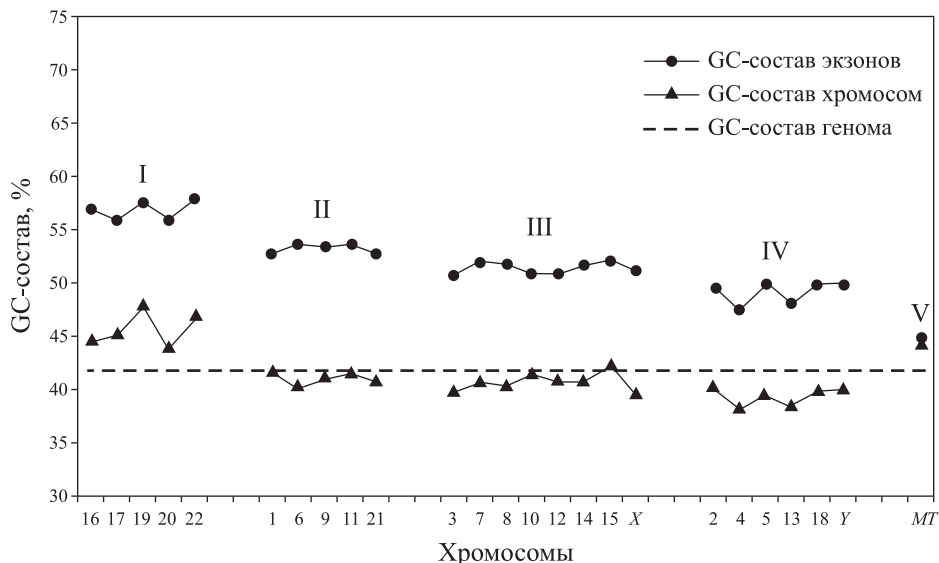


Рис. 12. Дифференциация хромосом генома человека по GC-составу экзонных областей

Выделяются пять типов хромосом:

- тип I — хромосомы 16, 17, 19, 20, 22 с самым высоким GC-составом экзонов (56–58 %) и с локальным доминированием в них смешанных $S(G/C)_n$ -треков предельной длины $n \leq 8$, а также $oligo(G)_n$ - и $oligo(C)_n$ -треков длины до 5 пар нуклеотидов. Можно предположить, что этот тип хромосом должен характеризоваться исходным, относительно высоким фоном предрасположенности к точечным спонтанным структурным мутациям своих белок-кодирующих областей.
- тип II — хромосомы 1, 6, 9, 11, 21. Здесь GC-состав экзонов чуть ниже (около 53–54 %). Доминируют короткие треки $S(G/C)_n$ длины $n \leq 5$, а также $oligo(G)_n$ - и $oligo(C)_n$ -треки длины $n \leq 3$. Вполне вероятно, что у этого типа хромосом следует ожидать уже более низкий общий фон частоты точечных структурных спонтанных мутаций экзонов по сравнению с предыдущим типом.
- тип III — хромосомы 3, 7, 8, 10, 12, 14, 15, X с явно пониженным GC-составом экзонов (51–52 %). Доминируют здесь весьма короткие треки $S(G/C)_n$ длины $n \leq 3$, а также $oligo(G)_n$ - и $oligo(C)_n$ -треки с $n = 2$. Можно предполагать у этого типа хромосом существование весьма умеренного фона частоты точечных спонтанных структурных мутаций экзонных областей.
- тип IV — хромосомы 2, 4, 5, 13, 18, Y с еще более низким GC-составом (~48–50 %) своих экзонов. Отличительной чертой этих хромосом является резкое снижение вклада GC-треков в структуре экзонов. Доминирующими

здесь остались только очень короткие, динуклеотидные смешанные треки типа $S(G/C)_2$. Вероятнее всего данный тип хромосом будет характеризоваться самым низким исходным фоном частоты точечных структурных спонтанных мутаций экзонов. Отмечаемая рядом работ повышенная частота спонтанных мутаций у очень маленькой, уникальной Y-хромосомы может быть здесь связана, по нашему мнению [68], с влиянием специфики нуклеотидной организации ее регуляторных областей в ДНК, где обнаруживается неожиданное появление некоторого доминирования треков повышенной длины $S(G/C)_n$ -типа.

тип V — особый случай. Сюда отнесена митохондриальная мтДНК (МТ). GC-состав ее экзонов 45 % и здесь нет доминирующих треков GC-типа. В определенном смысле это достаточно автономное структурное образование весьма малых размеров. Количество белок-кодирующих генов — минимально. Нет интронов. Поэтому она должна характеризоваться, по нашему мнению, исходно низкой частотой точечных спонтанных мутаций своих экзонов. Наблюдаемые, тем не менее, в митохондриях повышенные частоты патогенных мутаций по сравнению с другими хромосомами обычно связывают с известными мутациями ядерного генома. Его белки активно участвуют в функционировании митохондрий, содержание которых в клетке всегда очень велико.

Таким образом, пример генома человека, обладающего известным «дефицитом GC-состава» в своей структурно-функциональной организации, оптимизирован весьма своеобразным способом. Наиболее важные его области — белок-кодирующие участки, действительно обогащены этим составом. Но в то же время сами экзоны ограничены участием в них лишь очень коротких GC-треков. Минимизируется таким способом влияние исходно повышенного структурного полиморфизма Уотсон-Криковских GC-пар по сравнению с АТ-парами для сохранения надежности и точности протекания в клетке генетических процессов.

Специфика состава кодонов, предпочтительно используемых (*codon usage bias*) в геномах про- и эукариот

Одним из важнейших примеров нетривиальной роли структурного полиморфизма Уотсон-Криковских АТ- и GC-пар в организации геномной ДНК является, на наш взгляд, наблюдаемое уникальное смещение частоты кодонов (*codon usage bias*) в белок-кодирующих генах живых организмов.

Как известно, несмотря на вырожденность генетического кода природные аминокислоты «стараются использовать» в генетических процессах преимущественно определенного вида синонимические кодоны [69, 70]. Устоялось мне-

ние, что такая предпочтительность кодонов — это отражение сложного баланса между мутационной предрасположенностью и естественным отбором. Тем не менее и здесь есть основания ожидать определенный вклад отличий в форме водородного связывания у комплементарных АТ- и GC-пар в зарождении указанного явления. Повышенная неоднозначность формы GC-спаривания оснований должна каким-то образом отразиться на конкретном составе триплетов в структуре «кодон–антикодон» связывания с целью поддержания общей высокой точности и надежности протекания в клетке процессов считывания и передачи генетической информации.

Согласно проведенным нами оценкам, вырисовываются действительно некоторые общие черты «оптимизации» состава кодонов. На рис. 13 представлены результаты анализа встречаемости всех 64 типов кодонов в геноме современного человека (*H. sapiens*) и реликтовой тихоходки (*Tardigrada*). Была использована все та же база данных генов GenBank [64].

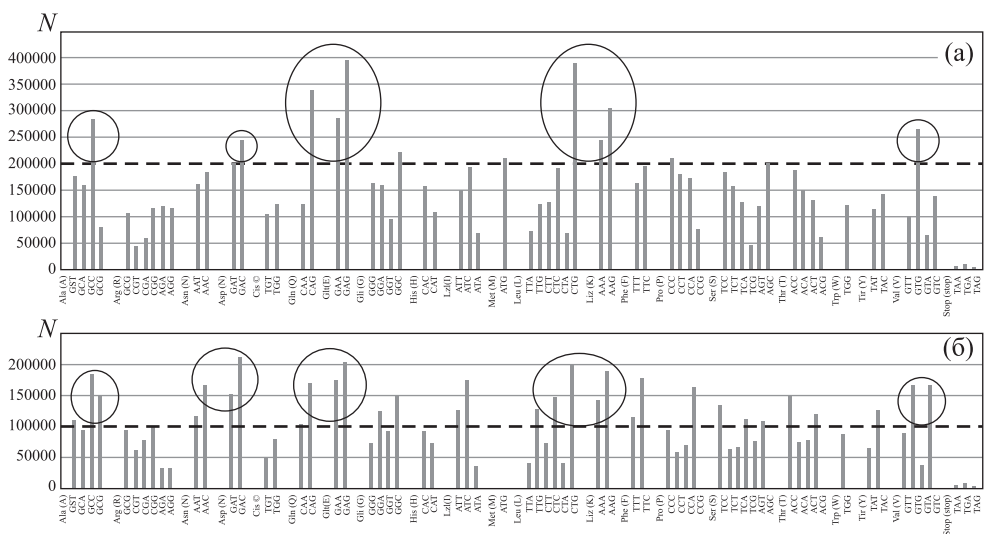


Рис. 13. Распределение кодонов в белковых генах человека, *H. sapiens* (а) и реликтовой тихоходки, *Tardigrada* (б). Рассчитано по данным GenBank [64]. По осям абсцисс расположены все 64 кодона, а по осям ординат — числа встречаемости кодонов. Жирные горизонтальные пунктирные линии на графиках обозначают 50%-ную границу встречаемости кодонов. Овалами отмечены сходные области доминирования кодонов в обоих геномах

Из рисунка видно, что у этих двух довольно сильно разделенных по времени происхождения представителей эукариот области часто повторяющихся кодонов во многом оказываются схожими. При этом, например, для генома чело-

века список кодонов вида *codon usage bias* с более чем 50 %-ным вкладом в структуре генных областей ДНК оказывается «оптимизированным» к следующему набору:

GAT GAC CAG GAA GAG ATG CTG AAA AAG GTG CCC GCC GGC AGC.

Наблюдаются две группы приоритетных кодонов. Первая — наиболее многочисленная группа. В ней обозначились часто встречающиеся синонимические кодоны аминокислот, имеющие в центральном своем положении либо аденин, либо тимин. На «ключевое», второе положение в триплетях спаривания «кодон–антикодон» здесь вышли именно те основания, которым, по нашему мнению, свойственен исходно низкий (как более «надежный») полиморфизм геометрии комплементарного Н-спаривания. Вторая группа — отвечает оставшимся другим, часто встречающимся аминокислотам. Структура их кодонов такова, что во втором положении оказываются либо гуанин, либо цитозин. Эта группа сравнительно невелика, содержит всего 28 % от общего числа доминирующих кодонов. Малочисленность образовавшейся группы удивительным образом оказывается коррелирующей с повышенной «неоднозначностью» (с четырехкратным полиморфизмом) структуры Уотсон-Криковского спаривания своего центрального основания (G или C) в составе кодона.

Для случая генома реликтовой тихоходки также обозначились две неравноправные группы кодонов:

AAT AAC GAT GAC CAA CAG GAA GAG ATT ATC ATG	GCU GCC GCG CGG
TTG CTC CTG AAA AAG TTC TTT TAC GTG GTC	GGA GGC CCG TCC
	TCG AGC ACC ACG.

Соотношение числа кодонов в них составляет 64 % к 36 % и тоже отражает доминирование предпочтительных триплетов с аденином или тиминном во втором положении. Можно также говорить о корреляции относительно малого числа кодонов во второй группе, с наличием в центральном положении триплетов либо гунина, либо цитозина. То есть именно тех азотистых оснований, которым свойственен необычно высокий полиморфизм геометрии своего комплементарного спаривания при организации важнейшего участка узнавания «кодон–антикодон» в составе нуклеинового комплекса.

С целью более убедительного обоснования выявленной общности в организации предпочтительных кодонов мы провели дополнительный частотный анализ встречаемости кодонов в генах широкого представительства про- и эукариот, охватывающий масштабный разброс размеров их геномов (от 1,6 Mb до 140 000 Mb). В список реликтовых представителей эукариот вошли амеба (*A. proteus*), мечехвост (*L. Polyphemus*) и моллюск (*N. Pompius*). В качестве

примеров обычных эукариот и прокариот были взяты геномы шимпанзе (*P. troglodytes*), мыши (*M. musculus*), рыбы (*P. aethiopicus*), лягушки (*X. tropicalis*), дрозофилы (*D. melanogaster*), резуховидки Таля (*A. thaliana*), слизевика (*D. discoideum*), паразита (*L. major*), пекарских дрожжей (*S. cerevisiae*), малярийного паразита (*P. falciparum*), кишечной палочки (*E. coli*) и бактерии (*C. Pelagibacter*). Использовались данные GenBank, а также специализированная база Codon Usage Database ресурса www.kazusa.or.jp.

Выполненный такой расширенный анализ подтвердил справедливость установленного выше наблюдения. В составе белок-кодирующих генов всех рассмотренных организмов наиболее предпочтительными всегда оказывались кодоны, у которых во втором положении находились либо А, либо Т (У-урацил). Именно эти основания обеспечивают наиболее четкую фиксацию структуры центрального звена (замок–ключ) системы «кодон–антикодон» в функциональных комплексах ДНК–ДНК, ДНК–мРНК, мРНК–тРНК, тРНК–рРНК генетических процессов репликации, транскрипции и трансляции.

В качестве иллюстрации в таблице 2 представлены выборочные результаты сделанных оценок.

Таблица 2. Примеры процентного содержания числа доминирующих кодонов с А- или Т-основанием во втором положении в белок-кодирующих генах некоторых видов организмов

Организм	Человек (<i>H. sapiens</i>)	Тихоходка (<i>Tardigrada</i>)	Резуховидка Таля (<i>A. thaliana</i>)	Дрозофила (<i>D. melanogaster</i>)	Дрожжи пекарские (<i>S. cerevisiae</i>)	Бактерия (<i>E. coli</i>)
Размер генома, п. н.	$3,2 \cdot 10^9$	$2,15 \cdot 10^8$	$1,57 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^6$
GC-состав генома, %	42	47	38	38,8	39	51
Доля кодонов с А- или Т-основанием в центральном положении, %	72	64	75	78	85	64

Таким образом, проведенное в этом разделе обсуждение наблюдаемого явления смещения кодонов (*codon usage bias*) в составе белок-кодирующих генов лишний раз указывает на решающую роль Уотсон-Криковского АТ (AU) спаривания оснований в иницировании общих структурно-функциональных особенностей геномной ДНК различных видов живых организмов.

Заключение

Последовательный учет обычно пренебрегаемого в структурных исследованиях неплоского, sp^3 -гибридного строения валентных связей NH_2 -группы аденина, гуанина и цитозина позволяет адекватно описывать не только наблюдаемый некопланарный характер укладки пар в организации двойной спирали ДНК. Он дает возможность выявить более фундаментальную особенность электронного строения азотистых оснований — существование скрытого полиморфизма водородного связывания в Уотсон-Криковских парах. Бистабильный характер пирамидальной геометрии аминокрупп оснований обуславливает наличие у комплементарной GC-пары исходно высокого, четырехкратного полиморфизма структуры Н-спаривания. Повышенная неоднозначность формы комплементарного связывания гуанин-цитозиновой пары достаточно явным образом лимитирует встречаемость протяженных G/C-треков в структуре нуклеиновых кислот различных видов организмов. В то же время отличительно низкий двухкратный полиморфизм геометрии Уотсон-Криковской AT-пары служит вполне объективным показателем ее «более надежного и преимущественного использования» в организации структурно-функциональных особенностей геномной ДНК и, соответственно, в обеспечении стабильности протекания процессов сохранения и передачи генетической информации в живой клетке.

Список литературы

1. Marx K. A., Hess S. T., Blake R. D. // J. Biomol. Struct. & Dyn. — 1993. — Vol. 11. — P. 057–066.
2. Marx K. A., Zhou Y., Kishawi I. Q. // J. Biomol. Struct. & Dyn. — 2006. — Vol. 23. — P. 429–446.
3. Decherling K. J., Cuelenaere K., Konings R. N. H., Leunissen J. A. M. // Nucleic Acids Research. — 1998. — Vol. 26. — P. 4056–4062.
4. Shomer B., Yagil G. // Nucl. Acids Res. — 1999. — Vol. 27. — P. 4491–4500.
5. Coenye T., Vandamme P. // DNA Research. — 2005. — Vol. 12. — P. 221–233.
6. Piazza F., Lio P. // Physica A. — 2005. — Vol. 347. — P. 472–488.
7. Subirana J. A., Messegueur X. // J. Theor. Biol. — 2011. — Vol. 283. — P. 28–34.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1987.
9. Франк-Каменецкий М. Самая главная молекула. От структуры ДНК к биомедицине XXI века. — Изд. 2-е. — М.: Альпина нон-фикшн, 2018.
10. Wilson C. C. // Nucl. Acids Res. — 1987. — Vol. 15. — P. 8577–8591.
11. Wilson C. C., Tollin P. // Nucleosides & Nucleotides. — 1987. — Vol. 6. — P. 643–653.
12. Watson J. D., Crick F. H. C. // Nature. — 1953. — Vol. 171. — P. 737–738.

13. Yakovchuk P., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M. D. // *Nucleic Acids Research*. — 2006. — Vol. 34 (2). — P. 564–574.
14. Комаров В. М., Полозов Р. В., Коноплев Г. Г. Неплоское строение аминозамещенных азотистых оснований. PCILO конформационное исследование. — Препринт Научного центра биологических исследований АН СССР. — Пущино, 1989.
15. Komarov V. M., Polozov R. V. // *Z. Naturforsch.* — 1990. — Vol. 45c. — P. 1080.
16. Komarov V. M., Polozov R. V., Konoplev G. G. // *J. Theor. Biol.* — 1992. — Vol. 155. — P. 281–294.
17. Свездлов Л. М., Ковнер М. А., Крайнов Е. П. Колебательные спектры многоатомных молекул. — М.: Наука, 1970.
18. Brand J. C. D., Williams D. R., Cook T. J. // *J. Mol. Spectr.* — 1966. — Vol. 20. — P. 359–380.
19. Brown R. D., Godfrey P. D., Kleibomer D. B. // *J. Mol. Spectr.* — 1987. — Vol. 124. — P. 21–33.
20. Brown R. D., Godfrey P. D., McNaughton D., Pierlot A. P. // *J. Am. Chem. Soc.* — 1989. — Vol. 111. — P. 2308–2310.
21. Brown R. D., Godfrey P. D., McNaughton D., Pierlot A. P. // *Chem. Phys. Lett.* — 1989. — Vol. 156. — P. 61–63.
22. Alonso J. L., Pena I., Lopez J. C., Juan C., Vaquero V. // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2009. — Vol. 48. — P. 6141–6143.
23. Комаров В. М. // *Биофизика*. — 1994. — Т. 39, № 5. — С. 837–842.
24. Герцберг Г. Электронные спектры и строение многоатомных молекул. — М.: Мир, 1969.
25. Комаров В. М. // *Биофизика*. — 1998. — Т. 43, № 6. — С. 967–974.
26. Komarov V. M. // *J. Biol. Phys.* — 1999. — Vol. 24. — P. 167–184.
27. Комаров В. М., Мевх Н. Г. // *Ж. физич. химии*. — 1995. — Т. 69, № 8. — С. 1419–1421.
28. Hobza P., Sanderfy C. // *J. Am. Chem. Soc.* — 1987. — Vol. 109. — P. 1302–1307.
29. Hobza P., Šponer J. // *Chem. Rev.* — 1999. — Vol. 99, No. 11. — P. 3247–3276.
30. Roscioli J. R., Pratt D. W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2003. — Vol. 100. — P. 13752–13754.
31. Kabanov A. V., Komarov V. M. // *Int. J. Quant. Chem.* — 2002. — Vol. 88. — P. 579–587.
32. Самченко А. А., Киселев С. С., Кабанов А. В., Кондратьев М. С., Комаров В. М. // *Биофизика*. — 2016. — Т. 61, № 6. — С. 1045–1058.
33. Stewart J. J. P. // *J. Comput. Chem.* — 1989. — Vol. 10. — P. 209.
34. Stewart J. J. P. // *J. Mol. Struct. (theochem)*. — 1997. — Vol. 401. — P. 195.
35. Kabanov A. V., Komarov V. M., Yakushevich L. V., Teplukhin A. V. // *Int. J. Quant. Chem.* — 2004. — Vol. 100. — P. 595–609.

-
36. de Koning A. P. J., Gu W., Castoe T. A., Batzer M. A., Pollock D. D. // *PLoS Genetics*. — 2011. — Vol. 7 (12). — P. e1002384.
 37. Wen-Hua Qi, et al. // *AGING*. — 2016. — Vol. 8. — P. 2635–2650.
 38. Zhou Y., Bizzaro J. W., Marx K. A. // *BMC Genomics*. — 2004. — Vol. 5. — P. 95.
 39. Marx K. A., Hess S. T., Blake R. D. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 1994. — Vol. 12 (1). — P. 235–246.
 40. Toth G., Gaspari Z., Jurka J. // *Genome Res.* — 2000. — Vol. 10. — P. 967–981.
 41. Dechering K. J., Cuelenaere K., Konings R. N. H., Leunissen J. A. M. // *Nucleic Acids Research*. — 1998. — Vol. 26. — P. 4056–4062.
 42. Vinogradov A. E. // *Nucleic Acids Res.* — 2003. — Vol. 31. — P. 1838–1844.
 43. Веркин Б. И., Янсон И. К., Суходуб Л. Ф., Теплицкий А. Б. Взаимодействия биомолекул. — Киев: Наукова думка, 1985.
 44. Nishida H. // *Curr. Issues Mol. Biol.* — 2013. — Vol. 15. — P. 19–24.
 45. Wu H., Zhang Z., Hu S., Yu J. // *Biology Direct*. — 2012. — Vol. 7, No. 2. — P. 1–16.
 46. Frank-Kamenetskii M. D. // *Biopolymers*. — 1971. — Vol. 10. — P. 2623–2624.
 47. Musto H., Naya H., Zavala A., Romero H., Alvarez-Valin F., Bernardi G. // *FEBS Lett.* — 2004. — Vol. 573. — P. 73–77.
 48. Singer C. E., Ames B. N. // *Science*. — 1970. — Vol. 170. — P. 822–825.
 49. Musto H., Naya H., Zavala A., Romero H., Alvarez-Valin F., Bernardi G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2006. — Vol. 347. — P. 1–3.
 50. Oliver J. L., Marin A. // *J. Mol. Evol.* — 1996. — Vol. 43. — P. 216–223.
 51. Sueoka N. // *J. Mol. Evol.* — 1993. — Vol. 37. — P. 137–153.
 52. Kudla G., Lipinski L., Caffin F., Helwak A., Zylicz M. // *PLoS Biol.* — 2006. — Vol. 4. — P. e180.
 53. Foerster K. U., von Mering C., Hooper S. D., Bork P. // *EMBO Rep.* — 2005. — Vol. 6. — P. 1208–1213.
 54. Ussery D. W., Wassenaar T. M., Borini S. B. *Computing for Comparative Microbial Genomics: Bioinformatics for Microbiologists*. — London: Springer-Verlag, 2009.
 55. Watson J. D. *Molecular biology of the gene*. — NY, Amsterdam: W. A. Benjamin, Inc., 1965.
 56. Karlin S., Mrazek J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1997. — Vol. 94. — P. 10227–10232.
 57. Hamilton W. L., Claessens A., Otto T. D., Kekre M., Fairhurst R. M., Rayner J. C., Kwiatkowski D. // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — Vol. 45, No. 4. — P. 1889–1901.
 58. Subirana J. A., Messegue X. // *Nucleic Acids Res.* — 2010. — Vol. 38, No. 4. — P. 1172–1181.
 59. Yagil G. // *J. Mol. Evol.* — 1993. — Vol. 37. — P. 123–130.
 60. Yagil G. // *Genomics*. — 2006. — Vol. 87. — P. 591–597.
 61. Tiemann-Boege I., Schwarz T., Striedner Y., Heissl A. // *Phil. Trans. R. Soc.* — 2017. — Vol. B372. — P. 20160462.

62. Hildebrand F., Meyer A., Eyre-Walker A. // PLoS Genetics. — 2010. — Vol. 6 (9). — P. e1001107.
63. Lynch M., Sung W., Morris K., Coffey N., Landry C. R., Dopman E. B., Dickinson W. J., Okamoto K., Kulkarni S., Hartl D. L., Thomas W. K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2008. — Vol. 105 (27). — P. 9272–9277.
64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
65. Киселев С. С., Комаров В. М., Масулис И. С., Озолинь О. Н. // Компьют. исследов. моделир. — 2010. — Т. 2, № 2. — С. 183–187.
66. Schaibley V. M., Zawistowski M., Wegman D., Ehm M. G., Nelson M. R., Jean P. L. St, Abecasis G. R., Novembre J., Zollner S., Li J. Z. // Genome Research. — 2013. — Vol. 23. — P. 1974–1984.
67. Glemin S., Clement Y., David J., Ressayre A. // Trends in Genetics. — 2014. — Vol. 30, No. 7. — P. 263–270.
68. Комаров В. М., Самченко А. А., Кондратьев М. С. // Математическая биология и биоинформатика: Докл. Междун. конф. / Под ред. В. Д. Лахно. — Т. 7. — Пушкино: ИМПБ РАН, 2018. — Статья № e103. — DOI: 10.17537/icmbb18.114.
69. Sharp P. M., Li W.-H. // Nucleic Acids Res. — 1987. — Vol. 15, No. 3. — P. 1281–1295.
70. Narakuma Y., Gojobori T., Ikemura T. // Nucleic Acids Res. — 2000. — Vol. 28. — P. 292.

Features of the structural and functional organization of genomic DNA

V. M. Komarov, A. A. Samchenko

Institute of Cell Biophysics of RAS,
142290 Pushchino, Institutskaya str., 3
E-mail: komarov_vm@mail.ru

The purpose of this report is to illustrate how the idea of the initial stability of the pyramidal structure of the valence bonds of the NH_2 group in the molecules of nitrogenous bases can be considered as a possible physical reason of the organization of many structural and functional features of genomic DNA.

Keywords: aminogroup, non-planarity of nitrous bases, Watson-Crick AT and GC pairs, hidden polymorphism of hydrogen bonding, DNA, nucleotide tracts, genome, gen, codon.

ТЕОРИЯ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В БИОСИСТЕМАХ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

П. М. Красильников¹

Представлен краткий обзор теории фактора Франка–Кондона, которая является основой теории переноса электрона в молекулярных биосистемах. Рассмотрен пример реакции переноса электрона в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и представлен подробный анализ зависимости константы скорости от температуры и разности свободной энергии. Результаты этого анализа однозначно свидетельствуют о недостаточности представлений данной теории для адекватной интерпретации экспериментальных данных. Проведено обсуждение основных вопросов, связанных как с проблемой электронного матричного элемента, так и с проблемой влияния среды на скорость реакции электронного переноса. Дан краткий обзор возможных подходов к решению этих проблем, реализация которых может существенно помочь в понимании механизмов электронного переноса в молекулярных биосистемах.

Ключевые слова: перенос электрона, электронный матричный элемент, бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, связанные квантовые состояния, электрон-фононные взаимодействия.

*«Нередко самый ценный вклад ученого
закljučается не в выдвижении новой теории
или обнаружении какого-то нового факта,
а в новом взгляде на уже существующие теории
или известные факты.
... изменение подхода может в случае удачи
подарить нечто большее, чем просто теорию.
Оно может создать особую атмосферу мышления,
в которой зародится много увлекательных,
поддающихся проверке теорий и обнаружатся факты,
которые нельзя было даже вообразить».*

Р. Докинз «Эгоистичный ген»

Введение

Напомним основные положения теории электронно-колебательных взаимодействий (ЭКВ), которая широко используется в биофизике для интерпретации экспериментальных результатов, получаемых при изучении процессов электронного транспорта в биологических молекулярных системах [Генри, 1972; Marcus, 1985; Jortner, 1980]. Эта теория *de facto* является теорией фактора Франка–Кондона или, что равнозначно, теорией безызлучательных переходов в макромолекулах. В основании теории ЭКВ лежат следующие четыре приближения [Ген-

¹Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12.
E-mail: krapam@mail.ru

ри, 1972; Франк-Каменецкий, 1975; Лонге-Хиггинс, 1964]. Одноэлектронное приближение, используемое для сведения многочастичной задачи к одночастичной с учетом спина электронов (Слэтер (1929) [Слэтер, 1965], см. также [Пекар, 1953]). Адиабатическое приближение, используемое для разделения электронной (быстрой) и ядерной (медленной) подсистем молекулы (Борн – Оппенгеймер (1927)) [Born, 1927]. Гармоническое приближение в разложении потенциальной энергии молекулы по ядерным смещениям, позволяющее представить ядерную подсистему молекулы в виде системы связанных гармонических осцилляторов (нормальные колебания, Дебай, Борн и Карман (1912)) [Maradudin, 1971]. Принцип Франка – Кондона (1926) [Frank, 1926], который постулирует, что при изменении электронного состояния молекулы ее ядра остаются неподвижными (грубое адиабатическое приближение).

В приближение Борна – Оппенгеймера полная волновая функция молекулы представляется в виде произведения

$$\Psi(r, R) = \psi(r, R)\Phi(R),$$

где r и R — соответственно, электронные и ядерные координаты; $\Psi(r, R)$ — одноэлектронная волновая функция, зависящая от ядерных координат R как от параметров; $\Phi(R)$ — ядерные волновые функции. В гармоническом приближении для потенциальной энергии ядерной подсистемы волновые функции Φ при использовании обобщенных (нормальных) координат выражаются в виде произведения

$$\Phi(Q) = \prod_k \phi(Q_k),$$

где $\phi_k(Q_k)$ — волновая функция k -го нормального гармонического осциллятора молекулы, Q_k — нормальные (обобщенные) координаты k -й нормальной моды.

В рамках теории ЭКВ [Пекар, 1953; Генри, 1972; Франк-Каменецкий, 1975] перенос электрона представляется как *внутримолекулярный* процесс, в котором задействованы общие вибронные термы молекулярной системы. Это означает, что при рассмотрении процесса переноса электрона, происходящего внутри макромолекулярного комплекса (например, между кофакторами фотосинтетического реакционного центра), этот комплекс рассматривается как *целое* и представляется в виде *единой* системы — *супермолекулы*, колебательное движение ядер которой описывается общей системой нормальных координат. При этом электронные состояния такой «супермолекулы» не определены. Единственно, при рассмотрении электронных переходов принцип Франка – Кондона позволяет придать электронным волновым функциям более простой вид $\psi(r, R_0) \rightarrow \psi(r)$, где R_0 — фиксированные координаты равновесных положений ядер.

Формально выделяют два вибронных состояния такой системы, символически обозначаемые D^+A (состояние донора, Ψ_D) и DA^- (состояние акцептора, Ψ_A),

которые различаются как пространственной локализацией электрона, так и равновесным положением ядер. Волновые функции этих состояний с учетом вышеуказанных приближений можно представить в виде

$$\Psi_D = \psi_D(r)\Phi_D(Q) \quad \text{и} \quad \Psi_A = \psi_A(r)\Phi_A(Q).$$

Здесь, как и выше, $\psi_{D,A}(r)$ — электронные волновые функции, $\Phi_{D,A}(Q)$ — волновые функции нормальных мод ядерной подсистемы. Для i -го электронного состояния молекулы в гармоническом приближении сечение поверхности потенциальной энергии вдоль некоторой k -й нормальной координаты Q_k имеет вид параболической зависимости

$$E_{ik}(Q_k) = E_i^0 + \frac{1}{2}M_k\Omega_k^2(Q_k - Q_k^0)^2,$$

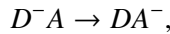
где E_i^0 — электронная энергия, а второе слагаемое определяет энергию ядерных колебаний, M_k и Ω_k — соответственно, приведенная масса и частота k -й нормальной моды, а Q_k^0 — ее равновесное положение. В квантовом представлении эта энергия имеет вид

$$E_{ik} = E_i^0 + \hbar\Omega_k\left(n_{ik} + \frac{1}{2}\right),$$

где $\hbar$ — постоянная Планка, n_{ik} — число возбуждения k -го нормального осциллятора. Полная энергия i -го электронного терма включает энергию всех нормальных мод

$$E_i = E_i^0 + \sum_k \hbar\Omega_k\left(n_{ik} + \frac{1}{2}\right).$$

Переход системы из состояния Ψ_D в состояние Ψ_A символически представляется в виде реакции



константа скорости которой k_{DA} (т. е. вероятность в единицу времени) вычисляется в первом порядке нестационарной теории возмущений. Для нашего рассмотрения ее удобно представить в виде

$$k_{DA} = \frac{2\pi}{\hbar}|V_e|^2 FC \delta(E_D - E_A). \quad (1)$$

Здесь введены следующие обозначения. Электронный матричный элемент

$$V_e = \int \psi_A \widehat{V} \psi_D dr, \quad (2)$$

определяющий энергетический интеграл перекрывания двух электронных состояний системы D^-A и DA^- , где $\widehat{V}$ — оператор взаимодействия этих состояний

(оператор возмущения). Дельта-функция $\delta(E_D - E_A)$ символизирует выполнение энергетического баланса при переходе системы из одного состояния в другое. Если переход происходит в состояние с квазинепрерывным энергетическим спектром, то дельта-функция может быть заменена энергетической плотностью $\rho(E)$ конечных состояний: $\delta(E_D - E_A) \rightarrow \rho(E)$ и тогда формула для k_{DA} приобретает вид «золотого» правила Ферми. Величина FC — это так называемый фактор Франка – Кондона, который представляет собой усредненный по распределению Больцмана квадрат интеграла перекрывания колебательных волновых функций в начальном и конечном состояниях системы. Фактор Франка – Кондона представляет собой произведение $FC = \prod_k FC_k$, где FC_k — этот фактор для k -й нормальной моды [Франк-Каменецкий, 1975]. Аналитическое выражение для этого фактора было впервые получено в работе [Пекар, 1953], что явилось большим достижением теории электронно-колебательных взаимодействий. Дальнейшее развитие теории многофононных процессов показало, что это выражение можно получить многими способами при различной формализации задачи [Перлин, 1963].

В силу того, что электронные состояния молекулярной системы точно не определены, а также не известен вид оператора взаимодействия $\hat{V}$ [Jortner, 1980], в теории ЭКВ электронный матричный элемент (2) является свободным параметром. Следовательно, согласно (1), теория электронного переноса, как уже упоминалось, *de facto* представляет собой теорию фактора Франка – Кондона.

Наиболее часто на практике эта теория применяется при следующих упрощающих допущениях. Предполагается, что при изменении электронного состояния не происходит изменения частот нормальных колебаний молекулярной системы, хотя это и не всегда справедливо [Лонге-Хиггинс, 1964]. Рассматривается одно-модовое приближение [Jortner, 1980], когда в факторе Франка – Кондона учитывается единственная так называемая «акцептирующая» колебательная мода, определяющая координату реакции [Коварский, 1999]. Предполагается также, что квантовая система совершает переход в состояние с квазинепрерывным энергетическим спектром, что позволяет заменить δ -функцию энергетической плотностью конечных состояний. Благодаря этим допущениям существенно упрощается формализм теории, так как в произведении $FC = \prod_k FC_k$ остается единственный сомножитель.

Как уже говорилось, переход системы из состояния Ψ_D в состояние Ψ_A происходит при условии сохранения полной энергии, $E_D = E_A$. Из этого равенства в одномодовом приближении легко получить выражение для разности свободной энергии реакции электронного переноса

$$-\Delta G = E_A^0 - E_D^0 = p\hbar\Omega, \quad (3)$$

где Ω — частота, а $p = n_A - n_D$ — изменение числа возбуждения акцептирующей моды при этом переходе.

Величину смещения равновесных положений ядер начального и конечного состояний обозначим $\Delta Q^0 = |Q_A^0 - Q_D^0|$. В теории фактора Франка–Кондона формально вводится параметр

$$\lambda = \hbar\Omega \cdot S, \quad (4)$$

получивший название энергии реорганизации. Параметр S — это квадрат обезразмеренной величины смещения равновесного положения акцептирующей моды

$$S = \frac{1}{2}(\Delta Q^0)^2 \frac{M\Omega}{\hbar},$$

где M — приведенная масса этой моды². Величина параметра S характеризует интенсивность электронно-колебательного взаимодействия в системе. Выпишем явный вид фактора Франка–Кондона в одномодовом приближении,

$$FC = \exp(-S \operatorname{cth}(\zeta) + \zeta p) I_p\left(\frac{S}{\operatorname{sh}(\zeta)}\right), \quad (5)$$

где введено обозначение $\zeta = \frac{\hbar\Omega}{2k_B T}$, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, $I_p(\dots)$ — функция Бесселя чисто мнимого аргумента целого индекса, который, согласно (3), равен $p = \frac{\Delta G}{\hbar\Omega}$ (знак p может быть любой).

Введя энергетическую плотность конечных состояний $\rho = (\hbar\Omega)^{-1}$, выражение для константы скорости (1) представим в виде

$$k_{DA} = \frac{2\pi}{\hbar}(\hbar\Omega)^{-1}|V_e|^2 \cdot FC \equiv k_0 \cdot FC, \quad (6)$$

где величину

$$k_0 = \frac{2\pi}{\hbar}(\hbar\Omega)^{-1}|V_e|^2$$

можно интерпретировать как константу скорости собственно переноса электрона.

Формулы (5) и (6) являются основой стандартного подхода, используемого в биофизике для анализа реакций электронного переноса. Отметим, что данный подход классифицируют как *неадиабатическую* теорию [Marcus, 1985; Jortner, 1980], подчеркивая этим, что он применим к ситуации, когда величина электронного матричного элемента существенно меньше энергии электрон-колебательного взаимодействия или, другими словами, эффективная скорость переноса электрона в результате туннелирования существенно меньше скорости колебательной релаксации молекулярной системы. В этом случае не происходит расщепления уровней в точке пересечения термов начального и конечного состояний системы. Физическая причина этого состоит в том, что при малой величине электронного

²Напомним, что $\sqrt{\frac{\hbar}{M\Omega}}$ — это амплитуда нулевых колебаний осциллятора.

матричного элемента система, достигая точки пересечения термов, в большинстве случаев остается на начальном терме, так как вероятность перехода электрона с донора на акцептор весьма мала. В силу этого перенос электрона происходит только в некоторых случаях при достижении системой точки пересечения термов.

В противоположном предельном случае, когда величина электронного матричного элемента велика по сравнению с энергией электрон-колебательного взаимодействия, применяется адиабатическая теория. В этом случае в точке пересечения термов возникает переходное состояние, за время жизни которого электрон успевает многократно перейти с донора на акцептор и обратно (т. е. возникают квантовые осцилляции). Такое переходное состояние аналогично вырожденной двухуровневой системе, в которой благодаря сильному взаимодействию происходит расщепление уровня.

Следуя работе [Marcus, 1985], можно дать критерий, разделяющий адиабатический и неадиабатический предельные случаи. В общем случае константу скорости реакции переноса электрона можно представить в виде

$$k = \alpha_0 \nu \cdot \exp\left(-\frac{U_a}{k_B T}\right), \quad (7)$$

где величина коэффициента α_0 зависит, помимо прочего, от отношения частоты электронных квантовых осцилляций (квантовых биений) и частоты акцептирующей моды ν , U_a — энергия активации. Если выполнено неравенство $\alpha_0 \ll 1$, то реакция классифицируется как неадиабатическая, если же $\alpha_0 \approx 1$, то как адиабатическая.

Отметим два важных предельных случая формулы (5), имеющих большое значение для анализа температурных закономерностей протекания реакций электронного переноса. Первый случай — это низкотемпературный (или высокочастотный) предел, когда справедливо неравенство $\hbar\Omega \gg k_B T$. В этом предельном случае формула (5) принимает простой вид, который мы обозначим FC_0 :

$$FC_0 = \frac{S^p e^{-S}}{p!}. \quad (8)$$

Важным свойством низкотемпературного предела является независимость величины фактор Франка–Кондона (и, следовательно, константы скорости (6)) от температуры, что подтверждается экспериментом. Это в свое время сыграло важную роль в биологии, в парадигму которой вошло представление о туннелировании микрочастиц [DeVault, 1980].

Противоположный случай — это высокотемпературный (или низкочастотный — «мягкие моды») предел, когда выполнено неравенство $\hbar\Omega \ll k_B T$. В этом случае формула (5) принимает вид хорошо известной формулы Маркуса [Marcus,

1985], которую мы обозначим FC_M :

$$FC_M = \frac{\hbar\Omega}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}} \exp\left(-\frac{(\lambda + \Delta G)^2}{4\lambda k_B T}\right). \quad (9)$$

Именно эта формула, независимо полученная Маркусом в 1956 г. для описания окислительно-восстановительных химических реакций³ [Marcus, 1956], приобрела наибольшую популярность в биофизике, что, по-видимому, обусловлено простотой ее применения. С математической точки зрения функция (9) является функцией Гаусса, а с точки зрения химической кинетики эта функция описывает активационный процесс, где энергия активации U_a имеет вид

$$U_a = \frac{(\lambda + \Delta G)^2}{4\lambda}. \quad (10)$$

Из этой формулы следует, что для экзотермических реакций, когда $\Delta G < 0$, энергия активации как функция ΔG или λ описывается параболической кривой («маркусова парабола»), имеющей максимум при условии $\lambda = |\Delta G|$, причем, при этом условии энергия активации (10) обращается в ноль. Это так называемый безактивационный случай, когда фактор (9) принимает вид

$$FC_{M|(\lambda=|\Delta G|)} = \frac{\hbar\Omega}{\sqrt{4\pi\lambda k_B T}}. \quad (11)$$

Таким образом, в безактивационном случае константа скорости уменьшается с ростом температуры по закону $\sim T^{-1/2}$. Отметим, что в активационном случае (9) этот фактор также присутствует, но его проявление подавляется более сильной экспоненциальной зависимостью.

С формальной точки зрения причина, обуславливающая зависимость $\sim T^{-1/2}$, имеет статистический характер — дисперсия распределения Гаусса (9). Здесь можно привести качественные соображения. Фактор Франка–Кондона определяет вероятность достижения системой точки пересечения термов при заданных значениях параметров. Эта вероятность, согласно (9), распределена по нормальному закону с центром λ и дисперсией $\sigma^2 = 2\lambda k_B T$. Точка пересечения термов определяет конкретное состояние возбуждения акцептирующей моды, вероятность достижения которого определяется больцмановским фактором. Следовательно, чем выше температура, тем выше вероятность «проскочить» точку пересечения термов, а если система первоначально находится в состоянии пересечения термов, то с увеличением температуры будет возрастать вероятность «уйти» из этой точки. Это означает, что константа скорости реакции переноса электрона будет уменьшаться с ростом температуры, а характер этого уменьшения $\sim \frac{1}{\sqrt{T}}$ определяется свойствами статистического распределения.

³В 1992 г. Р. А. Маркус был удостоен Нобелевской премии за вклад в теорию переноса электрона в химических системах.

* * *

Выводы. В рамках теории электронно-колебательных взаимодействий молекулярная система представляется в виде системы связанных гармонических осцилляторов. Следовательно, в такой системе не могут быть рассмотрены никакие движения ядерной подсистемы кроме гармонических колебаний. Электронные состояния в данной теории считаются делокализованными по всей молекулярной системе и их конкретный вид не определен.

Для вычисления константы скорости (6) реакции электронного переноса необходимо иметь значения четырех параметров: электронного матричного элемента V_e , энергии реорганизации среды λ , частоты «акцептирующей» моды Ω , разности свободной энергии реакции ΔG . Первые три из этих параметров являются свободными параметрами, т.е. не вычисляются в рамках теории. В этой связи необходимо отметить, что здесь мы не обсуждаем подход, связанный с применением методов компьютерного моделирования к изучению процессов переноса зарядов в химических и биологических системах (см., например, [Daizadeh, 1997]). Это особая тема, требующая специального рассмотрения, так как речь идет о моделировании именно процесса электронного переноса (туннельный эффект), а не о вычислении энергетических параметров отдельных кофакторов электрон-транспортной цепи. Заметим только, что, несмотря на определенные успехи, достигнутые в этой области [Nazmutdinov, 2012], моделирование *in silico* процессов электронного переноса в биосистемах все еще сталкивается с затруднениями принципиального характера. Подчеркнем также, что эти три параметра *по определению* не зависят от температуры.

В этой связи обратим внимание на один нюанс теории Маркуса, которая была развита им независимо от теории электронно-колебательных взаимодействий. В теории Маркуса различают так называемый внутрисферный и внешнесферный механизмы электронного переноса. Такое разделение связано с некоторым различием в определении энергии реорганизации для этих случаев. Внутрисферный механизм по сути ничем не отличается от рассмотренного выше подхода на основе теории безызлучательных переходов, когда энергия реорганизации определяется также, как и выше (4). В случае внешнесферного механизма энергия реорганизации несколько переопределяется — к выражению λ добавляется часть, обусловленная реорганизацией растворителя⁴. Тогда полная энергия реорганизации имеет вид $\lambda = \lambda_i + \lambda_o$, где λ_i — внутрисферная часть, которая совпадает с определенной выше (4), а λ_o — внешнесферная часть, которая связана с переориентацией дипольных молекул воды и по существу представляет собой энергию Борна, $\lambda_o \sim \frac{1}{n^2} - \frac{1}{\epsilon_s}$, где n и ϵ_s — это показатель преломления и статиче-

⁴В теории Маркуса одним из важных аспектов является рассмотрение электронного переноса между свободными ионами в растворе, в то время как в теории электронно-колебательных взаимодействий — это всегда внутримолекулярный переход между квантовыми состояниями молекулы.

ская диэлектрическая проницаемость растворителя. Существенно то, что величина ϵ_s , вообще говоря, зависит от температуры. Следовательно, в теории Маркуса, в принципе, допускается некоторая температурная зависимость энергии реорганизации. В дальнейшем, однако, мы не будем учитывать это обстоятельство, так как электронный перенос в биосистемах, согласно принятой классификации, следует относить к внутрисферному механизму.

Сравнение с экспериментом

В эксперименте можно измерить три величины — собственно константу скорости k_{DA} , температуру среды T и равновесное значение разности свободной энергии ΔG , что позволяет получать зависимость константы скорости от температуры $k_{DA}(T)$ и от величины разности свободной энергии $k_{DA}(\Delta G)$ для конкретной реакции. Из сравнения предсказываемых теорией и наблюдаемых в опыте закономерностей можно выработать критерий оценки полноты и адекватности используемых теоретических представлений. Такое сравнение проведем на примере биологической электрон-транспортной системы.

Система. Одной из природных реализаций электрон-транспортной молекулярной системы является фотосинтетический реакционный центр (РЦ) пурпурных бактерий *Rhodobacter (Rb.) sphaeroides*, который представляет собой интегральный мембранный белково-пигментный комплекс, состоящий из трех белковых субъединиц L, M, H и 10 кофакторов. Структура РЦ *Rb. sphaeroides* содержится в Банке данных белковых структур (PDB) (например, структура 1AIJ [Stowell, 1997] или структура 1PCR [Ermler, 1994]). Субъединицы L и M встроены в мембрану и каждая из них состоит из пяти трансмембранных альфа-спиралей, а H-субъединица присоединена к субъединицам L и M со стороны цитоплазмы (рис. 1).

Девять из десяти кофакторов: димер бактериохлорофилла или специальная пара (P), две мономерных молекулы бактериохлорофилла (B_A , B_B), две молекулы бактериофеофитина (H_A , H_B), две молекулы хинона (Q_A , Q_B) и двухвалентный ион атома негемового железа (Fe^{2+}) — образуют почти симметричную структуру с осью симметрии C_2 , проходящую через димер P и атом негемового железа (рис. 3). Эта структура подразделяется на две ветви A и B, соответственно которым индексируются кофакторы. Десятым кофактором является молекула каротиноида, располагающаяся вблизи мономера бактериохлорофилла B_B (на рис. не показана).

Димер P состоит из двух молекул бактериохлорофилла P_A и P_B , лежащих в параллельных плоскостях, расстояние между которыми составляет примерно 5 Å (центры колец не лежат на общей нормали этих плоскостей (см. рис. 2)). Димер располагается ближе к периплазматической поверхности мембраны меж-

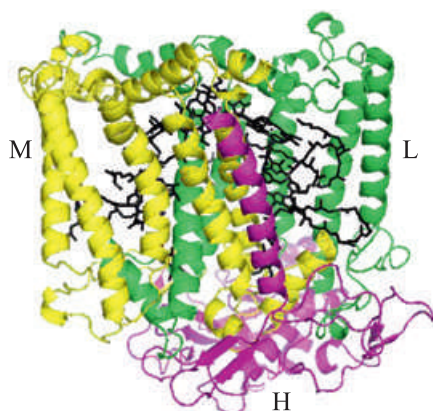


Рис. 1. Молекулярная структура РЦ. Указаны М-, L- и Н-субъединицы. Система кофакторов выделена черным цветом

ду мономерными молекулами бактериохлорофилла B_A и B_B . В глубине мембраны располагаются молекулы бактериофеофитина H_A и H_B , а далее, уже ближе к цитоплазматической поверхности мембраны, располагаются молекулы убинона Q_A , Q_B с ионом железа между ними. Кофакторы, обозначенные индексом А (B_A , H_A , Q_A), образуют так называемую активную трансмембранную цепь кофакторов (или L-цепь), а кофакторы, обозначенные индексом В (B_B , H_B , Q_B), соответственно, неактивную цепь кофакторов (или М-цепь). В структуре РЦ также обнаружены кластеры молекул воды [Fritzsche, 1988], роль которых еще до конца не выяснена, но которые, вероятно, играют важную роль в функции РЦ.

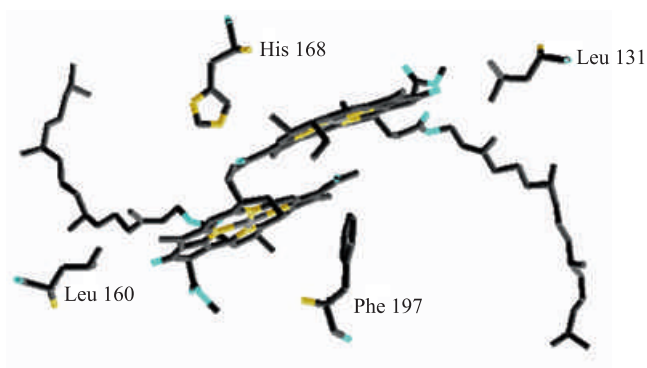


Рис. 2. Фрагмент молекулярной структуры димера бактериохлорофилла. Показаны остатки аминокислот Leu(L131), His(L168), Leu(M160), Phe(M197), которые замещаются при точечном мутагенезе. В диком типе димер образует единственную водородную связь с His(L168)

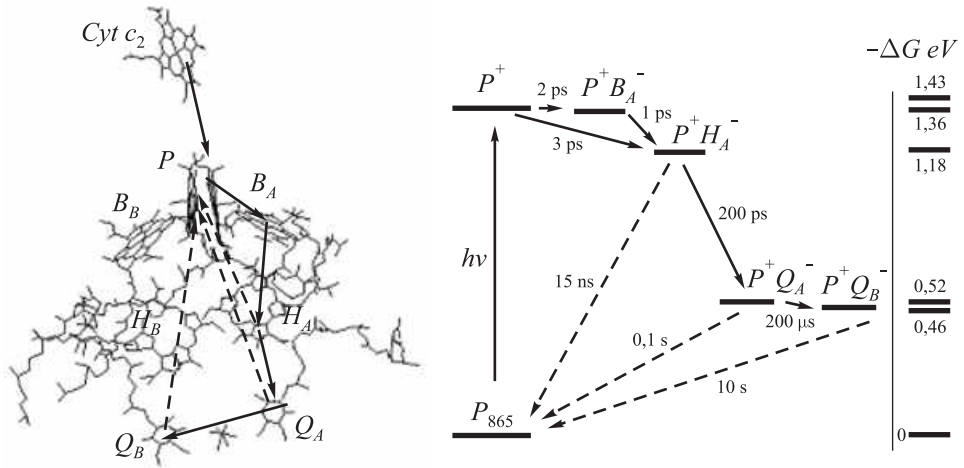
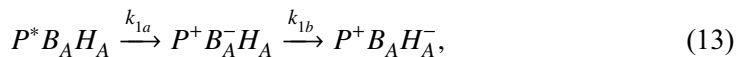


Рис. 3. Система кофакторов РЦ *Rb. sphaeroides* (слева), схема возможных реакций (12)–(19) переноса электрона (посередине), значения разности свободной энергии между нейтральным PA состоянием РЦ и его состоянием с разделенными зарядами P^+A^- , где A^- — восстановленный кофактор (справа). Сплошными стрелками схематически обозначена электронная тропа процесса прямого разделения зарядов. Пунктирные стрелки символизируют реакции рекомбинации зарядов, которые имеют место при выполнении надлежащих условий

Элементарные реакции электронного переноса. Процесс разделения зарядов в фотосинтетических реакционных центрах инициируется электронным возбуждением первичного донора $P \rightarrow P^*$ либо в результате прямого поглощения фотона, либо в результате миграции энергии возбуждения с антенного комплекса. В нативных РЦ после возбуждения электрон примерно за 3 пс переносится с димера на бактериофеофитин (H_A)



k_1 — скорость этой реакции. С помощью техники фемтосекундной спектроскопии было установлено, что реакция (12) протекает в две стадии: сначала электрон переходит на промежуточный центр — мономер бактериохлорофилла (B_A), а затем очень быстро переходит с молекулы бактериохлорофилла на молекулу бактериофеофитина. Таким образом, эту реакцию можно представить в виде



где константа скорости первой стадии обозначена k_{1a} , а последующей стадии — k_{1b} .

Примерно через 200 пс после восстановления бактериофеофитина электрон переходит на следующий кофактор — так называемый первичный хинонный акцептор (Q_A)



где k_2 — константа скорости этой реакции.

Время жизни восстановленного хинона Q_A^- оценивается примерно в 200 мкс, после чего электрон переходит на вторичный хинонный акцептор Q_B



где k_3 — константа скорости этой реакции.

В результате этих реакций в РЦ формируется состояние с разделенными зарядами $P^+ Q_B^-$. Другой реакцией, протекающей в то же время, является реакция восстановления окисленного димера внешним донором, которым является цитохром с



где k_0 — константа скорости этой реакции. На рис. 3 показана молекула цитохрома c_2 , входящая в структуру внешнего по отношению к РЦ цитохромного комплекса.

После восстановления димера процесс разделения зарядов посредством реакций (12)–(15) повторяется, в результате чего молекула вторичного хинона восстанавливается дважды, превращаясь в семихинол Q_B^{2-} . Восстановление молекулы вторичного хинона Q_B сопровождается ее протонированием — она присоединяет к себе два протона (дважды протонируется) и после этого выходит из РЦ, покидая свой сайт связывания. Детали молекулярных процессов, обуславливающих восстановление и протонирование вторичного хинона, до сих пор остаются не вполне ясными. В частности, остается дискуссионным вопрос об очередности реакций электронного переноса и присоединения протонов, а также о механизме самого протонирования. Эти вопросы более подробно обсуждаются в последующих главах данной работы.

Реакции (12)–(15) являются прямыми реакциями первичного разделения зарядов в фотосинтезе. Однако при выполнении определенных условий (экстракция внешнего электронного донора cyt^{2+}), блокирование реакций (14) или (15), а также при соблюдении многих других экспериментальных деталей) можно осуществить реакции рекомбинации зарядов между соответствующим восстановленным кофактором электрон-транспортной цепи РЦ и окисленным димером бакте-

риохлорофилла. Исследованы следующие реакции рекомбинации:



где k_{-1} , k_{-2} и k_{-3} — соответствующие константы скоростей этих реакций.

Энергетика всех этих реакций определяется окислительно-восстановительными (иначе, редокс- или среднеточечными) потенциалами кофакторов, значения которых приведены на рисунке 3. Величина этих потенциалов определяется не только свойствами самих молекул кофакторов, но также опосредуется структурой, составом и динамикой белкового микроокружения этих молекул. Существенную роль здесь играют водородные связи и дальнodelствующие электростатические взаимодействия. Подробное обсуждение этих вопросов является одной из основных задач настоящей работы.

В данном разделе мы, в качестве примера, приведем результаты экспериментальных исследований реакции (18), полученных при различных температурах и/или редокс-потенциалах кофакторов, а также проведем анализ этих результатов в рамках стандартной теории.

Реакция рекомбинации $P^+ Q_A^- \rightarrow P Q_A$. Реакция (18), представляющая собой рекомбинацию зарядов между анионом молекулы первичного хинона Q_A^- и катионом димера P^+ , классифицируется как медленная реакция. Характерное время ее протекания в нативных РЦ при комнатных температурах составляет примерно 0,1 с. Характерное время колебательной релаксации в молекулярных системах составляет единицы-десятки пикосекунд. В силу этого анализ данной реакции проводится в рамках неадиабатической теории, где константа скорости определяется выражением (6).

Температурная зависимость константы скорости. Реакция рекомбинации (18) является примером элементарной реакции переноса электрона в биомолекулярных системах. В РЦ пурпурных бактерий *Rb. sphaeroides* эту реакцию можно осуществить, заблокировав прямую реакцию (15). В результате такой блокировки происходит рекомбинация зарядов между восстановленной молекулой первичного хинонного акцептора (убихинон-10 в нативных РЦ) и окисленным димером бактериохлорофилла. Анализ наблюдаемых особенностей этой реакции в различных условиях дает яркую иллюстрацию недостаточности основных представлений стандартной теории для полного описания процессов электронного переноса в биологических системах.

На рисунке 4 приведена температурная зависимость константы скорости этой реакции, полученная на образцах РЦ, первоначально замороженных в темноте до

температуры жидкого гелия с последующим постепенным нагревом [McMahon, 1998].

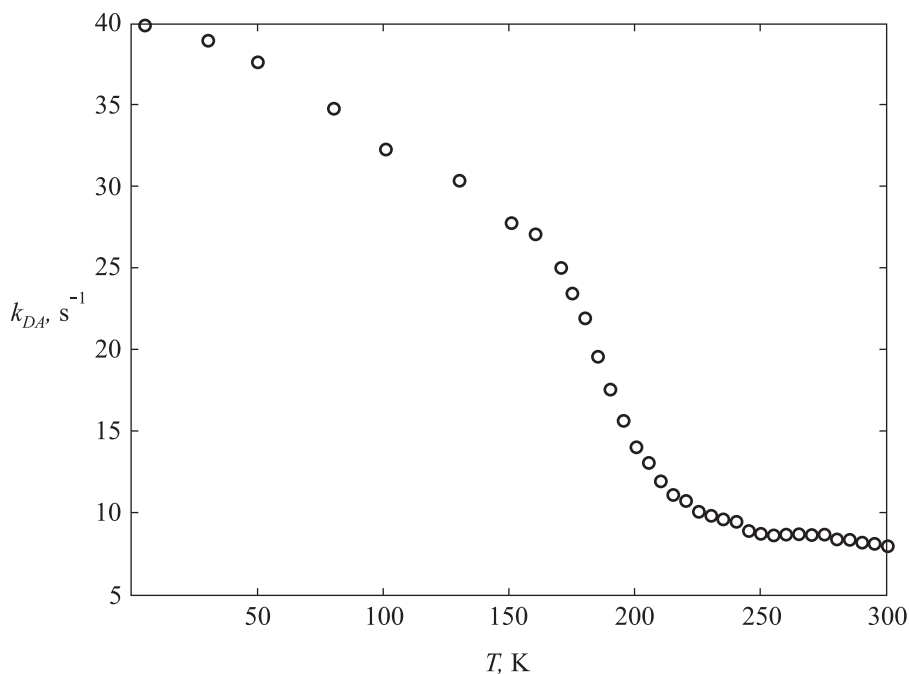


Рис. 4. Температурная зависимость константы скорости реакции рекомбинации (18), полученная на образцах РЦ *Rb. sphaeroides*, замороженных в темноте [McMahon, 1998]

Как видно из этого рисунка, температурная зависимость константы скорости реакции (18) носит аномальный характер, при этом кривая имеет достаточно заметный отрицательный наклон уже в области самых низких температур, а наиболее сильные изменения происходят в температурном интервале примерно от 150 до 230 К. В окрестности 180 К имеет место точка перегиба, когда кривизна кривой меняется с положительной на отрицательную, что свидетельствует об изменении характера процессов, определяющих наблюдаемую зависимость. В диапазоне примерно от 250 до 300 К константа скорости изменяется слабо, но во всем температурном диапазоне от 5 до 300 К она уменьшается примерно в 6 раз — от 40 до 7 s^{-1} .

На рисунке 5 представлены два из возможных результатов фитирования данной зависимости с помощью формулы (6), а также формул (5) и (9). Для их получения мы использовали известное из эксперимента значение $\Delta G = 0,52$ эВ, а так как это безактивационный процесс, то $\Delta G = \lambda$. Первое фитирование (кривая 1) получена следующим образом. Выбрав температурную точку 5 К, мы подобрали для этой температуры значения параметров, при которых расчетные значения константы скорости совпадают с экспериментальными для этой реакции — в на-

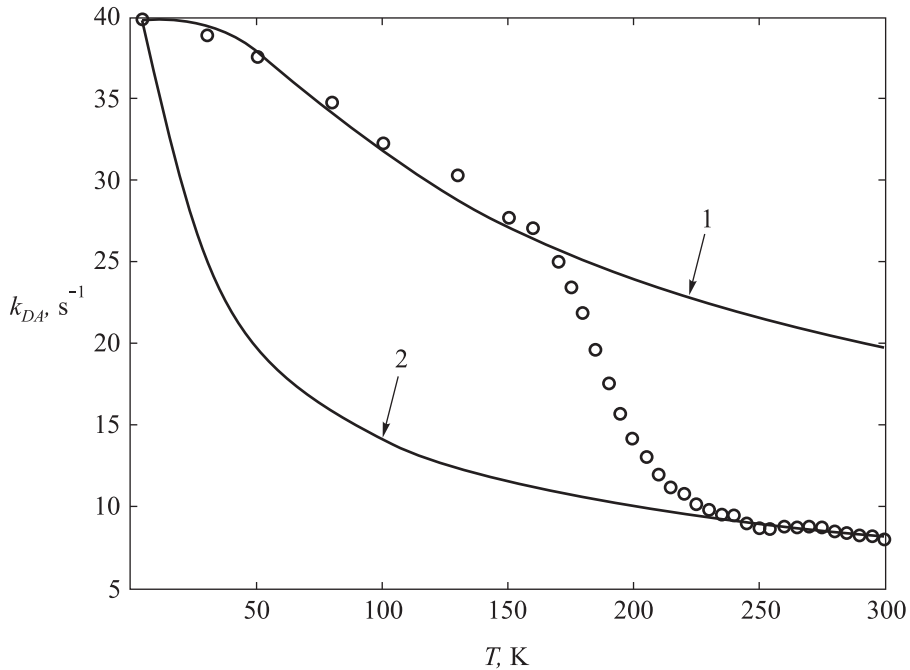


Рис. 5. Результаты фитирования температурной зависимости константы скорости реакции (18), представленной на рисунке 4

шем случае это примерно 40 с^{-1} : $V_e = 2,93 \cdot 10^{-8} \text{ эВ}$, $\nu = \frac{\Omega}{2\pi} = 3,1 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$. Как видно из рисунка 5 в области низких температур расчетная кривая 1 вполне удовлетворительно ложится на экспериментальные точки, но в диапазоне примерно от 170 до 300 К она сильно отклоняется в сторону более высоких значений константы скорости. Второй результат фитирования (кривая 2) получен согласованным подбором параметров для двух температурных точек, 5 и 300 К: $V_e = 1,87 \cdot 10^{-8} \text{ эВ}$, $\nu = \frac{\Omega}{2\pi} = 5,1 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Из рисунка видно, что кривая 2 удовлетворительно ложится на экспериментальные точки в области высоких температур 220–300 К, но существенно отклоняется от экспериментальной кривой в области низких температур 5–220 К. Таким образом, при заданном условии $\Delta G = \lambda = 0,52 \text{ эВ}$ значения параметров, приводящих к удовлетворительному результату в низкотемпературной и высокотемпературной областях, существенно различаются: частота акцептирующей моды в 6 раз, а величина V_e — в 1,5 раза. Следовательно, условный «переход» молекулярной системы с кривой 1 на кривую 2 связан не только с изменением характера ее колебательного движения (акцептирующей моды), но также с изменением вероятности туннелирования собственно электрона, в соответствии с изменением величины электронного матричного элемента. Это означает, что структурные изменения белковой мат-

рицы, вызываемые усилением ее микроконформационной подвижности с ростом температуры, могут опосредованно влиять на вероятность туннелирования электрона. Этот аспект будет подробно обсуждаться ниже.

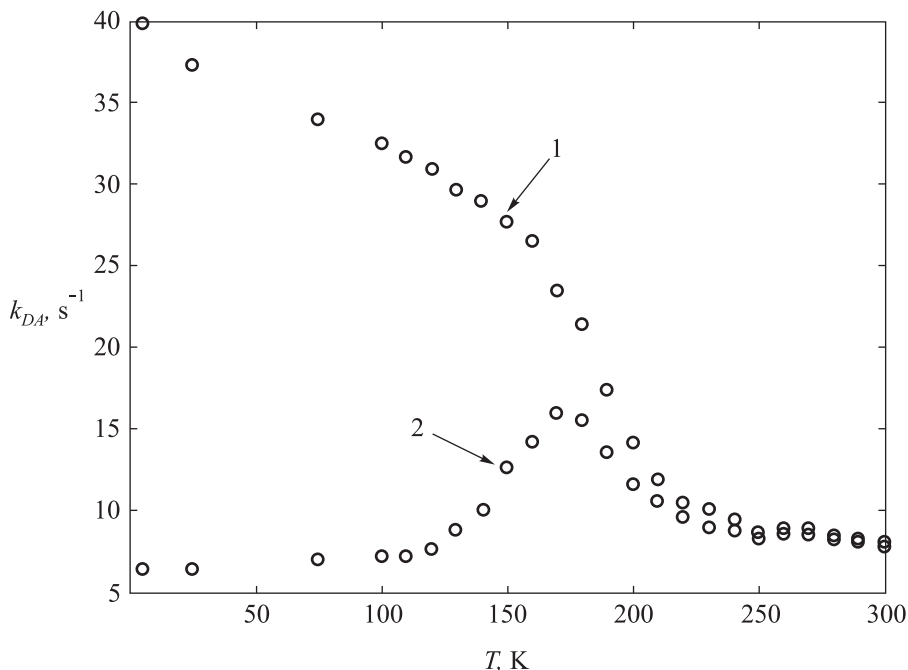


Рис. 6. Температурная зависимость константы скорости реакции рекомбинации (18), полученная на образцах РЦ *Rb. sphaeroides*, замороженных в темноте (кривая 1) и замороженных в условиях интенсивного освещения (кривая 2) [McMahon, 1998]

Из проведенного анализа следует, что стандартная теория не может удовлетворительно объяснить наблюдаемое в экспериментах поведение $k_{DA}(T)$ реакции (18) (рис. 5, кривые 1 и 2) в температурном диапазоне 170–220 К. Это свидетельствует о том, что в стандартной теории не учтены важные свойства изучаемой молекулярной системы⁵. Они могут быть обусловлены динамическими особенностями белковых структур и их конформационной подвижностью, описание которых не входит в «арсенал» стандартной теории. Ярким примером, иллюстрирующим недостаточность представлений стандартной теории для полного описания процессов электронного переноса, является та же реакция (18), которая протекает в образцах РЦ, первоначально замороженных в условиях интенсивного освещения. На рисунке 6 представлена температурная зависимость (кривая 2) константы скорости реакции (18) для таких образцов.

⁵Подчеркнем еще раз, что в рамках стандартной теории молекулярная система рассматривается как система связанных гармонических осцилляторов. Такая система, по определению, может совершать только колебательное движение.

Из этого рисунка видно (кривая 2), что в образцах РЦ, замороженных при непрерывном освещении, константа скорости в низкотемпературном диапазоне 5–120 К остается примерно равной ее величине при высоких (250–300 К) температурах. Однако в интервале от 120 до 180 К константа скорости возрастает, а затем, в области 180–300 К, характер зависимости $k_{DA}(T)$ приближается к таковому для образцов РЦ, замороженных в темноте (рис. 6, кривая 1). Можно предположить, что такое поведение $k_{DA}(T)$ свидетельствует о существенных фотоиндуцированных изменениях в структуре РЦ, обусловленных длительным существованием анион-радикала первичного хинона Q_A^- при непрерывном освещении. Очевидно, эти структурные изменения фиксируются в системе посредством глубокого замораживания, что и проявляется в эксперименте.

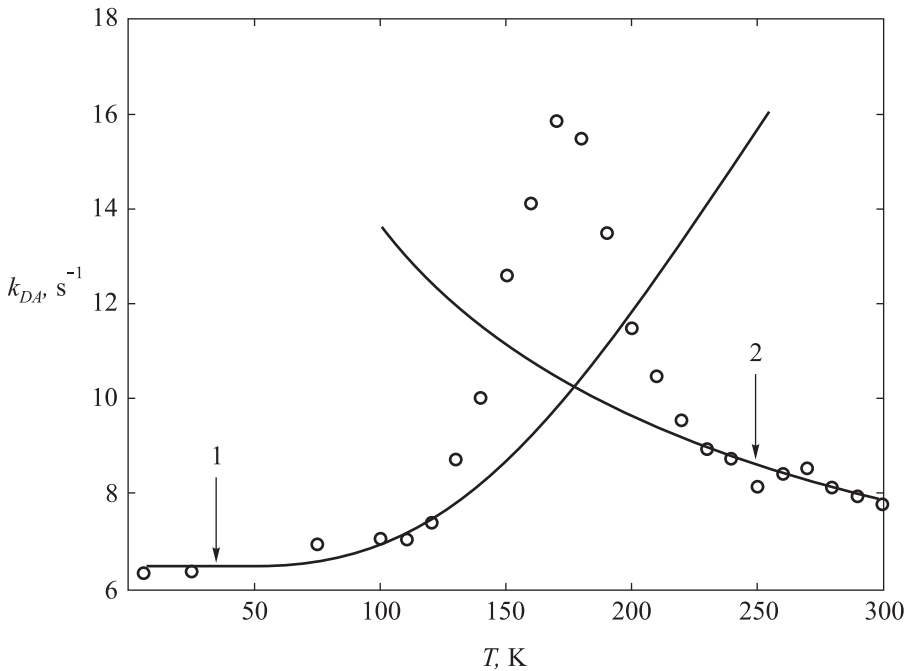


Рис. 7. Фитирование температурной зависимости константы скорости реакции (18) для образцов, замороженных в условиях интенсивного освещения: для низкотемпературной области (кривая 1) $\lambda = 1$ эВ, $\Delta G = 0,5$ эВ, $\nu = 10^{13}$ с $^{-1}$, $V = 10^{-7}$ эВ; для высокотемпературной области (кривая 2) $\lambda = \Delta G = 0,52$ эВ, $\nu = 5 \cdot 10^{11}$ с $^{-1}$, $V = 1,84 \cdot 10^{-7}$ эВ

На рисунке 7 представлены результаты фитирования температурной зависимости константы скорости реакции (18) для образцов, замороженных в условиях интенсивного освещения. Для низкотемпературной области (кривая 1) были подобраны следующие значения параметров: $\lambda = 1$ эВ, $\Delta G = 0,5$ эВ, $\nu = 10^{13}$ с $^{-1}$, $V = 10^{-7}$ эВ, что соответствует активационному характеру процесса. Для высокотемпературной области (кривая 2) значения параметров следующие: $\lambda = \Delta G =$

$= 0,52$ эВ, $\nu = 5 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$, $V = 1,84 \cdot 10^{-7}$ эВ и соответствуют безактивационному процессу. Следовательно, при нагревании образцов РЦ от криогенных до комнатных температур в молекулярной системе происходит модификация структуры, благодаря которой процесс переноса электрона «трансформируется», согласно представлениям стандартной теории, из активационного в безактивационный. Очевидно, что для понимания механизмов такой «трансформации» требуется привлечь те или иные представления о механизмах релаксационной и микроконформационной динамике белковых структур.

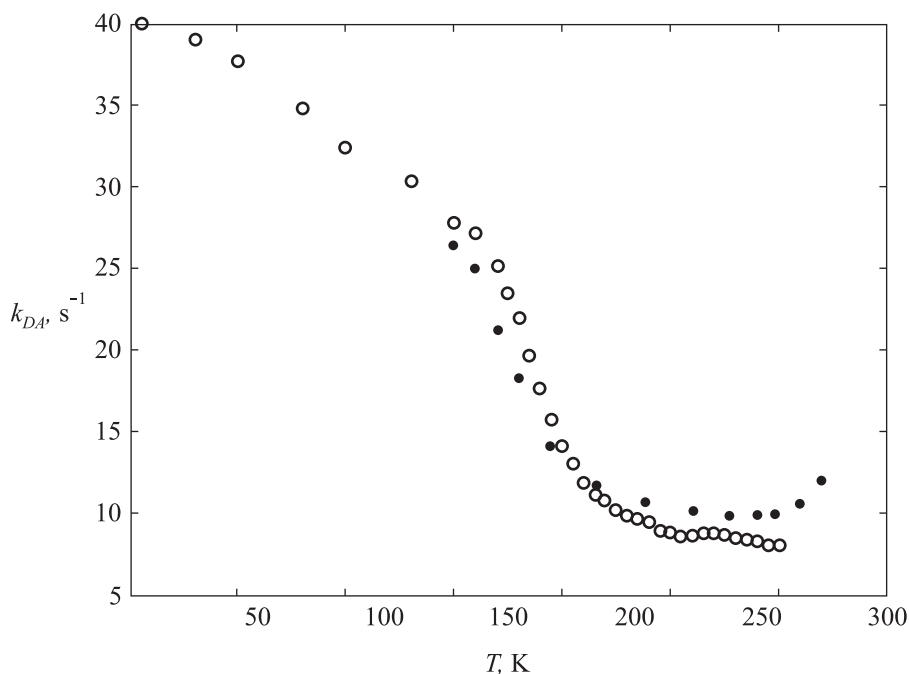


Рис. 8. Температурная зависимость константы скорости реакции (18), полученная на образцах РЦ, прогретых до температуры 320 К ($\sim 50^\circ\text{C}$)

В дополнение к представленным экспериментальным данным о температурной зависимости константы скорости реакции рекомбинации (18) приведем еще один любопытный факт [Красильников, 2000]. На рисунке 8 представлены данные константы скорости этой реакции в температурном интервале от 150 до 320 К (черные кружки) и для сравнения данные, представленные на рис. 4 (светлые кружки), где температура ограничена 300 К. Из этого рисунка видно, что до температуры 280 К ход этих кривых примерно одинаковый, но при дальнейшем росте температуры скорость реакции, согласно работе [Красильников, 2000], начинает возрастать. Наиболее отчетливо ускорение реакции при высоких температурах можно проиллюстрировать, построив температурную зависимость для

характерного времени реакции (18), $\tau_{DA} = k_{DA}^{-1}$, которая представлен на рисунке⁶ 9.

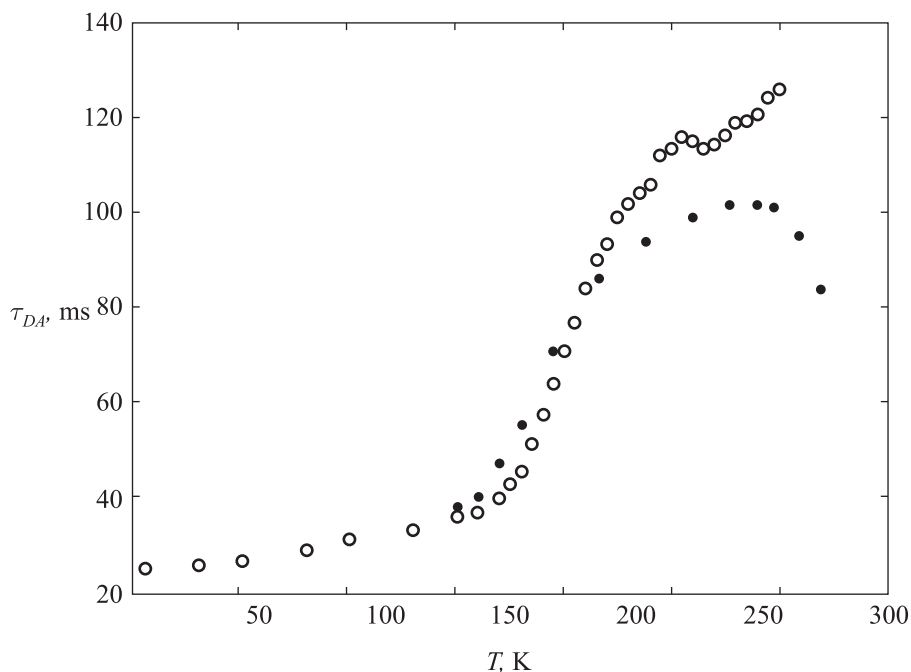


Рис. 9. Температурная зависимость характерного времени τ_{DA} протекания реакции (18), полученная на образцах РЦ, прогретых до температуры 320 К ($\sim^{\circ}\text{C}$)

Отметим значимое качественное расхождение в высокотемпературной области кривых $k_{DA}(T)$ или $\tau_{DA}(T)$, полученных в работах [McMahon, 1998] (светлые кружки) и [Красильников, 2000] (черные кружки). Трудно сказать, каков был бы ход кривой, представленной светлыми кружками, если бы в работе [McMahon, 1998] температурный диапазон был бы расширен до температуры выше 300 К. Вместе с тем, эффект ускорения реакции (18) при температуре выше 300 К, первоначально обнаруженный в работе [Красильников, 2000], является достоверным, так как был многократно подтвержден в последующих экспериментах, причем, аналогичный немонотонный характер зависимости $k_{DA}(T)$ наблюдается в реакции (18) не только для реакционных центров бактерий *Rb. sphaeroides*, но и для РЦ других бактерий, например, *Rhodospirillum rubrum*. Вместе с тем, однако, необходимо сделать существенное замечание. Как показали эксперименты, ускорение реакции (18) наблюдается только в так называемых свободных РЦ,

⁶Количественное расхождение экспериментальных графиков в диапазоне 220–290 К, видимо, можно отнести на счет технических причин. Так, например, в работе [Красильников, 2000] блокирование реакции переноса на вторичный хинон осуществлялось с помощью о-фенантролина, а в работе [McMahon, 1998] — с помощью тербутрина.

т. е. в РЦ, находящихся в растворе. Однако если встроить РЦ в липосомы (так называемые хроматофоры), то в таких РЦ ускорения данной реакции не наблюдается — при увеличении температуры до 330–335 К скорость данной реакции остается примерно постоянной и равной скорости при 290 К. Это факт свидетельствует о существенном влиянии макроокружения РЦ на процесс переноса, протекающий во внутренней области реакционного центра. Однако механизм такого влияния пока до конца не ясен.

В качестве одного из возможных механизмов ускорения реакции (18) нами был предложен [Krasilnikov, 2007] механизм, основанный на эффекте переноса протона вдоль линии водородной связи, образуемой молекулой первичного хинона с остатком гистидина в его локальном окружении. Подробное обсуждение этого вопроса будет проведено в следующих главах данной работы. Здесь же только отметим, что существование эффекта ускорения реакции (18) в высокотемпературной области можно рассматривать в качестве дополнительного аргумента в обсуждении необходимости учета динамики белковых структур при описании происходящих в них процессов переноса электрона.

Зависимость константы скорости от ΔG . На рис. 2 представлен фрагмент димера бактериохлорофилла из РЦ *Rb. sphaeroides* с четырьмя аминокислотными остатками. Техника точечного мутагенеза позволяет заменять эти аминокислотные остатки другими. В РЦ дикого типа димер образует единственную водородную связь с остатком His(L168). Если заменить этот остаток на фенилаланин (Phe), то димер будет лишен водородных связей. При этом изменится его окислительно-восстановительный потенциал. Таким образом, заменяя остатки, можно варьировать количество водородных связей, образуемых димером, и тем самым изменять его редокс-потенциал. Были получены [Lin, 1994] мутанты, содержащие 0, 1, 2, 3 и 4 водородных связей при этом редокс-потенциал димера менялся от 410 до 765 мВ.

С использованием таких мутантных РЦ в работе [Ortega, 1996] были получены зависимости константы скорости реакции рекомбинации (18) от разности свободной энергии, $k(\Delta G)$, при различных температурах. На рисунке 10 представлены некоторые из этих зависимостей, обозначенные символом ($\circ$), а сплошными линиями отображены результаты их фитирования гауссовыми функциями. Из рисунка видно, что максимум этих кривых сдвигается в сторону меньших значений ΔG при понижении температуры. Если кривые фитирования соответствуют «маркусовым параболам», то максимум кривых соответствует точке, в которой $|\Delta G| = \lambda$. Следовательно, согласно стандартной теории необходимо допустить, что при понижении температуры энергия реорганизации λ системы уменьшается или, наоборот, при повышении температуры эта энергия увеличивается. Такое допущение, однако, противоречит теории, так как по определению (4) величина энергии реорганизации принципиально от температуры не зависит. Другими словами, если в одной и той же молекулярной системе протекает одна

и та же реакция электронного переноса, то и реорганизация ядерной подсистемы должна быть одинаковой при любой температуре. Вместе с тем, экспериментальные данные говорят об обратном: при росте температуры от 10 до 293 К энергия реорганизации, согласно [Ortega, 1996], увеличивается примерно на 250 мэВ: от 650 до 900 мэВ.

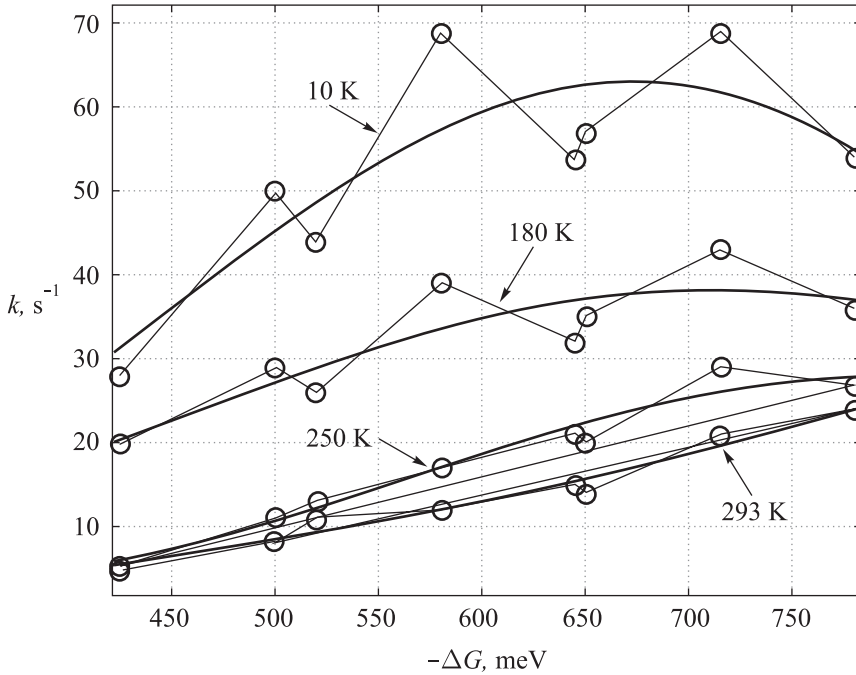


Рис. 10. Зависимость константы скорости реакции рекомбинации (18), $k(\Delta G)$, построенные по данным работы [Ortega, 1996] (○) для различных температур образцов. Сплошные плавные жирные кривые — результат фитирования гауссовыми функциями

Если это так, то что это может означать с точки зрения стандартной теории? Так как в рамках этой теории молекулярная система представляется в виде системы связанных гармонических осцилляторов, то здесь можно предположить только то, что при изменении температуры происходит последовательная смена активной для данной реакции акцептирующей моды. При этом, согласно (4), изменяется как частота Ω акцептирующей моды, так и величина S , определяющая смещение равновесного положения этой моды в результате реакции. Напомним, что для каждой нормальной моды величина S индивидуальна, не зависит от ее частоты и, согласно общепринятой терминологии, характеризует интенсивность электронно-колебательного взаимодействия данной моды. Используя (4), составим отношение

$$\frac{\lambda_1(T_1)}{\lambda_2(T_2)} = \frac{S_1 \Omega_1}{S_2 \Omega_2},$$

из которого при $\lambda_1(293) = 900$ и $\lambda_2(10) = 650$ эВ [Ortega, 1996] получим

$$\frac{S_1 \Omega_1}{S_2 \Omega_2} \approx 1,38.$$

Казалось бы, нет каких-либо затруднений подобрать соответствующие этому отношению частоты и смещения. Однако здесь возникает принципиальный вопрос, требующий детального анализа. Дело в том, что реальный процесс изменения электронного состояния системы сопровождается колебательной релаксацией, в которой, вообще говоря, задействованы все нормальные моды системы, каждая из которых вносит свой вклад в общую реорганизацию молекулярной системы. Этот момент учитывается в стандартной теории, где (см., например, [Франк-Каменецкий, 1975]) фактор Франка–Кондона представляет собой произведение таких факторов для каждой нормальной моды $FC = \prod_i FC_i$. Следовательно, в общем случае энергия реорганизации системы есть сумма $\lambda = \sum \lambda_i$, включающая энергию λ_i всех нормальных мод и для данного внутримолекулярного процесса по определению является величиной постоянной, независимой от температуры.

Обнаруженный в [Ortega, 1996] эффект, однако, противоречит этому представлению. Действительно, исследуется одна и та же реакция (18) в одной и той же молекулярной системе⁷. Следовательно, величина энергии реорганизации для этой реакции должна быть одной и той же независимо ни от величины ΔG (т. е. от вида мутанта), ни от температуры среды. Между тем, результаты измерений [Ortega, 1996] показывают, что величина λ изменяется с температурой.

Если оставаться в рамках представлений о молекулярной системе только как о системе связанных гармонических осцилляторов, то тогда надо допустить, что с изменением температуры изменяется система нормальных мод. Другими словами, это допущение предполагает, что с изменением температуры в структуре молекулярной системы происходят определенные изменения. Однако если такой эффект имеет место в реакции (18), то он, вообще говоря, должен, в той или иной мере, проявляться и в других реакциях, т. е. иметь достаточно общий характер.

Отметим, что, вообще говоря, нет принципиальных ограничений на возможность осуществления тех или иных структурных изменений молекулярной системы в зависимости от температуры. Однако описание подобных эффектов выходит за рамки стандартной теории. В связи с этим необходимо включать в описание молекулярной системы микроконформационную динамику, также учесть релаксационные процессы, различающиеся как по временной шкале, так и по масштабу структурных изменений. Подробное обсуждение этих вопросов проведено в следующих главах данной работы.

⁷Здесь необходимо сделать оговорку, так как точечные мутации, вообще говоря, вносят некоторое возмущение в молекулярную структуру. Вместе с тем температурные зависимости константы скорости реакции (18) для мутантных РЦ оказались достаточно схожими. В этой связи полагают, что и структура мутантных РЦ практически идентичная.

Влияние растворителей. Как показали эксперименты [Пашенко, 1986], константа скорости реакции (18) чувствительна к типу растворителя, в котором находятся выделенные из бактерий реакционные центры. Показано, что добавление различных криопротекторов в раствор, содержащий РЦ, приводит к сдвигу редокс-потенциала димера бактериохлорофилла. Например, добавление глицерина (70 % по объему) сдвигает среднеточечный потенциал димера на 30 мВ (от 430 до 460 мВ), добавление 35 % ДМСО сдвигает этот потенциал еще больше — на 45 мВ (от 430 до 475 мВ), а при замещении воды тяжелой водой среднеточечный потенциал димера не изменяется, оставаясь равным 430 мВ.

Среднеточечный потенциал первичного хинона не меняется ни при добавлении глицерина, ни ДМСО. Следовательно, изменение разности свободной энергии между димером и первичным хиноном обусловлено изменением редокс-потенциала только димера, аналогично тому, как это происходит при точечных мутациях, использованных в работе [Ortega, 1996]. Тогда, согласно стандартной теории, если РЦ для реакции рекомбинации находится на восходящей ветви маркусовой параболы, то скорость реакции рекомбинации при добавлении глицерина должна возрасти, а при добавлении ДМСО этот рост должен быть еще больше. В тяжелой воде изменений в скорости реакции рекомбинации быть не должно.

Измерения, между тем, показали, что при добавлении глицерина скорость реакции рекомбинации не только не увеличилась, а даже немного уменьшилась — с 10 до $8,3 \text{ с}^{-1}$. При добавлении ДМСО скорость реакции практически не изменилась, лишь слегка наметилась тенденция к росту. В растворе же тяжелой воды скорость реакции продемонстрировала слабое увеличение. В связи с этим интересно отметить, что при этих условиях скорость прямой реакции переноса электрона с бактериофеофитина на первичный хинон во всех случаях замедлялась: в глицерине в 1,1, в ДМСО в 2,4, в тяжелой воде в 1,66 раз.

Приведенные данные показывают, что изменение редокс-потенциала кофакторов неоднозначно влияет на изменение скорости реакции переноса электрона. Здесь, очевидно, проявляются свойства среды, обусловленные релаксационной динамикой белкового окружения кофакторов, отличающиеся по своей природе от колебательной релаксации. Это отчетливо проявляется в экспериментах с замещением обычной воды на тяжелую воду. Действительно, редокс-потенциал кофакторов не изменяется, а скорость переноса электрона изменяется. Так, согласно данным работы [Paschenko, 2001], характерное время реакции (12), соответствующей переносу электрона с димера на феофитин увеличивается с 3,5 до 8,2 пс (т. е. скорость реакции уменьшается почти в 2,5 раз); время реакции (14) увеличивается от 190 до 350 пс (т. е. скорость этой реакции уменьшается почти в 2 раза).

Проблема электронного матричного элемента

Электронный матричный элемент V_e определяет вероятность туннельного перехода электрона от одного редокс-центра к другому, при условии, что кон-

фигурация ядерной подсистемы соответствует переходному состоянию. Как отмечалось выше, вероятность электронного туннелирования в теории ЭКВ не вычисляется, вследствие чего электронный матричный элемент V_e имеет статус свободного параметра. Здесь мы кратко опишем некоторые подходы к решению этой проблемы, а также наметим возможные пути их развития.

Энергетический барьер. Наиболее простой способ оценки величины V_e основан на использовании хорошо известной формулы Гамова для вероятности⁸ D проникновения частицы через одномерный потенциальный барьер $U(x)$

$$D = \exp \left(-\frac{2\sqrt{2m}}{\hbar} \int_{x_1}^{x_2} \sqrt{U(x) - E} dx \right), \quad (20)$$

где m и E — соответственно, масса и энергия частицы, $U(x)$ — потенциальная энергия системы, x_1, x_2 — координаты точек поворота, определяемые из условия $U(x) = E$. Разность $R = |x_1 - x_2|$ определяет ширину барьера; высота барьера U_m определяется как максимальное значение разности $U_m = U(x_m) - E$, где $x_1 < x_m < x_2$.

Формула (20) определяет вероятность преодоления барьера при однократной «попытке». Для получения средней вероятности в единицу времени (т.е. константы скорости) величину D надо умножить на частоту совершения таких «попыток». В случае обсуждаемого в данной работе процесса электронного переноса можно предположить, что эта частота связана с вероятностью достижения системой переходного состояния. Несколько упрощая, эту частоту можно принять близкой к частоте акцептирующей колебательной моды $\nu = \frac{\Omega}{2\pi}$, а константу скорости представить в виде

$$k_G = \nu \cdot D.$$

Сравнивая это выражение с формулой (6), получим равенство $k_G = k_0$, из которого выразим величину $|V_e|^2$:

$$|V_e|^2 = (\hbar\nu)^2 D. \quad (21)$$

Как можно видеть из формулы (20), величина D , а следовательно и величина V_e , существенно зависит от формы барьера $U(x)$. Для наиболее простой формы прямоугольного барьера имеем

$$D_{sq} = \exp \left(-\frac{2\sqrt{2mU_m}}{\hbar} R \right), \quad (22)$$

а для барьера параболической формы эта вероятность D_{pr} имеет вид

$$D_{pr} = \exp \left(-\frac{2\sqrt{2mU_m}}{\hbar} \frac{\pi}{4} R \right). \quad (23)$$

⁸Параметр D также называют коэффициентом проницаемости барьера.

Основываясь на этих примерах, коэффициент проницаемости (20) можно представить в виде

$$D = \exp(-\beta R), \quad (24)$$

где параметр β выражается следующим образом:

$$\beta = \alpha \cdot \frac{2\sqrt{2mU_m}}{\hbar}, \quad (25)$$

α — числовой коэффициент, величина которого зависит от формы барьера ($\alpha = 1$ для прямоугольного, $\alpha = \frac{\pi}{4}$ для параболического и т. п.). Подставив значения констант в формулу (25), получим

$$\beta \approx \alpha \cdot \sqrt{U_m}, \quad (26)$$

где β выражается в $\text{\AA}^{-1}$, а U_m — в эВ.

Используя выражения (21) и (24), константу скорости (6) можно представить в виде

$$k_{DA} = \nu \cdot FC \cdot \exp(-\beta R), \quad (27)$$

откуда следует важный вывод — *константа скорости реакции электронного переноса должна экспоненциально уменьшаться с увеличением расстояния R между редокс-центрами.*

Экспериментальные данные. В связи с этим большой интерес представляет результат обработки обширного массива экспериментальных данных по реакциям электронного переноса, протекающих как в биосистемах (фотосинтетические РЦ, митохондрии), так и в полусинтетических белковых комплексах⁹ [Moser, 1992; Farid, 1993; Dutton, 1994]. В результате анализа этих данных экспоненциальная зависимость (27) была подтверждена: оказалось, что экспериментальные точки ложатся на прямую в координатной плоскости, где по оси ординат отложены значения $\ln\left(\frac{k_{DA}}{k_0}\right)$, а по оси абсцисс — значения R . При этом абсолютные значения скоростей различных реакций могут отличаться на несколько (до десяти) порядков. Из этой эмпирической зависимости легко определить значение k_0 (пересечение графика с осью ординат) и значение параметра β (тангенс угла наклона), что и было сделано. Но это приводит к совершенно неожиданному выводу — параметры k_0 и β имеют *одинаковое* (т. е. *универсальное*) значение для различных реакций, протекающих в белковых средах [Moser, 1992]: $k_0 \approx 10^{13} \text{ с}^{-1}$ (скорость при вандерваальсовом контакте кофакторов, $R \approx 3,5 \text{ \AA}$), $\beta = \beta_p \approx 1,7 \text{ \AA}^{-1}$. Другими словами, получается, что величина электронного матричного элемента V_e (см. (21) и (24)) определяется не свойствами собственно центров электронной локализации (кофакторов), а свойствами среды, в которую они встроены. Это весьма необычный и нетривиальный результат.

⁹Комплексы [Ru-цитохром c] и [Ru-миоглобин].

В работе [Farid, 1993] значение параметра β для белковых сред было скорректировано и составило $\beta_p \approx 1,4 \text{ \AA}^{-1}$. Более того, в этой работе приводятся сведения о том, что аналогичный анализ для 20 ковалентно связанных донорно-акцепторных соединений (ароматических и неароматических) показал такую же зависимость скорости реакции от расстояния, но при другом среднем значении параметра β : $\beta_c = 0,7 \text{ \AA}^{-1}$.

Весьма интересным является то, что изменение свойств среды, в которой находятся редокс-центры, существенно влияет на кинетику реакции переноса электрона. Так, для органических стеклообразных растворов также справедлива зависимость (27), но среднее значение параметра $\beta = \beta_g = 1,2 \text{ \AA}^{-1}$.

Если же кофакторы *гипотетически* находятся в вакууме, то для правильной оценки константы скорости электронного переноса необходимо принять значение параметра $\beta = \beta_v = 2,8 \text{ \AA}^{-1}$ [Farid, 1993].

Таким образом, из анализа экспериментальных данных вытекают два важных вывода:

- 1) подтверждается справедливость зависимости (27);
- 2) обнаруживается свойство универсальности параметра β — величина β одинакова для всех реакций, протекающих в среде данного типа.

* * *

Суперобменное взаимодействие. Один из известных подходов к описанию механизма переноса электрона в конденсированных средах основан на теории так называемого суперобменного взаимодействия, которая первоначально была разработана в работе [Anderson, 1950]. Некоторые представления этой теории были использованы в работе [McConnel, 1961] для описания переноса электрона вдоль молекулярной цепочки, состоящей из нескольких CH_2 -групп и соединяющей два ароматических кольца. Теория суперобменного взаимодействия использует представления теории ЛКАО¹⁰, но при этом учитывает взаимодействие только между ближайшими соседними атомами в молекуле. Следовательно, в этом подходе *не рассматривается прямое взаимодействие между молекулами донора и акцептора*.

В теории суперобменного взаимодействия рассматриваются *виртуальные* состояния атомов, которые представляют собой *анионные* состояния A^- изначально нейтрального атома и которые являются классически недоступными, так как отделены от основного состояния высоким энергетическим барьером. Предполагается, что эти состояния могут быть заселены посредством туннелирования электрона. Если такое заселение произошло, то последующий перенос электрона по цепочке атомных групп можно представить как последовательные квантовые

¹⁰ЛКАО — линейная комбинация атомных орбиталей.

прыжки от одной атомной группы к другой по виртуальным состояниям. Таким образом, в теории суперобменного взаимодействия прямое туннелирование электрона от донора к акцептору заменяется его последовательным туннелированием между соседними атомами в молекулярной цепи, соединяющей молекулы донора и акцептора.

В работе [McConnel, 1961] были сконструированы виртуальные состояния из $3d$ -орбиталей атома углерода, входящего в каждое звено цепочки $(\text{CH}_2)_n$, состоящей из n звеньев. Полагая, что состояния, когда электрон находится либо на одном, либо на другом ароматическом кольце, соединенных цепочкой $(\text{CH}_2)_n$, является вырожденными и используя теорию возмущений, в [McConnel, 1961] было получено выражение для энергии расщепления этого вырожденного состояния, которое имеет смысл удвоенной величины электронного матричного элемента V_e

$$2|V_e| = -2 \frac{W^2}{U_D} \left(-\frac{w}{U_D} \right)^{n+1}, \quad (28)$$

где U_D — энергия, необходимая для того, чтобы электрон достиг виртуального состояния, первоначально находясь на каком-либо кольце; W — матричный элемент, определяющий вероятность перехода электрона с кольца на ближайшую CH_2 -группу цепочки; w — матричный элемент, определяющий вероятность перехода электрона между соседними звеньями цепи, n — число звеньев в цепи.

Данное представление по существу ничего не проясняет, ибо проблема вычисления матричного элемента V_e просто превращается в проблему вычисления матричных элементов U_D , W и w . Как отмечает Д. Дево [DeVault, 1980], хотя теорию суперобменного взаимодействия и можно рассматривать в качестве некоторого альтернативного подхода для вычисления вероятности переноса электрона на большие расстояния, но эта теория не отвечает на основной вопрос — как вычислить электронный матричный элемент.

Более того, по нашему мнению, применение теории суперобменного взаимодействия к описанию процессов переноса электрона может столкнуться с неоднозначностью. Дело в том, что в этом подходе прямое взаимодействие между донором и акцептором отсутствует и, следовательно, между ними не возникает смешанного состояния, которое, собственно, и задает «вектор переноса». Если такой вектор не задан, то электрон, вообще говоря, может «пойти» по любому пути, создаваемому виртуальными состояниями атомов, образующих разветвленные цепи. Так, например, если молекула донора образует несколько связей с атомными группами белковой структуры, то возникает проблема выбора «электронной тропы», которая ведет к акцептору.

Электронные тропы. В серии работ [Mayo, 1986; Gray, 1989, 1992, 1996, 2005; Beratan, 1992; Winkler, 1992; Miyshita, 2005] на основе анализа результатов собственных экспериментов был предложен подход к интерпретации процесса переноса электрона, основанный на идее суперобменного взаимодействия, но

использующий более общее понятие «электронной тропы». Как уже отмечалось, теория суперобменного взаимодействия основана на том, что перенос электрона осуществляется только между *ближайшими соседними* атомами молекулярной цепочки. Однако, как отмечается в [Gray, 1996], в ряде исследований было установлено, что величина V_e преимущественно определяется взаимодействием, как правило, удаленных друг от друга донорно-акцепторных групп, в то время как вклад в V_e от взаимодействия между ближайшими атомами пренебрежимо мал. Такой эффект наблюдался, например, в насыщенных алканах, эффективность переноса в которых оказалась чувствительной к конформации этих молекул.

Предлагаемая авторами указанных работ модель электронной (туннельной) тропы предполагает, что среду между донором и акцептором можно разбить на небольшие структурные единицы, связанные друг с другом посредством либо ковалентных, либо водородных, либо вандерваальсовых связей. Каждому типу связи присваивается своя способность (вероятность) к электронному переносу, которая обозначается параметрами ϵ_C , ϵ_H , ϵ_S соответственно. Задачей теории является нахождение оптимального пути, соединяющего донор и акцептор и состоящего из различных структурных единиц. Электронный матричный элемент для одного пути представляется в виде произведения

$$V_e \propto \prod \epsilon_C \prod \epsilon_H \prod \epsilon_S. \quad (29)$$

Применение этого подхода к интерпретации конкретных экспериментов является, по нашему мнению, достаточно *спекулятивным*, поэтому далее мы не будем его обсуждать. По-видимому, аналогичные соображения послужили причиной того, что в более поздних работах авторов [Gray, 2005; Winkler, 2014] данный подход не только не развивается, но даже не упоминается.

Еще экспериментальные данные. В обзоре [Winkler, 2014] содержится богатый фактический материал, из которого отметим здесь наиболее интересные, на наш взгляд.

Измерения константы скорости реакции переноса электрона в 30 образцах Ru-модифицированных белков, в которых расстояние между редокс-центрами варьировалось от 12 до 26 Å, показали, что зависимость константы скорости от расстояния имеет экспоненциальный характер типа (27) со средним значением параметра затухания $\beta \approx 1,1 \text{ Å}^{-1}$. Однако при этом имел место существенный разброс экспериментальных точек на диаграмме $(\ln k, R)$, что в принципе характерно для белковых сред. В частности отмечается, что существуют примеры, когда скорости реакций в белковой среде различались на три порядка при одинаковом расстоянии между редокс-центрами, и, наоборот, скорости были одинаковыми, когда расстояния различались на 5 Å.

Результаты аналогичных измерений для 10 реакций переноса электрона в *n*-алканах, образующих упорядоченные монослойные пленки на поверхности золотого электрода, показали существенно меньший разброс экспериментальных

точек ($\beta = 1,06 \text{ \AA}^{-1}$). Это указывает на важную роль структурной организации белковой матрицы в опосредовании переноса электрона на большие расстояния. С этой точки зрения наблюдаемый разброс экспериментальных точек может быть обусловлен структурной гетерогенностью различных белковых молекул. Такая структурная гетерогенность не позволяет белковой матрице унифицировать параметры барьера для электронного туннелирования. Этот вывод подтверждается, например, тем, что если донор и акцептор разделены структурированным белком β -слоя, то зависимость скорости реакции электронного переноса от расстояния достаточно точно описывается простой экспонентой (27).

Другим примером являются стеклообразные среды, в которых эффективность электронного транспорта чувствительна не только к химической композиции стекла, но и к типу межмолекулярных связей. Например, установлено, что величина параметра β для различных стекол соотносится следующим образом¹¹:

$$\beta_{\text{oligoxylylene}} < \beta_{\text{toluene}} < \beta_{\text{H}_2\text{SO}_4} \approx \beta_{\text{2-MTHF}},$$

где $\beta_{\text{oligoxylylene}} \approx 0,76 \text{ \AA}^{-1}$, $\beta_{\text{toluene}} \approx 1,23 \text{ \AA}^{-1}$, $\beta_{\text{H}_2\text{SO}_4} \approx 1,6 \text{ \AA}^{-1}$, $\beta_{\text{2-MTHF}} \approx 1,62 \text{ \AA}^{-1}$.

В результате анализа обширного экспериментального материала в работе [Winkler, 2014] формулируются два основных положения:

- 1) в средах, содержащих ароматические молекулы, перенос электрона осуществляется более эффективно, нежели в средах, содержащих алканы; следовательно, в белковых средах электронный перенос будет осуществляться более эффективно тогда, когда в них будет больше содержаться ароматических аминокислот, таких, как Phe, Tyr и Trp;
- 2) ковалентные связи более эффективно опосредуют перенос электрона, нежели вандерваальсовы контакты.

Некоторые перспективы

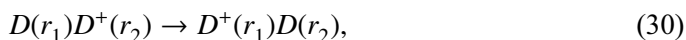
Прыжковая проводимость неупорядоченных полупроводников. На примере теории прыжковой проводимости, развитой для описания электропроводности неупорядоченных полупроводников, проиллюстрируем подход, в рамках которого вычисляется электронный матричный элемент.

При высоких температурах полупроводники обладают собственной электропроводностью, связанной с тепловой активацией электронов из валентной зоны в зону проводимости. Ввиду достаточно большой энергии активации, определяемой шириной запрещенной зоны, при понижении температуры концентрация собственных носителей быстро убывает, пока не станет меньше концентрации

¹¹2-MTHF = 2-methyltetrahydrofuran.

носителей, поставляемых в зоны примесями. При дальнейшем понижении температуры проводимость полупроводника целиком будет определяться концентрацией и свойствами примесей и поэтому называется примесной.

Дальнейшее понижение температуры приводит к «вымораживанию» примесных электронов, т. е. к их возвращению на атомы примеси. Это приводит к быстрому уменьшению концентрации свободных электронов в зоне проводимости и, соответственно, к уменьшению электропроводности. При таких температурах существенную роль начинает играть явление компенсации, состоящее в том, что электроны примесных атомов-доноров связываются примесными атомами-акцепторами. При понижении температуры наступает момент, когда свободных электронов в зоне проводимости практически не остается. В этом случае наибольшую роль в проводимости начинают играть прыжки электронов непосредственно по примесным атомам, без их активации в зону проводимости. Такая проводимость называется прыжковой. Необходимым условием прыжковой проводимости является наличие свободных мест на донорах, когда некоторое количество донорных атомов остается в ионизованном состоянии. При низкой температуре это может быть обеспечено только компенсацией, которая происходит в полупроводнике, если имеется некоторая концентрация неосновных примесей [Шкловский, 1975]. Для краткости назовем этот механизм прыжковой проводимостью D^+ -типа, для которого элементарный акт переноса электрона представляется в виде схемы

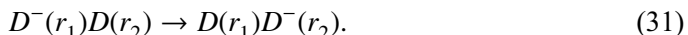


где $D(r_1)$ — нейтральный атом донора, находящийся в точке r_1 , $D^+(r_2)$ — ионизованный атом донора (катион-состояние), находящийся в точке r_2 . Атомы донорной примеси, очевидно, являются идентичными. Наличие ионизованных доноров D^+ (т. е. свободных мест для электронов) является необходимым условием для реализации прыжковой проводимости D^+ -типа.

Прыжковая проводимость D^+ -типа обладает достаточно заметной энергией активации, что обусловлено разбросом уровней примесных атомов из-за их взаимодействия с локальным окружением. Поэтому, прыгая по донорам, электроны поглощают или излучают фононы, в результате чего возникает экспоненциальная зависимость электропроводности от температуры. Обратим особое внимание на то, что характерной чертой прыжковой проводимости является исключительно сильная зависимость от концентрации примесей. Например, увеличение концентрации примеси в 30 раз может приводить к увеличению проводимости полупроводника в 10^7 раз [Шкловский, 1979]. Физическая причина этого состоит в том, что вероятность прыжка между донорами определяется перекрытием их волновых функций, которые экспоненциально спадают с увеличением расстояния и, следовательно, экспоненциально убывают с увеличением расстояния интегралы перекрытия между ними. Тогда при уменьшении концентрации примеси возрастает среднее расстояние между донорами, что и приводит к экспоненци-

альному уменьшению вероятности прыжков, а следовательно, и проводимости. Наличие экспоненциальной зависимости проводимости полупроводника от концентрации примеси является главным критерием прыжкового механизма проводимости [Шкловский, 1979].

В слабо компенсированных полупроводниках в ограниченном интервале концентраций, кроме зонной и прыжковой проводимости D^+ -типа, проявляется еще один активационный механизм проводимости, который мы назовем прыжковой проводимостью D^- -типа. Этот тип проводимости имеет место в промежуточном между зонной и прыжковой проводимостью D^+ -типа интервале температур. Предполагается, что механизм D^- -типа проводимости обусловлен прыжками электронов между донорами, один из которых находится в анионном состоянии D^- . В подтверждение этого было показано, что, например, в германии возникает анионное состояние D^- с энергией связи порядка $0,1E_0$, где E_0 — потенциал ионизации изолированного донора [Шкловский, 1979]. Элементарный акт переноса электрона по этому типу проводимости представляется в виде схемы

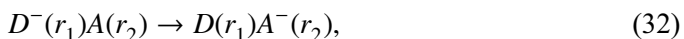


Состояние D^- обладает большим радиусом (т. е. волновая функция спадает с расстоянием более плавно по сравнению с нейтральным состоянием донора), и поэтому такие состояния сильно перекрываются, что позволяет при определенных условиях этому типу проводимости конкурировать с прыжковой проводимостью D^+ -типа.

Сравнение с биосистемами. Если сравнить описанные выше механизмы переноса электрона в неупорядоченных полупроводниках с элементарными реакциями электронного переноса в биосистемах, то можно выделить следующие аналогии.

Первое, в полупроводниках перенос электрона по обоим типам прыжковой проводимости осуществляется между *локализованными* электронными состояниями, индикатором чего является экспоненциальная зависимость проводимости от расстояния между донорами. Аналогично этому, в биосистемах также имеет место экспоненциальная зависимость скорости переноса электрона от расстояния между кофакторами. Это позволяет утверждать, что в биосистемах перенос электрона происходит между локализованными состояниями¹².

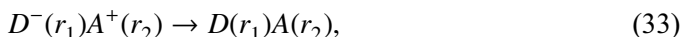
Второе, все первичные реакции разделения зарядов в РЦ, за исключением быть может самой первой, осуществляются по схеме, аналогичной механизму прыжковой проводимости D^- -типа:



¹²Напомним, что в описанном выше подходе (теория безызлучательных переходов) эти электронные состояния считаются делокализованными по всей молекулярной системе.

где отличие от схемы (31) состоит только в том, что перенос осуществляется между нетождественными центрами — разные молекулы кофакторов донора D и акцептора A .

Третье, все реакции рекомбинации (17)–(19) в РЦ протекают по схеме



которая отличается от схемы (30) не только нетождественностью центров, но и тем, что молекула донора находится в анионном D^- , а не в нейтральном состоянии. Заметим, однако, что указанные различия носят скорее «технический» нежели принципиальный характер и могут быть достаточно просто скорректированы.

Рассмотрим теперь более подробно описание элементарного процесса переноса, протекающего в полупроводниках по механизму прыжковой проводимости D^+ -типа.

Прыжковая проводимость D^+ -типа. Теория механизма прыжковой проводимости в полупроводниках, когда роль центров локализации электронов играют ионизированные атомы примеси, была разработана в работе [Miller, 1960]. Основной подход в этой теории состоит в том, что, исходя из локализованных на отдельных донорах электронных состояниях, вычисляется вероятность перехода электрона между двумя донорами с поглощением или излучением фонона. Мы кратко рассмотрим основные положения этой теории, основываясь на работах [Miller, 1960; Шкловский, 1979], при этом опустим некоторые детали, относящиеся к описанию состояния электронов в периодическом потенциале решетки полупроводника.

Согласно схеме (30), рассмотрим систему, состоящую из двух атомов-доноров с координатами $\vec{R}_1$ и $\vec{R}_2$, на которых находится один электрон. Обозначим $\psi(\vec{r} - \vec{R}_i) \equiv \psi_i(\vec{r})$, ($i = 1, 2$) волновую функцию основного состояния отдельного донора, которая определяется из уравнения Шредингера¹³

$$(T_e + U_i)\psi_i(r) = E_i^0\psi_i(r) \quad (34)$$

с потенциальной энергией

$$U_i(r) = -\frac{e^2}{\epsilon|\vec{r} - \vec{R}_i|}, \quad (35)$$

где T_e — оператор кинетической энергии электрона, e — элементарный заряд, ϵ — статическая диэлектрическая проницаемость решетки полупроводника, E_i^0 — энергия уединенного в кристаллической решетке донора. Отметим, что введение

¹³Здесь мы опустили не существенное для нашего рассмотрения периодическое поле кристаллической решетки.

параметра ϵ в потенциал (35) оправдано в тех случаях, когда радиус примесного состояния (т. е. радиус верхней занятой электронной орбиты атома примеси) велик по сравнению с постоянной решетки. Это характерно для так называемых мелких примесей, у которых энергетический уровень близок к уровню дна зоны проводимости. Такие примеси легко ионизируются, отдавая электрон в зону проводимости полупроводника.

Полагаем, что расстояние между донорами велико по сравнению с характерным параметром затухания волновых функций β^{-1} , т. е.

$$R = |\vec{R}_1 - \vec{R}_2| \gg \beta^{-1}$$

и, следовательно, перекрытие волновых функций доноров мало. Хотя донорные атомы идентичны, но благодаря их взаимодействию с локальным окружением, создаваемым хаотичным распределением заряженных примесных атомов, энергии E_1 и E_2 их состояний различаются, т. е. в общем случае $E_1 \neq E_2$. Энергию взаимодействия электрона с локальным окружением обозначим $V(\vec{r})$, тогда гамильтониан системы в случае фиксированных положений доноров представится в виде

$$H = T_e + V + U_1 + U_2, \quad (36)$$

где U_i определены формулой (35).

Для нахождения основного состояния системы воспользуемся вариационным методом, где пробную функцию представим в виде линейной комбинации волновых функций отдельных доноров

$$\Psi = a_1\psi_1 + a_2\psi_2. \quad (37)$$

В результате получим, что система двух доноров в основном состоянии представляется в виде двухуровневой системы с энергией уровней

$$E_{1,2} = E_{1,2}^0 + J + \frac{V_{11} + V_{22}}{2} - SI \pm \frac{\Delta}{2} \left(1 + \frac{4I^2}{\Delta^2} \right)^{1/2}, \quad (38)$$

где введены следующие обозначения матричных элементов ($i, j = 1, 2$):

$$J = \langle \psi_i | U_j | \psi_i \rangle, \quad L = \langle \psi_i | U_i | \psi_j \rangle, \quad V_{ii} = \langle \psi_i | V | \psi_i \rangle, \quad S = \langle \psi_i | \psi_j \rangle, \\ \Delta = V_{11} - V_{22}, \quad I = L - SJ.$$

Выражение (38) получено при условии малости интеграла перекрытия волновых функций доноров $S \ll 1$, а также при условии $V_{ij} - SV_{ii} \ll L - SJ$, где $V_{ij} = \langle \psi_i | U_j | \psi_j \rangle$. Эти условия всегда соблюдаются при достаточно большом расстоянии между донорами. Интегралы J и L представляют собой, соответственно, кулоновский и обменный интегралы взаимодействия двух доноров. Величина матричного элемента V_{ii} определяется энергией взаимодействия i -го донора с локальным окружением. Величина I представляет собой энергетический

интеграл перекрывания состояний двух доноров, который можно также назвать энергией резонансного взаимодействия доноров [Miller, 1960]. Если расстояние между донорами достаточно велико, то будет выполняться неравенство $I \ll \Delta$, при котором из (38) получим, что

$$E_1 - E_2 \approx \Delta \left(1 + \frac{2I^2}{\Delta^2} \right) \approx \Delta, \quad (39)$$

и, следовательно, величина Δ практически определяет разность уровней системы двух доноров.

При условии $I \ll \Delta$ и $S \ll 1$ волновые функции двух состояний системы доноров представятся в виде

$$\begin{aligned} \Psi_1 &\approx \psi_1 + \frac{I}{\Delta} \psi_2, \\ \Psi_2 &\approx \psi_2 - \frac{I}{\Delta} \psi_1. \end{aligned} \quad (40)$$

Эти волновые функции мало отличаются от волновых функций отдельных доноров, что отражает ситуацию, когда имеет место локализация электронных состояний на донорах¹⁴ [Шкловский, 1979]. Очевидно, что переход электрона из состояния Ψ_1 в состояние Ψ_2 означает перенос электрона на расстояние R .

Вероятность этого перехода можно вычислить методом нестационарной теории возмущений. Для этого необходимо знать явный вид локализованных электронных волновых функций ψ_1 и ψ_2 , а также вид оператора возмущения, под действием которого осуществляется переход, так как при этом должна компенсироваться разность энергий (39) состояний Ψ_1 и Ψ_2 . В теории прыжковой проводимости полупроводников обе эти задачи имеют решение.

Можно показать [Шкловский, 1979], что волновая функция $\psi_i(\vec{r})$ атома-донора, входящего в структуру кристаллической решетки полупроводника, представляется в виде водородоподобной функции и, например, для случая донора с примесным энергетическим уровнем вблизи невырожденной зоны проводимости, имеющим экстремум в центре зоны Бриллюэна, представляется в виде

$$\psi_i(\vec{r}) = u(r) \frac{1}{\sqrt{\pi a^3}} \exp\left(-\frac{r}{a}\right), \quad (41)$$

где $u(r)$ — функция, периодическая с периодом решетки¹⁵, $a = \frac{\epsilon \hbar^2}{m_{eff} e^2}$ — эффективный боровский радиус, определяющий характерный размер волновой функции,

¹⁴В случае неупорядоченного полупроводника такая локализация называется андерсоновской локализацией.

¹⁵При условии $a \gg d$, где d — период решетки, функцию $u(r)$ можно считать постоянной и принять $u(r) \approx 1$.

m_{eff} — эффективная масса электрона в кристалле. В более сложном случае эта функция также будет водородоподобной, но уже не сферически симметричной из-за анизотропии кристалла.

Переход из состояния Ψ_1 в состояние Ψ_2 и компенсация разности энергий Δ осуществляется за счет электрон-фононного взаимодействия. В пионерской работе [Miller, 1960] это взаимодействие рассмотрено в рамках теории деформационного потенциала решетки для одной продольной акустической ветви фононов. Мы не будем здесь подробно останавливаться на рассмотрении этого подхода, так как он, очевидно, непосредственно не применим к описанию процессов электронного переноса в биологических макромолекулярных системах. Приведем только некоторые результаты вычислений [Шкловский, 1979; Miller, 1960], которые в дальнейшем можно будет сопоставить с расчетами для других систем. Вероятность перехода в единицу времени k_q вычисляется, как обычно, в первом порядке нестационарной теории возмущений

$$k_q = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{v_0}{(2\pi)^3} \int |M_q|^2 \delta(\hbar s q - \Delta) d\vec{q}, \quad (42)$$

где v_0 — объем кристалла, s — скорость звука в кристалле, $\vec{q}$ — волновой вектор фонона,

$$M_q = iG \left(\frac{\hbar q N_q}{2v_0 s \rho} \right)^{1/2} \int \Psi_2 e^{i\vec{q}\vec{r}} \Psi_1 d\vec{r}$$

— матричный элемент электрон-фононного взаимодействия (электронный матричный элемент) для случая перехода с поглощением фонона ($\Delta < 0$), G — постоянная деформационного потенциала, ρ — плотность кристалла, N_q — число фононов с импульсом q , $e^{i\vec{q}\vec{r}}$ — функциональная часть оператора электрон-фононного взаимодействия.

Используя волновые функции (41) доноров, можно получить явное выражение для матричного элемента электрон-фононного взаимодействия

$$|M_q|^2 = \frac{\hbar G^2}{2\rho v_0 s} \left(\frac{I}{\Delta} \right)^2 N_q \cdot q (1 - \cos \vec{q}\vec{R}) \left[1 + \left(\frac{qa}{2} \right)^2 \right]^{-4}, \quad (43)$$

где

$$I = \frac{2e^2 R}{3\epsilon a^2} \exp\left(-\frac{R}{a}\right).$$

Подставив (43) в (42), окончательно получим¹⁶

$$k_q = k_{0q} N_q(\Delta), \quad (44)$$

¹⁶При этом пренебрегают осциллирующим членом $\cos \vec{q}\vec{R}$, так как он не дает вклад в проводимость [Miller, 1960]. Здесь мы также пренебрежем членом в квадратных скобках, так как его величина в большинстве случаев близка к единице.

где

$$k_{0q} = \frac{G^2 \Delta}{\pi \rho s^5 \hbar^4} \left(\frac{2e^2}{3\epsilon a} \right)^2 \frac{R^2}{a^2} \exp\left(-\frac{2R}{a}\right) \quad (45)$$

и $N_q(\Delta)$ — равновесная планковская функция распределения

$$N_q(\Delta) = \left[\exp\left(\frac{\Delta}{k_B T}\right) - 1 \right]^{-1}. \quad (46)$$

Для переходов с излучением фонона ($\Delta > 0$) в выражении (44) функция (46) заменяется на выражение $(N_q(\Delta) + 1)$.

Выражение (43) представляет собой электронный матричный элемент, определяющий вероятность туннельного переноса электрона от одного центра локализации к другому. Константа скорости этого процесса определяется формулой (44), из которой следует, что скорость реакции экспоненциально уменьшается с увеличением расстояния R между центрами локализации (донорами). Это согласуется с аналогичной зависимостью для элементарных реакций переноса электрона, протекающих в биологических и химических системах. Отметим, что в выражение (44) вместо фактора Франка–Кондона¹⁷ входит «активационный» фактор $N_q(\Delta)$, определяющий вероятность выполнения энергетического баланса в процессе переноса. Избыток или недостаток энергии компенсируется за счет взаимодействия электрона с решеткой полупроводника, играющей роль термостата. Это взаимодействие обуславливает температурную зависимость константы скорости элементарной реакции переноса электрона между двумя центрами, а следовательно, и прыжковой проводимости полупроводника.

Оценочное приложение к биосистемам. К сожалению, нельзя непосредственно воспользоваться формулой (44) для оценки величины электронного матричного элемента элементарных реакций переноса электрона в биологических системах. Тем не менее, ради любопытства, оценим величину k_{0q} по формуле (45), которая имеет тот же смысл, что и величина k_0 из формулы (6). Сравнение проведем для реакции рекомбинации (18).

Величину k_{0q} оценим при следующих условиях: примем $\beta = \frac{2}{a}$; диэлектрическую проницаемость ϵ примем равной 1; для величины константы деформационного потенциала¹⁸ выберем среднее значение 5 эВ; плотность среды и скорость звука в ней примем такими же, как у воды при нормальных условиях: $\rho = 1 \text{ г/см}^3$, $s = 1,5 \cdot 10^5 \text{ см/с}$; величину Δ определим из энергии фонона, для

¹⁷Фактор Франка–Кондона — это параметр многофононного взаимодействия центра локализации с окружением, а в данном варианте теории прыжковой проводимости D^+ -типа рассматривается однофононный процесс.

¹⁸Величина константы деформационного потенциала может принимать значения в пределах от 1 до 10 эВ [Бонч-Бруевич, 1977].

которого волновой вектор $\vec{q}$ направлен вдоль вектора $\vec{R}$, а его величину определим из условия¹⁹ $\cos(qR) = -1$, например, $q_1 = \frac{\pi}{R}$ или $q_2 = \frac{3\pi}{R}$. Соответствующая частота фонона (нормального колебания) есть $\Omega_q = sq$. Расстояние R определим из структуры РЦ и примем равным расстоянию центр-центр между димером и кольцом молекулы хинона, $R \approx 28 \text{ \AA}$.

Для фонона q_1 получим $\Delta \approx 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ эВ}$, а соответствующая частота фонона (частота нормального колебания) $\Omega_q \approx 1,6 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ или линейная частота $\nu_q \approx 2,6 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$, а для фонона q_2 , соответственно, в три раза больше: $\Delta \approx 3,3 \cdot 10^{-3} \text{ эВ}$, $\Omega_q \approx 5 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ или линейная частота $\nu_q \approx 8 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$. Эти значения соответствуют так называемым «мягким» модам молекулярных колебаний.

Поскольку интеграл перекрывания электронных состояний анион-радикала молекулы хинона и нейтрального димера зависит от параметров затухания волновых функций β_Q и β_D этих состояний, то в качестве оценки величины параметра β для реакции рекомбинации (18) надо взять среднее между этими значениями. Величина β_Q определяется значением вертикальной энергии сродства к электрону E_A молекулы хинона, а β_D — значением потенциала ионизации I димера бактериохлорофилла. Используя значения $E_A = 2,16 \text{ эВ}$ и $I = 5,4 \text{ эВ}$ [Blomberg, 1998], получим $\beta_Q \approx 1,5 \text{ \AA}^{-1}$, $\beta_D \approx 2,38 \text{ \AA}^{-1}$ и $\beta \approx 1,94 \text{ \AA}^{-1}$, что соответствует достаточно глубокой локализации электронных состояний²⁰.

Используя выражение (45), получим оценку $k_{0q} \approx 6 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$ или $1,8 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$, соответствующие первому и второму значениям величины Δ .

Оценим теперь величину k_0 для реакции рекомбинации (18) по формуле (6). Для этого воспользуемся результатами, полученными выше при анализе температурной зависимости этой реакции: в области низких температур при частоте акцептирующей моды $\nu \approx 3,1 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ величина электронного матричного элемента $V_e \approx 2,93 \cdot 10^{-8} \text{ эВ}$, а в области высоких температур при частоте $\nu \approx 5,1 \cdot 10^{11} \text{ с}^{-1}$ величина $V_e \approx 1,87 \cdot 10^{-8} \text{ эВ}$. Согласно этим данным получим, что в первом случае $k_0 \approx 6,4 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$, а во втором — $k_0 \approx 1,6 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$. Отсюда следует, что по порядку величины значения k_{0q} и k_0 совпадают. Отметим также, что частоты фононов и акцептирующей моды попадают примерно в один диапазон, 10^{11} – 10^{12} с^{-1} .

Такое совпадение, безусловно, может оказаться случайным. Действительно, наиболее существенную неточность в оценку может внести некорректное определение значения расстояния R между центрами локализации. Например, если в качестве такового взять расстояние edge-to-edge между молекулой хинона и димером, равное примерно $23 \text{ \AA}$, то величина k_{0q} возрастет на четыре порядка. Другим источником возможной ошибки до двух порядков величины является неопре-

¹⁹При рассмотрении одного элементарного акта переноса электрона между конкретными центрами членом $\cos(\vec{q}\vec{R})$ пренебрегать нельзя.

²⁰Отметим, что параметр $\beta_Q \approx 1,5 \text{ \AA}^{-1}$ соответствует белковым средам, а $\beta_D \approx 2,4 \text{ \AA}^{-1}$ близко к значению β для вакуума [Farid, 1993].

деленность значения константы деформационного потенциала. Тем не менее полученное совпадение по порядку величины констант скоростей k_{q0} и k_0 , а также частот нормальных колебаний могут косвенно свидетельствовать об адекватности данного подхода к анализу туннельного переноса электрона в молекулярных биосистемах, имеющих достаточно жесткую структуру.

Однако наиболее существенным в данном подходе является то, что перенос электрона осуществляется между центрами электронной локализации, каждый из которых может *реально*, а не виртуально, акцептировать электрон. Это означает, что каждый центр должен иметь достаточно глубокую потенциальную яму для локализации электрона. Даже в случае слабого взаимодействия такие центры образуют связанную систему, в которой состояния отдельных центров перемешиваются. Именно это обстоятельство позволяет электрону как квантовой частице «находить» нужное направление среди множества виртуальных возможностей.

Прыжковая проводимость D^- -типа. Теория механизма прыжковой проводимости, когда элементарный акт переноса электрона между центрами локализации происходит по схеме (32), до сих пор остается практически неразработанной. Применительно к полупроводникам такой тип проводимости был рассмотрен [Nishimura, 1965], однако ее механизм описан в рамках зонной модели, что неприменимо к биосистемам.

Основные вопросы

Электронный матричный элемент. Очевидно, что элементарный акт переноса электрона между донором и акцептором в схеме (32), также как и в схеме (33), осуществляется по туннельному механизму. В этом отношении эти схемы эквивалентны. Отличие этих схем обуславливается различным состоянием акцепторов. Если молекулы доноров в обоих случаях находятся в состоянии анион-радикала D^- , то состояния молекул акцептора различаются: в случае (33) акцептор является катионом A^+ , а в случае (32) — нейтральной молекулой A . Однако для описания процесса переноса электрона это различие не является принципиальным. Действительно, энергия и волновые функции этих состояний будут различаться, но принципиально важным здесь является не это, а то, что в обоих состояниях молекула акцептора способна связать электрон. Другими словами, в обоих случаях на молекуле акцептора есть «место» для локализации электрона. Следовательно, для описания элементарного акта туннелирования электрона между соответствующими центрами локализации можно воспользоваться методом, развитым в работе [Miller, 1960]. Применение этого метода к описанию переноса электрона в биосистемах должно послужить достижению основной цели — решению (или, по крайней мере, приближение к решению) проблемы электронного матричного элемента. Для приближения к этой цели предварительно необходимо решить три задачи.

Первой задачей является построение адекватной модели, описывающей квантовые состояния центра электронной локализации. В биосистемах такими центрами являются сложные молекулы, как правило, небелковой природы (кофакторы), например, молекулы хинонов или молекулы хлорофилла различных типов. Понятно, что ни о каком точном описании таких многочастичных квантовых систем речь идти не может. Однако учет того, что в биосистемах имеет место именно межмолекулярный перенос электрона, может существенно упростить решение этой задачи²¹. Действительно, так как расстояние между кофакторами, как правило, существенно превышает характерную длину химической связи, то перекрытие волновых функций кофакторов, определяющее вероятность переноса электрона, будет зависеть только от характера асимптотического затухания этих волновых функций. Следовательно, основной задачей здесь является установление асимптотического поведения волновых функций локализованных состояний кофакторов.

Второй задачей, согласно методу [Miller, 1960], является построение модели связанного состояния системы донор+акцептор. Для этого необходимо определить взаимодействие этих центров. Если в случае схемы (33) в качестве такового можно принять кулоновское взаимодействие электрона и дырки, то в случае схемы (32) природа взаимодействия менее очевидна.

Третьей задачей является нахождение оператора возмущения, под действием которого связанная система донор+акцептор переходит из одного состояния Ψ_1 в другое Ψ_2 , при этом происходит перенос электрона от одного центра локализации к другому. Природа такого возмущения также не очевидна. Здесь можно предложить различные подходы, одним из которых является рассмотрение электронно-колебательных взаимодействий.

Параметр β и свойства РЦ. Решение (пусть предварительное) проблемы электронного матричного элемента позволит более предметно подойти к рассмотрению интересных особенностей протекания реакций переноса электрона как в фотосинтетических реакционных центрах, так и в других молекулярных биосистемах. Ряд таких особенностей был обозначен выше.

Одним из нетривиальных вопросов является вопрос о природе универсальности параметра β в экспоненциальной зависимости константы скорости электронного переноса от расстояния между кофакторами. Ответ на этот вопрос может оказаться интересным не только для биологических, но и для более широкого класса процессов электронного обмена в различных средах.

Проблема «свет/темнота». Следующие два вопроса непосредственно связаны с особенностями функционирования бактериальных фотосинтетических центров.

²¹Напомним, что в стандартной теории перенос электрона рассматривается как внутримолекулярный безызлучательный процесс.

Большой интерес вызывает проблема, которую условно можно назвать «свет/темнота». Речь идет об адекватном описании температурной зависимости константы скорости реакции рекомбинации (18) при замораживании образцов РЦ в темноте и на активирующем свете (см. рис. 4–7). До настоящего времени этот феномен не получил ясной физической интерпретации.

Еще один вопрос также связан с температурной зависимостью константы скорости реакции (18), но в так называемой высокотемпературной области (от 30 до 60 °С, см. рис. 8 и 9). Для РЦ в растворе (для изолированных РЦ) в этой области температур константа скорости увеличивается, а для РЦ в хроматофорах — не изменяется.

Неравновесные состояния. Еще один вопрос связан с неоднозначностью определения численного значения свободной энергии реакций электронного переноса в биосистемах.

Как было подчеркнуто выше, существенным аспектом функционирования биосистем и, в частности, фотосинтетических РЦ является локальная неравновесность их состояния. В связи с этим важное значение имеет исследование различных релаксационных механизмов, сопутствующих электронному переносу и которые переводят молекулярную систему в равновесное состояние. Необходимо также провести классификацию и временную иерархию таких релаксационных процессов.

Литература

- Бонч-Бруевич В. Л., Калашников С. Г. Физика полупроводников. — М.: Наука, 1977. — 672 с.
- Генри Б., Каша М. Безызлучательные молекулярные электронные переходы // УФН. — 1972. — Т. 108, № 1. — С. 113–141.
- Коварский В. А. Квантовые процессы в биологических молекулах. Ферментативный катализ // УФН. — 1999. — Т. 169, № 8. — С. 889–908.
- Красильников П. М., Нокс П. П., Лукашев Е. П., Пашенко В. З., Чурбанова И. Ю., Шайтан К. В., Рубин А. Б. Ускорение реакции рекомбинации фотоокисленного бактериохлорофилла и восстановленного первичного хинона в реакционных центрах *Rb. Sphaeroides* при $T > 300$ К // ДАН. — 2000. — Т. 375, № 6. — С. 828–830.
- Лонге-Хиггинс Г. Современные достижения теории энергетических уровней молекул // УФН. — 1964. — Т. 83, № 1. — С. 137–170.
- Пашенко В. З., Корватовский Б. Н., Логунов С. Л., Васильев С. С., Кононенко А. А., Нокс П. П., Захарова Н. И., Гришанова Н. П., Рубин А. Б. Эффективность пикосекундного переноса электрона при фотосинтезе зависит от состояния водородных связей в реакционном центре // ДАН СССР. — 1986. — Т. 290, № 3. — С. 742–747.
- Пекар С. И. О влиянии деформации решеток электронами на оптические и электрические свойства кристаллов // УФН. — 1953. — Т. 50, № 2. — С. 197–252.

- Перлин Ю. Е. Современные методы теории многофононных процессов // УФН. — 1963. — Т. 80, № 4. — С. 553–595.
- Слэтер Дж. Электронная структура молекул. — М.: Мир, 1965. — 587 с.
- Франк-Каменецкий М. Д., Лукашин А. В. Электронно-колебательные взаимодействия в многоатомных молекулах // УФН. — 1975. — Т. 116, № 2. — С. 193–229.
- Шкловский Б. И., Эфрос А. Л. Теория протекания и проводимость сильно неоднородных сред // УФН. — Т. 117, № 3. — С. 401–435.
- Шкловский Б. И., Эфрос А. Л. Электронные свойства легированных полупроводников. — М.: Наука, 1979. — 416 с.
- Anderson P. W. Antiferromagnetism. Theory of superexchange interaction // Phys. Rev. — 1950. — Vol. 79. — P. 350–356.
- Beratan D. N., Onuchic J. N., Winkler J. R., Gray H. B. Electron-tunneling pathways in proteins // Science. — 1992. — Vol. 258. — P. 1740–1741.
- Blomberg M. R. A., Siegbahn P. E. M., Babcock G. T. Modeling Electron Transfer in Biochemistry: A Quantum Chemical Study of Charge Separation in Rhodobacter sphaeroides and Photosystem II // J. Am. Chem. Soc. — 1998. — Vol. 120. — P. 8812–8824.
- Born M., Oppenheimer J. R. Zur Quantentheorie der Molekeln // Ann. Phys. — 1927. — Vol. 84. — P. 457–484.
- Daizadeh I., Medvedev E. S., Stuchebrukhov A. A. Effect of protein dynamics on biological electron transfer // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — Vol. 94. — P. 3703–3708.
- DeVault D. Quantum mechanical tunneling in biological systems // Quarterly Rev. Biophys. — 1980. — Vol. 13, No. 4. — P. 387–564.
- Dutton P. L., Mosser C. C. Quantum biomechanics of long-range electron transfer in protein: Hydrogen bonds and reorganization energies // PNAS. — 1994. — Vol. 91. — P. 10247–10250.
- Ermiler U., Fritzsche G., Michel H. Structure of the photosynthetic reaction centre from Rhodobacter sphaeroides at 2,65 angstroms resolution: cofactors and protein — cofactor interactions // Structure. — 1994. — Vol. 2. — P. 925–936.
- Farid R. S., Moser C. C., Dutton P. L. Electron transfer in proteins // Current Opinion in Structural Biology. — 1993. — Vol. 3. — P. 225–233.
- Frank J. Elementary processes of photochemical reactions // Trans. Farad. Soc. — 1926. — Vol. 21. — P. 536–542.
- Condon E. A theory of intensity distribution in band systems // Phys. Rev. — 1926. — Vol. 28. — P. 1182–1201.
- Fritzsche G., Kampmann L., Kapaun G., Michel H. Water cluster in the reaction centre of Rhodobacter sphaeroides // Photosynthesis Research. — 1988. — Vol. 55. — P. 127–132.
- Gray H. B., Malmstrom B. G. Long-range electron transfer in multisite metalloproteins // Biochem. — 1989. — Vol. 28, No. 19. — P. 7499–7505.
- Gray H. B., Winkler J. R. Photoinduced electron transfer in ruthenium-modified cytochrome c // Pure and Appl. Chem. — 1992. — Vol. 84, No. 9. — P. 1257–1262.
- Gray H. B., Winkler J. R. Electron transfer in proteins // Annual Rev. — 1996. — Vol. 65. — P. 537–561.

- Gray H. B., Winkler J. R. Long-range electron transfer // PNAS. — 2005. — Vol. 102, No. 10. — P. 3534–3539.
- Haffa A. L. M., Lin S., Katilius E., Williams J. C., Taguchi A. K. W., Allen J. P., Woodburry N. W. The dependence of the initial electron-transfer rate on driving force in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers // J. Phys. Chem. B. — 2002. — Vol. 106. — P. 7376–7384.
- Hopfield J. J. Electron transfer between biological molecules by thermally activated tunneling // PNAS. — 1974. — Vol. 71, No. 9. — P. 3640–3644.
- Huber H., Meyer M., Scheer H., Zinth W., Wachtveitl J. Temperature dependence of the primary electron transfer reaction in pigment-modified bacterial reaction centers // Photosynthesis Research. — 1998. — Vol. 55. — P. 153–162.
- Huppman P., Arlt T., Penzkofer H., Schmidt S., Bibikova M., Dohse B., Oesterhelt D., Wachtveitl J., Zinth W. Kinetics, energetics, and electronic coupling of the primary electron transfer reactions in mutated reaction centers *Blastochloris viridis* // Biophys. J. — 2002. — Vol. 82. — P. 3186–3197.
- Jortner J. Dynamics of electron transfer in bacterial photosynthesis // Biochim. Biophys. Acta. — 1980. — Vol. 594. — P. 193–230.
- Kalman L., Maroti P. Conformation-activated protonation in reaction centers of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* // Biochemistry. — 1997. — Vol. 36. — P. 15269–15276.
- Krasilnikov P. M., Mamonov P. A., Knox P. P., Paschenko V. Z., Rubin A. B. The influence of hydrogen bonds on electron transfer rate in photosynthetic RCs // Biochim. Biophys. Acta. — 2007. — Vol. 1767. — P. 541–549.
- Krasilnikov P. M., Knox P. P., Rubin A. B. Relaxation mechanism of molecular systems containing hydrogen bonds and free energy temperature dependence of reaction of charges recombination within *Rhodobacter sphaeroides* RC // Photochem. Photobiol. Sci. — 2009. — Vol. 8. — P. 181–195.
- Lauterwasser C., Finkle U., Scheer H., Zinth W. Temperature dependence of the primary electron transfer in photosynthetic reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* // Chem. Phys. Lett. — 1991. — Vol. 183. — P. 471–477.
- Lin X., Murchison H. A., Nagarajan V., Parson W. W., Allen J. P., Williams J. C. Specific alteration of the oxidation potential of the electron donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 10265–10269.
- Makita H., Hastings G. Inverted-region electron transfer as a mechanism for enhancing photosynthetic solar energy conversion efficiency // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2017. — Vol. 114, No. 5. — P. 9267–9272.
- Mayo S. L., Ellis W. R. Jr., Crutchley R. J., Gray H. B. Long-range electron transfer in Heme proteins // Science. — 1986. — Vol. 233. — P. 948–952.
- Maradudin A. A., Montroll E. W., Weiss G. H., Ipatova I. P. Theory of Lattice Dynamics in the Harmonic Approximation. — NY: Academic, 1971.
- Marcus R. A., Sutin N. Electron transfer in chemistry and biology // Biochim. Biophys. Acta. — 1985. — Vol. 811. — P. 265–322.

- Marcus R. A. On the theory oxidation-reduction reactions involving electron transfer I // J. Chem. Phys. — 1956. — Vol. 24, No. 5. — P. 966–978.
- McConnel H. M. Intramolecular Charge Transfer in Aromatic Free Radicals // J. Chem. Phys. — 1961. — Vol. 35, No. 2. — P. 508–515.
- McMahon B. H., Moller J. D., Wraight C. A., Nienhaus G. U. Electron transfer and protein dynamics in the photosynthetic reaction center // Biophys. J. — 1998. — Vol. 74. — P. 2567–2587.
- Miller A., Abrahams E. Impurity conduction at low concentration // Phys. Rev. — 1960. — Vol. 120, No. 3. — P. 745–755.
- Miyshita O., Okamura M. Y., Onuchic J. N. Interprotein electron transfer from cytochrome c_2 to photosynthetic reaction center: Tunneling across an aqueous interface // PNAS. — 2005. — Vol. 102, No. 10. — P. 3558–3563.
- Moser C. C., Dutton P. L. Engineering protein structure for electron transfer function in photosynthetic reaction centers // BBA. — 1992. — Vol. 1101. — P. 171–176.
- Nazmutdinov R. R., Bronshtein M. D., Zinkicheva T. T., Chi Q., Zhang J., Ulstrup J. Modeling and computations of the intramolecular electron transfer process in the two-heme protein cytochrome c_4 // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2012. — Vol. 14. — P. 5953–5965.
- Nishimura H. Impurity conduction in the intermediate concentration region // Phys. Rev. — 1965. — Vol. 138, No. 3A. — P. 815–821.
- Ortega J. M., Mathis P., Williams G. C., Allen J. P. Temperature dependence of the reorganization energy for charge recombination in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* // Biochemistry. — 1996. — Vol. 35. — P. 3354–3361.
- Paddock M. L., Flores M., Isaacson R., Chang C., Abresch E. C., Okamura M. Y. ENDOR spectroscopy reveals light induced movement of the H-bond from Ser-L223 upon forming the semiquinone in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* // Biochemistry. — 2007. — Vol. 46. — P. 8234–8243.
- Paschenko V. Z., Knox P. P., Chamorovsky S. K., Krasilnikov P. M., Mamedov M. D., Semenov A. Y., Zakharova N. I., Renger G., Rubin A. B. Effect of D_2O and cryosolvents on the redox properties of bacteriochlorophyll dimer and electron transfer processes in *Rhodobacter sphaeroides* reaction center // Bioelectrochemistry. — 2001. — Vol. 53. — P. 233–241.
- Stowell M. H. B., McPhillips T. M., Rees D. C., Soltis S. M., Abresch E., Feher G. Light-induced structural changes in photosynthetic reaction center: implications for mechanism of electron-proton transfer // Science. — 1997. — Vol. 276. — P. 812–816.
- Tang C.-K., Williams J. C., Taguchi A. K. W., Allen J. P., Woodbury N. W. Charge recombination reaction rate constant in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers is independent of midpoint potential // Biochemistry. — 1999. — Vol. 38. — P. 8794–8799.
- Winkler J. R., Gray H. B. Electron transfer in ruthenium-modified protein // Chem. Rev. — 1992. — Vol. 92. — P. 369–379.
- Winkler J. R., Gray H. B. Long-range electron tunneling // J. Am. Chem. Soc. — 2014. — Vol. 136. — P. 2930–2939.

The theory of electron transfer in biosystems: Problems and perspectives

P. M. Krasilnikov

Faculty of Biology, Moscow State University,
119234 Russia, Moscow, Leninskie Gory, 1, building 12
E-mail: krapam@mail.ru

A brief review of the Franck–Condon factor theory which is the basis of the theory of electron transfer in molecular biosystems is presented. An example of an electron transfer reaction in a photosynthetic reaction center of purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* is considered and a detailed analysis of the temperature and free energy rate constant dependence is presented. The results of this analysis unambiguously indicate that the concepts of this theory are insufficient for an adequate interpretation of the experimental data. The discussion of the main issues related to both the problem of the electronic matrix element and the problem of the influence of the medium on the electron transfer reaction rate is carried out. A brief overview of possible approaches to solving these problems is given. The implementation of these ideas can significantly help in understanding the mechanisms of electron transfer in molecular biosystems.

Keywords: electron transfer, electronic matrix element, bacteria *Rhodobacter sphaeroides*, quantum bound states, electron-phonon interactions.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕНАТУРАЦИИ ДНК ПРИ ПОМОЩИ МОДИФИЦИРОВАННОЙ МОДЕЛИ ПЕЙРАРДА– БИШОПА–ДОКСУА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ: ВЛИЯНИЕ ОГРАНИЧЕНИЙ НА ДОСТУПНЫЙ ОБЪЕМ, СРАВНЕНИЕ С МЕТОДОМ МОНТЕ-КАРЛО

И. В. Лихачев, В. Д. Лахно¹

Исследован фазовый переход дуплекса (PolyA/PolyT)₁₀₀ в денатурированное состояние в модели Пейрарда–Бишопа–Доксуа методами прямого молекулярно-динамического моделирования, проведено сравнение с методом Монте-Карло. Показано и объяснено качественное отличие в поведении моделей при введении радиуса обрезания.

Ключевые слова: одномерное моделирование ДНК, гомогенные цепочки нуклеотидов, столкновительный термостат.

1. Введение

Денатурация ДНК предшествует любой реакции, связанной с передачей генетической информации, поэтому условия, при которых молекула находится в комплементарном или открытом состоянии, очень важны для понимания этих процессов. Изучение процесса плавления ДНК играет важную роль для развития биоэлектроники, целью которой является создание устройств на основе ДНК: биочипов и микропроцессоров.

При моделировании молекулярной динамики (МД) биомакромолекул используются межатомные потенциалы, значения которых всегда ограничены в случае больших расстояний между атомами (Леннард-Джонс, Кулон, Морс и др. [1]). Статистическая сумма всегда расходится для ограниченных потенциалов. Это означает, что макромолекулы в равновесном состоянии должны находиться в денатурированном состоянии при сколь угодно низкой температуре. Однако на самом деле это не так, поскольку концентрация молекул в растворе конечна, что определяет характерный масштаб при расчетах статистической суммы.

¹ Институт математических проблем биологии РАН, филиал Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной математики им. М. В. Келдыша Российской академии наук», 142290 Московская область, г. Пущино, ул. проф. Виткевича, 1.
E-mail: ilya_lihachev@mail.ru

В работах [2, 3] нами было осуществлено моделирование плавления полинуклеотидной цепочки (PolyA/PolyT)₁₀₀. Доказано, что система может пребывать в двух состояниях — связанном и денатурированном — при одной и той же температуре. Этот вывод был основан исключительно на данных МД-моделирования. Проводились эксперименты по линейному нагреванию молекулы ДНК. Скорость нагрева была настолько низкой (для вычислительного эксперимента), что считалось, что система в каждый момент времени пребывает в квазистационарном состоянии. Об этом свидетельствовали монотонные зависимости энергетических характеристик от времени.

При таком моделировании всегда остается вопрос, будет ли состояние, в котором находится система во время численного эксперимента, равновесным? Равновесное состояние достигается двумя способами. Во-первых, можно добавить стенки в потенциал Морзе — т. е. модифицировать модель. Во-вторых, брать ансамбль систем. Был выбран путь модификации модели ПБД для расчета равновесного состояния — были установлены потенциальные стенки, чтобы не получить слишком больших смещений.

В настоящей работе проводится исследование системы (PolyA/PolyT)_N в рамках модифицированной модели ПБД (мПБД) с измененным потенциалом. В классический потенциал Морзе была добавлена правая потенциальная стенка, чтобы цепочки ДНК не смогли уйти на бесконечно большое расстояние друг от друга. Сделать это можно двумя способами: 1) кибернетически при помощи отталкивающей стенки; 2) физически при помощи добавления слагаемого в потенциал. Был реализован второй подход для обеспечения непрерывности производной потенциала. В качестве дополнительного потенциала была выбрана отталкивающая часть потенциала Леннард-Джонса, который уходит на бесконечность, когда значение координаты стремится к определенному значению (радиусу обрезания) слева:

$$U_{\text{LJ}}(r) = \varepsilon \left[\left(\frac{R_{\text{min}}}{R_{\text{wall}} - r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\text{min}}}{R_{\text{wall}} - r} \right)^6 + 1 \right], \quad (1)$$

где ε — константа, r — значение координаты, R_{wall} — положение стенки, R_{min} — радиус обрезания.

Формально справа от радиуса обрезания значение функции существует. Однако в процессе моделирования ни одна частица (обозначающая нуклеотидную пару) не может перейти через подобный потенциальный барьер ввиду того, что сила, сдерживающая частицу, также стремится к бесконечности. Заметим, что при выборе слишком большого шага численного интегрирования и/или высоких температур частица все же может уйти в область другой гиперболы. Однако такой случай приравнивается к ошибке.

Для исследования проблемы был также применен метод моделирования Монте-Карло (МК) [4]. Для более четкого сравнения результатов исследовалась та же одномерная модель ПБД с тем же радиусом обрезания. В методе моделирования Монте-Карло нет необходимости вводить потенциал, обозначающий стенку. Вместо этого метод просто не рассматривает (не генерирует) системы, находящиеся за потенциальной стенкой.

Физически потенциальную стенку можно рассматривать как возможность одной цепочки молекулы ДНК найти в растворе свое комплементарное дополнение. Предполагается, что две цепочки будут находиться на расстоянии двух радиусов экранирования.

Показано, что кривые теплоемкости, полученные при моделировании методом молекулярной динамики совпадают с полученными по методу Монте-Карло ниже и выше температуры плавления.

Важным является вопрос, когда имеет место соответствие между методами МД и МК? Четкого ответа на этот вопрос не существует. Одна из возможных точек зрения состоит в том, что эти два метода должны полностью совпадать. В данной работе показано, что это не всегда так.

Если мы хотим моделировать реальные системы, то должны быть реальные величины и времена. При моделировании процесса плавления обоими методами нами вводятся потенциальные стенки. Проведено также дополнительное моделирование методом МД с исчезающим потенциалом — потенциал Морзе полностью зануляется в том случае, если вся цепочка целиком раскрылась. Этот алгоритм имеет физическую интерпретацию — как только молекула ДНК денатурирует, то две цепочки не смогут найти друг друга в растворе за рассматриваемые времена.

Плавление (денатурация) ДНК [1] происходит в результате усиления температурных флуктуаций. В этом случае обе цепи удаляются друг от друга, разрывая водородные связи. Сами по себе цепи остаются неразрывными. Популярная динамическая модель ДНК, описывающая такое поведение дуплекса, — модель ПБД — моделирует как поведение разрыва водородных связей (модель Пейрарда–Бишопа [5]) с использованием потенциала Морзе, так и неразделимость каждой цепи благодаря добавке Доксуа [6, 7] и стала популярной [8]. Термодинамическое поведение системы в этой модели хорошо согласуется с экспериментальными данными. По модели ПБД рассчитана температура плавления методом трансфер-интеграла (ТИ) как 361,5 К [7]. Эта модель также используется для моделирования пузырей (баблов) [9]. Природа образования пузырей и пика теплоемкости одинакова и состоит в разрушении водородных связей.

В работе подробно исследуется зависимость теплоемкости от количества реализаций и сходимость максимальной теплоемкости к плавному пику.

2. Результаты и методы

2.1. Метод моделирования молекулярной динамики

В модели ПБД цепочка нуклеотидов ДНК представлена как система материальных точек в одномерном пространстве, движение которых описывается классическими уравнениями движения:

$$m_i \frac{d^2 x_i}{dt^2} = - \frac{dU}{dx_i},$$

где $i = 1, \dots, N$; N — это количество частиц (нуклеотидных пар); m_i — приведенная масса частицы; x_i — координата (отклонение от положения равновесия между нуклеотидами); U — потенциал; t — время.

Согласно модели ПБД, каждая частица находится в потенциальном поле:

$$U = U_{\text{Morze}} + W.$$

В модифицированной модели ПБД (мПБД) взаимодействие нуклеотидов в паре описывается ограниченным потенциалом Морзе:

$$U_{\text{Morze}}(x_i) = \begin{cases} D(1 - e^{-\alpha x_i})^2 & \text{при } x_i < R_{\text{wall}} - R_{\text{min}}, \\ D(1 - e^{-\alpha x_i})^2 + U_{\text{LJ}} & \text{при } x_i > R_{\text{wall}} - R_{\text{min}}, \end{cases}$$

$$U_{\text{LJ}}(x_i) = \varepsilon \left[\left(\frac{R_{\text{min}}}{R_{\text{wall}} - x_i} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{\text{min}}}{R_{\text{wall}} - x_i} \right)^6 + 1 \right].$$

Взаимодействие соседних пар имеет вид:

$$W(x_i, x_{i-1}) = \frac{k}{2} (1 + \rho e^{-a(x_i + x_{i-1})}) (x_i - x_{i-1})^2.$$

Рассматривается цепочка из 100 АТ-пар оснований со следующими параметрами: $D = k = 0,92$ ккал/моль, $\alpha = 4,45 \text{ \AA}^{-1}$, $a = 0,35 \text{ \AA}^{-1}$, $\rho = 0,5$, $\varepsilon = 1$, $R_{\text{min}} = 1 \text{ \AA}$, $R_{\text{wall}} = 10, 25, 50, 100, 1000 \text{ \AA}$, $m = 300$ а.е.м. согласно [7].

Для интегрирования уравнений движения модели мПБД будем использовать скоростной алгоритм Верле [10].

Температура учитывается в модели так же, как и в методе полноатомной молекулярной динамики [11], с использованием столкновительного термостата, где среда, в которой находится искомая система, моделируется точечными виртуальными частицами, демонстрирующими распределение Максвелла по скоростям [10, 11]. Распределение скоростей соответствует определенной темпера-

туре T_{ref} . В случайные моменты времени виртуальные частицы среды упруго сталкиваются с частицами системы. Уравнения движения имеют вид:

$$m_i \frac{dv_i}{dt} = F_i + \sum_k f_{ik} \cdot \delta(t - t_{ik}),$$

$$F_i = -\frac{dU}{dx_i}.$$

Здесь $\delta(t)$ — дельта-функция Дирака, f_{ik} — стохастический источник силы, приводящий к скачкам скорости i -го атома в случайные моменты времени t_{ik} . Величина скачка скорости вычисляется по закону сохранения импульса в результате столкновения двух точечных частиц, которые до столкновения имели скорости v (для моделируемой частицы) и v_0 (для виртуальной частицы):

$$\Delta v(t) = \frac{2m_0}{m_0 + m} (v_0(t) - v(t)).$$

Здесь m — масса моделируемой частицы, m_0 — масса виртуальной частицы. Скорости v_0 выбираются из распределения Максвелла.

Столкновения происходят в соответствии с пуассоновским процессом, который определяется единственным параметром λ_0 — среднее значение столкновений атома с виртуальными частицами за единицу времени, т. е. частота столкновений.

Броуновская динамика является частным случаем столкновительной динамики (столкновительный термостат), когда масса виртуальных частиц стремится к нулю, а частота столкновений стремится к бесконечности. Этот вывод был сделан в [10, 11]. В этом подходе аналог трения (вязкости среды) — произведение массы виртуальных частиц на частоту столкновений.

В процессе моделирования температура столкновительного термостата T_{current} изменялась линейно с постоянной скоростью: $V_t = 0,1$ К/нс, $T_{\text{current}} = T_{\text{initial}} + V_t \cdot t$; что иллюстрирует график зависимости потенциальной, кинетической и полной энергии от времени (см. рис. 1).

В отличие от работ [2, 3], начальная температура была выбрана 0 К для проверки гипотезы от том, что теплоемкость вблизи 0 К равна универсальной газовой постоянной R . Кроме того, теплоемкость в начале вычислительного эксперимента приблизительно равна теплоемкости системы после денатурации. Фактически, мы не можем использовать классическое описание ДНК для правильного поведения при низких температурах, которое требует квантово-механического описания. Но формально мы можем исследовать нашу модель при низких температурах в целях еще одной проверки правильности расчетов.

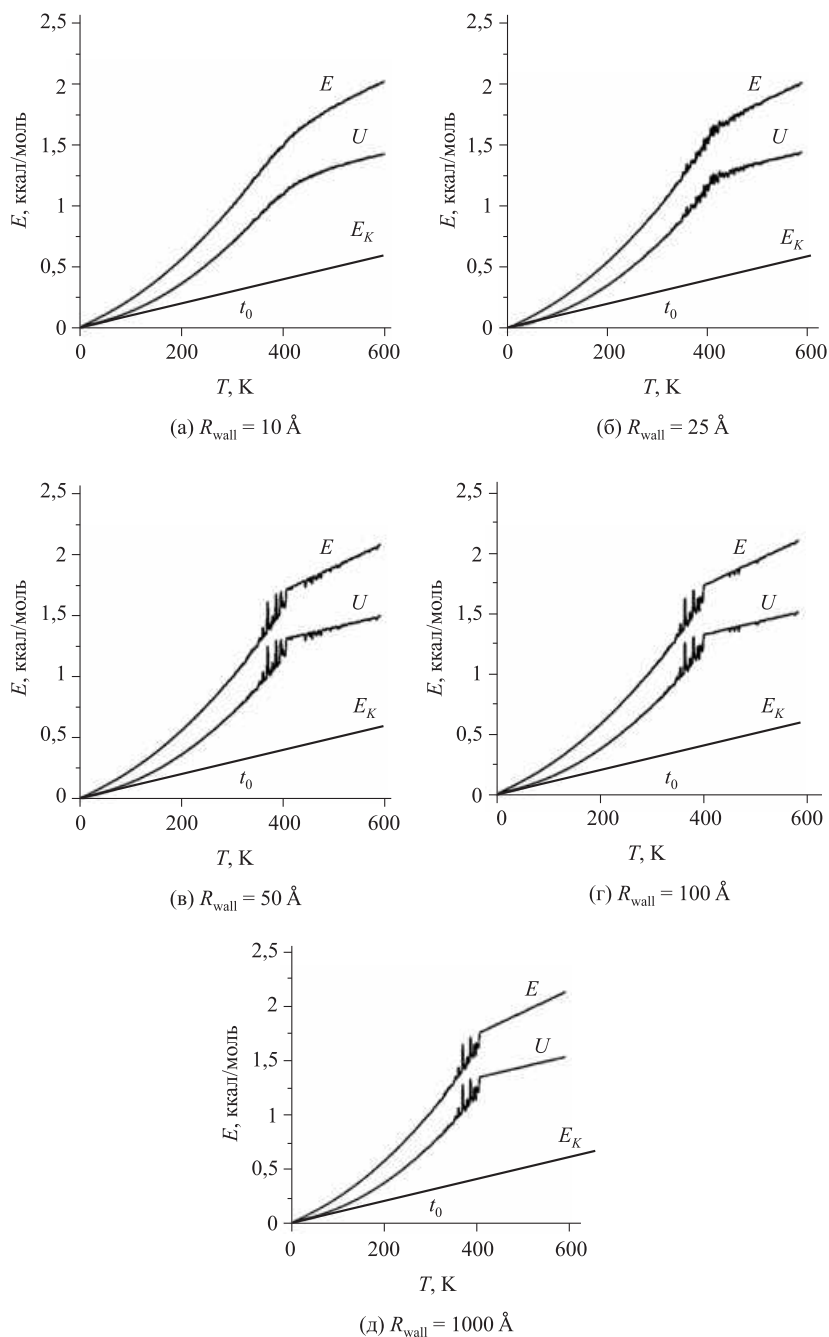


Рис. 1. Зависимость от времени полной (E), потенциальной (U) и кинетической (E_K) энергии для одной реализации в численном эксперименте при линейном увеличении температуры термостата $T_{\text{ref}} = 0,1 \text{ K/нс} \cdot t$ с различными значениями радиуса обрезания R_{wall} (10 (а), 25 (б), 50 (в), 100 (г), 1000 (д) $\text{\AA}$)

Представляется важным вопрос, каким образом влияет значение радиуса экранирования (R_{wall}) на поведение системы. Для ответа на этот вопрос нами было проведено линейное нагревание при различных параметрах R_{wall} модифицированного потенциала Морзе. Для обеспечения статистической значимости кривых каждый вычислительный эксперимент был повторен 512 раз при различных последовательностях датчика случайных чисел. Как показано в работе [2], именно 512 реализаций достаточно для обеспечения гладкости кривых и отсутствия стремления пика к раздвоению.

На рисунке 2 приведены кривые денатурации ДНК, т. е. зависимости теплоемкости от температуры, для следующих параметров радиуса экранирования: 10, 25, 50, 100 Å.

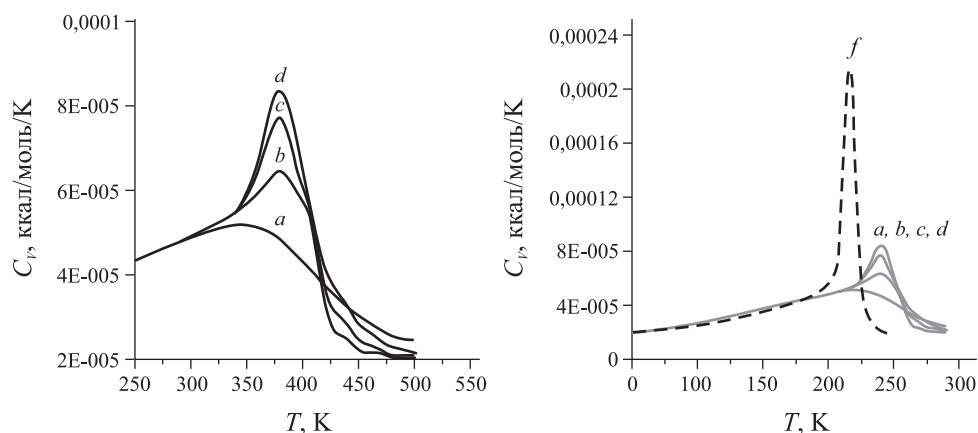


Рис. 2. Денатурация ДНК при различных значениях радиуса экранирования: 10 (а), 25 (б), 50 (с) и 100 (д) Å, сравнение с методом Монте-Карло (f)

Полученные результаты приводят к следующим выводам.

- При увеличении радиуса экранирования пик теплоемкости смещается вверх и становится уже, т. е. стремится к данным, полученным методом моделирования Монте-Карло [4].
- До области пика все графики ведут себя одинаково. Это объясняется существованием системы в потенциальной яме потенциала Морзе (в данном контексте нет разницы выбора модифицированного потенциала Морзе, либо оригинального).
- Начало и конец расчетов выходят на универсальную газовую постоянную. Это подтверждает корректность вычислений.
- Поведение системы при значениях радиуса обрезания 100 и 1000 Å практически одинаково (на рисунке не приводится). Эти значения можно рассматривать как бесконечно большие, при которых модифицированный потен-

циал Морзе стремится к оригинальному потенциалу. При данных температурах система не успевает дойти до стенки модифицированного потенциала Морзе достаточное количество раз, чтобы это сказалось на кривой плавления.

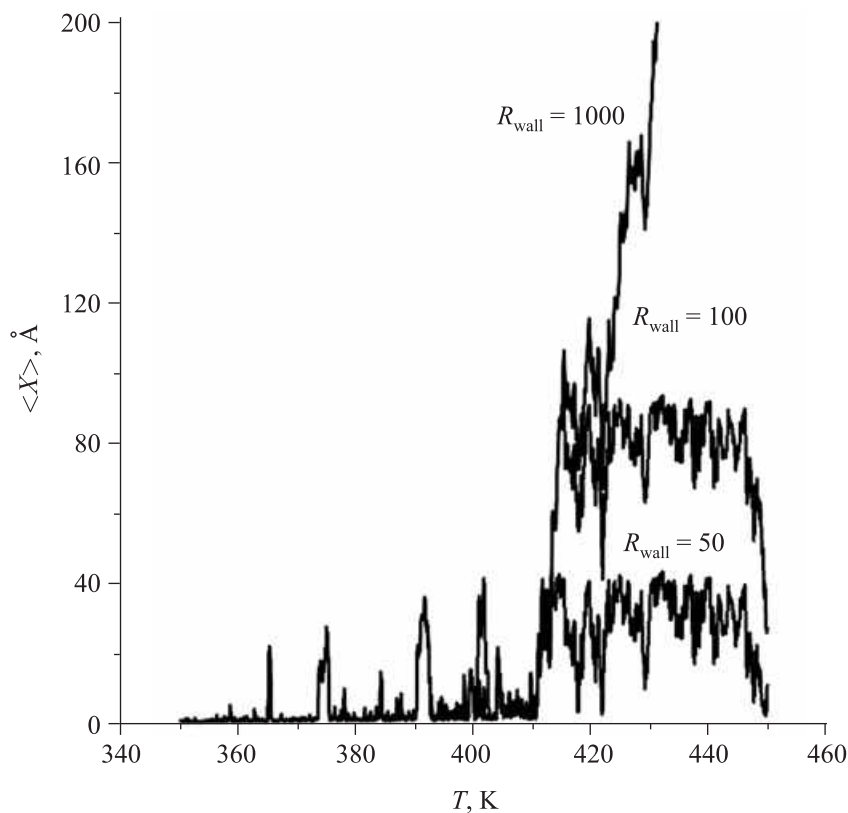


Рис. 3. Зависимость средней координаты от температуры при значениях радиуса обреза 50, 100 и 1000 Å

Зависимость полной, потенциальной и кинетической энергий от времени, представленная на рис. 1, описывает переход от квазигармонического режима к денатурированному. Время t_0 соответствует температуре термостата $T_{\text{ref}} = 0,1 \text{ K/нс} \cdot t_0$. Усреднение этих времен по реализациям дает температуру перехода (см. рис. 2).

Фактически рис. 1 описывает запрещенную зону, порядок величины которой равен $k_B T$, где T — температура, соответствующая времени начала скачка t_0 . Он отделяет денатурированное состояние (справа от области перехода) от неденатурированного (слева от области перехода). В разных реализациях скачок потенциальной энергии происходит в разное время, так как внешняя сила (термо-

стат) действует случайным образом. Ранний переход демонстрирует большую энергетическую щель, поздний переход — меньшую. Наличие такого зазора, как указывалось выше, вызвано расхождением статистической суммы для ограниченных потенциалов, что представляет вычислительные трудности для описания процесса плавления.

Изучение характера плавления ДНК для одной реализации (см. рис. 1 и 3) по зависимостям кинетической, потенциальной и полной энергий от температуры (равно как и времени, так как идет процесс линейного нагревания) дает дополнительные сведения о поведении системы.

Выбор начальной температуры равной нулю показывает равенство кинетической и потенциальной энергий в области низких температур, лишней раз доказывая, что потенциал Морзе в области низких температур стремится к гармоническому потенциалу.

Как было показано в работах [2, 3], система может существовать при одной и той же температуре как в нативном, так и в денатурированном состоянии. Однако при малых значениях радиуса обрезания этого не наблюдается. Видимо, данный эффект объясняется охлаждением системы, когда она «взбирается» на правую нишу потенциала Морзе. При малых значениях радиуса обрезания система успевает дойти до стенки потенциала, отразиться от нее и войти опять в колебательный режим. При больших температурах возможен колебательный режим между левой экспоненциальной и правой Леннард-Джонсовской стенками потенциала.

Поведение системы при радиусе обрезания 100 и 1000 Å все же незначительно отличается «шероховатостями» потенциальной и полной энергий на графиках после фазового перехода. Это объясняется отталкиваниями от правой стенки модифицированного потенциала Морзе и возвращением системы к левой экспоненциальной стенке оригинального потенциала.

В области, отличной от окрестности особой точки — точки плавления, — зависимости, вычисленные по методу МК и МД, совпадают. Это важный результат.

2.2. Влияние условий среды на процесс плавления

В расчетах мы имеем дело с неравновесной системой. Наши расчеты всегда будут лимитированы машинным временем — очевидно, чем быстрее нагревается система, тем меньшее количество времени остается на релаксацию. Бесконечно медленный нагрев означал бы равновесную ситуацию. Рисунок 4, показанный ниже, доказывает, что при понижении скорости нагрева температура плавления стремится к некоторому постоянному значению. Ввиду ограниченности вычислительных мощностей решено было взять скорость нагрева равной 0,1 К/нс.

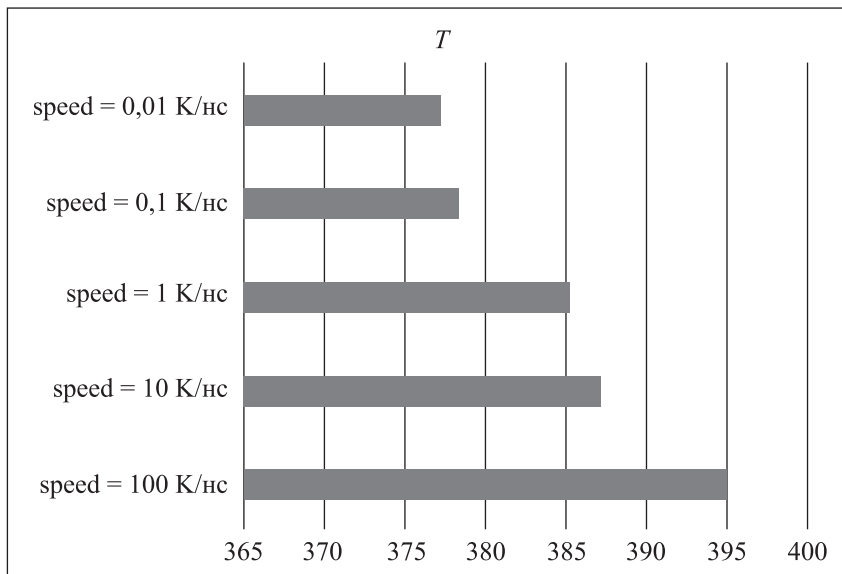


Рис. 4. Влияние скорости линейного нагрева на температуру фазового перехода в МД-экспериментах по линейному нагреванию

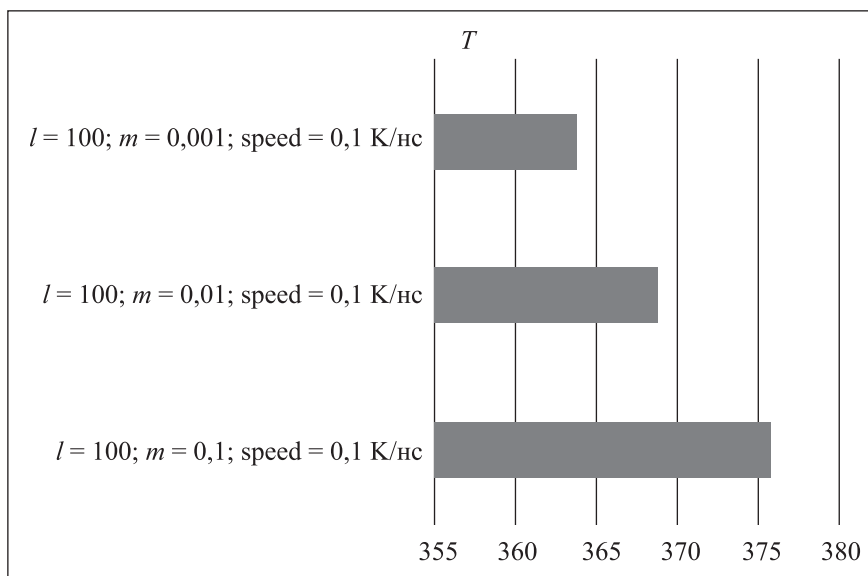


Рис. 5. Влияние параметров термостата на температуру фазового перехода в МД-экспериментах по линейному нагреванию

Согласно [10,11], в столкновительной среде произведение количества соударений виртуальных частиц на массу виртуальной частицы играет роль вяз-

кости среды. Рисунок 5 показывает характер такой зависимости. Чем меньше вязкость среды, тем ниже температура плавления.

Таблица 1. Сводная таблица зависимости температуры фазового перехода от скорости линейного нагревания и параметров виртуальной столкновительной среды

Эксперимент		T
Варьирование скорости линейного нагревания	$l = 10; m = 1; \text{speed} = 100 \text{ К/нс}$	395
	$l = 10; m = 1; \text{speed} = 10 \text{ К/нс}$	387,2
	$l = 10; m = 1; \text{speed} = 1 \text{ К/нс}$	385,3
	$l = 10; m = 1; \text{speed} = 0,1 \text{ К/нс}$	378,4
	$l = 10; m = 1; \text{speed} = 0,01 \text{ К/нс}$	377,3
Варьирование массы виртуальной частицы	$l = 10; m = 0,1; \text{speed} = 0,1 \text{ К/нс}$	376
	$l = 10; m = 0,01; \text{speed} = 0,1 \text{ К/нс}$	368,9
	$l = 10; m = 0,001; \text{speed} = 0,1 \text{ К/нс}$	363,9

speed — скорость линейного нагревания, К/нс, l — частота столкновений за 1 пс, m — масса виртуальной частицы, а.е.м.

2.3. Метод канонического ансамбля. Динамика плавления ДНК. Отключающийся потенциал Морзе

Метод линейного нагревания. В методике линейного нагревания есть свои плюсы и минусы. Предполагается, что скорость нагрева настолько мала, что в каждый момент времени система находится в квазиравновесном состоянии. Одна реализация такого подхода способна покрыть весь интересующий нас температурный диапазон. К сожалению, время момента перехода из нативного состояния в денатурированное выглядит при этом случайно. При наборе достаточной статистики (усреднению по 256–512 реализациям) мы выходим на плавную кривую.

Метод канонического ансамбля. Метод канонического ансамбля позволяет наблюдать систему в равновесном состоянии. Каждая реализация моделируется при своей постоянной температуре в течение всего эксперимента. Таких реализаций мы можем взять достаточное количество, чтобы покрыть интересующий нас диапазон температур в окрестности особой точки — точки плавления. В данном случае мы брали 512 реализаций, охватывая температурный диапазон от 320 до 352 К.

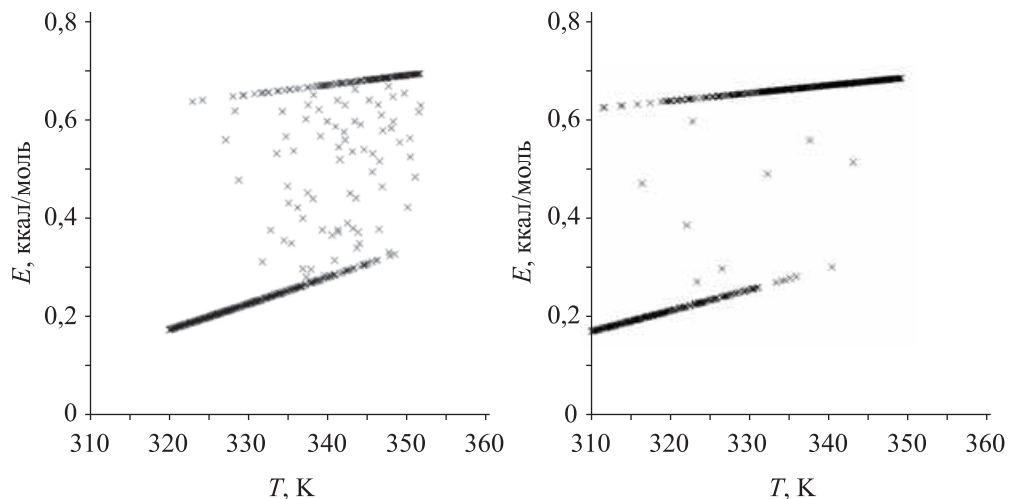


Рис. 6. Динамика плавления ДНК. Потенциальная энергия разных реализаций в начале (слева) и конце (справа) МД-эксперимента

Также был введен отключающийся потенциал Морзе: потенциал Морзе полностью зануляется в том случае, если вся цепочка целиком раскрылась.

Потенциальная энергия систем, характеризующих процесс плавления при различных температурах, показана на рисунке 6 в начале и конце вычислительного эксперимента. Видно, что с течением времени кривые разделяются на два класса: класс денатурированных образцов и нативных. При этом с течением времени денатурированных становится все больше.

Зададимся вопросом: случаен ли характер перехода из нативного состояния в денатурированное? Или он подчиняется какому-то закону?

Для ответа на этот вопрос будем подсчитывать количество переходов в денатурированное состояние из неденатурированного. Как показано на рисунке 7, характер плавления ДНК по модели мПБД в столкновительном термостате подобен закону радиоактивного распада.

Количественная сторона наблюдаемого явления зависит от выбора интервала температур, а также от параметров модели и среды. Более того, если указать диапазон температур вне окрестности точки плавления, то на данную зависимость невозможно будет выйти.

Если провести серию экспериментов при одинаковой температуре (340 K), то мы получим похожую зависимость. Это объясняется тем, что изначально в денатурированное состояние переходит определенный процент из реализаций. Затем часть от оставшихся и т. д. Численное значение этого процента зависит от температуры: чем она выше, тем процент перехода в денатурированное состояние будет выше.

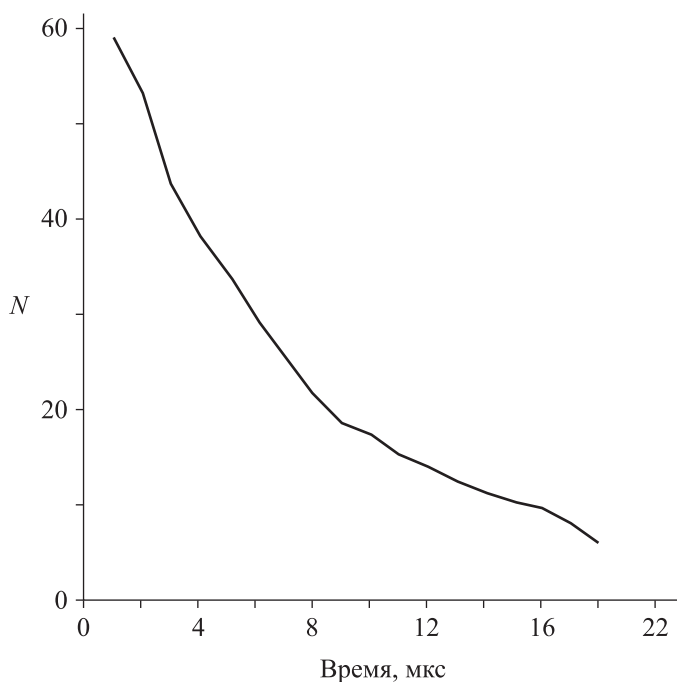


Рис. 7. Количество переходов в денатурированное состояние от длительности эксперимента в серии экспериментов одинаковой температуры (340 K)

3. Обсуждение

В работах [6, 12, 13], в отличие от рис. 2 и работы [14], получены ступенчатые кривые для теплоемкости. В области температур, близких к критическим, в модели ПБД кинетическая энергия, полученная от термостата, расходуется на увеличение потенциальной энергии межуikleотидного взаимодействия. Этим объясняется плавное уменьшение теплоемкости после пика. Метод трансфер-интеграла, использованный в [6] для расчета $C_V(T)$, дает δ -образный пик, который соответствует результатам моделирования очень длинных цепочек. В отличие от метода трансфер-интеграла, наш подход может быть использован для цепей любой длины и любого нуклеотидного состава. Кроме того, метод трансфер-интеграла ограничен моделью Пейрарда–Бишопа. Даже простейшая модификация модели, такая как рассмотрение модели ПБД, не позволяет использовать какие-либо аналитические решения соответствующих интегральных уравнений, что делает невозможным расчет реальных систем.

Было проведено сравнение с методом Монте-Карло. В отличие от МД, этот метод применим к системам, находящимся в равновесном состоянии. Также при моделировании этим методом мы установили потенциальный барьер (стенку), чтобы система не выходила на большие расстояния от минимума потенциала

Морзе. Метод молекулярной динамики при линейном нагревании всегда будет завышать температуру пика теплоемкости по сравнению с методом Монте-Карло. Методу моделирования молекулярной динамики необходимо большее время, чтобы достичь квазиравновесного состояния.

Методы МД и МК имеют разные области применения. Формально метод МД является более общим, поскольку он содержит результаты МК в качестве своего предельного случая, который сводится к изучению статистического равновесия. Считается, что результаты МД в этом пределе следует сравнивать с «точным» результатом МК. Прямое сравнение численных расчетов термодинамических характеристик методами МД и МК показывает, что результаты моделирования совпадают точно вдали от точки фазового перехода. Однако вблизи этой точки такое сравнение оказывается неверным. Причина расхождения результатов МД и МК вблизи точки фазового перехода заключается в следующем. Все реальные потенциалы взаимодействия между атомами и молекулами являются конечными функциями расстояний между ними. Отсюда следует, что соответствующая статистическая сумма (конфигурационный интеграл), если не вводить специального обрезания, расходится. Вдали от критической точки, например, при температуре намного ниже температуры диссоциации молекулы, введение отсечки не меняет результата. Это связано с тем, что количество траекторий, приводящих к бесконечному вкладу в статистическую сумму системы, очень мало. В практических расчетах этот вклад формально можно исключить разными способами. Например, можно создать потенциальную стенку на больших расстояниях в потенциале взаимодействия. Другой способ — просто отбросить траектории, уходящие в бесконечность, при статистическом усреднении. Наконец, можно просто подсчитать весь ансамбль частиц, тогда среднее расстояние между частицами в ансамбле будет характерным масштабом отсечки. Однако в самой критической точке существует полный произвол в выборе характерного масштаба. Метод МК в данном случае оказывается неприменимым, поскольку он определяется целиком за счет выбора характерного масштаба. Формально метод МД позволяет моделировать любые динамические процессы. Однако, при моделировании фазового перехода в равновесной системе, для получения адекватного результата требуется бесконечное время на расчет траекторий и количества реализаций, что делает невозможным его прямое применение [15].

Как показали дополнительные исследования (рис. 5), при моделировании в столкновительном термостате, существенный вклад вносят параметры столкновительной среды — частота столкновений и масса виртуальных частиц. И этот вклад более существенный, нежели модификация системы согласно [13]. Изначально мы исходили из параметров, принятых при МД-моделировании — частота столкновений 10 за 1 пс и масса виртуальной частицы 1 а.е.м., что соот-

ветствует вязкости воды. Уменьшение вязкости среды за счет уменьшения массы виртуальной частицы делает возможным фазовый переход при более низкой температуре. Учитывая медленную скорость нагрева, у наименее вязкого термостата хватает времени, чтобы установить требуемую температуру. Однако в данном случае часть кинетической энергии уходит на движение системы от ямы потенциала Морзе в сторону больших координат, приводя ДНК в денатурированное состояние и делая фазовый переход возможным. Более интенсивный термостат при критических температурах, напротив, гасит скорость системы как целого. И система скатывается опять в потенциальную яму, оставаясь в нативном состоянии.

В проводимых МД-экспериментах также была установлена стенка для достижения более равновесного состояния. В отличие от предыдущих экспериментов, описанных в [2, 3], текущие результаты моделирования при тех же параметрах показали более высокую температуру плавления. Вместе с тем, пик теплоемкости стал шире. Последний факт подтверждает вероятностную природу перехода молекулы ДНК в денатурированное состояние. Наличие стенки аналогично наличию точно такой же комплементарной цепочки в растворе. И при температурах, близких к температуре фазового перехода, две комплементарные цепочки вновь сцепляются.

Сравнение с работой [6] показывает, что наши средние значения координат совпадают с результатами данной работы, а теплоемкость — нет. Причина в том, что в работах [6, 7] координаты рассчитываются методом молекулярной динамики до момента денатурации, а теплоемкость задается только методом интеграла переноса. Мы используем метод молекулярной динамики для расчета координат как до денатурации, так и после нее.

Полученные результаты являются достаточно общими и могут быть обобщены на другие системы. В частности, широкий пик теплоемкости наблюдался экспериментально в белках [16] и при моделировании решеток с движением частиц в плоскости [17].

Для сравнения с работой [6], приводим зависимость средней координаты от времени (см. рис. 3). В работе [6] она уходила на бесконечность при температурах, близких к температурам плавления. При использовании столкновительного термостата этот уход подобен «случайным блужданиям».

Благодарности

Авторы выражают благодарность Н. К. Балабаеву за предложения и консультации по методике проведения экспериментов и Н. С. Фиялко за критические замечания.

Вычисления проведены с помощью гибридного суперкомпьютера К-60, установленного в Центре коллективного пользования ИПМ им. М. В. Келдыша РАН.

Литература

1. Wartell R. M., Benight A. S. Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment // *Physics Reports*. 1985. — Vol. 126, No. 2. — P. 67–107. — DOI: 10.1016/0370-1573(85)90060-2
2. Likhachev I. V., Lakhno V. D. Investigation of DNA denaturation in Peyrard–Bishop–Dauxois model by molecular dynamics method // *Eur. Phys. J. B*. — 2019. — Vol. 92, No. 11. — P. 253. — DOI: 10.1140/epjb/e2019-90741-6
3. Likhachev I. V., Lakhno V. D. The direct investigation of DNA denaturation in Peyrard–Bishop–Dauxois model by molecular dynamics method // *Chemical Physics Letters*. — 2019. — Vol. 727. — P. 55–58. — DOI: 10.1016/j.cplett.2019.04.027
4. Теплухин А. В. // *Математическая биология и биоинформатика* / под ред. В. Д. Лахно. — Т. 8. — Пущино: ИМПБ РАН, 2020. — Статья № 5. — DOI: 10.17537/icmbb20.13
5. Peyrard M., Bishop A. R. Statistical mechanics of a nonlinear model for DNA denaturation // *Phys. Rev. Lett. American Physical Society*. — 1989. — Vol. 62, No. 23. — P. 2755–2758. — DOI: 10.1103/PhysRevLett.62.2755
6. Dauxois T., Peyrard M., Bishop A. R. Entropy-driven DNA denaturation // *Phys. Rev. E. American Physical Society*. — 1993. — Vol. 47, No. 1. — P. R44–R47. — DOI: 10.1103/PhysRevE.47.R44
7. Dauxois T., Peyrard M., Bishop A. R. Dynamics and thermodynamics of a nonlinear model for DNA denaturation // *Phys. Rev. E. American Physical Society*. — 1993. — Vol. 47, No. 1. — P. 684–695. — DOI: 10.1103/PhysRevE.47.684
8. Alexandrov B. S. et al. Bubble statistics and dynamics in double-stranded DNA // *Phys. Rev. E. American Physical Society*. — 2006. — Vol. 74, No. 5. — P. 050901. — DOI: 10.1103/PhysRevE.74.050901
9. de los Santos F., Al Hammal O., Muñoz M. A. Simplified Langevin approach to the Peyrard–Bishop–Dauxois model of DNA // *Phys. Rev. E. American Physical Society*. — 2008. — Vol. 77, No. 3. — P. 032901. DOI: 10.1103/PhysRevE.77.032901
10. Lemak A. S., Balabaev N. K. A Comparison Between Collisional Dynamics and Brownian Dynamics // *Molecular Simulation*. — 1995. — Vol. 15, No. 4. — P. 223–231. — DOI: 10.1080/08927029508022336
11. Балабаев Н. К., Лемак А. С. Молекулярная динамика линейного полимера в гидродинамическом потоке // *Журнал физической химии*. — 1995. — Т. 69, № 1. — С. 28–32.
12. Dauxois T., Peyrard M. Entropy-driven transition in a one-dimensional system // *Phys. Rev. E. American Physical Society*. — 1995. — Vol. 51, No. 5. — P. 4027–4040. — DOI: 10.1103/PhysRevE.51.4027

13. Zoli M. Path integral method for DNA denaturation // *Phys. Rev. E. American Physical Society*. — 2009. — Vol. 79, No. 4. — P. 041927. — DOI: 10.1103/PhysRevE.79.041927
14. Vaitiekunas P., Crane-robinson C., Privalov P. L. The energetic basis of the DNA double helix: a combined microcalorimetric approach // *Nucleic Acids Research*. — 2015. — Vol. 43, No. 17. — P. 8577–8589. — DOI: 10.1093/nar/gkv812
15. Балабаев Н. К., Лахно В. Д. О применении методов молекулярной динамики и Монте-Карло вблизи критических точек // *Математическая биология и биоинформатика*. — 2020. — Т. 15, № 2. — С. 394–395. — DOI: 10.17537/2020.15.394
16. Privalov P. L., Khechinashvili N. N. A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study // *J. Mol. Biol.* — 1974. — Vol. 86, No. 3. — P. 665–684. — DOI: 10.1016/0022-2836(74)90188-0
17. Ebeling W., Podlipchuk V. Yu., Valuev A. A. Molecular dynamics simulation of the activation of soft molecules solved in condensed media // *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. — 1995. — Vol. 217, No. 1. — P. 22–37. DOI: 10.1016/0378-4371(95)00049-D

**Molecular dynamics investigation of DNA denaturation using a modified
Peyrard–Bishop–Dauxois model: the effect of restrictions on the available
volume, a comparison with the Monte-Carlo method**

I. V. Likhachev, V. D. Lakhno

The Institute of Mathematical Problems of Biology RAS — the Branch of Keldysh Institute
of Applied Mathematics of Russian Academy of Sciences,
IMPB RAS, 1, Professor Vitkevich St., 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia
E-mail: ilya_lihachev@mail.ru

The phase transition of the (PolyA/PolyT)₁₀₀ duplex to the denatured state in the Peyrard–Bishop–Dauxois model has been studied by direct molecular dynamics simulation and compared with the Monte-Carlo method. A qualitative difference in the behavior of models with the introduction of a cutoff radius is shown and explained.

Keywords: one-dimensional DNA modeling, homogeneous nucleotide chains, collision thermostat.

ПРОБЛЕМЫ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ В ЖИВОЙ КЛЕТКЕ НА ПРИМЕРЕ МОДЕЛЕЙ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА

Г. Ю. Ризниченко, А. Б. Рубин¹

Обсуждаются современное состояние и перспективы развития моделирования процессов в живой клетке, возможности и преимущества системно-динамического и агентного подхода. На примере моделирования процессов в энергопреобразующей фотосинтетической мембране демонстрируются основные принципы и примеры кинетического, броуновского и молекулярного моделирования. Детальные кинетические модели позволяют изучать динамику происходящих в фотосинтетической мембране процессов, недоступных непосредственному экспериментальному измерению, оценить константы скоростей отдельных реакций по данным экспериментов, проследить изменения характеристик фотосинтеза автотрофных организмов в ходе роста культуры, при разных режимах освещения, в условиях стресса. Компьютерные многочастичные модели в явном виде моделируют броуновскую диффузию подвижных белковых переносчиков и их электростатические взаимодействия с мультиферментными комплексами как в растворе, так и в интерьере биомембраны, влияние геометрии реакционного объема, ионной силы и pH клеточной среды на скорости реакций транспорта электронов между белками-переносчиками. Методы броуновской и молекулярной динамики дают последовательное описание роли броуновских движений, электростатических взаимодействий и конформационных перестроек молекул при образовании финального реакционного белок-белкового комплекса. Совместное использование методов кинетического, броуновского и молекулярного моделирования позволяет изучать регуляцию целостной системы электрон транспортных процессов на субклеточном и молекулярном уровнях, механизмы переключения электронных потоков в клетках растений и водорослей, оценивать оптимальные условия для получения клетками микроводорослей целевых продуктов. Материал статьи основан на результатах исследований, выполненных на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Ключевые слова: фотосинтез, электронный транспорт, флуоресценция, кинетические модели, мультиэкспоненциальная аппроксимация, метод Монте-Карло, многочастичные броуновские модели, молекулярное моделирование, электростатические взаимодействия.

¹ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12.
E-mail: riznich@biophys.msu.ru

Введение

История развития математического моделирования процессов в живых системах прошла несколько этапов. К середине XX века были предложены отдельные феноменологические модели процессов в живых системах. Некоторые наиболее известные из них: модель неограниченного роста Мальтуса [Malthus, 1798; Мальтус, 1993], ограниченного роста Ферхюльста [Verhulst, 1838], модели взаимодействия биологических видов Вольтерра [Volterra, 1931; Вольтерра, 1976], модель ферментативного катализа Михаэлиса–Ментен [Michaelis, Menten, 1913], модель роста микроорганизмов в проточной культуре Моно [Monod, 1950].

Во второй половине XX века круг моделируемых процессов существенно расширился, появились модели ферментативных реакций, в том числе модели колебаний в гликолизе Хиггинса [Higgins, 1954, 1967] и Е. Е. Селькова [Сельков, 1968; Иваницкий и др., 1978], модели метаболической и генной регуляции [Эйген, 1973; Эйген, Шустер, 1982], модели биологических ритмов, или биологических часов [Колебательные процессы в биологических и химических системах, 1967; Уинфри, 1990; Гласс, Мэки, 1991].

Были предложены и получили развитие модели, представлявшие собой системы нелинейных дифференциальных уравнений с двумя или тремя переменными, допускающие аналитическое исследование методами качественной теории дифференциальных уравнений [Романовский и др., 1975, 2004; Рубин и др., 1977, 1987]. Представление о характерных временах процессов в клетке и наличии узкого места (bottle neck), соответствующее в биологии принципу Либиха, теория лимитирующего фактора [Полетаев, 1966, 1973] давали возможность упростить полную систему уравнений и при этом выявить главные факторы, которые определяют динамику биологических процессов, протекающих в системе. Теорема А. Н. Тихонова (1952), в которой сформулированы условия, допускающие упрощение систем дифференциальных уравнений с малыми параметрами при производных, дала строгое математическое обоснование метода квазистационарных концентраций для сложных систем, в которых процессы протекают с сильно отличающимися характерными временами.

Перечисленные выше «классические» модели математической биологии, представленные в монографиях и учебниках [Мюррей, 2009, 2011; Романовский и др., 2004; Ризниченко, 2011; Rubin, Riznichenko, 2014; Рубин, 2017; Ризниченко, Рубин, 2018], являются результатом системно-динамического подхода к моделированию. Он состоит в том, что в изучаемой системе выделяются реально измеряемые переменные (концентрация веществ в клетке, численность видов в популяции или клеток в культуре) и связи между ними. В докомпьютерную эпоху описывающая реальную систему модель (система уравнений) исследовалась аналитически (на бумаге). Поэтому авторы стремились сформулировать

модель максимально просто, в силу чего большинство моделей имели феноменологический характер. Хотя и сильно упрощенные, такие системно-динамические, или кинетические, модели сыграли большую роль в становлении и развитии математической биологии. Они позволили найти общие (базовые) условия возникновения нетривиальных динамических режимов, таких как периодические колебания, хаос, пространственно-временные режимы типа автоволн и самоорганизация негомогенных структур.

В реальных живых системах параметры функционирования непрерывно меняются, а сами лимитирующие стадии переключаются. Поэтому описание сложных систем с помощью небольшого числа уравнений в большинстве случаев могло отражать лишь самые общие качественные черты процессов. В целом, феноменологические модели были слишком схематичными и, конечно, не могли удовлетворить биологов, обладавших к этому времени обширными и детальными знаниями о сложной организации биологических систем на всех уровнях от макромолекулярного до популяционного.

Возможности математического моделирования существенно расширились в конце XX века в связи с появлением и бурным развитием компьютерной техники. Стало возможным разрабатывать детальные системно-динамические модели, содержащие сотни и тысячи «реальных» компонентов, решать системы огромного числа уравнений, моделировать процессы в системах, обладающих сложной геометрией. Современные информационные технологии позволяют моделировать процессы в многокомпонентных системах, используя большие массивы данных, объем которых непрерывно возрастает в разных областях биологии. В свою очередь, необходимость обработки больших объемов данных (Big data) требует достаточно изощренных математических методов.

В начале XXI века при моделировании систем самой разной природы получили распространение так называемые «агентные» модели. В традиционном системно-динамическом подходе система исходно характеризуется некими обобщенными переменными (численность видов, концентрация веществ). В «агентном», «корпускулярном» методе моделирования предполагается вывести общие свойства сложных систем на основе свойств и механизмов взаимодействия составляющих эти системы «агентов» или «атомов» — неких простейших реальных объектов, составных элементов этой системы. «Агентное» и традиционное «системно-динамическое» описания взаимно дополняют друг друга. В большой мере сам способ описания во многом определяется целями моделирования. Так, для ответа на качественные вопросы о типе и условиях динамического поведения системы удобно составлять и изучать упрощенные «феноменологические» модели. А детальные «атомистические модели» необходимы для понимания, каким образом механизмы взаимодействия биомacroмолекул в клетке или особей в популяции определяют динамические свойства

сложных систем. Наиболее полное понимание достигается, когда оба описания «проникают» друг в друга. В науке таким классическим примером взаимопроникновения общего феноменологического и атомистического подхода является истолкование методами статистической физики понятия химического потенциала и характеристических функций (свободная энергия), которыми широко пользуются в химии и биологии [Рубин, 2017].

В настоящее время в моделировании биологических процессов в клетке разрабатываются как системно-динамические (кинетические), так и агентные (атомистические) многочастичные модели. На разных уровнях здесь выступают в качестве «агентов», «атомов» непосредственно атомы (модели внутримолекулярной динамики биополимеров), взаимодействующие биомакромолекулы (модели броуновской динамики белков), а также фрагменты разной степени агрегированности этих же элементов — крупнозернистые (course-grain) модели.

Для успешного моделирования необходимо обеспечить определение параметров (констант скоростей реакций) взаимодействия компонентов системы, что, однако, представляет большие сложности, в том числе и для биохимических реакций. Именно эти обстоятельства и не позволяют пока еще осуществить заманчивой проект «Электронная клетка», хотя мощь современных компьютеров, казалось бы, позволяет воспроизвести динамику всех реакций в клетке, число которых около 10 млн. Строго говоря, параметры взаимодействия между элементами системы можно точно определить только в моделях внутримолекулярной динамики биополимеров, где известны физические силы взаимодействия отдельных атомов в макромолекуле. Молекулярными носителями «настоящей жизни» являются взаимодействующие комплексы, содержащие миллиарды атомов, а характерные времена процессов занимают широкий диапазон от миллисекунд до минут, часов и более. В настоящее время методами полноатомной молекулярной динамики рассчитывают динамику систем, состоящих из миллионов атомов на временах не более порядка микросекунд. В моделях более крупных субклеточных, клеточных и систем более высокого уровня выделяют составные элементы, содержащие много атомов, это так называемые крупнозернистые модели [Papoian, 2017].

Динамическая система первичных процессов фотосинтеза

С точки зрения возможностей математического моделирования система первичных процессов фотосинтеза является уникальным объектом. Для первичных процессов фотосинтеза экспериментально определены константы скоростей отдельных элементарных стадий как в растворах, так и в нативных системах. Короткие лазерные вспышки длительностью от фемтосекунд до пикосекунд — запускают быстрые первичные процессы в фотосинтезирующих мембранах. Кинетика переноса электронов по фотосинтетической цепи и сопряженных процессов

преобразования энергии в фотосинтетической мембране может непосредственно регистрироваться при возбуждении такими короткими мощными вспышками света с помощью спектральных методов (дифференциальная спектроскопия, флуоресцентные методы, метод электронного парамагнитного резонанса). Эти методы позволяют в реальном времени регистрировать кинетические кривые и определять скорости быстрых изменений состояний отдельных компонентов системы в начальных стадиях фотосинтеза.

Возможность непосредственной оценки констант скоростей элементарных реакций является существенным преимуществом системы первичных процессов фотосинтеза по сравнению с большинством биологических процессов, для которых определение констант скоростей отдельных стадий реакций представляет собой сложную задачу. Так, регистрируемая в биохимических экспериментах кинетика обычных ферментативных реакций отражает лишь этапы образования и распада фермент-субстратных комплексов, но не элементарных взаимодействий в них, которые протекают по квантово-химическим механизмам в наносекундном временном диапазоне.

На рис. 1 представлены схемы и микрофотографии хлоропластов зеленых растений. Первичные процессы преобразования поглощенных квантов света в энергию макроэргических соединений происходят в субклеточных системах — тилакоидах хлоропластов зеленых растений и водорослей и хроматофорах фотосинтезирующих бактерий. Подробнее эти комплексы изображены на рис. 1б. На рис. 2 представлен срез томографического объема и соответствующая трехмерная структура края чаши хлоропласта.

Основные участники процесса фотосинтетического электронного транспорта — мультиферментные комплексы фотосистемы II (ФСII), цитохромный комплекс, фотосистемы I (ФСI) — встроены в бислойную мембрану и обеспечивают направленный перенос электрона через фотосинтетическую мембрану (рис. 1а, 1б). Посредниками между цитохромным комплексом и ФСI являются молекулы белка пластоцианина (Pc), диффундирующие в люмене. Восстановление молекул NADP, необходимых в цикле фиксации углерода, осуществляют подвижные в строме молекулы небольшого белка ферредоксина (Fd). Кинетические параметры взаимодействия комплексов с подвижными переносчиками определяются как диффузией подвижного переносчика к соответствующему комплексу, так и вероятностью «правильной» посадки подвижного переносчика на соответствующий сайт на донорной или акцепторной стороне комплекса. Важную роль здесь играют размеры, форма и электростатические свойства переносчика, подвижного в соответствующем компартменте (см. рис. 2), а также геометрия реакционного объема. Именно эти участки, где скорость переноса электрона зависит от пространственной организации мембраны и характера диффузии переносчиков, являются объектом регуляции со стороны целой клетки.

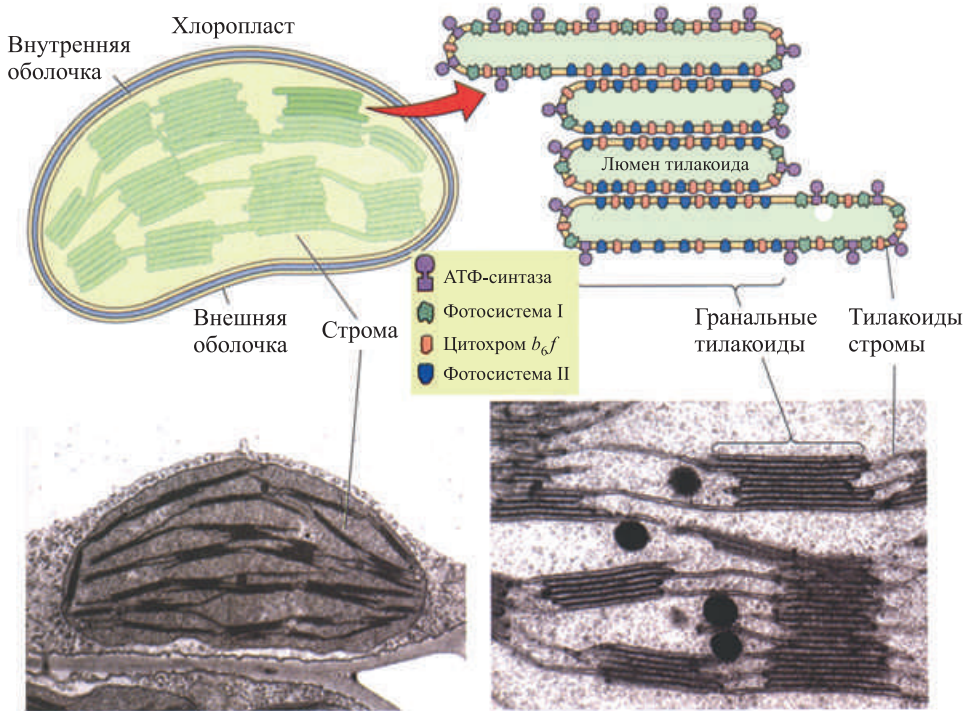


Рис. 1а. Схемы и микрофотографии хлоропластов зеленых растений. В верхнем правом углу показано расположение основных молекулярных комплексов в фотосинтетической мембране [Albertsson, 2001]. Подробнее эти комплексы изображены на рис. 1б

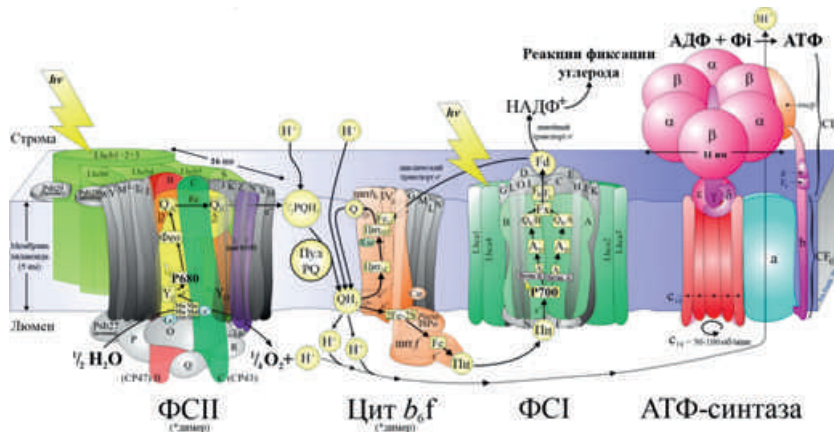


Рис. 1б. Мультиферментные комплексы в фотосинтетической мембране. Стрелками на рисунке указаны пути переноса электрона. <http://photosynthesis.sbcs.qmul.ac.uk/nield/downloads.html>

Модели фотосинтетического электронного транспорта

Первые кинетические модели фотосинтеза [Holzapfel, Bauer, 1975; Кукушкин и др., 1975], как и модели других биохимических процессов, были основаны на законе действующих масс, который гласит, что скорость взаимодействия двух веществ пропорциональна произведению концентраций этих веществ. Этот закон справедлив только в случае полного перемешивания, когда достаточно большое число молекул каждого вещества свободно диффундируют в гомогенной среде.

В конце 60-х годов XX века пришло понимание того факта, что компоненты фотосинтетической цепи не плавают свободно в цитоплазме. Это вызвало к жизни появление новых моделей, где отдельный фотосинтетический реакционный центр рассматривается как единый комплекс [Malkin, 1971; Сорокин, 1972].

Для описания процессов переноса электрона в пределах такого рода мультиферментных комплексов мы использовали обыкновенные дифференциальные уравнения, линейные относительно вероятностей этих состояний, типа master equation [Riznichenko et al., 1999; Лебедева и др., 2000, 2002; Belyaeva et al., 2008, 2011, 2014, 2016, 2019, 2020; Ризниченко и др., 2020; Ризниченко, Рубин, 2020]. Пути переноса электронов в пределах комплекса характеризует ориентированный граф переходов между состояниями, константы скоростей переходов между состояниями могут зависеть от концентраций протонов в люмене и строме, от концентраций подвижных переносчиков, поэтому в общем случае уравнения модели являются нелинейными. Концентрация какого-либо определенного состояния данного мультиферментного комплекса равна произведению вероятности этого состояния комплекса на концентрацию данного комплекса в объекте моделирования.

Большинство моделей фотосинтетического электронного транспорта описывали процесс переноса электрона в пределах ФСII, которая является основным источником флуоресценции [Stirbet, Strasser, 1995, 1996; Stirbet et al., 1998; Strasser, Stirbet, 1998, 2001; Vredenberg, Prasil, 2009; Lazár, 2003, 2009; Zhu et al., 2005; Xin, 2013]. Сопоставление построенной в результате моделирования с наблюдаемой в эксперименте индукционной кривой флуоресценции позволяет судить об адекватности заложенных в модель представлений о механизмах протекающих в системе процессов.

В работах нашей группы [Belyaeva et al., 2008, 2011, 2013] была разработана детальная модель ФСII, для идентификации параметров которой были использованы данные регистрации флуоресценции после освещения объекта короткой (нс) насыщающей лазерной вспышкой. Проведенное фитирование позволило получить оценки тех параметров системы, которые недоступны для

экспериментального подхода, в частности, константы скоростей безызлучательной релаксации в РЦ ФСII, которые существенно зависят от интенсивности освещения. При больших интенсивностях поток энергии в тепло может составлять до 30 % поглощенной фотосинтетическим объектом энергии света [Belyaeva et al., 2015], обеспечивая защиту системы от ускоренного образования активных форм кислорода. Модель ФСII позволяет воспроизвести реальные кинетические изменения, проявляющиеся на нарастающем участке индукционной кривой флуоресценции в диапазоне времен от наносекунд до секунды.

Информационное значение индукционной кривой флуоресценции этим не исчерпывается. Характер индукционной кривой флуоресценции в ходе роста культуры и в неблагоприятных условиях жизни автотрофных организмов существенно меняется как на нарастающем участке индукционной кривой, так и на более медленном «спадающем» участке. Для правильной интерпретации изменений выхода флуоресценции на больших временах необходим учет не только переноса электронов в пределах ФСII, но и других процессов в фотосинтетической мембране. В работах последних лет [Lazár, 2013; Ebenhöf et al., 2014; Stirbet, Govindjee, 2016; Belyaeva et al., 2016, 2019] моделируются процессы не только в ФСII, но также и дальнейший путь электрона через ФСI. Общая схема процессов, учтенных в модели [Belyaeva et al., 2016, 2019, 2020], приведена на рис. 3.

Вероятностное описание процессов в ансамблях фотосинтетических реакционных центров. Кинетический метод Монте-Карло

В реальных автотрофных организмах фотосинтетический аппарат отдельной клетки включает множество фотосинтетических цепей, в каждой из которых происходит перенос электрона. Наблюдаемый в эксперименте ответ представляет собой результат фотосинтетической активности сотен миллионов – миллиардов фотосинтетических цепей. Регистрируемая интенсивность сигнала флуоресценции определяется общим числом квантов флуоресценции, испускаемой всеми индивидуальными молекулами хлорофилла, входящими в ансамбль.

Реальные процессы в каждой отдельной фотосинтетической цепи носят вероятностный характер. С целью адекватного воспроизведения таких вероятностных процессов в ансамбле фотосинтетических цепей нами разработана кинетическая модель Монте-Карло фотосинтетического электронного транспорта [Маслаков, 2020; Маслаков и др., 2016; Ризниченко, Рубин, 2020].

Исходя из экспериментальных данных о значениях констант скоростей отдельных элементарных реакций, задаются вероятности переходов, приводящих к соответствующему изменению состояния данной фотосинтетической цепи.

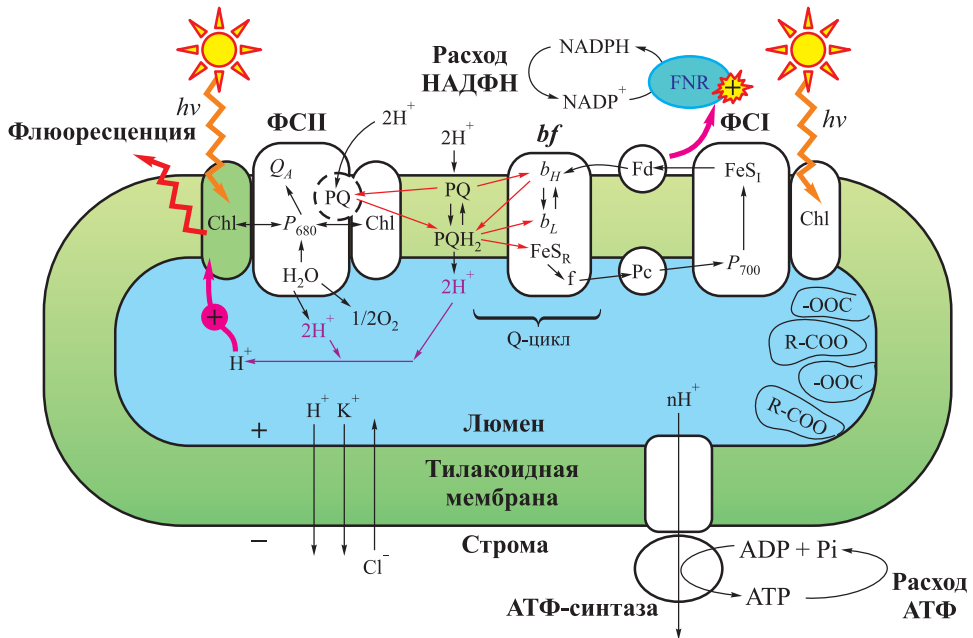


Рис. 3. Схема процессов, рассматриваемых в обобщенной кинетической модели первичных процессов фотосинтеза. ФСИ, ФСП — фотосистемы I и II, bf — цитохромный b_6f -комплекс, Chl — хлорофилл антенны, P_{680} и P_{700} — пигменты реакционных центров фотосистем II и I. Q_A — первичный хинонный акцептор электронов ФСП, b_L и b_H — низко- и высокопотенциальный гемы цитохрома b, FeS_R — железосерный центр Риске, f — цитохром f, FeS_I — акцепторный комплекс PSI, PQ — пластохинон; PQH_2 — пластохинол; Fd — ферредоксин, Hc — пластоцианин. $R-COO^-$ — буферные группы. Знаки «+» и «-» показывают, что в результате светоиндуцированных процессов люмен тилакоида заряжается положительно, а строма хлоропласта — отрицательно. Желтые ломаные стрелки обозначают потоки квантов падающего света, красные — флуоресценцию. Тонкими стрелками показан перенос электронов по цепи электронного транспорта и потоки ионов H^+ , K^+ и Cl^- после включения освещения [Beliyaeva et al., 2019]. Для фитирования модели наряду с кривыми индукции флуоресценции использованы экспериментальные кривые редокс-превращений P_{700} на временах от миллисекунд до 30 с [Belyaeva et al., 2019]. Модель, включающая дополнительно более медленные процессы, в том числе миграцию антенного комплекса от ФСП к ФСИ, позволяет описать индукционную кривую флуоресценции как зеленых растений и водорослей, так и циановых бактерий на временных интервалах от мкс до минут, рис. 4 [Belyaeva et al., 2020]

При этом в процессе счета программа последовательно делает короткие временные шаги, на каждом из которых выясняется, осуществился ли переход каждой элементарной фотосинтетической цепи из того состояния, в котором она находится в данный момент времени, в какое-либо другое из возможных состояний (модификация алгоритма Галлеспи [Gillespie, 1976]). Каждый пере-

ход, который при этом сопровождается высвечиванием кванта флуоресценции, фиксируется. Одновременное воспроизведение в модели работы сотен тысяч – миллионов фотосинтетических цепей позволяет накопить достаточное количество сигналов флуоресценции для построения суммарной адекватной кривой индукции флуоресценции. Моделируемый таким образом суммарный сигнал флуоресценции от совокупности всех цепей может быть напрямую сопоставлен с реальным сигналом, регистрируемым в разных экспериментальных условиях. Модель воспроизводит влияние разной интенсивности света, повышенной температуры, а также различных ингибиторов фотосинтеза на характер кривых индукции флуоресценции (рис. 5).

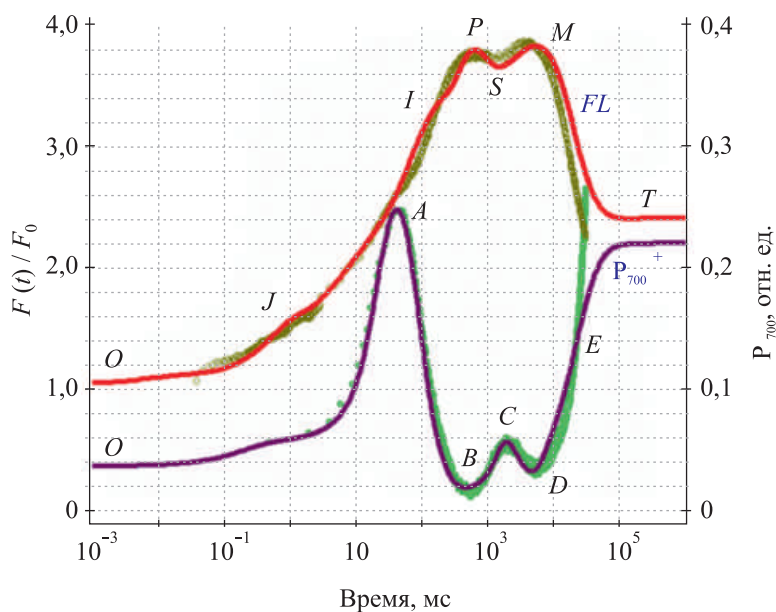


Рис. 4. Модельные кинетические кривые индукции флуоресценции и окислительно-восстановительных превращений P_{700} (FL, красный P_{700}^+ , фиолетовый), фитированные по экспериментальным кривым флуоресценции хлорофилла а и кривым поглощения ΔA_{810} (бежевые и зеленые кружки), зарегистрированные на целых листьях *P. Sativum*, адаптированных 15 мин в темноте, при освещении красным светом, освещенность $200 \text{ mol фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ (максимум излучения 650 нм). Время регистрации — 30 с [Belyaeva et al., 2019]

Таким образом, кинетическая модель Монте-Карло, учитывающая в явном виде вероятностный характер процессов в каждой из фотосинтетических цепей клетки микроводоросли, адекватно воспроизводит наблюдаемый в эксперименте суммарный сигнал, который в принципе соответствует решению, полученному с помощью дифференциальных уравнений. Таким образом, результаты мо-

делирования с помощью модельного алгоритма процессов, происходящих в каждом из компонентов изучаемого ансамбля и дальнейшего их суммирования, подтверждает правомерность использования детерминистического описания.

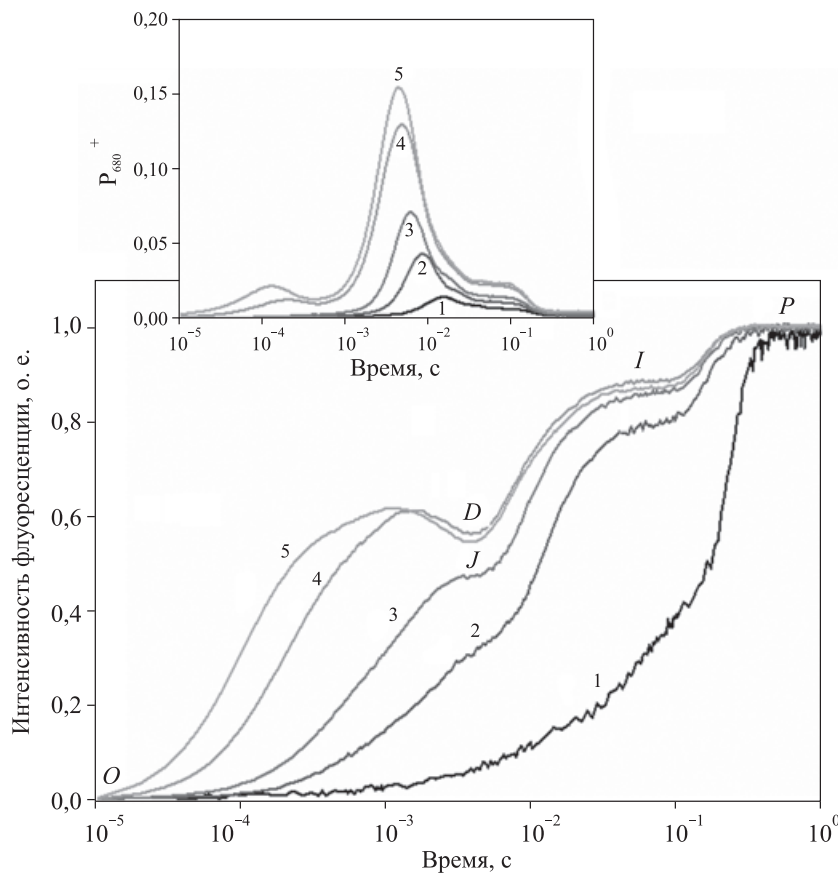


Рис. 5. Модельные кривые индукции флуоресценции для разных интенсивностей действующего света 120, 1000, 2000, 6000 и 12000 М·фотон·м⁻²·с⁻¹ (кривые 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно). Во врезке показаны соответствующие светоиндуцированные изменения P_{680} — фотоактивного пигмента фотосистемы II [Antal et al., 2018a]

Прямое многочастичное компьютерное моделирование

Кинетические модели, построенные на основе математического аппарата обыкновенных дифференциальных уравнений, исходят из предположения о гомогенном распределении компонентов системы в пространстве. Большинство моделей метаболических систем использует для описания уравнения действующих масс и их модификации.

В кинетических моделях процессов в фотосинтетической мембране предполагается, что мультиферментные комплексы ФСІ, ФСІІ и цитохромные комплексы взаимодействуют с подвижными переносчиками в соответствии с законом действующих масс. Между тем, в интерьере фотосинтетической мембраны взаимодействие белков не соответствует представлениям о свободной диффузии и случайных соударениях по типу реакций в растворах. Общее количество подвижных переносчиков, приходящееся на одну грану, как и количество малоподвижных в мембране реакционных центров, составляет десятки-сотни молекул, что значительно меньше необходимого количества для реализации представлений о свободных соударениях и законе действующих масс.

Результаты, полученные методом электронной микроскопии, свидетельствуют о плотном расположении мультиферментных комплексов в мембране, причем комплексы выступают на значительное расстояние внутрь люминального пространства [Albertsson, 2000; Albertsson, 2001; Dekker, Boekema, 2005; Ruban, 2013]. Это делает невозможным свободную диффузию пластохинона во внутримембранном пространстве [Kirchhoff et al., 2002] и ограничивает движение в люмене молекул подвижного переносчика пластоцианина, передающего электроны с цитохромного комплекса на ФСІ. То же относится и к диффузии в стромальном пространстве, где молекулы ферредоксина участвуют в переносе электронов по линейному пути и циклическому пути вокруг ФСІ.

Для описания образования реакционного комплекса двух взаимодействующих белков в растворе с целью предсказания структуры комплекса и оценки константы скорости его образования используются модели броуновской динамики (BD), основанные на математическом аппарате уравнений Ланжевена, которые описывают поступательное и вращательное движение белков под действием случайной броуновской силы и электростатических взаимодействий [Pearson, Gross, 1998; Haddadian, Gross, 2005; Gross, Rosenberg, 2006; Хрущев и др., 2015]. Однако в интерьере фотосинтетической мембраны необходимо рассматривать ансамбли десятков-сотен взаимодействующих молекул.

Для описания в явном виде броуновской диффузии подвижных белковых переносчиков как в растворе, так и в интерьере биологической мембраны нами разрабатываются прямые многочастичные броуновские модели. В этих моделях белки в количествах, составляющих десятки-сотни молекул на реакционный объем, могут быть подвижными, как Fd и FNR в стромах тилакоида, или один из белков может быть подвижным как Pс в люмене тилакоида, а второй быть частью относительно неподвижного встроенного в мембрану мультиферментного комплекса — белок Cyt *f* — часть цитохромного *b₆f*-комплекса (рис. 6).

Основы метода и результаты описаны в книгах [Rubin, Riznichenko, 2014; Ризниченко, Рубин, 2020] и оригинальных статьях [Kovalenko et al., 2006, 2010, 2011a, 2011b, 2017; Коваленко и др., 2009, 2014, 2016; Князева и др., 2010;

Riznichenko et al., 2010; Riznichenko, Kovalenko, 2019; Ризниченко и др., 2011, 2014, 2020; Хрущев и др., 2013, 2015b; Устинин и др., 2013; Diakonova et al., 2016; Дьяконова и др., 2016].

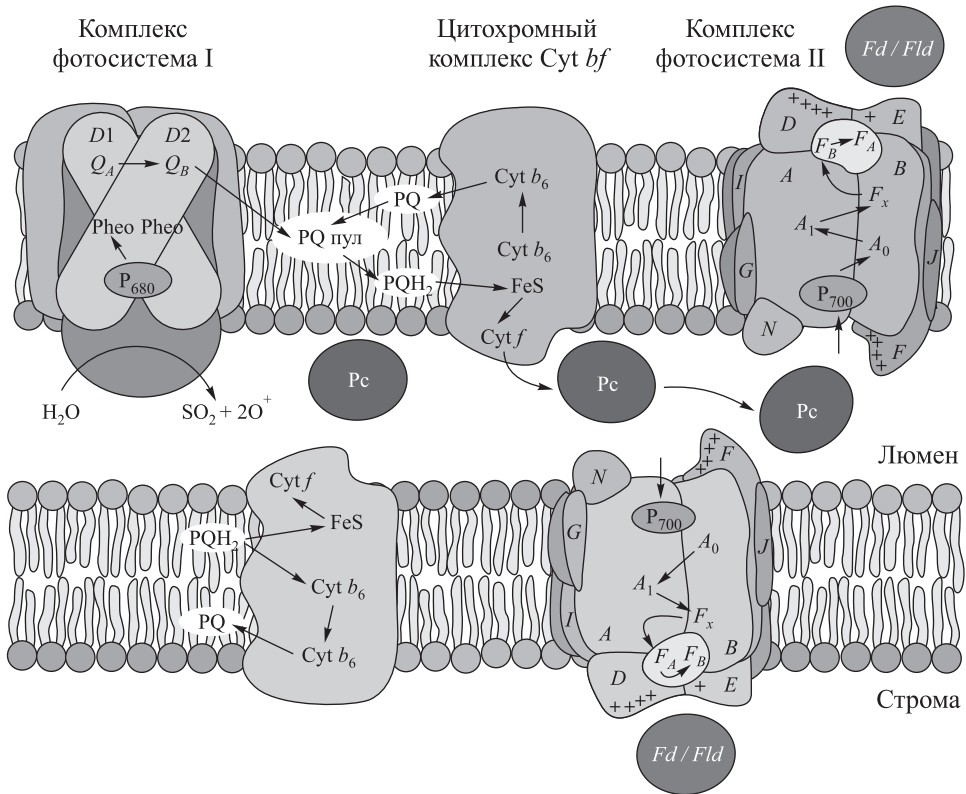


Рис. 6. Схема электрон-транспортных процессов при фотосинтезе. Показаны две тилакоидные мембраны и люминальное пространство между ними. В мембрану встроены мультиферментные комплексы фотосистемы 1, фотосистемы 2 и цитохромный комплекс. Молекулы мобильного белка пластоцианина (Pc) диффундируют в люминальном пространстве. Стрелки показывают пути переноса electrons. Связь с циклом Кальвина осуществляет белок ферредоксин (Fd) или флаводоксин (Fd). Темным выделены белки, для взаимодействия которых разработаны многочастичные броуновские модели

Разрабатываемый нами метод прямого многочастичного моделирования позволяет использовать преимущества BD-метода, учитывающего роль формы белков и электростатических взаимодействий в процессах электронного транспорта, для изучения взаимодействия не отдельных белков, а их ансамблей в реакционных объемах сложной формы. Прямая модель дает наглядное трехмерное визуальное представление о динамике процессов в системе на разных про-

пространственных и временных масштабах, возможность наблюдать за поведением отдельных компонентов и получать усредненные статистические сведения по всему ансамблю. Пример сцены в модели многочастичной броуновской динамики представлен на рис. 7.

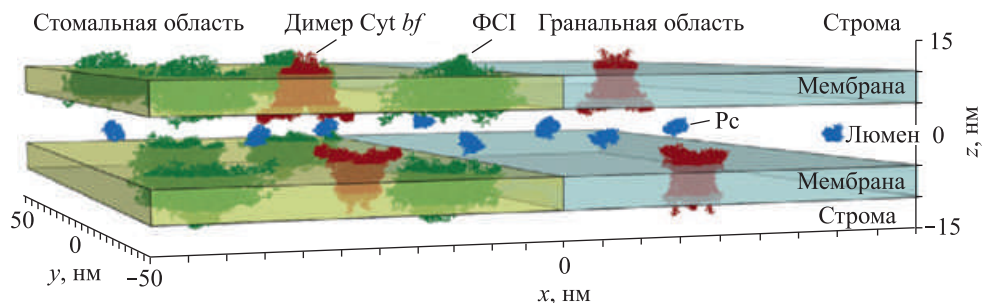


Рис. 7. Сцена в модели многочастичной броуновской динамики, участок фотосинтетической мембраны, на котором подвижный белок Рс осуществляет перенос электрона от *Cyt f* — субъединицы цитохромного комплекса, к донорной части ФСЦ [Kovalenko et al., 2017]

Модели диффузионного движения мобильных белков Рс и Fd и их взаимодействия с мультиферментными комплексами описаны в работах [Kovalenko et al., 2006, 2010, 2011a, 2011b, 2017; Коваленко и др., 2009, 2014, 2016; Князева и др., 2010; Riznichenko et al., 2010; Riznichenko, Kovalenko, 2019; Ризниченко и др., 2011, 2014, 2020; Хрущев и др., 2013, 2015b; Устинин и др., 2013; Diakonova et al., 2016; Дьяконова и др., 2016], а также в книгах [Rubin, Riznichenko, 2014; Ризниченко, Рубин, 2020].

Стадии взаимодействия белков

Молекулы белков-переносчиков электронов осуществляют броуновское движение в среде и одновременно испытывают электростатические взаимодействия друг с другом и с заряженной поверхностью фотосинтетической мембраны. Как подтвердили результаты вычислительных экспериментов, процесс электростатической ориентации значительно (на 1–2 порядка) увеличивает наблюдаемую кинетическую константу суммарной скорости реакции по сравнению с тем, как если бы белки соударялись случайными местами своих поверхностей в результате чисто броуновского движения без предварительной электростатической взаимной ориентации.

При сближении молекулы донора и акцептора способны образовывать белок-белковый комплекс. Модели броуновской динамики, в которых молекулы белков рассматриваются как твердые тела, способны описать образование

именно такого предварительного (encounter) комплекса. Первоначально образованный комплекс с течением времени может преобразоваться в финальный комплекс или развалиться под действием броуновской силы. К образованию финального реакционного комплекса приводит сложная последовательность процессов, обеспечивающих конформационное соответствие молекул белков донора и акцептора. В финальном комплексе становится возможным туннельный перенос электрона между реакционными центрами белков донора и акцептора. Для описания конформационных движений в таком реакционном комплексе необходимо уже применение методов молекулярной динамики, а для описания переноса электрона с реакционного центра молекулы-донора на реакционный центр молекулы-акцептора внутри комплекса — применение методов квантовой химии.

Роль электростатических взаимодействий в образовании окислительно-восстановительного комплекса двух белков мы подробно изучали для пары фотосинтетических белков-переносчиков электрона — Pc и $Cyt\ f$. Эти белки являются окислительно-восстановительными партнерами с четко локализованными реакционными центрами — атомами меди и железа соответственно. Конечные конфигурации молекул в группе наиболее часто встречающихся траекторий броуновской динамики, ведущих к формированию предварительного комплекса, были затем использованы в качестве начальных для расчетов последующей внутримолекулярной динамики. На этом этапе в ходе молекулярно-динамического расчета происходило (либо не происходило) образование финального комплекса, где атом меди Pc и атом железа $Cyt\ f$ сближались до расстояний, на которых осуществляется туннельный перенос электрона. На рис. 8 представлены результаты молекулярно-динамических расчетов взаимодействия Pc и $Cyt\ f$ из высших растений [Fedorov et al., 2019].

Оказалось, что в случае зеленых растений ансамбль образовавшихся в процессе диффузионного движения структур с внутренней энергией $8\ kT$, разбивается на два значительно отличающихся кластера. В первом кластере (рис. 8, *a*1, 61 % структур) молекулы белка имеют ориентацию, близкую к таковой в экспериментально полученном функционально активном комплексе. Здесь молекула пластоцианина за счет вращения под действием тепловых флуктуаций имеет возможность занять выгодную для переноса электрона позицию относительно гема цитохрома f . Расстояние между кофакторами активных центра составляет около 1,5 нм.

Во втором кластере (рис. 8, *b*) расстояние между кофакторами значительно больше и составляет около 3,7 нм. Пластоцианин находится здесь в перевернутом положении относительно ориентации, которую он имеет в активных комплексах, полученных при помощи ЯМР. Очевидно, что структуры второго кла-

стера находятся в непродуктивных метастабильных состояниях, которые не могут быть легко разрушены под действием случайной броуновской силы.

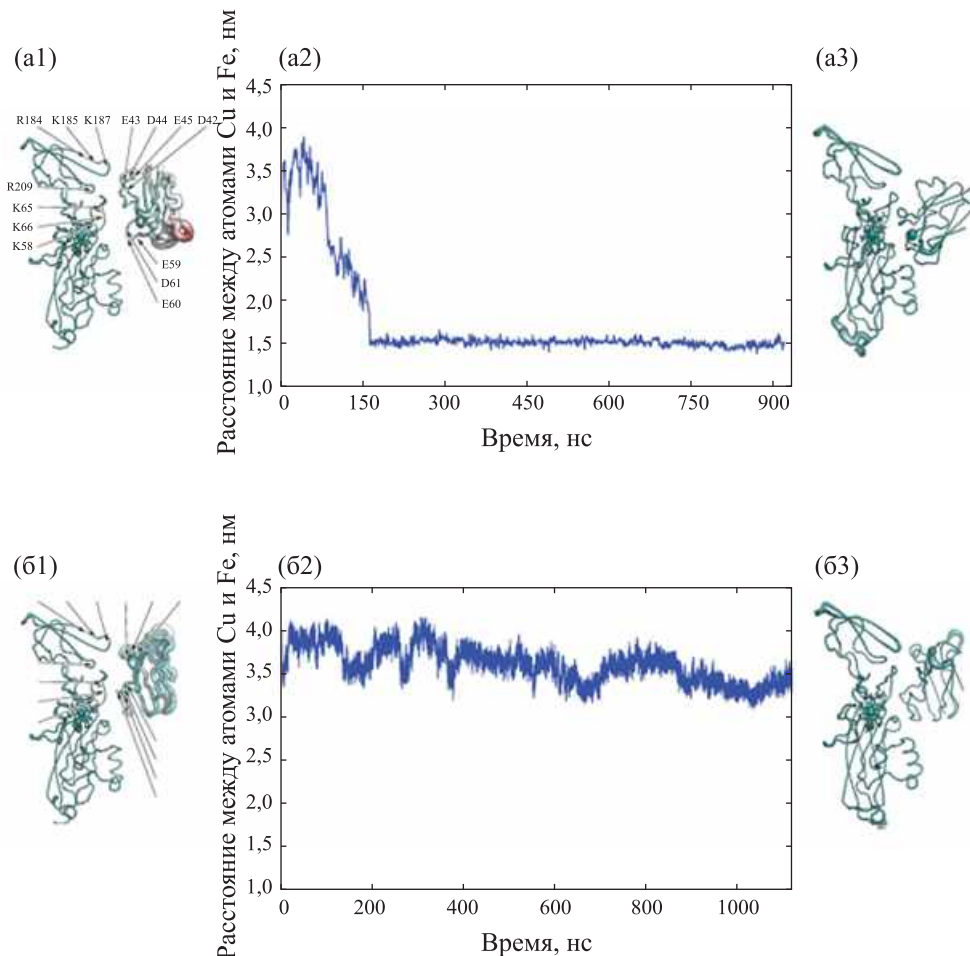


Рис. 8. a1, b1: центральные структуры первого (a1) и второго (b1) кластеров диффузионно-столкновительных комплексов пластоцианина и цитохрома *f* из высших растений с энергией электростатического притяжения более 8 *kT*. a2, b2: расстояние между атомами меди и железа пластоцианина и цитохрома *f*, полученное из расчетов молекулярной динамики, имеющих в качестве исходных конформаций центральную структуру первого (a2) и второго (b2) кластеров. a3, b3: структуры первого (a3) и второго (b3) финальных комплексов, полученных из молекулярно-динамических расчетов [Fedorov et al., 2019]

Общая последовательность этапов образования электрон-транспортного комплекса белков *Pc* и *Cyt f* из высших растений приведена на схеме на рис. 9.

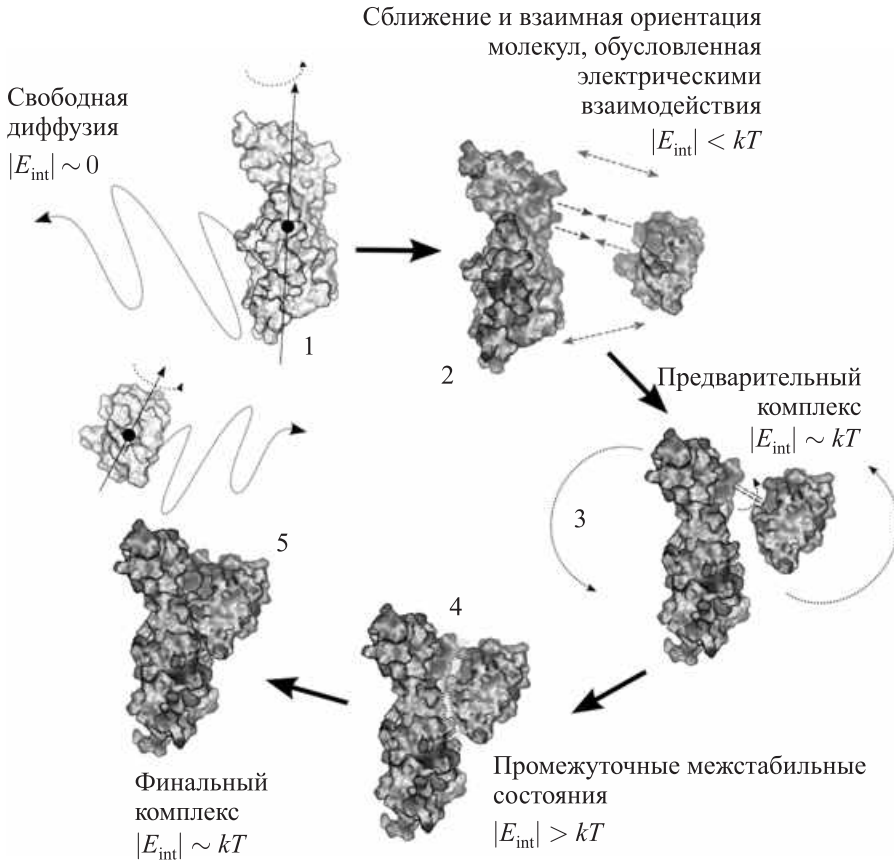


Рис. 9. Схема образования белок-белкового комплекса для электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* из высших растений. (1) свободная диффузия молекул; (2) взаимная ориентация, обусловленная электростатическими взаимодействиями; (3) формирование энергетически-выгодных конформаций; (4) трансформация дифузионно-столкновительного комплекса в метастабильное энергетически выгодное состояние; (5) формирование финального комплекса (функционально активная конфигурация) путем конформационных изменений в рамках белок-белкового интерфейса. Поверхности белков окрашены в соответствии с их поверхностным потенциалом в диапазоне от -100 до 100 мВ [Fedorov et al., 2019]

Заключение

В настоящей статье рассматривались современные математические модели динамического поведения биологических систем на примере первичных процессов фотосинтеза. Общей целью динамического моделирования сложных систем является раскрытие закономерностей их поведения во времени и изменения во времени количественных характеристик взаимодействующих компонентов. Ключевое условие адекватности модели реальному объекту состоит

в соответствии структуры модели и реальной системы, а также соответствии формы уравнений, механизмов и параметров взаимодействия ее составных элементов. В моделях клеточных процессов это означает, что в полной модели должны присутствовать известные компоненты клеточного метаболизма, отраженные в соответствующих метаболических схемах. Сюда же относятся все связи между компонентами, в первую очередь прямые и обратные положительные и отрицательные связи между ними. Что касается самих математических уравнений, то они должны соответствовать конкретным механизмам взаимодействий компонентов, таким как свободное соударение по закону действующих масс, диффузионные перемещения в вязкой среде, внутримолекулярные кооперативные переходы в макромолекулярных комплексах. Все это возможно отразить в модели только на основе независимых данных экспериментов или наблюдений.

В свою очередь это требует и применения математических методов, адекватно отражающих характерные особенности взаимодействий в биологических системах. По мере углубления наших знаний об устройстве биологической системы менялся и продолжает меняться арсенал применяемых математических методов. Этим обусловлен переход от обыкновенных дифференциальных уравнений кинетики в гомогенной среде к уравнениям кинетики, в которых наряду с химическими членами учитывается и диффузия веществ в гетерогенном реакционном пространстве.

В отдельных компартментах клетки, где взаимодействуют сравнительно небольшие ансамбли молекул, свою эффективность демонстрирует новый метод «прямого многочастичного моделирования». На современных мощных компьютерах можно также адекватно в режиме реального времени методом Монте-Карло воспроизводить процессы, одновременно происходящие в миллионах цепей активных белков, которые взаимодействуют друг с другом. Повидимому, для выяснения механизмов клеточных процессов необходимы как модели, построенные на основе дифференциальных уравнений, детальные и упрощенные, допускающие качественное исследование, так и алгоритмические стохастические модели Монте-Карло, а также методы агентного многочастичного моделирования, воспроизводящие перемещения и взаимодействия отдельных подвижных макромолекул в клетке.

Компьютерное воспроизведение броуновского диффузионного сближения белков основано на учете действия случайных толчков, которые испытывают белковые молекулы со стороны ближайшего окружения. Влияние электростатических взаимодействий вносит существенную поправку в «случайность» происходящих встреч белков, вызывая их взаимную нужную ориентацию. Это фактически означает наличие фактора дальнедействующих взаимодействий, который придает «векторный» характер, казалось бы, чисто случайным блужданиям

белков. Можно предположить, что этим не исчерпывается «векторизация» броуновского движения в клетке и что возможно существование других дальнедействующих факторов взаимодействий в клетке. Например, правомерен вопрос о том, какой вклад в отбор случайных толчков может внести форма белковой глобулы по отношению к появлению преимущественного результирующего направления ее броуновского движения. Вообще это может говорить о возможных скрытых пока от нас особенностях элементарных взаимодействий структурных элементов в живой системе, которые были выявлены и «целесообразно» использованы в биологии за миллионы лет эволюции на низших структурных уровнях организации живого.

В целом, критерий успешного математического моделирования заключается не только в правильном описании динамического поведения системы и количественной обработке результатов экспериментов или наблюдений. Наиболее ценным является достижение нового понимания механизмов и способов регуляции процессов в клетке, которое может быть достигнуто путем изучения свойств адекватной математической модели. В этом и заключается эвристическая ценность моделирования, которая в полной мере проявилась в классических моделях автоколебаний в гликолизе в синхронной культуре дрожжей. Авторами был постулирован, или, как говорят, «вложен руками» нелинейный автокаталитический характер реакции превращения фруктозо-6-фосфат в фруктозо-ди-фосфат, который в то время в биохимии еще не был известен. А в результате были найдены и экспериментально подтверждены математические условия осуществления в культуре дрожжей автокаталитического режима колебаний.

Особая проблема — как включать данные моделирования систем более низкого уровня организации в сложные модели. В биологии речь идет о понимании поведения целостного организма на основании знаний о поведении его составных частей — клеток, субклеточных систем и биомакромолекул и их взаимодействий. То же может относиться к пониманию поведения популяций и экологических систем на основании знаний о поведении отдельных особей, хотя эта проблема может оказаться еще намного сложнее. Иными словами, как перейти от «агентного» элементарного описания к системно-динамическому описанию целостной системы. Это сродни вопросу о том, как, изучив каждую ниточку ковра, «понять» и представить в математическом виде закономерность его целостного прекрасного рисунка. Очевидно, ниточки необходимо «правильно» соединить, осознав закономерность этой «правильности». Однако эта аналогия неполна, поскольку ковер статичен, а живые системы динамичны. Речь идет о «понимании» поведения организма на основании знаний о его клетках, субклеточных системах и биомакромолекулах и их взаимодействиях. Для создания целостной картины необходимо перейти от агентного к системно-динамическому описанию системы.

Вспомним слова Владимира Ивановича Вернадского:

«Большая часть научной работы состоит в поиске математических соотношений. Когда мы их находим, наш ум успокаивается и нам кажется, что вопрос, который нас мучил, решен». Но в действительности вопрос не решен, и мучения продолжают.

Литература

- Вольтерра В. Математическая теория борьбы за существование. — М.: Наука, 1976. — 286 с.
- Гласс Л., Мэки М. От часов к хаосу: Ритмы жизни. — М.: Мир, 1991. — 248 с.
- Дьяконова А. Н., Хрущев С. С., Коваленко И. Б. Роль электростатических взаимодействий при образовании комплексов ферредоксин-ферредоксин-НАДФ-редуктазы и ферредоксин-гидрогеназы // Биофизика. — 2016. — Т. 61 (4). — С. 677–685.
- Иваницкий Г. Р., Кринский В. И., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки. — М.: Наука, 1978. — 312 с.
- Колебательные процессы в биологических и химических системах / Франк Г.М. (ред.). — М.: Наука, 1967. — 440 с.
- Кукушкин А. К., Тихонов А. Н., Блюменфельд Л. А., Рууге Э. К. Теоретические аспекты кинетики первичных процессов фотосинтеза высших растений и водорослей // Физиол. растений. — 1975. — Т. 22. — С. 241–250.
- Мальтус Т. Р. Опыт о законе народонаселения. — Петрозаводск: Петроком, 1993. — 139 с.
- Маслаков А. С., Антал Т. К., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Моделирование первичных процессов фотосинтеза с помощью кинетического метода Монте-Карло // Биофизика. — 2016. — Т. 61 (3). — С. 464–477.
- Маслаков А. С. Описание процессов в ансамблях фотосинтетических реакционных центров с помощью кинетической модели типа Монте-Карло // Компьютерные исследования и моделирование. — 2020. — Т. 12, № 5. — С. 1207–1221.
- Мюррей Дж. Математическая биология. Т. 1. Введение. — М.-Ижевск: ИКИ-РХД, 2009. — 776 с.
- Мюррей Дж. Математическая биология. Т. 2. Пространственные модели и их приложения в медицине. — М.-Ижевск: ИКИ-РХД, 2011. — 1104 с.
- Полетаев И. А. О математических моделях элементарных процессов в биогеоценозах. — Проблемы кибернетики. — Вып. 16. — М.: Наука, 1966. — С. 171–190.
- Ризниченко Г. Ю. Математические модели первичных процессов фотосинтеза. — Успехи науки и техники, серия Биофизика. — Т. 31. — М.: ВИНТИ, 1991. — 162 с.
- Ризниченко Г. Ю. Лекции по математическим моделям в биологии. — М.-Ижевск: Изд. РХД, 2011. — 560 с.

- Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Модели регуляции фотосинтетического электронного транспорта // Проблемы регуляции в биологических системах / А. Б. Рубин (ред.). — М.-Ижевск: ИКИ-РХД, 2007. — С. 165–194.
- Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Математические методы в биологии и экологии. Биофизическая динамика продукционных процессов: в 2 ч. — 3-е изд., перераб. — М.: Изд. Юрайт, 2018. — Ч. 1. — 210 с.; Ч. 2. — 185 с.
- Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Динамические модели электронного транспорта в фотосинтезе. — М.-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2020. — 332 с.
- Ризниченко Г. Ю., Беляева Н. Е., Дьяконова А. Н., Коваленко И. Б., Маслаков А. С., Антал Т. К., Горячев С. Н., Плюснина Т. Ю., Федоров В. А., Хрущев С. С., Рубин А. Б. Модели фотосинтетического электронного транспорта // Биофизика. — 2020. — Т. 65, № 5. — С. 886–902. — DOI: 10.31857/S0006302920050063
- Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическое моделирование в биофизике. — М.: Наука, 1975. — 344 с.
- Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернавский Д. С. Математическое моделирование в биофизике. Введение в теоретическую биофизику. — М.-Ижевск: ИКИ-РХД, 2004. — 464 с.
- Рубин А. Б. Биофизика. Т. 3. — М.-Ижевск: ИКИ-РХД, 2017. — 480 с.
- Рубин А. Б., Пытьева Н. Ф., Ризниченко Г. Ю. Кинетика биологических процессов. — М.: Изд. МГУ, 1977. — 330 с.; 1987. — 304 с.
- Сельков Е. Е. Автоколебания в гликолизе. Простая одночастотная модель // Молек. биол. — 1968. — Т. 2. — С. 252–266.
- Сорокин Е. М. Нециклический транспорт электронов и связанные с ним вопросы // Физиол. растений. — 1973. — Т. 20. — С. 733–741.
- Тихонов А. Н. Системы дифференциальных уравнений, содержащие малые параметры при производных // Матем. сб. — 1952. — Т. 31 (73). — С. 575–586.
- Уинфри А. Т. Время по биологическим часам. — М.: Мир, 1990. — 208 с.
- Хрущев С. С., Абатурова А. М., Дьяконова А. Н. и др. Моделирование взаимодействий белков фотосинтетической электрон-транспортной цепи фотосинтеза методом броуновской динамики // Биофизика. — 2015. — Т. 60 (2). — С. 270–292.
- Хрущев С. С., Абатурова А. М., Федоров В. А. и др. Идентификация промежуточных состояний в процессе диффузионного сближения электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* // Биофизика. — 2015б. — Т. 60 (4). — С. 629–638.
- Эйген М. Самоорганизация материи и эволюция биологических макромолекул. — М.: Мир, 1973. — 224 с.
- Эйген М., Шустер П. Гиперцикл. Принципы самоорганизации макромолекул. — М.: Мир, 1982. — 270 с.
- Albertsson P.-A. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane // Trends Plant Sci. — 2001. — Vol. 6. — P. 349–354.
- Antal T. K., Maslakov A. S., Yakovleva O. V., Krendeleva T. E., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Simulation of chlorophyll fluorescence rise and decay kinetics, and P700-

- related absorbance changes by using a rule-based kinetic Monte-Carlo method // *Photosyn. Res.* — 2018. — Vol. 138 (2). — P. 191–206.
- Belyaeva N. E., Schmitt F.-J., Paschenko V. Z. PSII model-based simulations of single turnover flash-induced transients of fluorescence yield monitored within the time domain of 100 ns – 10 s on dark-adapted *Chlorella pyrenoidosa* cells // *Photosyn. Res.* — 2008. — Vol. 98. — P. 105–119.
- Belyaeva N. E., Schmitt F.-J., Paschenko V. Z. Model based analysis of transient fluorescence yield induced by actinic laser flashes in spinach leaves and cells of green algae *Chlorella pyrenoidosa* Chick // *Plant Physiology and biochemistry.* — 2014. — Vol. 77. — P. 49–59.
- Belyaeva N. E., Schmitt F.-J., Paschenko V. Z. Modelling of the redox state dynamics in photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa* Chick cells and leaves of spinach and *Arabidopsis thaliana* from single flash induced fluorescence quantum yield changes on the 100 ns – 10 s time scale // *Photosynth. Res.* — 2015. — Vol. 125. — P. 123–140.
- Belyaeva N. E., Bulychev A. A., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Thylakoid membrane model of the Chl *a* fluorescence transient and P700 induction kinetics in plant leaves // *Photosynth. Res.* — 2016. — Vol. 130. — P. 491–515.
- Belyaeva N. E., Bulychev A. A., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Analyzing both the fast and the slow phases of chlorophyll *a* fluorescence and P700 absorbance changes in dark-adapted and preilluminated pea leaves using a Thylakoid Membrane model // *Photosynth. Res.* — 2019. — Vol. 140. — P. 1–19.
- Belyaeva N. E., Bulychev A. A., Klementiev K. E., Paschenko V. Z., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Model quantification of the light-induced thylakoid membrane processes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in vivo and after exposure to radioactive irradiation // *Photosynth. Res.* — 2020. — Vol. 145.
- Dekker J. P., Boekema E. J. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — Vol. 1706 (1–2). — P. 12–39.
- Diakonova A. N., Khrushchev S. S., Kovalenko I. B. Influence of pH and ionic strength on electrostatic properties of ferredoxin, FNR, and hydrogenase and the rate constants of their interaction // *Phys. Biol.* — 2016. — Vol. 13 (5). — 056004.
- Ebenhöh O., Fucile G., Finazzi G., et al. Short-term acclimation of the photosynthetic electron transfer chain to changing light: a mathematical model // *Philos. Trans. R. Soc. B.* — 2014. — Vol. 369. — P. 20130223.
- Engel B. D., Schaffer M., Cuellar L. K., Villa E., Plitzko J. M., Baumeister M. Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography // *eLife* 2015;4:e04889 — DOI: 10.7554/eLife.04889
- Fedorov V. A., Kovalenko I. B., Khrushchev S. S. Comparative analysis of plastocyanin-cytochrome *f* complex formation in higher plants, green algae and cyanobacteria // *Physiologia Plantarum.* — 2019. — Vol. 166 (1). — P. 320–335.
- Gillespie D. A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions // *Journal of Computational Physics.* — 1976. — Vol. 22, No. 4. — P. 403–434.

- Govindjee. The Photosynthesis Page. — <http://www.life.illinois.edu/govindjee/>
- Gross E. L., Rosenberg I. A brownian dynamics study of the interaction of Phormidium cytochrome f with various cyanobacterial plastocyanins // *Biophys. J.* — 2006. — Vol. 90. — P. 366–380.
- Higgins J. A. A chemical mechanism for oscillations in glycolytic intermediates in yeast cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1954. — Vol. 51. — P. 989–994.
- Higgins J. A. The theory of oscillating reactions // *Ing. Chem.* — 1967. — Vol. 59 (5). — P. 18–62.
- Holzappel C., Bauer R. Computer simulation of primary photosynthetic reactions compared with experimental results on O₂-exchange and chlorophyll fluorescence of green plants // *Z. Naturforsch.* — 1975. — Vol. 30. — P. 489–498.
- Kirchhoff H., Mukherjee U., Galla H.-J. Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone // *Biochemistry.* — 2002. — Vol. 41. — P. 4872–4882.
- Kovalenko I. B., Abaturva A. M., Gromov P. A. Direct simulation of plastocyanin and cytochrome f interactions in solution // *Phys. Biol.* — 2006. — Vol. 3. — P. 121–129.
- Kovalenko I. B., Diakonova A. N., Ryznichenko G. Yu., Rubin A. B. Computer simulation of interaction of photosystem 1 with plastocyanin and ferredoxin // *BioSystems.* — 2011. — Vol. 103. — P. 180–187.
- Kovalenko I. B., Knyaseva O. S., Antal T. K. Multiparticle Brownian dynamics simulation of experimental kinetics of cytochrome bf oxidation and photosystem 1 reduction by plastocyanin // *Physiologia Plantarum.* — 2017. — Vol. 161. — P. 88–96.
- Lazár D. Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity // *J. Theor. Biol.* — 2003. — Vol. 220. — P. 469–503.
- Lazár D. Simulations show that a small part of variable chlorophyll a fluorescence originates in photosystem I and contributes to overall fluorescence rise // *J. Theor. Biol.* — 2013. — Vol. 335. — P. 249–264.
- Malkin S. Fluorescence induction studies in isolated chloroplast. On the electron-transfer equilibrium in the pool of electron acceptors of photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1971. — Vol. 234. — P. 425–427.
- Malthus T. R. An essay on the principal of Population. — London: Charleston, 1798. — 126 p.
- Michaelis L., Menten M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung // 1913. — Vol. 49. — P. 333–369.
- Monod J. La technique de culture continue. Theorie et applications // *Ann. Inst. Pasteur.* — 1950. — Vol. 79. — P. 390–410.
- Papioan G. A. Coarse-Grained Modeling of Biomolecules. — CRC-Press, 2017. — 430 p.
- Pearson D. C., Gross E. L. Brownian Dynamics Study of the interaction between plastocyanin and cytochrome f // *Biophysical Journal.* — 1998. — Vol. 75. — P. 2698–2711.
- Ryznichenko G. Yu., Lebedeva G. V., Demin O. V. Kinetic mechanisms of biological regulation in photosynthetic organisms // *J. Biol. Phys.* — 1999. — Vol. 25. — P. 177–192.

- Riznichenko G. Yu., Kovalenko I. B. Multiparticle Models of Brownian Dynamics for the Description of Photosynthetic Electron Transfer Involving Protein Mobile Carriers // *International Journal of Applied Research in Bioinformatics*. — 2019. — Vol. 9 (1). — P. 1–19.
- Ruban A. The photosynthetic membrane: molecular mechanisms and biophysics of light harvesting. — Wiley, 2012. — 282 p.
- Rubin A. B., Riznichenko G. Yu. Modeling of the primary processes in a photosynthetic membrane // *Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems* / A. Laisk, L. Nedbal, Govindjee (eds.). — Vol. 29. — Dordrecht: Springer, 2009. — P. 151–176.
- Rubin A. B., Riznichenko G. Yu. *Mathematical Biophysics*. — NY: Springer, 2014. — 273 p.
- Stirbet A., Govindjee, Strasser B. J., Strasser R. J. Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: modelling and numerical simulation // *J. Theor. Biol.* — 1998. — Vol. 193. — P. 131–151.
- Strasser R. J., Stirbet A. D. Estimation of the energetic connectivity of PS II centers in plants using the fluorescence rise (O-J-I-P) — Fitting of experimental data with to three different PS II models // *Math. Comput. Simulat.* — 2001. — Vol. 56. — P. 451–461.
- Verhulst P. F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement // *Corr. Math. et Phys.* — 1838. — Vol. 10. — P. 113–121.
- Volterra V. *Lecçons sur la théorie mathématique de la lutte pour la vie*. — Paris: Gauthiers-Villars, 1931. — 222 p.
- Vredenberg W., Prasil O. Modeling of chlorophyll a fluorescence kinetics // *Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems* / A. Laisk, L. Nedbal, Govindjee (eds.). — Vol. 29. — Dordrecht: Springer, 2009. — P. 125–149.
- Zhu X.-G., Govindjee, Baker N. R. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete set of excitation energy and electron transfer associated with photosystem II // *Planta*. — 2005. — Vol. 223. — P. 114–133.

Mathematical modeling of processes in a living cell on the example of models of primary photosynthesis processes

G. Yu. Riznichenko, A. B. Rubin

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Department of Biophysics,
Russia, 119991 Moscow, Leninskiye Gory, 1, building 12
E-mail: riznich@biophys.msu.ru

The current state and prospects for the development of modeling processes in a living cell, the possibilities and advantages of the system-dynamic and agent-based approaches are discussed. The basic principles and examples of kinetic, Brownian and molecular modeling are demonstrated using the example of modeling processes in an energy-converting photosynthetic membrane. Detailed kinetic models make can be used to study the dynamics of process-

es in the photosynthetic membrane that are inaccessible to direct experimental measurement. We can estimate the rate constants of individual reactions according to experimental data, to trace changes in the characteristics of photosynthesis of autotrophic organisms during culture growth, under different lighting conditions, under stress conditions. Computer multiparticle models explicitly model the Brownian diffusion of mobile protein carriers and their electrostatic interactions with multienzyme complexes both in solution and in the interior of the biomembrane, the influence of the geometry of the reaction volume, ionic strength and pH of the cellular medium on the rate of electron transport reactions between carrier proteins. The methods of Brownian and molecular dynamics provide a consistent description of the role of Brownian motions, electrostatic interactions, and conformational rearrangements of molecules in the formation of the final reaction protein-protein complex. The combined use of kinetic, Brownian, and molecular modeling methods makes it possible to study the regulation of an integral system of electron transport processes at the subcellular and molecular levels, the mechanisms of switching electron flows in plant and algae cells, and to evaluate the optimal conditions for obtaining target products by microalgae cells. The material of the article is based on the results of research carried out at the Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University.

Keywords: photosynthesis, electron transport, fluorescence, kinetic models, multiexponential approximation, Monte-Carlo method, multiparticle Brownian models, molecular modeling, electrostatic interactions.

СИММЕТРИИ, ХИРАЛЬНОСТЬ, МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАШИНЫ

В. А. Твердислов¹, Е. В. Малышко¹

Биофизика — наука о физических основах организации и функционирования живых систем, а также о принципах и механизмах совершения «полезной работы» (выполнения биологической функции) биологическими машинами. Молекулярная машина есть иерархическое устройство, циклически сопрягающее преобразование формы энергии, необходимое для совершения полезной работы, и череду преобразований или переключений симметрии в ее регулярных структурных элементах, реализующих выделенные «механические» степени свободы, при сборке и функционировании. Молекулярные машины являются иерархически организованными динамическими хиральными конструкциями.

Предложена и обоснована концепция, согласно которой хиральный дуализм углеродных соединений является физической симметрией основой структурообразования и системных взаимодействий в молекулярной биологии. В макромолекулярных системах впервые выделены как хиральные инварианты знакопеременных иерархий хиральных структур в последовательностях от «нижнего» асимметричного атома углерода в sp^3 -гибридизации до спиралей, суперспиралей и спиральных надмолекулярных структур цитоскелета. Отмечено чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурной организации ДНК для наиболее распространенной В-формы. Последовательность смены знака хиральности в иерархии белковых структур подобна, но стартует с левого энантиомера: L-D-L-D.

Выявленная закономерность позволяет прогнозировать разработку биотехнологии сборки молекулярных машин с заданными свойствами.

Ключевые слова: термодинамика, симметрии, хиральность, молекулярные машины, самоорганизация, сборка, фолдинг, ферменты, бионанотехнологии.

«Насколько я знаю, все физические результаты
a priori имеют свои источники в симметрии».

Герман Вейль

«Развитие Вселенной с момента ее возникновения выглядит
как непрерывная последовательность нарушений симметрии...

Феномен жизни естественно вписывается в эту картину».

Фриман Дж. Дайсон

«Одним из основных направлений биофизики XXI века будет
развитие представлений о молекулярных машинах».

Лев А. Блюменфельд

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики, 119234 Москва, Россия.
E-mail: tverdislov@mail.ru, ev.malyshko@physics.msu.ru

Со времен классической физики в биологии складывалось мнение о том, что в основе развития живых систем, включая биологическую эволюцию, лежит, в первую очередь, энергетический фактор, поддерживающий процессы самоорганизации [Умов, 1916; Пригожин, 2002]. По-видимому, это не совсем так. Сами процессы самоорганизации, включающие упорядочивание в системе, с необходимостью включают обратные связи, канализирующие процессы диссипации энергии. Потоки и преобразования форм энергии неразрывно связаны с другим фундаментальным физическим фактором, геометрически характеризующим особым качеством материи — симметрией.

В последнее время в научном сообществе все более укрепляется мнение, ранее утвердившееся в современной физике, о том, что понятие симметрии является значимым не столько в ее проявлениях в структурах неживой и живой природы, сколько в фундаментальных представлениях о формировании и эволюции неживой и живой материи. Сформировалось понимание того, что конструктивная эволюционная ветвь движения материи, связанная с формированием и развитием сложных, в том числе живых, систем в процессах самоорганизации, имеет не только энергетические, но и сопряженные симметричные основания. Максимальной симметрией обладает изотропное бесконечное пространство, не способное выполнять функции машины, поскольку, в принципе, не обладает свойствами создавать «конструкции» [Блюменфельд, 2002; Чернавский, 1999]. Понижение энтропии в развивающихся сложных системах в ходе эволюции сопровождается понижением ранга симметрии специализированных, эволюционно отбираемых и фиксируемых элементов. Фактор симметрий в конечном счете определяет движение системы по «координате реакции», особенно на уровне супрамолекулярных конструкций типа биомакромолекул.

Наиболее значимым выражением этого неразрывного сопряжения служит озарение человеческой мысли столетней давности. Речь идет о теоремах Эмми Нётер: *законам сохранения в физике соответствуют определенные формы симметрии. К примеру, закону сохранения энергии в механике соответствует симметрия времени и т. д.* [Noether, 1918].

Необратимые процессы в линейной области необязательно сопрягаются, но, если они сопрягаются, то скалярный (изотропный) процесс сопрягается со скалярным, векторный — с векторным. Еще один принцип сопряжения энергий и симметрий известен как «принцип симметрии Кюри – Пригожина»: *внешние воздействия, вызывающие различные явления в макроскопической системе, не могут обладать более высокой симметрией, чем порождаемый ими процесс. При сопряжении не может снижаться степень симметрии. Скалярный процесс не может породить векторный* [Пригожин, 2002]. Обращаем внимание читателей на то, что понятию «повышения симметрии» в данном контексте соответствует снижение степени (ранга) симметрии. Иными словами, упорядоче-

нию в системе, согласно источнику, сопутствует понижение ранга симметрии. В дальнейшем мы будем придерживаться подобной терминологии.

В нелинейной области в открытых системах данный принцип не выполняется. Здесь может произойти «потеря или нарушение симметрии», или же самопроизвольное возникновение пространственных структур в исходно однородной среде — «диссипативных структур» (например, гидродинамических термоячеек Бенара или автоволн при сопряжении химической реакции и диффузии, как это происходит в цветной химической реакции Белоусова) [Николис, 1979].

Обе означенные выше закономерности имеют непосредственное отношение к структурам и функциям молекулярных биологических машин, поскольку их формирование и функционирование непосредственно связано с нарушениями симметрии, сопряженными с преобразованием форм энергии при совершении «полезной работы», которая и является биологической функцией — транспортной, сократительной, ферментативной и пр. Так, к примеру, в белке-ферменте машинность проявляется в механо-химических переходах, а именно, в реализации прецизионных конформационных смещений в активном центре, реализующих специфическое каталитическое действие [Блюменфельд, 2002; Чернавский, 1999].

В неживой природе в нелинейных системах и в биомолекулярных системах при самосборке сопряжение энергетических и симметричных преобразований может происходить спонтанно в процессах диссипации энергии [Пригожин, 2002; Твердислов, 2019]. При этом нарушение симметрии и понижение ее ранга в элементах системы (образование диссипативных структур) является следствием в едином процессе. В молекулярных машинах, напротив, симметричные особенности элементов ее конструкции определяют череду преобразований форм энергии, приводящую, как следствие, к совершению полезной работы. Диссипативные системы/активные среды создают симметрии и переключают их в процессах самоорганизации, а биологические машины/молекулярные машины используют их в процессах преобразования форм энергии.

Машиной можно назвать устройство, обладающее специальной конструкцией, способное в циклическом режиме преобразовывать энергию, совершая полезную работу благодаря наличию «выделенных механических, в том числе квантово-механических, степеней свободы», кинетически разделяющих работу и диссипацию. Молекулярные машины ввиду их малых размеров работают в изотермических условиях.

В следующем разделе мы рассмотрим роль симметричных процессов в самосборке биологических молекулярных машин, а далее выскажем соображения о самих машинах.

Хиральный дуализм и нарушения симметрии как инструмент стратификации уровней структурной организации в биомакромолекулах

В настоящей статье авторы делают акцент на представлениях о ключевой роли симметрий в формировании и работе молекулярных машин. Явление симметрии в целом было бы слишком широко и неопределенно для использования ее Природой в качестве конкретного количественного инструмента биологической эволюции в целом и морфогенеза в частности. Живая природа в своем развитии, если не всегда «рациональна», то достаточно «экономна» в подборе и использовании доступных ресурсов и ходов. Вероятно, по этой причине биологическая эволюция сделала одной из своих основ минималистский принцип бинарности, широко представленный в неживой природе (электрический заряд, спин). Поэтому представляется эволюционно рациональным включение хирального дуализма в химическую палитру органических соединений земных форм жизни.

Как правило, в научной и популярной литературе гомохиральность мономеров, составляющих биополимеры (левые L-аминокислоты в белках, правые D-сахара в полисахаридах и рибоза и дезоксирибоза в нуклеиновых кислотах, L-липиды и фосфолипиды мембран у эукариотов) трактуется как досадная побочная, дорогостоящая компенсаторная необходимость, произошедшая при выборе углерода в качестве основы макромолекулярного устройства земных форм жизни. Из-за того, что углерод в sp^3 -гибридизации способен становиться асимметричным углеродом и равновероятно образовывать правые и левые хиральные соединения с тетраэдрической симметрией. В этом случае рациональность биологической гомохиральности объясняется только той причиной, что неизмеримо вырос бы объем необходимой информации в геноме для однозначного кодирования гипотетических гетерохиральных структур у гипотетических гетерохиральных организмов. Иными словами, гомохиральность воспринимается как плата за использование углерода, способного производить хиральные соединения. Однако странно, что в рамках этой концепции абсолютно не рассматривается возможность построения углеродной жизни на ахиральной основе!

Вероятно, найдено куда более интересное и богатое возможностями решение проблемы. *Гомохиральность не есть плата, а есть важнейший механизм структурообразования во всей молекулярной биологии* [Твердислов, 2015, 2019]. В самом общем представлении: *хиральный дуализм является ключевым симметричным фактором иерархического структурообразования и периодической системности всей молекулярной биологии, основанном на принципе нарушения симметрии (смены знака хиральности) при формировании высших уровней регулярных внутри- и надмолекулярных структур.*

В своей работе для описания молекулярно-биологических систем мы будем использовать классическое определение хиральности, предложенное еще лордом Кельвином: хиральность — особое свойство какой-либо молекулы или объекта, не позволяющее ему быть совмещенным со своим зеркальным отображением при любых вариациях перемещений и вращений в трехмерном пространстве. В энантиомере (энантиоморфе) отсутствуют осевая симметрия и симметрия относительно сторон. В живых системах хиральная асимметрия обусловлена гомохиральностью органических молекул, составляющих первичные структуры биологических макромолекул: левых аминокислот в белках, синтезируемых в рибосомах, и правых сахаров рибозы и дезоксирибозы в нуклеиновых кислотах. Все основные углеводы, структурные и включенные в метаболические цепи, правые. Мембраны клеток эукариотов составлены гомохиральными семействами левых (фосфо)липидов и холестерина. Известные отклонения от этой закономерности связаны со специальными функциями соединений и особенностями их синтеза.

В 1966 году была создана непротиворечивая система описания стереоизомеров — R,S-номенклатура Кана–Ингольда–Прелога [Cross, 1974]. Для установления конфигурации соединения проводится нумерация заместителей у асимметрического центра соединения по правилам последовательного старшинства. Заместители рассматриваются наблюдателем с наиболее удаленной от самого младшего заместителя стороны. Если направление убывания старшинства совпадает с движением *по часовой стрелке*, то конфигурацию данного асимметрического центра обозначают символом R (от лат. *rectus* — правый), а если *против часовой стрелки* — символом S (от лат. *sinister* — левый). Оказалось, что большинство D-стереоизомеров обладают (R)-конфигурацией, а L-стереоизомеры, как правило, принадлежат к (S)-ряду. Отметим, что данная система может быть распространена на выявление хиральности более сложных структур типа спиралей и суперспиралей [Sidorova, 2021].

Авторами настоящей статьи и их коллегами предложена и обоснована концепция, согласно которой хиральный дуализм углеродных соединений является физической симметричной основой структурообразования в молекулярной биологии, а гомохиральность аминокислот, рибозы и дезоксирибозы является ресурсом свободной энергии и инструментом стратификации внутримолекулярных и надмолекулярных структурных уровней [Твердислов, 2015, 2019; Tverdislov, 2020]. Ниже обсуждаются физические причины чередования знака хиральности внутри- и надмолекулярных структурных уровней L-D-L-D для белков и D-L-D-L для ДНК. Фолдинг в макромолекулах будет кратко рассмотрен как автоволновой процесс самоорганизации в активных средах.

Ранее авторами было показано, что иерархии первичной, вторичной и т. д. структур белков и нуклеиновых кислот характеризуются сменой размерности —

типов симметрии, увеличением масштабов и чередованием знаков хиральности, определяющих их физические особенности и молекулярно-биологические функции. В макромолекулярных системах нуклеиновых кислот и белков были впервые выделены как целое, как хиральные инварианты молекулярной биологии знакопеременные иерархии хиральных структур в последовательностях от «нижнего» асимметричного атома углерода в sp^3 -гибридизации до суперспиралей и надмолекулярных структур. Отмечено чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК. Две базовые первичные полимерные цепочки ДНК составлены молекулами D-дезоксирибозы. Цепочки соединены нуклеиновыми основаниями в «левой» гош-конформации, а все вместе они образуют известную «правую» двойную спираль ДНК. У бактерий кольцевая «правая» спираль скручивается в «левую» суперспираль. У эукариот «правая» двойная спираль ДНК обвивает гистоновый октамер «левым» образом.

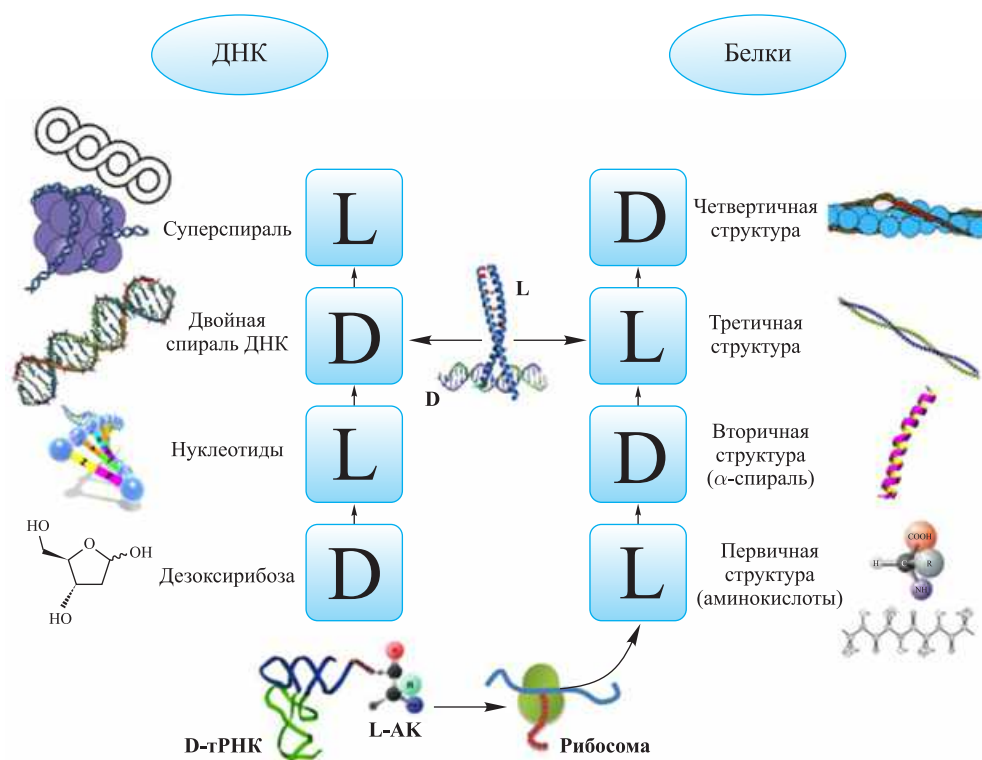


Рис. 1. Периодическая таблица знакопеременных иерархий хиральных (спиральных) структур от первичной до четвертичной для ДНК (левая колонка) и белков (правая колонка): L — левая конфигурация энантиомера или спирали, D — правая [Твердислов, 2019]

Первичная структура белков образована последовательностью «левых» аминокислотных остатков. Образуя вторичные структуры, они скручиваются в «правые» α -спирали, которые, в свою очередь, сворачиваются в букеты «левых» суперспиралей. Четвертичные структуры белков, собирающиеся уже из самостоятельных молекул, снова образуют «правые» витые конструкции. У белков последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии: L-D-L-D.

В целом, можно считать, что с точки зрения хиральности молекулярная биология является периодической системой иерархий знакопеременных хиральных структур, а центральный блок, состоящий из четырех структурных уровней белков и ДНК, образует замкнутый ахиральный инвариант. Им завершается уровень молекулярной биологии, выше находится цитологический уровень со своими симметрическими особенностями [Малышко, 2020].

Хиральность — дуалистическое свойство, определяющее, как мы теперь понимаем, не только особенности статической пространственной иерархической организации макромолекул, но и траекторию процессов их пространственной самоорганизации — фолдинга. Гомохиральность первичной структуры белков, составленной левыми аминокислотными остатками, или цепочки правых молекул (дезоксир)ибозы у нуклеиновых кислот обуславливает наличие в системе рассредоточенного запаса свободной энергии, что придает ей свойства одномерной активной среды и создает предпосылки автоволновой самоорганизации — формирования спиральных, суперспиральных и складчатых регулярных структур. Это соображение, в принципе, не тривиально и, по-видимому, впервые обсуждается в наших работах. Отмеченные вложенные структуры, в свою очередь, образуют «выделенные механические степени свободы», свойственные молекулярным машинам. Периодический характер структур молекулярных машин и принципиальная цикличность их работы явным образом предполагают наличие волновых процессов в ходе их функционирования. Понятна природа делокализованного ресурса энергии — гомохиральность структур всех важнейших классов биомacroмолекул. Реализуется давняя гипотеза «конформационных волн», теперь уже в представлениях активных сред и автоволновой самоорганизации.

Формирование знакопеременных хиральных иерархий в макромолекулярных структурах обусловлено четкой физической причиной — стремлением системы понизить исходный уровень свободной энергии, образующийся при энергозависимом отборе гомохиральных мономеров первичных структур макромолекул из их рацемических смесей. Заметим, что в неживой природе имеется множество примеров спонтанного формирования подобных иерархий, а живая природа успешно адаптировала этот принцип [Твердислов, 2019].

В 1968 году Сайрус Левинthal сформулировал известный парадокс: «Промежуток времени, за который полипептид приходит к своему скрученному состоянию, на много порядков меньше, чем если бы полипептид просто перебирал все возможные конфигурации» [Levinthal, 1969]. Этот же термин относят и к проблеме свертывания нуклеиновых кислот. Объяснение этого парадокса связывают с предположением о существовании воронки в конфигурационном пространстве на поверхности потенциальной энергии со сложным ландшафтом, которая втягивает процесс сворачивания полипептидной цепи в нативную конформацию. Предполагается, что эта воронка, характеризующаяся минимумом свободной энергии, задает направление траектории фолдинга в конфигурационном пространстве макромолекулы, проходящей через цепочку локальных минимумов энергии. Однако этот образ не наполнен физическим содержанием, принцип не конкретизирован механизмом. Мы предполагаем, что обнаруженные нами знакопеременные хиральные комплементарные друг к другу последовательности структурных уровней D-L-D-L и L-D-L-D для ДНК и белков образуют ту самую «нить Ариадны», которая направляет фолдинг макромолекул по необходимой траектории в ловушку Левинтала.

Термодинамические обоснования состоят в следующем. Известно, что гомохиральная молекулярная субстанция, будь то раствор аминокислот или углеводов, подвергается рацемизации, стремясь уравнять концентрации энантиомеров, повышая до максимума энтропию системы и понижая уровень ее свободной энергии. Вместе с тем, для линейного гомохирального полимера имеется принципиальная возможность понизить свою свободную энергию не только за счет рацемизации мономеров (назовем это «горизонтальной» рацемизацией), но и за счет «вертикальной» рацемизации: за счет создания структур высшего уровня с другим знаком хиральности. В данном рассмотрении в качестве частиц в системе выступают не сами «асимметричные углероды», а «правые» и «левые» структурные единицы разного уровня организации. Таким образом, система «размазывает» свою исходную гомохиральность, понижая свободную энергию, и это сопровождается появлением у части или всех макромолекул более устойчивого (стабильного, долгоживущего, жесткого) каркаса, нежели в исходном состоянии.

Смещение по фазе знака хиральности соответствующих структурных уровней белков и нуклеиновых кислот на половину периода, по всей вероятности, служит кодом распознавания «свой-чужой» для этих важнейших классов биомолекул. В таком случае все поле молекулярно-биологических соответствий представляется в виде периодической таблицы — шахматной доски, где по клеткам хиральности передвигаются и взаимодействуют хиральные химические соединения.

Физические принципы функционирования молекулярных машин как хиральных иерархических устройств

Подход, разрабатываемый авторами, вслед за фундаментальной физикой, теперь уже в биологии, основан на представлениях о симметричной природе организации и развития материи [Твердислов, 2015, 2019]. Самоорганизация всегда есть спонтанное нарушение симметрии с понижением ее ранга в термодинамически открытой системе. Машина в целом, благодаря своей конструкции, понижает ранг симметрии в процессе преобразования энергии, вещества или информации. Более того, в любой машине должен быть, как минимум, один конструктивный элемент, который однонаправленно изменяет тип симметрии, заданный исходным состоянием рабочего тела в начале цикла и изменяющийся при переходе энергии (силы) по степеням свободы (колебательным, вращательным, поступательным).

Многие десятилетия остается открытым принципиальный вопрос относительно того, зачем, к примеру, ферменту «нужна» большая глобула, сложно иерархически организованная. Казалось бы — каталитический акт происходит локально, в активном центре фермента, и этого достаточно. Общий ответ имеется: фермент — молекулярная машина, конструкция. То, что окончательная нативная структура белка формируется исключительно в полно синтезированной цепи, свидетельствует о принципиальной роли интегрального энтропийного фактора, на наш взгляд связанного с симметриями, тогда как энтальпийный фактор срабатывает в локальных процессах структурообразования. Мы считаем, что не только фермент, но любая преобразующая вещество, энергию или информацию молекулярная биологическая машина имеет «большое тело» с хирально детерминированной иерархической структурой для двух целей: для работы всей конструкции как машины и для системного распознавания ею хиральных молекул-партнеров.

В настоящей статье авторы не предполагают излагать даже частично цельную теорию молекулярных машин, а намерены обозначить некоторые существенные, на наш взгляд, аспекты их устройства и функционирования. Первое упоминание о *молекулярных машинах* в русскоязычной научной литературе содержалось в статьях Ю. И. Хургина, С. Э. Шноля и Д. С. Чернавского [Шноль, 1967; Чернавский, 1967], фундаментальный вклад в развитие теории молекулярных машин внес Л. А. Блюменфельд [Блюменфельд, 2002].

Заметим, что наш выдающийся соотечественник профессор Московского университета физик Н. А. Умов в самом начале прошлого века, рассуждая о машинах и сравнивая их работу с работой живых организмов, отмечал, что машины «умеют» из беспорядка создавать направленные движения [Умов, 1916]. У него речь шла о тепловых машинах и водяном паре с хаотически дви-

жущимися молекулами, который, благодаря специальной конструкции паровоза, направленно движет весь состав. Так, давление пара в цилиндре паровоза, движущее поршень, изотропно, но сам паровоз векторно движется из Москвы в Санкт-Петербург. Свободная энергия, освобождающаяся при гидролизе АТФ, изотропна, а векторная направленность механохимического преобразования в сократительных системах клеток или электро-механо-химического «полезного» действия в мембранных ионных насосах имеет четко выраженную направленность. Эти его рассуждения вполне современно звучат и в наше время.

В англоязычной и отечественной литературе существуют исторически сложившиеся разночтения в понятиях молекулярного мотора и машины, а также механизма и машины. Как и в макросистемах, мотор является движущим элементом, входящим в конструкцию всей машины, совершающей полезную работу. Существует также понятие «простая машина». Простая машина типа рычага или блока только изменяет направление или величину силы без преобразования формы энергии, но в нашей классификации является «механизмом», а не машиной.

В инженерном машиноведении существует обширная классификация деталей машин и конструктивных элементов, которую в определенной степени можно использовать и в теории молекулярных машин [Блюменфельд, 2002; Чернавский, 1999; Шноль, 1967]. В структуре «белка-машины» в качестве конструктивных элементов можно выделить «балки», «фермы», «механизмы» и пр. Одни конструкции составляют статические детали устройства, другие могут передавать внутри системы силу или энергию. В таких динамических устройствах включается в фазу преобразования типа симметрии и формы энергии «рабочее тело». В макроскопических технических устройствах «рабочее тело» и конструктивные элементы машины разнесены функционально и пространственно. В биологических молекулярных машинах вследствие миниатюризации физических устройств эти подсистемы соединяются и конструктивно, и функционально.

Молекулярные машины, как, впрочем, и макроскопические рукотворные машины, «хиральны» по своей сути — они работают по направленному циклу, что подпадает под определение хиральности, как, например, стрелочные часы — «машина времени». При этом речь уже идет не о традиционной статической конструкции, соответствующей классическому определению хиральности, а о динамическом устройстве [Твердислов, 2019].

В задачи настоящего обсуждения входит изложение нового базового положения о молекулярных машинах как динамических хиральных устройствах, в которых роль конструктивных элементов, реализующих «выделенные медленные (квази)механические степени свободы», играют спиральные и суперспиральные внутри- и надмолекулярные структуры белков, а роль вентильных

переключающих элементов выполняют те же нелинейные по механо-химическим свойствам конструкции. В этом отношении можно сказать, что «конструктивные элементы» и «рабочее тело» в молекулярных машинах, в отличие от макроскопических машин, объединены в одних структурных элементах конструкции (см. [Аветисов, 2013]).

Когда мы говорим о иерархичности макроскопических рукотворных машин, мы подразумеваем, что функциональные уровни в них структурно и пространственно разнесены, локализованы. Молекулярная машина, по-видимому, организована иначе по причине иного кинетического принципа работы. В ней в общих структурах объединены и «рабочее тело» машины, и ее конструктивные элементы и, более того, не локализованы, а структурно сопряжены управляющий (регулирующий) и исполнительный уровни функционирования. Это как раз и есть регулярно организованные спиральные, трубчатые и складчатые внутри- и надмолекулярные структуры. По-видимому, из-за того, что в молекулярных машинах на микроуровне в условиях теплового шума энергетически не реализуем режим «прецезирования» фазы цикла, то система запуска цикла функционирует в «ждущем режиме», а сам цикл осуществляется как релаксационный процесс [Blumenfeld, 1994; Блюменфельд, 2002]. Запуск, например, ферментативного цикла, осуществляется при присоединении полного числа участников процесса — субстрата и эффекторов. Так, для запуска транспортного цикла мембранного Na-насоса (Na,K-АТФазы) к ферменту должны «правильно» и в нужном порядке присоединиться $Mg \cdot АТФ$, 3 иона Na, 2 иона K, только после чего насос-машина проведет весь белковый комплекс по «координате реакции» — сложной релаксационной последовательности структурных (конформационных) перестроек [Твердислов, 1987].

Как мы уже упоминали, каждая машина является устройством, преобразующим форму энергии сопряженно с изменением ранга симметрии, независимо от того, является ли «полезная работа» буквально физической «работой» или преобразованием вещества, или информации. При этом совершенно не обязательно предполагать, что это механическая машина. Машина может быть электрической, электронной, механохимической и пр. При этом в любой машине должен существовать нелинейный «вентильный/выпрямляющий» механизм — устройство, которое осуществляет нарушение симметрии, переводя, например, колебательное движение маятника в строго однонаправленное движение, как это бывает в механических маятниковых часах (анкерный механизм) или в лебедках и кабестанах (храповик и собачка). Ограничения, вызываемые тепловыми флуктуациями при уменьшении размеров до микроскопических на примере «храповика и собачки», подробно рассмотрены в известном курсе физики Фейнмана и последующих работах Блюменфельда, Чернавского, Иваницкого. Мы не будем останавливаться на деталях этого рассмотрения, но отметим наи-

более существенное с точки зрения биофизики: на уровне размерных масштабов, свойственным для тепловых флуктуаций, вентильные свойства системы «храповик–собачка» теряются, поскольку перестают существовать макроскопические степени свободы с локализованными на них выделенными вращательными, поступательными, колебательными степенями свободы, перешедшими в микромасштабах в смешанные тепловые степени свободы. Живая природа эволюционным отбором, по-видимому, построила миниатюрные молекулярные машины на уровне минимальных по размерам конструкций в *макромолекулах*, которых все-таки могут включать детали, способные реализовывать выделенные механические степени свободы, которые за времена, характерные для срабатывания молекулярных машин, не успевают рассеять энергию по тепловым степеням свободы, иначе говоря, будучи механическими, быть кинетически отделенными от диссипативных процессов.

Молекулярные машины рассматриваются авторами как иерархически организованные устройства, включающие хиральные по своей структуре элементы конструкций — «жесткие» фермы, а также системы рычагов и шарниры. Это элементы, каждый из которых обладает возможностью передавать силу (энергию) внутри конструкции по выделенным степеням свободы. Спираль — уникальный и простейший нелинейный («вентильный» — выпрямляющий, пропускающий в одну сторону) элемент конструкций молекулярных машин, способный реализовывать поступательные и вращательные степени свободы. Цикличность как принципиальная характеристика машины предполагает обязательное наличие симметрий в конструкции, а для движения по циклу в «правильном» направлении — несимметричного элемента, обладающего свойством «вентилia», т. е. конструкции типа «храповик–собачка». В самом упрощенном представлении плотно свернутая спираль обладает свойствами механического замка или вентиля: при небольших поворотах в сторону закрутки спирали в ней возникают большие напряжения, препятствующие вращению, тогда как разворот спирали в противоположном направлении осуществляется с легкостью. По-видимому, и для α -спиралей (разумеется, с учетом кооперативного замыкания и размыкания водородных связей между аминокислотными остатками при поворотах). Не менее интересны механические свойства суперспиралей в рассмотрении вращательных напряжений в них.

Заключение

В проблеме молекулярных машин можно выделить два общих принципиальных аспекта, связанных с явлениями симметричности, в частности, с хиральностью — их самосборку и непосредственно их работу. И в том, и в другом случае рассмотрение проблемы напрямую связано с представлениями об иерар-

хичности внутри- и надмолекулярных структур, сопряженных в рамках развиваемой модели симметричными перестройками, связанными с их хиральными характеристиками.

Развитие представлений о молекулярных машинах, на наш взгляд, включает выяснение общих принципов формирования выделенных механических степеней свободы с участием вторичных, третичных и четвертичных уровней структуры макромолекул. Конкретно, белков и нуклеиновых кислот. Что можно с определенностью сказать на настоящий момент по данному вопросу на основании изложенного в статье материала, так это то, что внесение в биофизику макромолекул представлений о хирально-контролируемых иерархиях позволило выявить физическую основу дискретности, позволяющей предметно разбирать механизмы функционирования молекулярных машин.

Развитие представлений о фолдинге в рамках развиваемого подхода будет в первую очередь связано с описанием его энтальпийных и энтропийных термодинамических характеристик на отдельных этапах самосборки.

Следующий этап развития теоретических представлений о работе молекулярных машин может быть связан с выяснением и систематизацией механических свойств спиральных и суперспиральных структур, β -структур белков, нерегулярных структур макромолекул как структур, в целом реализующих комплекс выделенных степеней свободы. Необходимо выяснение особенностей их коллективного (когерентного) поведения в проведении машинного цикла, включая энергетическое описание элементарных актов процесса.

Среди множества возможных направлений практического использования развиваемого симметричного подхода в биофизике макромолекул одним из самых актуальных и интересных представляется выяснение и систематизация хиральных соответствий при взаимодействиях «правых» и «левых» хиральных лекарственных препаратов с хиральными структурами макромолекул-мишеней, белков и нуклеиновых кислот.

Исследование выполнено при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Фундаментальные и прикладные исследования космоса» и частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-00082).

Литература

- Аветисов В. А., Иванов А. Х., Мешков Д. А., Нечаев С. К. Фрактальная глобула как молекулярная машина // Письма в ЖЭТФ. — 2013. — Т. 98, № 4. — С. 270–274.
- Блюменфельд Л. А. Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики. — М.: Эдиториал УРСС, 2002. — 158 с.

- Малышко Е. В., Муртазина А. Р., Твердислов В. А. Хиральность как физическая основа иерархической периодизации структур биомакромолекул // *Биофизика*. — 2020. — Т. 65, № 2. — С. 213–218.
- Николис Г., Пригожин И. Самоорганизация в неравновесных системах: От диссипативных структур к упорядоченности через флуктуации. — М.: Мир, 1979. — 512 с.
- Пригожин И., Кондепуди Д. Современная термодинамика. От тепловых двигателей до диссипативных структур. — М.: Мир, 2002. — 464 с.
- Твердислов В. А., Малышко Е. В. О закономерностях спонтанного формирования структурных иерархий в хиральных системах неживой и живой природы // *Успехи физических наук*. — 2019. — Т. 189, № 4. — С. 375–385.
- Твердислов В. А., Малышко Е. В., Ильченко С. А. От автоволновых механизмов самоорганизации к молекулярным машинам // *Известия Российской академии наук. Серия физическая*. — 2015. — Т. 79, № 3. — С. 1728–1732.
- Твердислов В. А., Тихонов А. Н., Яковенко Л. В. Физические механизмы функционирования биологических мембран. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1987. — 187 с.
- Умов Н. А. Собрание сочинений профессора Николая Алексеевича Умова. Т. 3. Речи и статьи общего содержания / Под ред. и с примеч. А. И. Бачинского. — М.: Типо-литогр. т-ва И. Н. Кушнерев и К°, 1916. — 666 с.
- Чернавский Д. С., Хургин Ю. И., Шноль С. Э. Об упругих деформациях белка-фермента // *Мол. биол.* — 1967. — Т. 1. — С. 419–424.
- Чернавский Д. С., Чернавская Н. М. Белок — машина. Биологические макромолекулярные конструкции. — М.: Янус-К, 1999. — 256 с.
- Шноль С. Э., Чернавский Д. С., Хургин Ю. И. Молекула белка-фермента как механическая система // *Колебательные процессы в биол. и хим. системах*. — М.: Наука, 1967. — С. 42–50.
- Blumenfeld L. A., Tikhonov A. N. Biophysical thermodynamics of intracellular processes: molecular machines of the living cell. — NY: Springer-Verlag, 1994. — P. 177.
- Cross L. C., Klyne W. Rules for the Nomenclature of Organic Chemistry: Section E: Stereochemistry // *Pure Appl. Chem.* — 1974. — Vol. 45. — P. 11–30.
- Levinthal C. How to Fold Graciously // *Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems Proceedings. Proceedings of a Meeting Held at Allerton House, Monticello, Illinois. University of Illinois Bulletin*. — 1969. — Vol. 67. — P. 22–26.
- Noether E. Invariante Variationsprobleme // *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Mathematisch-Physikalische Klasse*. — 1918. — P. 235–257.
- Sidorova A. E., Malyshko E. V., Lutsenko A. O., Shpigun D. K., Bagrova O. E. Protein helical structures: Defining handedness and localization features // *Symmetry*. — 2021. — Vol. 13, No. 5. — Paper number 879.
- Tverdislov V. A., Malyshko E. V. Chiral dualism as an instrument of hierarchical structure formation in molecular biology // *Symmetry*. — 2020. — Vol. 12, No. 4. — P. 587.

Symmetries, Chirality, Molecular machines

V. A. Tverdislov, E. V. Malyshko

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory, 1-2, 119234 Moscow, Russia
E-mail: tverdislov@mail.ru, ev.malyshko@physics.msu.ru

Biophysics is the science of the physical foundations of the organization and functioning of living systems, as well as the principles and mechanisms of performing «useful work» (performing a biological function) by biological machines. A molecular machine is a hierarchical device that cyclically connects the transformation of the form of energy required to perform useful work, and a series of transformations or switching of symmetry in its regular structural elements, realizing the selected «mechanical» degrees of freedom, during self-assembly and functioning. Molecular machines are hierarchically organized dynamic chiral constructs.

The concept is proposed and substantiated according to which the chiral dualism of carbon compounds is the physical symmetry basis of structure formation and systemic interactions in molecular biology. In macromolecular systems, alternating-sign hierarchies of chiral structures in sequences from the «lower» asymmetric carbon atom in sp^3 -hybridization to helices, supercoils, and cytoskeleton helical supramolecular structures have been identified as chiral invariants for the first time. An alternation of the chirality sign D-L-D-L was noted during the transition to a higher level of DNA structural organization for the most common B-form. The sequence of changing the chirality sign in the hierarchy of protein structures is similar but starts from the left enantiomer: L-D-L-D.

The revealed regularity makes it possible to predict the development of biotechnology for the self-assembly of molecular machines with desired properties.

Keywords: thermodynamics, symmetries, chirality, molecular machines, self-organization, self-assembly, folding, enzymes, bionanotechnology.

МЕТОДЫ ИНТЕГРАТИВНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРЫ И ДИНАМИКИ БИОМАКРОМОЛЕКУЛ

*А. К. Шайтан*¹

В данной статье в историческом контексте обсуждается развитие и современное значение методов молекулярного моделирования для изучения структуры и динамики биомакромолекул и биомакромолекулярных комплексов. Обсуждаются семантические значения таких терминов, как молекулярная модель, молекулярное моделирование, имитационное моделирование. Описываются возможности и ограничения современных методов молекулярного моделирования, а также экспериментальных методов структурной биологии. Вводится понятие интегративного моделирования как набора подходов, позволяющих проводить построение моделей молекулярных комплексов на основе комбинации разнородных экспериментальных данных с использованием представлений о характере физических взаимодействий между атомами и молекулами. Подходы интегративного моделирования позволяют решать задачи, которые не могут быть решены по отдельности экспериментальными методами или методами имитационного моделирования. Применение подходов интегративного моделирования проиллюстрировано на примере поиска структуры амилоидоподобных фибрилл.

Ключевые слова: биомакромолекулярные комплексы, структурная биология, молекулярное моделирование, интегративное моделирование, метод молекулярной динамики, амилоидоподобные фибриллы.

Введение

Понимание механизмов функционирования живых систем на молекулярном и супрамолекулярном уровнях является одной из ключевых задач биологии XXI века. Такое понимание важно не только с фундаментальной точки зрения, но и имеет прямые практические приложения в области медицины, здравоохранения, биоинженерии и биотехнологии. Особенностью биологических молекул является формирование ими сложных пространственных структур, которые могут перестраиваться в ходе различных функциональных процессов. Исследование структурно-динамических моделей биомакромолекул является одним из ключевых подходов к изучению механизмов функционирования живой материи

¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия.
E-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

и главной задачей структурной биологии. Методы компьютерного молекулярного моделирования являются неотъемлемой частью этого подхода. Среди методов построения моделей важное место занимают методы, использующие экспериментальные данные рентгеноструктурного анализа (РСА), ядерно-магнитного резонанса (ЯМР), криоэлектронной микроскопии (криоЭМ). В настоящее время они сочетаются с методами молекулярной динамики (МД), Монте-Карло, позволяющими проводить компьютерные эксперименты, имитационное моделирование молекулярных систем. Ниже мы в историческом контексте обсудим развитие и значение методов молекулярного моделирования для изучения структуры и динамики биомакромолекул и биомакромолекулярных комплексов, концептуально обоснуем понятие интегративного моделирования, позволяющего расширить возможности традиционных методов имитационного моделирования, и приведем пример его применения для определения структуры амилоидоподобных фибрилл.

Терминология и история методов молекулярного моделирования

Прежде чем приступить к более детальному обсуждению, уделим внимание обсуждению семантических значений ряда ключевых понятий, а именно, «структурная биология», «молекулярное моделирование» и «интегративное моделирование», в том числе в историческом контексте. Журнал *Nature* дает следующее определение структурной биологии: «Структурная биология — это изучение молекулярных структур и динамики биологических макромолекул, в особенности белков и нуклеиновых кислот, а также изучение того, как изменения в их структуре влияют на функцию». Данное определение, тем не менее, не дает ответа на вопрос о том, что мы понимаем под структурой биологической макромолекулы. В биологии активно используется подразделение уровней структурной организации биомакромолекул на первичный (химический) уровень и последующие уровни (вторичный, третичный, четвертичный), которые описывают укладку в пространстве биомакромолекул. Первые технологии секвенирования — чтения последовательности мономеров в биополимерах появились в 1950–1970-х годах. К 1951 году при участии Фредерика Сенгера была разработана технология определения первичной последовательности белков [Sanger, 1951], к 1964 году Робертом Холли определена первичная последовательность молекулы транспортной РНК [Holley, 1951], к 1973 году Аланом Максамом и Вальтером Гилбертом была определена последовательность ДНК *lac*-оператора [Gilbert, 1973], а к 1977 году ими [Maxam, 1977], а также Ф. Сенгером [Sanger, 1977] были развиты рутинные методы секвенирования ДНК, которые используются до сих пор. Среди работ отечественных ученых важный вклад внесла группа академика Александра Александровича Баева — к 1967

году была впервые определена первичная структура валиновой транспортной РНК пекарских дрожжей [Баев, 1967]. Несмотря на успехи определения первичной структуры биополимеров, именно пространственная структурная и динамическая организация биомакромолекул является ключевой для понимания механизмов их функционирования (что описывается термином «mechanistic insight», часто встречающимся в англоязычной литературе). В силу исторических и технических причин структура биомакромолекул обычно воспринимается как некоторая трехмерная модель, отображающая укладку биомакромолекул (белков, нуклеиновых кислот, липидов и т. д.) в пространстве. В некотором роде такой подход продолжает парадигму, принятую в химии для описания структуры химических соединений в виде взаимного расположения атомов и связей между ними. На рис. 1, *а* приведены примеры белковых структур в руках основоположников белковой кристаллографии Макса Перутца и Джона Кендрю, впервые разрешивших структуру миоглобина в 1958 году [Kendrew, 1958]. На рис. 1, *б* модели белков в 1980-х гг. в руках основоположника отечественной белковой кристаллографии академика Бориса Константиновича Вайнштейна [Ковальчук, 2012]. В компьютерную эпоху модели биомакромолекул принято представлять в виде файлов (например, в формате PDB) с описанием пространственных координат отдельных атомов. Следует, однако, отметить, что такое представление моделей позволяет описать лишь некоторые статичные конфигурации атомов. Насколько такой подход позволяет действительно представить и описать происходящие процессы в микромире? В реальном мире молекулы не являются некоторыми статическими структурами, а находятся в постоянном динамическом изменении. Для описания поведения газов, жидкостей, мягкой материи (soft matter), разупорядоченных и слабоупорядоченных систем в физике были разработаны формализмы термодинамики и статистической физики (см. рис. 2). В этих подходах приходится отказаться от описания молекулярных процессов в виде статических структур в пользу некоторых средних характеристик, ансамблей состояний, вероятностного описания различных микросостояний согласно статистике Гиббса–Больцмана. В микромире наличие, например, как у глобулярных белков, более-менее детерминированных пространственных структур является скорее счастливым исключением. В то же время при попытке описания многих биологических систем парадигма представления структуры в виде даже ограниченного набора статических структур испытывает значительные трудности. С одной стороны, здесь можно упомянуть неструктурированные белки (англ. intrinsically disordered proteins), у которых отсутствует какая-то одна статическая структура. С другой стороны, подобные проблемы характерны при попытке описания многих комплексных биологических образований, например, структуры хроматина или даже структуры нуклеосомы. В этой связи высказывается точка зрения, что понятие структуры биомолекулы следует

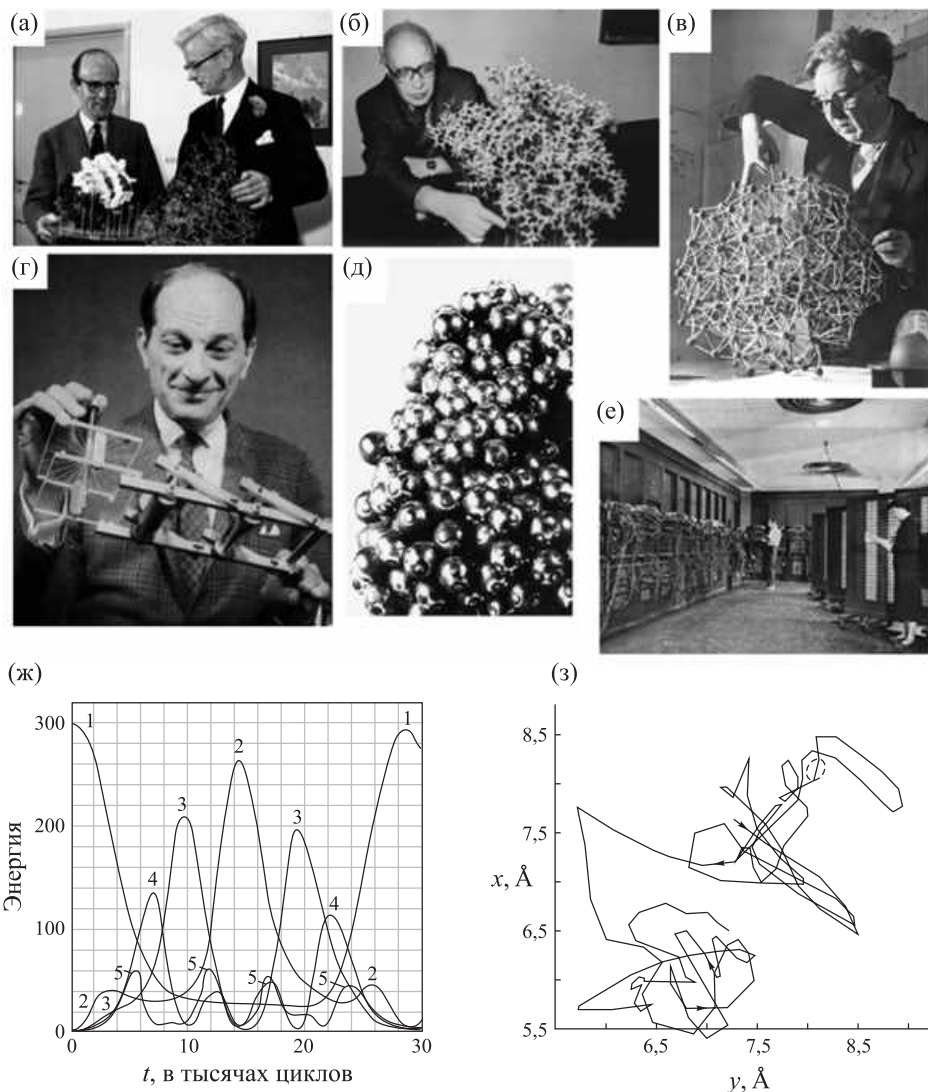


Рис. 1. Иллюстрации к истории структурной биологии и моделирования. (а) М. Перуц (слева) и Дж. Кендрю (справа) со структурными моделями миоглобина. (б) Б. К. Вайнштейн со структурой белка. в) Дж. Д. Бернал с моделью укладки атомов в жидкости. (г) С. Улам с тележкой Монте-Карло Энрико Ферми. (д) Результаты физического моделирования жидкости в виде стальных шаров в работах Д. Д. Бернала. (е) Первый программируемый компьютер общего назначения ENIAC. (ж) Изменение полной энергии со временем для первых пяти мод вибрирующей струны в задаче Ферми–Пасты–Улама–Цингу, первая работа по исследованию статистических свойств механических систем методом молекулярной динамики, 1955 г. (з) Траектории движения атомов в жидкости, рассчитанные методом МД из кандидатской диссертации А. Г. Гривцова, начало 1970-х годов

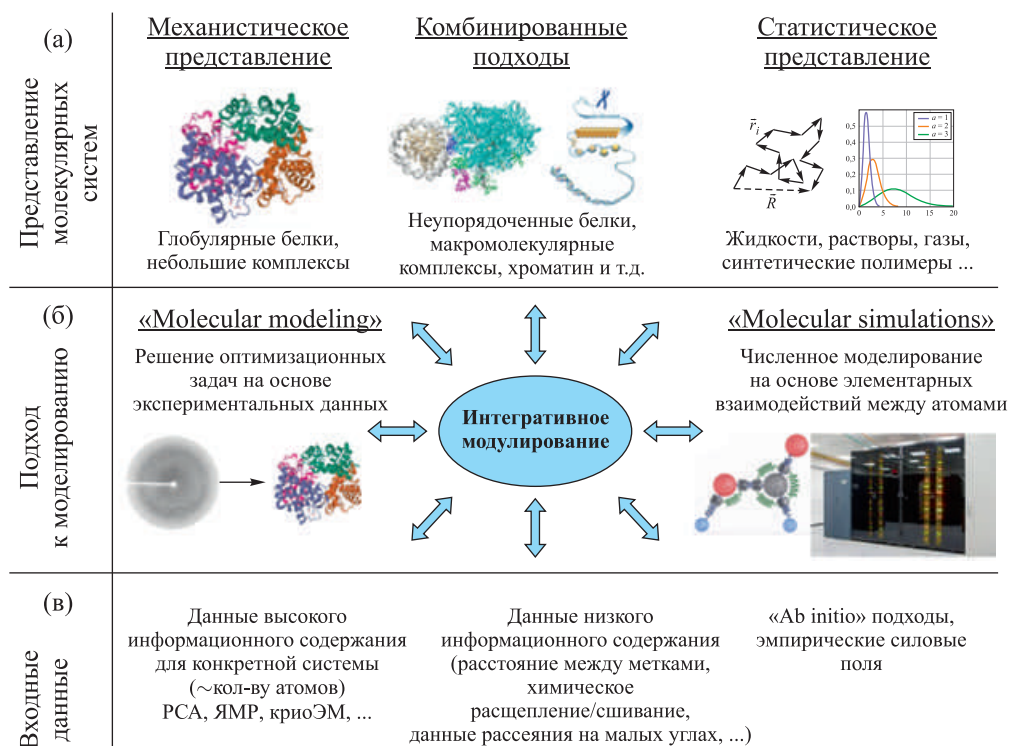


Рис. 2. Диаграмма, суммирующая различные подходы к описанию, моделированию и изучению структуры и динамики биомолекул

трактовать более широко, в идеальном случае как ансамбль возможных конформаций данной биомолекулы с указанием статистических весов различных конформаций, а также их зависимости от внешних условий [Mannige, 2014]. Такое понимание структуры биомолекулярных комплексов наиболее близко связано с пониманием их функционирования и, по-видимому, будет являться основой для познания функционирования живых систем. Развивая данную концепцию, стоит упомянуть о том, что большинство биологических объектов на молекулярном уровне являются неравновесными системами, в которых происходят процессы превращения энергии. Для описания таких систем не достаточно подходов только равновесной статистической физики, а требуется развитие подходов описания, так называемой активной материи (active matter) [Needleman, 2017].

Сам по себе термин «молекулярное моделирование» (molecular modeling) является достаточно широким понятием, значение которого постепенно расширяется и видоизменяется с развитием различных новых методов. В одних случаях упор может делаться непосредственно на задачу создания модели (например,

пространственной модели белка), в других случаях на анализ и исследование свойств молекул на основе физических моделей поведения и взаимодействия атомов. К первому типу задач можно отнести традиционные задачи реконструкции структуры биомакромолекул по экспериментальным данным. Данный процесс всегда включает в себя шаг создания модели, которая удовлетворяет этим данным. На заре структурной биологии реконструкция биомолекул по результатам кристаллографических экспериментов долгое время сводилась к построению пространственных моделей из проволоки, дерева, других материалов (рис. 1, а, б). Позднее данный процесс был значительно автоматизирован с применением компьютерных технологий, разработаны соответствующие программные пакеты по автоматизации построения моделей и их визуализации (например, CCP4, O, Phenix, Coot, Pymol, Chimera). Построение моделей молекул в виде пространственного расположения атомов, удовлетворяющего набору экспериментальных данных, одно из возможных значений термина «компьютерное молекулярное моделирование». В то же время со времен возникновения молекулярно-кинетической теории (основы которой были в том числе заложены М. В. Ломоносовым [Ломоносов, 1950]) ученые стремились к описанию и предсказанию свойств молекулярных систем на основе учета взаимодействий между отдельными атомами, описываемых законами физики. В докомпьютерную эпоху такие предсказания можно было делать либо на основе теоретических расчетов, либо на основе физических механических моделей. Так, например, в 1950–60-х годах для молекулярного моделирования жидкостей Джон Десмонд Бернал активно использовал механические модели в виде металлических и пластиковых шариков [Bernal, 1964] (рис. 1, в, д). Любопытным также является факт, что тот же Дж. Д. Бернал является одним из основателей области биомолекулярной кристаллографии, под его руководством работали классики структурной биологии Макс Перутц, Дороти Ходжкин, Розалинд Франклин [Breathnach, 1995], а также в честь него назван пакет по молекулярному моделированию DESMOND [Kevin, 2020]. С развитием компьютерных технологий появились возможности численного моделирования поведения молекулярных систем на основе их физических моделей. Следует отметить, что в английском языке для описания такого рода деятельности активно используется термин «molecular simulations» (см. например [Frenkel, 2002]), который на русский язык обычно переводится также «молекулярное моделирование», однако слово «simulations» имеет важные отличия в своей смысловой нагрузке. Под этим термином понимается не столько создание моделей, сколько изучение и анализ теоретических моделей с помощью вычислительных методов, так называемые «вычислительные эксперименты». В области инженерного моделирования в русском языке для обозначения термина «simulation modeling» используется термин «имитационное моделирование», однако он не вошел в обиход в среде иссле-

дователей, занимающихся молекулярным моделированием. Подход к изучению различных систем на основе проведения вычислительных экспериментов на данный момент многими воспринимается как одна из парадигм научного познания наравне с экспериментальным и теоретическими подходами [Heu, 2009] и получил название *in silico* подхода. В случае изучения свойств вещества данный подход предполагает наличие определенной физической модели исследуемого объекта, которая описывает взаимодействия между его составными частями и использует различные вычислительные алгоритмы, чтобы исследовать свойства данной модели вещества. Если для описания физической модели вещества используются различные приближения, основанные на законах квантовой механики, то такие подходы зачастую называют *ab initio* подходами (от лат. «из первых принципов», подразумевая, что для моделирования необходимо знать лишь базовые физические константы). Для моделирования многих задач и веществ такой формализм является слишком вычислительно затратным, поэтому исторически область «molecular simulations» развивалась в первую очередь на основе формализма классической механики (частицы вещества представлялись в виде материальных точек, взаимодействующих по законам классической механики).

Зарождение области вычислительных экспериментов в молекулярном моделировании происходило в середине-конце 1940-х годов во время работы над созданием ядерного и термоядерного оружия в США и связано в первую очередь с именами Станислава Улама, Джона фон Неймана, Николаса Метрополиса, а также с вводом в строй в 1945 году первого электронного цифрового вычислителя общего назначения ENIAC (рис. 1, е). С. Улам и Дж. фон Нейман, работая над проблемой транспорта нейтронов в различных типах ядерных систем, предложили в 1947 году моделировать диффузию нейтронов путем многократного численного расчета траекторий движения отдельных нейтронов с учетом случайности их взаимодействия с окружающим веществом. Таким образом, решение задачи о вычислении средних характеристик данного процесса сводилось к статистической выборке (statistical sampling), а не к полному численному решению уравнений, которые описывали этот процесс. Благодаря наличию компьютера ENIAC стало возможным написать компьютерную программу для соответствующих расчетов, которая использовала в том числе генератор псевдослучайных чисел для моделирования случайных событий и соответствующих статистических выборок [Eckhardt, 1987]. Подходы, основанные на статистическом моделировании с использованием случайных величин были названы ими методами Монте-Карло, по предложению Николаса Метрополиса, а первая статья по этому методу опубликована в 1949 году [Metropolis, 1949]. Любопытным является факт, что физик Энрико Ферми еще до формулировки метода Монте-Карло Уламом и фон Нейманом использовал метод статистических вы-

борок для своих задач, проводя расчеты вручную в предрассветные часы, когда страдал бессонницей [Metropolis, 1987]. В 1947 году, когда постановка расчетов на компьютере ENIAC была временно невозможной из-за его перевозки, Ферми придумал аналоговый компьютер, который можно было использовать для моделирования транспорта нейтронов. Данный компьютер представлял собой тележку с карандашом, которую нужно было передвигать по бумажному чертежу и периодически изменять ее направление на основе случайных чисел, таким образом моделируя передвижения нейтронов и их столкновения с атомами среды. Данное устройство получило название тележки Монте-Карло или FERMIAC (см. рис. 1, з).

Следующей важной вехой в развитии методов Монте-Карло в молекулярном моделировании и статистической механике явилась разработка Метрополисом, супругами Розенблют и Теллер в 1953 году метода Монте-Карло на основе марковских цепей (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) для изучения уравнений состояния вещества, состоящего из индивидуальных взаимодействующих молекул [Metropolis, 1953]. В этой работе авторы провели исследование двумерного газа из жестких сфер на компьютере MANIAC. Инновацией данного метода стало вычисление статистической выборки состояний согласно распределению Больцмана в многомерном пространстве через построение марковской цепи состояний. Случайные переходы между состояниями принимались или отклонялись согласно критерию Метрополиса–Хастингса таким образом, что лимитирующее распределение состояний в данной марковской цепи соответствовало Больцмановскому распределению состояний по энергиям. На идеях данной работы основано большинство подходов по моделированию молекулярных систем методами Монте-Карло и в наши дни [Иванов, 2009].

1950-е годы также ознаменовались первыми работами в области применения метода молекулярной динамики численного решения уравнений движения классической механики. Впервые Ферми, Паста, Улам и Цингу исследовали колебания струны с нелинейной упругостью и показали наличие необычной периодичности возникающей в нелинейных системах [Fermi, 1940]. Идея моделирования динамики молекулярных систем была сформулирована Олдером и Вайнрайтом в 1957 году — с помощью компьютера UNIVAC исследовались фазовые переходы в системе твердых сфер [Alder, 1957]. К первым попыткам применить методы молекулярной динамики к реалистичным системам можно отнести работу Гибсона и др. 1960 года по моделированию радиационного поражения меди [Gibson, 1960] и работу Анисура Рамана по моделированию жидкого аргона 1964 года [Rahman, 1964]. В нашей стране первые шаги по развитию методов молекулярной динамики связаны с деятельностью А. А. Гривцова, Э. Э. Шноля, Н. К. Балабаева из Института прикладной математики (ИПМ, Москва) начиная с 1967 года [Гривцов, 1996]. С тех пор методы молекулярной ди-

намики стали активно применяться для моделирования газов, жидкостей [Allen, 1989], а позднее стали активно применяться и для моделирования биомолекулярных систем. Развитие применения методов молекулярного моделирования к биомолекулярным системам связано с деятельностью групп Мартина Карплуса, Арье Варшеля, Майкла Левитта, которые получили в 2013 году Нобелевскую премию за «разработку мультимасштабных моделей сложных химических систем», а также групп Питера Коллмана, Хермана Берендсена, Клауса Шультена, Дэвида Кейса, Эрика Линдаля, Алекса МакКерела и др. Работы группа М. Карплуса легли в основу набора силовых полей CHARMM, а также одноименной программы для моделирования [Karplus, 2003]. На основе подходов, силовых полей и программного кода CHARMM были развиты многие родственные программы, например, программа для параллельных расчетов молекулярной динамики NAMD (в группе К. Шультена), программа для моделирования на основе данных ЯМР XPLOR, программа для моделирования по гомологии MODELLER. Работы группы Питера Коллмана положили основу программному пакету AMBER и одноименной группе силовых полей. Работы группы Хермана Берендсена в Голландии заложили основы пакета по моделированию GROMACS и силового поля GROMOS. В нашей стране развитие программных продуктов в области молекулярной динамики связано в том числе с разработкой программы PUMA и ее версий под руководством Н. К. Балабаева [Likhachev, 2018].

В первые десятилетия XXI века область молекулярного моделирования продолжала активно развиваться и совершенствоваться, в том числе и в методологическом плане. Стоит отметить адаптацию программного обеспечения для использования массивно-параллельных архитектур графических процессоров, что позволило уверенно проводить расчеты МД в микросекундном диапазоне не только на суперкомпьютерах, но и отдельных рабочих станциях. Усилиями нескольких групп создавались специализированные компьютерные платформы для расчета молекулярной динамики, в частности архитектуры MD GRAPE в Японии и компьютеры ANTON компании D. E. Shaw Research. Последние позволяют проводить вычисления в миллисекундном диапазоне времен моделируемых систем.

Серьезный прогресс был достигнут и в совершенствовании методов повышения эффективности статистических выборок (enhanced sampling methods) в ходе расчетов молекулярной динамики. К таким методам можно отнести методы метадинамики (metadynamics), адаптивной смещающей силы (adaptive biasing force), адаптивно смещаемой молекулярной динамики (adaptively biased molecular dynamics), динамики с обменом репликами (replica exchange molecular dynamic/parallel tempering), управляемой молекулярной динамики (steered molecular dynamics). Многие из этих методов получили активное распростра-

нение благодаря созданию кросс-платформенного дополнения к пакетам молекулярной динамики PLUMED. Были в том числе развиты теоретические основы, связывающие характеристики расчета неравновесных молекулярных процессов с равновесными параметрами моделируемых системы. К таковым можно отнести равенство Джарзинского, связывающее работу в ходе неравновесного процесса над системой с разницей свободной энергии между конечным и начальным состояниями [Jarzynski, 1997] и флуктуационную теорему Крукса (Crooks fluctuation theorem) [Crooks, 1999]. Любопытно, что открытие и формулировка данных достаточно лаконичных и простых соотношений неравновесной статистической физики произошла только на рубеже XX и XXI веков, хотя явные предпосылки для их формулировки существовали со времен Больцмана. Отдельно стоит отметить развитие и успехи различных эмпирических подходов к моделированию структуры и дизайну белков. В отличие от методов, исходящих в первую очередь из физических представлений о структуре, подвижности и взаимодействии атомов в боимакромолекулах (physics-based methods), такие подходы активно используют различные эмпирические скоринговые функции для оценки вероятности той или иной конформации белка, которые основываются на статистическом анализе большого количества уже известных пространственных структур белков, а также эволюционном анализе похожести различных аминокислотных мотивов в белках. Перебор конформационного пространства полипептидной цепи также зачастую ограничивают набором конформаций фрагментов присутствующих в уже известных структурах белков. К таким методам можно отнести подходы, основанные на пакете ROSETTA, AWSEM-MD и др.

Выше мы обсудили в историческом контексте различные взгляды на задачи и методы молекулярного моделирования. В одном случае речь идет о задачах поиска оптимальной пространственной модели молекулы на основе большого количества экспериментальных данных (например, реконструкции структуры белка по набору рефлексов картины дифракции его кристаллов), в другом случае упор делается на имитационное моделирование (molecular simulations) систем на основе физических моделей взаимодействий между атомами, которые иногда называют также *ab initio* подходами (напр. *ab initio* protein folding и т. д.). Разные аспекты данных подходов просуммированы на рисунке 2, они отличаются по наличию, качеству и информационному содержанию используемых экспериментальных данных (рис. 2, *в*), по используемым математическим подходам и физическим теориям (рис. 2, *б*) и по самому представлению моделей (рис. 2, *а*) в одном случае речь обычно идет о некоторой статической структуре или наборе структур, в другом о статистических ансамблях различных конформаций.

Интегративные подходы к молекулярному моделированию

В то же время в структурной биологии существует большое количество задач, которые не решаются в рамках одного из двух вышеописанных подходов. С одной стороны, для многих систем экспериментальные данные могут присутствовать лишь в ограниченном количестве и зачастую иметь опосредованное отношение к деталям молекулярной структуры (например данные спектроскопических экспериментов, где оценивается взаимодействие введенных в структуру меток, данные по химической доступности и реакционной способности различных групп, данные малоуглового рассеяния и т. д.). В особенности это утверждение относится к большим биомакромолекулярным комплексам. Сложность интерпретации и самого получения данных РСА, ЯМР, криоЭМ возрастает по мере увеличения размера и конформационной подвижности исследуемой системы. Так, по состоянию на 2021 год 90 % структур, депонированных в базе PDB, имеют молекулярный вес менее 200 кДа. С другой стороны, возможности исследования больших биомакромолекулярных комплексов (от 100 кДа и более) методами молекулярной динамики ограничиваются вычислительными возможностями и качеством параметризации атом-атомных взаимодействий (так называемых силовых полей). Несмотря на то, что благодаря прогрессу компьютерных технологий, методом МД стал возможен расчет систем, состоящих из сотен тысяч и миллионов атомов на временах десятков микросекунд (а с использованием специализированных суперкомпьютеров и на миллисекундных временах), временные масштабы многих физиологически важных процессов, включая важные моды динамики многих биомакромолекулярных комплексов, находятся пока за пределами возможностей моделирования в субсекундном и секундном диапазоне времен. С ростом размера биомолекулярной системы неточности задания атом-атомных взаимодействий суммируются и сильнее отражаются на качестве воспроизведения ее динамики, в то время как количество динамических состояний увеличивается, а разница свободной энергии между ними уменьшается. Отдельную проблему представляют задачи описания структуры биомакромолекул, у которых нет явной статической структуры, а она представлена ансамблем конформаций. К примерам таких систем можно отнести внутренне разупорядоченные белки (англ. *intrinsically disordered proteins*), а также большинство биомакромолекулярных комплексов (вплоть до структуры хроматина на масштабах клеточного ядра) — по мере роста размеров комплексов, они все реже формируют какую-то одну статическую конформацию, а их функционирование завязано на сложную внутри и межмолекулярную динамику. Для описания таких молекул динамический формализм, используемый в имитационном молекулярном моделировании (*molecular simulations*), подходит значительно лучше, однако зачастую решение таких задач из первых прин-

ципов опять сводится к вышеописанным затруднениям. Таким образом, актуальным является разработка гибридных методов и подходов по моделированию биомакромолекулярных комплексов, которые сочетают возможности построения структурных моделей как на основе экспериментальных данных (в том числе данных с низким информационным содержанием), так и на основе моделирования атом-атомных взаимодействий, а также учитывают структурные динамические особенности многих биомакромолекулярных систем. Такие подходы в последнее время в литературе получили название интегративного моделирования (от англ. *integrative modeling*, см. например [Braitbard, 2019]). Одной из задач интегративного моделирования является, в том числе, интеграция различного рода экспериментальных данных при построении моделей биомакромолекулярных систем. На рис. 3 представлены различные типы экспериментальных данных, которые могут быть использованы в интегративном моделировании. К ним могут относиться структуры биомакромолекул или отдельных их частей, полученные традиционными методами структурной биологии с высоким разрешением, а также набор данных низкого информационного содержания (когда данных недостаточно для реконструкции структуры традиционными методами), полученных различными биофизическими, биохимическими и другими методами. К последним могут относиться данные, полученные методами электронной микроскопии низкого разрешения, данные малоуглового рассеяния рентгеновских лучей или нейтронов, данные о характере укладки белковой цепи (например, ИК-, КД-спектроскопия, дифракция рентгеновских лучей на фибриллах), данные о взаимодействии введенных в структуру меток, получаемые методами ЯМР, ЭПР, спектроскопии Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET spectroscopy), данные по экспонированности в растворитель различных групп биомакромолекул, получаемые на основе экспериментов по дейтериеводородному обмену, данные экспериментов по реакционной доступности химических групп (методы футпринтинга, химического сшивания) данные получаемые с применением методов геномики (например, методов ChIP-seq, Hi-C и др.). Актуальной является и задача обратного рода — имея некоторую структурно-динамическую модель биомакромолекулярной системы, рассчитать параметры ее отклика в различных типах экспериментов (см. рис. 3). Обсуждаемые подходы также важны при дизайне и конструировании новых биомакромолекулярных комплексов с полезными функциями. Программы, используемые для реконструкции структур по данным экспериментов ЯМР, вероятно, первыми начали позволять использовать некоторые типы данных из других экспериментов, например, данные малоуглового рентгеновского и нейтронного рассеяния [Schwieters, 2003]. Другим примером является использование в методах МД дополнительных членов потенциальной энергии, которые зависят от экспериментально полученных карт электронной плотности низкого разрешения методами

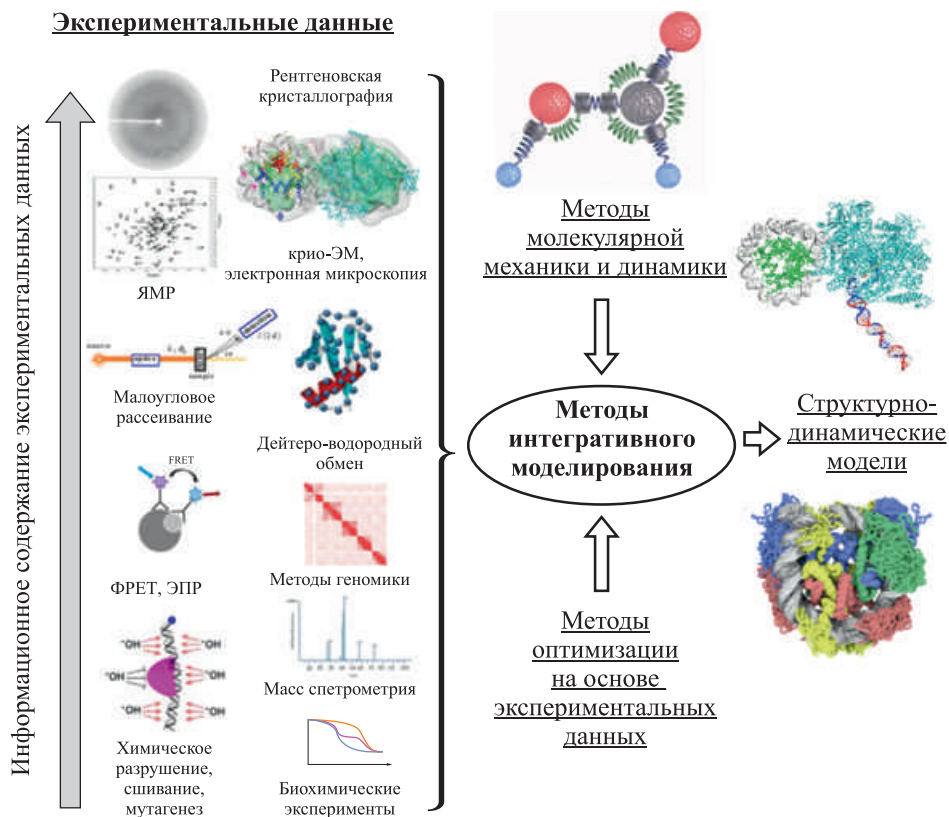


Рис. 3. Идея методов интегративного моделирования

электронной микроскопии или РСА. Такой подход позволит деформировать начальные структуры биомолекул для придания им экспериментально наблюдаемой формы [McGreevy, 2014]. Разрабатываются программные подходы, предоставляющие возможность одновременно использовать данные различных биофизических и биохимических экспериментов (например, карты электронной плотности и расстояния между группами атомов) [Russel, 2012]. В целом подходы интегративного моделирования могут различаться по: (i) уровню представления модели (например, атомистическое или огрубленное представление модели); (ii) способу оценки соответствия модели экспериментальным данным (использование различных силовых полей или оценочных функций); (iii) методам поиска структуры, соответствующей экспериментальным данным, включая использование различных алгоритмов оптимизации, в том числе минимизации энергии, расчетов методом Монте-Карло; (iv) заданию типа варьируемых параметров (координаты атомов, групп атомов, обобщенные координаты реакции). В настоящее время универсальных подходов интегративного моделирования не существует, такие подходы требуют специальных методов и программных реа-

лизаций под конкретный тип моделируемых систем (например, комплексы белок-ДНК, амилоидоподобные фибриллы, мембранные системы и т. д.) и конкретный набор экспериментальных данных. Далее мы проиллюстрируем подходы интегративного моделирования на примере разработанного нами метода установления структуры амилоидоподобных фибрилл.

Применение интегративного моделирования для определения структуры амилоидоподобных фибрилл

В качестве примера применения интегративного подхода рассмотрим разработанный нами способ установления структуры амилоидоподобных фибрилл [Shaytan, 2011a, 2011b; Yolamanova, 2013]. В основе амилоидоподобных фибрилл лежит агрегация пептидов в бета-листы с формированием кросс-бета-структуры [Sawaya, 2007]. Однако эти структуры могут формироваться по-разному: на основе параллельных или антипараллельных бета-листов, с различными способами взаимодействия бета-листов друг с другом. Фибриллы могут также формироваться на основе иерархической организации более мелких протофиламентов. Все это приводит к тому, что фибриллы являются крайне полиморфными структурами. Методами структурной биологии их организация плохо поддается изучению из-за их динамичности, полиморфности и относительной нерегулярности. Для решения данной проблемы нами был разработан интегративный подход, состоящий из следующих этапов: (i) сначала предсказываются пробные межмолекулярные укладки пептидов, соответствующие имеющимся экспериментальным данным (КД-, ИК-спектроскопия и т. д.); (ii) фибриллы, основанные на этих структурах, затем анализируются с использованием методов мультимасштабного моделирования и (iii) их крупномасштабные свойства дополнительно сравниваются с доступными экспериментальными данными (например, данными электронной и атомно-силовой микроскопии), что дает механизм обратной связи для понимания правильности первоначальных предположений. Эта методология представляет интерес, поскольку ее можно применять к широкому классу амилоидоподобных волокон, в том числе содержащими не только пептидный компонент, но и синтетические группы. Общая схема методологии проиллюстрирована на рисунке 4.

Предсказание возможных начальных межмолекулярных укладок пептидов — первый ключевой шаг в нашей методологии. В идеальном случае желательно знать пространственную структуру микрокристаллов, образованных исследуемыми молекулами, получаемую с помощью рентгеновской кристаллографии, или данные о пространственном расположении молекул в фибриллах, определенные методом ЯМР. Однако эти наборы данных могут быть получены только в некоторых редких случаях, поэтому возможно следовать альтернативной стратегии — построение возможных укладок пептидов, согласующихся

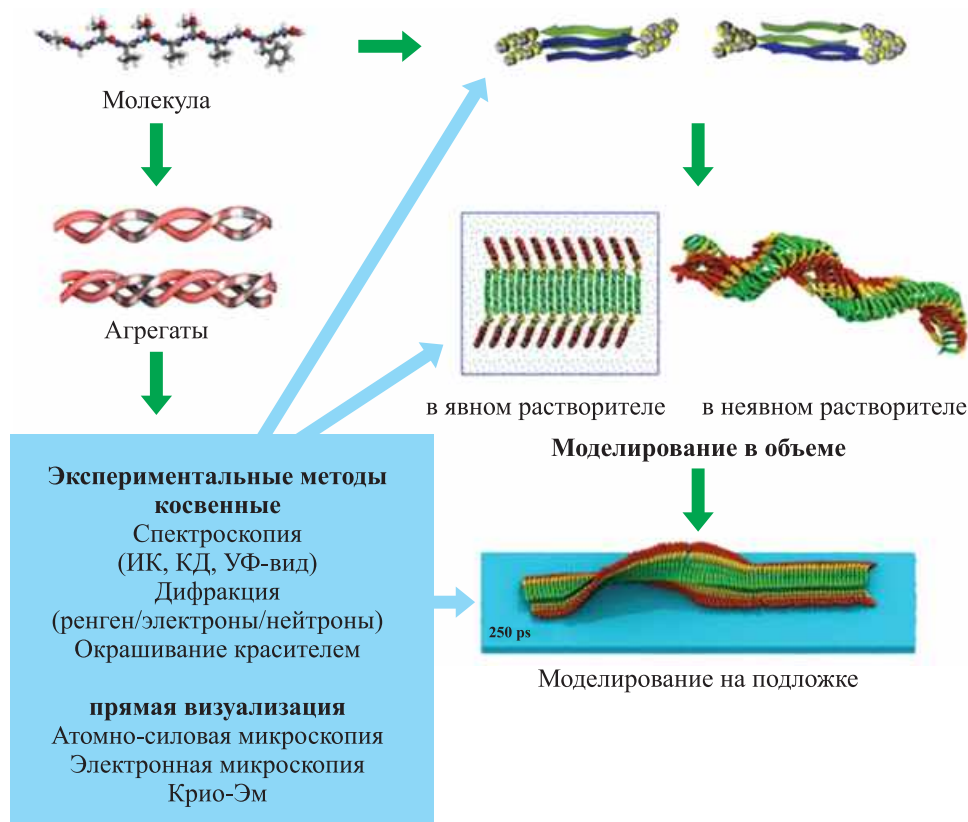


Рис. 4. Схематическое изображение комбинированной экспериментальной/вычислительной интегративной методологии для изучения амилоидоподобных фибрилл

с имеющимися экспериментальными данными, а затем использование методов моделирования для их оптимизации к наиболее энергетически выгодному состоянию. Данные, полученные с помощью различных экспериментальных методов, могут оказаться здесь большим подспорьем и облегчить понимание и построение пробных укладок. Опираясь на такие экспериментальные методы, как окрашивание красителем, ИК- и КД-спектроскопия или рентгеновская дифракция и электронная дифракция, можно понять склонность пептидов к образованию β -листных фибрилл и такие детали их организации, как (i) параллельная или антипараллельная организация β -листов; (ii) расстояние между стопками β -листов, если они образуют стопки; (iii) упаковка боковых цепей и т. д. Эти детали могут быть проанализированы с помощью ряда экспериментальных методов, на практике эксперименты могут быть сложными, и в некоторых случаях единственное, что мы знаем о межмолекулярном расположении, — это данные о существовании β -листов в структуре фибрилл.

При построении пробных укладок на основе одиночных β -листов можно дополнительно руководствоваться основными энергетическими принципами, такими как: (i) количество водородных связей на молекулу, образованную основной цепью и боковыми цепями; (ii) возможные ионные взаимодействия между определенными заряженными остатками или концами пептида; (iii) возможные стэкинг-взаимодействия между ароматическими остатками; (iv) электростатическое отталкивание или притяжение заряженных остатков. Оптимизация предлагаемых структур укладок пептидов проводится с использованием методов молекулярной механики и молекулярной динамики. Используя эти методы, можно дополнительно сравнить энтальпию образования различных укладок, что дает дополнительный критерий для предпочтения одного структурного устройства над другим. Если экспериментальные данные указывают на укладку пептидов в β -листы, то поэтапно должны быть проанализированы различные пробные схемы укладки на основе однослойных β -листов, а затем на основе двух взаимодействующих β -листов. Некоторые пробные расчеты фибрилл в растворителе и анализ взаимодействия фибрилл в растворителе (например, количество водородных связей, образованных между растворителем и фибриллой) могут дать понимание энергетической выгоды различных вариантов укладки. Вклад гидрофобных взаимодействий можно также оценить путем расчета гидрофобной поверхности, доступной для растворителя.

Следующим шагом в нашей многомасштабной методологии является моделирование фибрилл, сконструированных на основе предсказанных межмолекулярных укладок пептидов. Конструирование фибриллы производится путем периодического копирования структур элементов укладки вдоль оси фибриллы. Основная цель такого моделирования состоит в том, чтобы (i) проверить стабильность фибрилл в растворителе; (ii) оптимизировать и изучить межмолекулярную структуру молекул в фибриллярном состоянии; (iii) выявить и изучить супрамолекулярную морфологию фибрилл в различных средах (например, на подложке).

Наш опыт показывает, что ключевые вызовы при моделировании фибрилл происходят из (i) их большого пространственного масштаба, который делает моделирование требовательными к вычислительным ресурсам; (ii) важности дальнедействующих взаимодействий для супрамолекулярной морфологии; (iii) крупномасштабных конформационных переходов, которые могут происходить во время релаксации фибрилл; (iv) необходимости правильного выбора протоколов релаксации во время моделирования. Моделирование в растворителе позволяет оценить стабильность и основные конформационные свойства фибрилл, а также описать взаимодействия растворитель–фибрилла и дополнительно оптимизировать структуру фибрилл в присутствии растворителя. Однако поведение коротких фибрилл в этих расчетах не всегда с уверенностью можно

экстраполировать на более крупные масштабы, поскольку (i) конформационное поведение может быть искажено краевыми эффектами и эффектами конечного размера; (ii) некоторые конформационные черты могут быть не видны в этих условиях, например небольшие значения осевого скручивания (которое для многих амилоидных волокон может составлять всего $1-2^\circ$ на β -слой) или эффекты более крупного масштаба такие, как образование суперспирали. Моделирование фибрилл большого размера в вычислительном плане быстрее и эффективнее проводить в неявном растворителе. Для быстрой и эффективной релаксации конформации фибриллы рекомендуется применять моделирование методом молекулярной динамики с использованием термостата на основе метода диссипативной динамики частиц. Данный термостат в отличие от термостатирования с применением стохастической динамики Ланжевена не оказывает демпфирующего воздействия на крупномасштабные конформационные перестройки в ходе релаксации фибриллы. В качестве дополнительных методов моделирования возможно проводить моделирование фибрилл на графитовой подложке после их релаксации в объеме. Этот подход предназначен для имитации стандартной экспериментальной процедуры, когда фибриллы, уже образовавшиеся в растворе, наносятся на подложку, где анализируется их морфология методом атомно-силовой микроскопии. Соответствие фибриллярной структуры в растворе и на подложке в настоящее время является предметом дискуссий.

На заключительном этапе интегративного моделирования полученные в ходе моделирования морфологические параметры фибрилл сравниваются с экспериментальными данными. К таким параметрам, например, относятся ширина, высота, шаг спирали и угол спирали. Данные параметры экспериментальным образом могут быть определены с помощью различных видов микроскопии, например, электронной или атомно-силовой. Совпадение моделируемых и экспериментальных параметров является аргументом в пользу того, что корректной является межмолекулярная укладка пептидов, на которой основана моделируемая структура фибриллы.

В качестве успешного примера применения вышеописанной методологии приведем работу [Yolamanova, 2013], в которой нами была установлена структура фибрилл EF-C на основе пептидов из гликопротеина gp120 ВИЧ-1 человека. Экспериментально было установлено, что пептид EF-C (соответствует аминокислотам 419–427 gp120) приводит к увеличению инфицирования клеток лентивирусным вектором до 34 раз, не вызывая цитотоксических эффектов. Пептид EF-C обладает последовательностью QCKIKQINMWQ (1,533 Да; $pI = 9,31$, заряд = +2). Дальнейшие исследования показали, что пептид образует фибриллы, которые демонстрируют амилоид-специфическое увеличение связывания Конго красного и тιοфлавина Т. EF-C всегда самособирается в нанофибриллы сразу после разбавления его раствора в диметилсульфоксиде (ДМСО) в

различных буферах. Нановибриллы EF-C могут храниться не менее двух недель при комнатной температуре или 4 °C без потери активности по усилению трансдукции. Чтобы охарактеризовать нановибриллы, структура и морфология EF-C была проанализирована с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) (рис. 5). Были выявлены агрегаты диаметром $3,4 \pm 1,1$ нм, длиной от ~100 до 400 нм и кручением с полушагом кручения в 26 ± 2 нм. Биофизический анализ с использованием кругового дихроизма (КД) и инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (ИКФС) указали на присутствие преимущественно элементов вторичной структуры β -слоя и двух пиков в полосе амида-I, характерных для антипараллельного расположения β -листов. Порошковая дифракция рентгеновских лучей подтвердила типичный амилоидный паттерн дифракции с рефlekсами при 4,8 и 12 Å. Для определения молекулярной структуры фибрилл EF-C был применен подход интегративного моделирования, описанный выше. На основе полностью атомной молекулярно-механической модели пептида EF-C, экспериментальных данных, основных физических принципах, а также понимания принципов образования амилоидных фибрилл была предложена базовая модель межмолекулярного расположения пептидов в фибрилле. Полностью атомная молекулярно-механическая модель этого межмолекулярного расположения была построена следующим образом: (i) пептид был взят в вытянутой конформации с соответствующими двугранными углами; (ii) два пептида были расположены в виде димера двух антипараллельных бета-цепей, так чтобы максимизировать количество водородных связей между нитями; (iii) два димера были расположены в тетрамере путем наложения «незаряженных» поверхностей бета-листов, и тетрамер был помещен в коробку для моделирования с периодом 10 Å вдоль направления фибриллы, чтобы сформировать периодическую фибриллярную структуру; (iv) затем была использован метод молекулярной механики, основанный на силовом поле AMBER99SB-ILD, чтобы выполнить минимизацию энергии в фиксированных периодических граничных условиях. На следующем этапе была создана фибриллярная структура длиной 50 β -нитей (примерно 25 нм) путем воспроизведения периодической ячейки межмолекулярного расположения в одном направлении. Фибрилла сольватирована молекулами воды (модель TIP3P), добавлено 100 ионов хлора для нейтрализации системы. Общее количество атомов в системе составило около 296 тысяч с размерами ящика периодического моделирования $11 \times 9 \times 30$ нм. Система была подвергнута минимизации энергии с последующим моделированием релаксации с помощью МД с упругими ограничениями на положения атомов фибриллы, чтобы позволить положениям молекул ионов и воды отрелаксировать. После этого было проведено моделирование равновесной МД в течение 20 нс при давлении и температуре 1 атм и 300 К, соответственно, с использованием алгоритмов перемасштабирования скорости и баростата Парринелло–

Рамана. Электростатические взаимодействия на больших расстояниях обрабатывались с помощью алгоритма PME, для короткодействующих взаимодействий использовалось отсечение 1 нм. Моделирование проводилось параллельно с использованием пакета программ GROMACS 4.5. В ходе моделирования фибриллярная структура приняла свою благоприятную скрученную конформацию и была стабильной как на межмолекулярном, так и на морфологическом уровне. Полученная модель фибриллы обладает периодом кручения в 24 нм, что совпадает с данными микроскопии и подтверждает адекватность модели (рис. 5). Из полученной модели фибриллы следует, что боковые цепи лизина образуют гидрофильную поверхность с высокой плотностью катионных зарядов при физиологическом pH, которая, по-видимому, участвует в процессе слипания отрицательно заряженных мембран вируса и клетки, способствуя проникновению вируса в клетки.

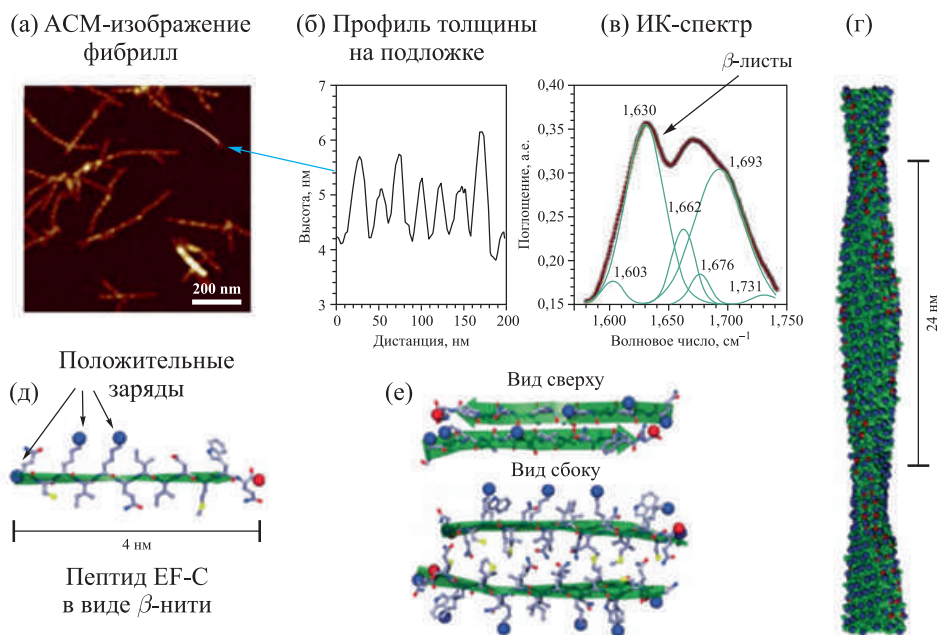


Рис. 5. Структурная характеристика и молекулярное моделирование фибрилл EF-C. (а) АСМ-изображение фибрилл EF-C. (б) Профиль по указанной линии в (а). Автокорреляция графика профиля дает средний полушаг фибрилл в 26 ± 2 нм. (в) ИКФС-спектр с вписыванием гауссианов для определения вторичной структуры. Пики на 1630 и 1693 см^{-1} указывают на антипараллельное расположение β -листов. (г) Молекулярная модель пептида EF-C. (д) Вид сверху и сбоку элементарной единицы фибриллы, состоящей из четырех β -нитей, собранных в стопку из двух антипараллельных β -листов. (е) Уточненная молекулярная модель фибриллы с шагом спирали 28 нм. Атомы С, серый; N, синий; O, красный; S, желтый. По материалам [Yolamanova, 2013]

Заключение

Несмотря на то, что за вторую половину XX и начало XXI века достигнут существенный прогресс в понимании работы живых организмов на молекулярном уровне, в частности, секвенированы геномы многих организмов, изучены структуры белков, мы все еще не понимаем, каким образом в результате комплексного взаимодействия между биомолекулами происходят сложные и тонко регулируемые процессы развития и функционирование живых организмов. Ключом к этому пониманию является комплексный анализ и изучение структурно-динамических моделей взаимодействий между биомакромолекулярными комплексами. Дальнейшее развитие методов молекулярного моделирования, в том числе интегративного моделирования, представляется необходимым для решения такого рода задач.

Литература

- Баев А. Первичная структура валиновой транспортной РНК 1 пекарских дрожжей / А. Баев, Т. Венкстерн, А. Мирзабеков, А. Крутилина, Л. Ли, В. Аксельрод // Молекулярная биология. — 1967. — Т. 1, № 5. — С. 745–766.
- Гривцов А. Г. Методика численных экспериментов и динамика микрогетерогенных систем // Метод молекулярной динамики в физической химии. — М.: Наука, 1996. — С. 16.
- Иванов В. Методы компьютерного моделирования для исследования полимеров и биополимеров. — ЛИБРОКОМ, 2009.
- Ковальчук М. В. Кристаллография и жизнь. — М.: Физматлит, 2012.
- Ломоносов М. Полное собрание сочинений: Ломоносов Михаил Васильевич. — 1950–1983.
- Alder B. J. Phase Transition for a Hard Sphere System / B. J. Alder, T. E. Wainwright // The Journal of Chemical Physics. — 1957. — Vol. 27, No. 5. — P. 1208–1209.
- Allen M. P. Computer Simulation of Liquids / M. P. Allen, D. J. Tildesley. — NY, USA: Clarendon Press, 1989.
- Bernal J. The Bakerian Lecture, 1962. The Structure of Liquids / J. Bernal // Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences. — 1964. — Vol. 280, No. 1382. — P. 299–322.
- Braitbard M. Integrative Structure Modeling: Overview and Assessment / M. Braitbard, D. Schneidman-Duhovny, N. Kalisman // Annual Review of Biochemistry. — 2019. — Vol. 88, No. 1. — P. 113–135.
- Breathnach C. S. Desmond Bernal and His Role in the Biological Exploitation of X-Ray Crystallography / C. S. Breathnach // Journal of Medical Biography. — 1995. — Vol. 3, No. 4. — P. 197–200.

- Crooks G. E. Entropy Production Fluctuation Theorem and the Nonequilibrium Work Relation for Free Energy Differences / G. E. Crooks // *Physical Review E*. — 1999. — Vol. 60, No. 3. — P. 2721–2726.
- Eckhardt R. Monte Carlo method / R. Eckhardt // *Los Alamos Science Special Issue*. — 1987. — P. 131–141.
- Fermi E. Studies of the Nonlinear Problems / E. Fermi, P. Pasta, S. Ulam, M. Tsingou // *Los Alamos Scientific Lab., N. Mex.* — 05/01/1955. — LA, 1940. — DOI: 10.2172/4376203
- Frenkel D. Understanding molecular simulation / D. Frenkel, B. Smit. — Academic Press, 2002.
- Gibson J. B. Dynamics of Radiation Damage / J. B. Gibson, A. N. Goland, M. Milgram, G. H. Vineyard // *Physical Review*. — 1960. — Vol. 120, No. 4. — P. 1229–1253.
- Gilbert W. The Nucleotide Sequence of the Lac Operator / W. Gilbert, A. Maxam // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1973. — Vol. 70, No. 12. — P. 3581–3584.
- Hey T. The Fourth Paradigm: Data-Intensive Scientific Discovery / T. Hey, S. Tansley, K. Tolle. — Microsoft Research, 10.2009.
- Holley R. W. Structure of a Ribonucleic Acid / R. W. Holley, J. Apgar, G. A. Everett, J. T. Madison, M. Marquisee, S. H. Merrill, J. R. Penswick, A. Zamir // *Science*. — 1965. — Vol. 147, No. 3664. — P. 1462–1465.
- Jarzynski C. Nonequilibrium Equality for Free Energy Differences / C. Jarzynski // *Physical Review Letters*. — 1997. — Vol. 78, No. 14. — P. 2690–2693.
- Karplus M. Molecular Dynamics of Biological Macromolecules: A Brief History and Perspective / M. Karplus // *Biopolymers*. — 2003. — Vol. 68, No. 3. — P. 350–358.
- Kendrew J. C. A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by x-Ray Analysis / J. C. Kendrew, G. Bodo, H. M. Dintzis, R. G. Parrish, H. Wyckoff, D. C. Phillips // *Nature*. — 1958. — Vol. 181, No. 4610. — P. 662–666.
- Kevin J. Schrodinger Desmond High-Performance Molecular Dynamics Simulations. — Schrodinger, 2020. — URL: <https://www.schrodinger.com/desmond>
- Likhachev I. Parallelism of different levels in the program of molecular dynamics simulation PUMA-CUDA / I. Likhachev, N. Balabaev // *Mathematical Biology and Bioinformatics*. — 2018. — P. e44.
- Mannige R. V. Dynamic New World: Refining Our View of Protein Structure, Function and Evolution / R. V. Mannige // *Proteomes*. — 2014. — Vol. 2, No. 1. — P. 128–153.
- Maxam A. M. A New Method for Sequencing DNA / A. M. Maxam, W. Gilbert // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1977. — Vol. 74, No. 2. — P. 560–564.
- McGreevy R. xMDFF: Molecular Dynamics Flexible Fitting of Low-Resolution X-Ray Structures / R. McGreevy, A. Singharoy, Q. Li, J. Zhang, D. Xu, E. Perozo, K. Schulten // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. — 2014. — Vol. 70, No. 9. — P. 2344–2355.
- Metropolis N. Equation of State Calculations by Fast Computing Machines / N. Metropolis, A. W. Rosenbluth, M. N. Rosenbluth, A. H. Teller, E. Teller // *The Journal of Chemical Physics*. — 1953. — Vol. 21, No. 6. — P. 1087–1092.

- Metropolis N. The Beginnig of the Monte Carlo Method / N. Metropolis // Los Alamos Science Special Issue. — 1987. — P. 125–130.
- Metropolis N. The Monte Carlo Method / N. Metropolis, S. Ulam // Journal of the American Statistical Association. — 1949. — Vol. 44, No. 247. — P. 335–341.
- Needleman D. Active Matter at the Interface between Materials Science and Cell Biology / D. Needleman, Z. Dogic // Nature Reviews Materials. — 2017. — Vol. 2, Issue 9, No. 9. — P. 1–14.
- Rahman A. Correlations in the Motion of Atoms in Liquid Argon / A. Rahman // Physical Review. — 1964. — Vol. 136, 2A. — P. A405–A411.
- Russel D. Putting the Pieces Together: Integrative Modeling Platform Software for Structure Determination of Macromolecular Assemblies / D. Russel, K. Lasker, B. Webb, J. Velázquez-Muriel, E. Tjioe, D. Schneidman-Duhovny, B. Peterson, A. Sali // PLoS biology. — 2012. — Vol. 10, No. 1. — P. e1001244.
- Sanger F. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 1977. — Vol. 74, No. 12. — P. 5463–5467.
- Sanger F. The Amino-Acid Sequence in the Phenylalanyl Chain of Insulin. 1. The Identification of Lower Peptides from Partial Hydrolysates / F. Sanger, H. Tuppy // Biochemical Journal. — 1951. — Vol. 49, No. 4. — P. 463–481.
- Sawaya M. R. Atomic Structures of Amyloid Cross-Beta Spines Reveal Varied Steric Zippers / M. R. Sawaya, S. Sambashivan, R. Nelson, M. I. Ivanova, S. A. Sievers, M. I. Apostol, M. J. Thompson, M. Balbirnie, J. J. W. Wiltzius, H. T. McFarlane, A. Ø. Madsen, C. Riekel, D. Eisenberg // Nature. — 2007. — Vol. 447, Issue 7143, No. 7143. — P. 453–457.
- Schwieters C. D. The Xplor-NIH NMR Molecular Structure Determination Package / C. D. Schwitters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore // Journal of Magnetic Resonance. — 2003. — Vol. 160, No. 1. — P. 65–73.
- Shaytan A. K. Self-Assembling Nanofibers from Thiophene–Peptide Diblock Oligomers: A Combined Experimental and Computer Simulations Study / A. K. Shaytan, E.-K. Schillinger, P. G. Khalatur, E. Mena-Osteritz, J. Hentschel, H. G. Börner, P. Bäuerle, A. R. Khokhlov // ACS Nano. — 2011. — Vol. 5, No. 9. — P. 6894–6909.
- Shaytan A. K. Self-Organizing Bioinspired Oligothiophene–Oligopeptide Hybrids / A. K. Shaytan, E.-K. Schillinger, E. Mena-Osteritz, S. Schmid, P. G. Khalatur, P. Bäuerle, A. R. Khokhlov // Beilstein Journal of Nanotechnology. — 2011. — Vol. 2. — P. 525–544.
- Yolamanova Y. Peptide Nanofibrils Boost Retroviral Gene Transfer and Provide a Rapid Means for Concentrating Viruses / M. Yolamanova, C. Meier, A. K. Shaytan, V. Vas, C. W. Bertoncini, F. Arnold, O. Zirafi, S. M. Usmani, J. A. Müller, D. Sauter, C. Goffinet, D. Palesch, P. Walther, N. R. Roan, H. Geiger, O. Lunov, T. Simmet, J. Bohne, H. Schrezenmeier, K. Schwarz, L. Ständer, W.-G. Forssmann, X. Salvatella, P. G. Khalatur, A. R. Khokhlov, T. P. J. Knowles, T. Weil, F. Kirchhoff, J. Münch // Nature Nanotechnology. — 2013. — Vol. 8, No. 2. — P. 130–136.

**Integrative modeling methods for the study of structure
and dynamics of biomolecules**

A. K. Shaytan

Department of bioengineering, Faculty of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
E-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru

This article discusses in a historical context the development and modern significance of molecular modeling methods for studying the structure and dynamics of biomacromolecules and biomacromolecular complexes. The semantic meanings of such terms as molecular model, molecular modeling, molecular simulations are discussed. The possibilities and limitations of modern methods of molecular modeling, as well as experimental methods of structural biology are described. The concept of integrative modeling is introduced as a set of approaches that make it possible to construct models of molecular complexes based on a combination of heterogeneous experimental data using ideas about the nature of physical interactions between atoms and molecules. Integrative modeling approaches allow solving problems that cannot be solved separately by experimental methods or simulation methods. The use of integrative modeling approaches is illustrated by the example of determining the structure of amyloid-like fibrils.

Keywords: biomacromolecular complexes, structural biology, molecular modeling, integrative modeling, molecular dynamics simulations, amyloid-like fibrils.

АРХИТЕКТУРА КОНДЕНСИРОВАННОЙ ДНК В БАКТЕРИЯХ

Ю. Ф. Крупянский¹

3D-архитектура генома определяет функцию клетки. Изучение конденсации ДНК в клетке важно для понимания механизмов выживания бактерий и для медицины, поскольку упорядоченная конденсация ДНК обеспечивает устойчивость патогенных бактерий к действию антибиотиков. В разбавленном растворе длина ДНК составляет несколько сантиметров. Длина бактерии *Escherichia coli* составляет около 0,5 μ . Столь драматичное уменьшение объема, занимаемого ДНК, — следствие ее конденсации. Обнаружено, что ДНК организована в нуклеоиде иерархически с тремя уровнями компактизации ДНК. Нижний уровень (малый масштаб ≥ 1 кб п.о.) обеспечивается гистоноподобными NAP-белками. Бактерии при стрессе голодания, в отличие от активно растущих бактерий, используют энергонезависимый механизм поддержания порядка и защиты жизненно важных структур (ДНК), как в неживой природе. Изучение структуры ДНК в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli* проводились с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Экспериментальные результаты позволили визуализировать структуры нижнего иерархического уровня компактизации ДНК в нуклеоиде покоящихся клеток. Впервые проведенная серия дифракционных экспериментов свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации ДНК во всех изученных бактериях. ПЭМ позволила извлечь более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде бактерии *Escherichia coli*. Обнаружены внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомо-подобные структуры ДНК. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась впервые, она является результатом множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг белка Dps и его ассоциатов.

Ключевые слова: ДНК, бактерия *Escherichia coli*, стресс голодания, покоящаяся клетка, внутриклеточная нанокристаллизация, жидкокристаллические структуры, свернутая нуклеосомоподобная структура, синхротронное излучение, электронная микроскопия и томография.

Введение

3D-архитектура генома определяет функцию клетки. Изучение конденсации ДНК в клетке важно также для понимания механизмов выживания бактерий и для медицины, поскольку упорядоченная конденсация ДНК обеспечивает устойчивость патогенных бактерий к действию антибиотиков. Устойчивость

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н. Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия.
E-mail: yufk@chph.ras.ru

к антибиотикам, на сегодняшний день, является одной из важнейших медицинских проблем в мире.

Бактерии *Escherichia coli*, как и другие микроорганизмы, находятся в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, часто неблагоприятных. Изменения параметров среды воспринимаются ими как стресс. В ответ на любые стрессовые воздействия клетки *Escherichia coli* включают универсальные наследственные стратегии адаптации, основанные на структурных, биохимических и генетических перестройках, позволяющие сохранить часть популяции и выжить в любых неблагоприятных условиях [Бухарин, 2005]. В первую очередь эти стратегии направлены на защиту генетического материала клетки. Стресс голодания и переход бактерий в покоящееся состояние представляет особый интерес, поскольку покоящиеся клетки существенно более устойчивыми к воздействию антибактериальных препаратов, кроме этого, бактерии приобретают способность выживать в самых агрессивных условиях.

Данный обзор посвящен последним оригинальным и литературным результатам экспериментальных исследований структурной организации ДНК (или архитектуры нуклеоида) в покоящихся клетках *Escherichia coli* с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) при действии на бактерию стресса голодания. Обсуждаются изменения в архитектуре нуклеоида при переходе от активно растущих к покоящимся клеткам, образующимся при стрессе голодания. Для лучшего понимания происходящих изменений обсуждается архитектура нуклеоида в активно растущей клетке. Обсуждаются последние методические успехи в нановизуализации и нанотомографии клеток с помощью синхротронного излучения и электронной микроскопии, которые позволят в обозримом будущем ожидать определения архитектуры нуклеоида с высоким разрешением как в активно растущих, так и покоящихся бактериях.

1. Конденсация ДНК в клетке в фазе роста. Фрактальная глобула

Escherichia coli или кишечная палочка — широко распространенная грамотрицательная бактерия являющаяся одним из важнейших и изученных инструментов биологической науки. *Escherichia coli* в этом смысле является аналогом атома водорода для микробиологии.

Бактериальная геномная ДНК и ассоциированные с ней белки (NAP) расположены в клетке в сильно конденсированной и функционально организованной форме в нуклеоиде.

ДНК — длинный, сильно заряженный гетерополимер. В разбавленном растворе при термодинамическом равновесии ДНК бактерии *E. coli* образует стохастический клубок объемом около $500 \text{ }\mu\text{m}^3$. Объем нуклеоида *Escherichia coli*, где

располагается ДНК в клетке, не превышает $1 \mu\text{m}^3$. Для размещения в нуклеоиде ДНК должна дополнительно компактизоваться [Bloomfield, 1996]. Кроме этого, конденсированная в нуклеоиде ДНК (хромосома) должна быть функциональной. Хромосома должна быть способна осуществлять такие процессы как репликация, рекомбинация, сегрегация и транскрипция. Структура бактериального нуклеоида с высоким разрешением ждет своего определения. Однако, исследования, начавшиеся еще в 1971 г., показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру и что конденсация ДНК имеет некоторое сходство с фолдингом (самоорганизацией) белка [Bloomfield, 1996, Крупянский, 2002]. Можно грубо выделить следующие уровни структурной организации компактной бактериальной ДНК [Verma, 2019]. Низший уровень (малый масштаб ~ 1 килобайт пар оснований (п.о.)) обеспечивается взаимодействием ДНК с ДНК-связывающими белками. На промежуточном уровне (средний масштаб ~ 10 килобайт п.о.) ДНК образует сверхспиральные петли. На самом высоком уровне (мегамасштаб $\sim 10^6$ п.о.) ДНК образует шесть пространственно-организованных макромоменов с четкой территориальной организацией, как у фрактальной глобулы (см. ниже), на которые разделен бактериальный нуклеоид.

Фрактальная (или складчатая) глобула — это компактное полимерное состояние, которое возникает при конденсации полимера в результате топологических ограничений, препятствующих одной области цепи перейти в другую. Это долгоживущее промежуточное состояние было введено в [Grosberg, 1988]. Экспериментальное исследование свойств пространственной организации хроматина в ядре клетки человека с использованием набора новых методов молекулярной биологии, сокращенно называемых 3C (*chromosome conformation capture*) и Hi-C, привлекли внимание к фрактальной глобуле как к структурной модели хроматина на крупном масштабе ~ 10 Мб [Lieberman-Aiden, 2009].

Согласно [Gennes, 1979], коллапс длинного полимера из-за топологических ограничений происходит с образованием складок все увеличивающихся размеров. В первую очередь появляются мелкие складки. Это приводит к образованию эффективно более толстого складчатого полимера, который затем уже сам образует более крупные складки и т. д. [Grosberg, 1988]. Авторы работы [Grosberg, 1988] продемонстрировали, что этот процесс должен приводить к образованию долгоживущего состояния, которое они назвали складчатой (впоследствии ее стали называть фрактальной) глобулой. Было предположено, что такая глобула характеризуется иерархией складок, образуя самоподобную структуру [Grosberg, 1988].

На рис. 1 показаны конформации фрактальной (а) и равновесной (б) глобулы. Фрактальная глобула имеет поразительную территориальную организацию цепочки, которая сильно контрастирует с перемешанной организацией цепочки,

наблюдаемой в равновесной глобуле. Хромосомные контакты в клетках человека были охарактеризованы с помощью экспериментов Hi-C. При сравнении с экспериментом было решено, что фрактальная глобула достаточно хорошо описывает свойства хромосомы человека на мегамасштабах, или 3-м уровне структурной организации ДНК. Поэтому фрактальная глобула была предложена в качестве модели сворачивания ДНК внутри клетки на крупном масштабе. Фрактальная глобула обладает несколькими важными свойствами, которые делают ее привлекательным способом организации хроматина. У фрактальной глобулы нет узлов. Динамика раскрытия хроматина в незаузленной конформации фрактальной глобулы очень сильно отличается от динамики раскрытия ДНК в чрезвычайно запутанной конформации равновесной глобулы [Mirny, 2011].

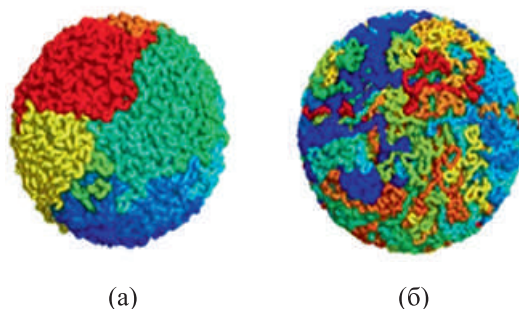


Рис. 1. Конформации фрактальной (а) и равновесной (б) глобул. Фрактальная глобула имеет четкую территориальную организацию, которая сильно контрастирует со смешением, наблюдаемым в равновесной глобуле

На рисунке 2, *а* и *б* показано флуктуационное открытие области размером около 3 Мб в двух глобулах — складчатой и равновесной. Для осуществления функции нужен легкий доступ к каждому кусочку цепочки ДНК. Очевидно преимущество модели, описываемой фрактальной глобулой, поскольку эта глобулярная структура позволяет практически безболезненно открыть любую петлю ДНК, открывая доступ к любому сайту ДНК (рис. 2, *а*). В модели хроматина, описываемого равновесной глобулой, заузленная цепочка ДНК не позволяет открыть петлю достаточного размера и доступ к сайтам ДНК ограничен (рис. 2, *б*).

2. Рост бактерий. Стресс голодания. Белок Dps

Бактериальный рост — это деление клетки бактерии на две дочерние клетки. Если не происходит мутационного события, полученные дочерние клетки генетически идентичны исходной клетке. Динамику роста бактериальной популяции подразделяют на четыре фазы [Zwietering et al., 1990]. Первая фаза роста

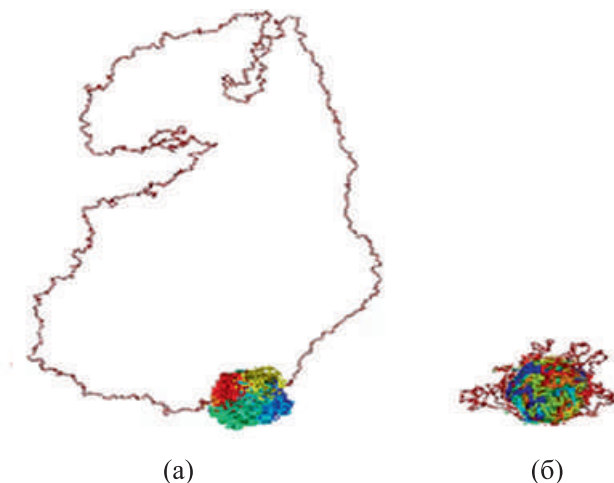


Рис. 2. Открытие петли, которая является либо частью фрактальной глобулы (а), либо равновесной (б). Глобулы из 32 000 мономеров свернуты за счет парных взаимодействий притяжения [Migny, 2011]. Далее взаимодействия притяжения для области из 3000 мономеров были удалены, что позволило области раскрыться из-за энтропии цепи. Во фрактальной глобуле область раскрывается, образуя большую петлю (а). Эта же область в равновесной глобуле (б) не открылась из-за перепутывания цепи

называется лаг-фазой, это период медленного роста, когда клетки адаптируются к среде, богатой питательными веществами. За лаг-фазой следует логарифмическая или экспоненциальная фаза, во время которой происходит быстрый экспоненциальный рост популяции. В ходе экспоненциальной фазы питательные вещества потребляются с максимальной скоростью, до тех пор, пока одно из необходимых соединений не кончится и не начнет подавлять рост. Третья фаза роста называется стационарной, она начинается при нехватке питательных веществ для быстрого роста. Скорость метаболизма падает, и клетки начинают расщеплять белки, не являющиеся строго необходимыми. Финальная фаза роста — фаза смерти, при которой запас питательных веществ исчерпывается и бактерии погибают. В экспоненциальной фазе роста меняется относительное содержание ДНК-ассоциированных гистоноподобных белков (NAP). Например, если в фазе роста содержание белка Dps (DNA-binding protein of starvation) составляет около 6000 белков на клетку, то в стационарной и в поздней стационарной фазе содержание Dps становится подавляющим по сравнению с другими белками и составляет 180 000–200 000 б/кл. В поздней стационарной фазе решающим для конформации ДНК (архитектуры бактериального нуклеоида) становится взаимодействие ДНК с Dps. Dps играет регулирующую и защитную роль в клетках *Escherichia coli* (*E. coli*) [De Martino, 2016; Almirón, 1992; Calhoun, 2011]. При голодании Dps очень активен и может сильно изменять

структуру бактериальной ДНК. Его структура [Grant, 1998] и взаимодействие с ДНК недавно были изучены *in vitro* [Grant, 1998; Frenkiel-Krispin, 2006] и *in silico* [Tereshkin, 2019; Tereshkin, 2019]. DPS представляет собой додекамер и состоит из 12 идентичных цепей [Grant, 1998] Структура депонирована в Protein Data Bank (PDB) — 1dps.pdb.

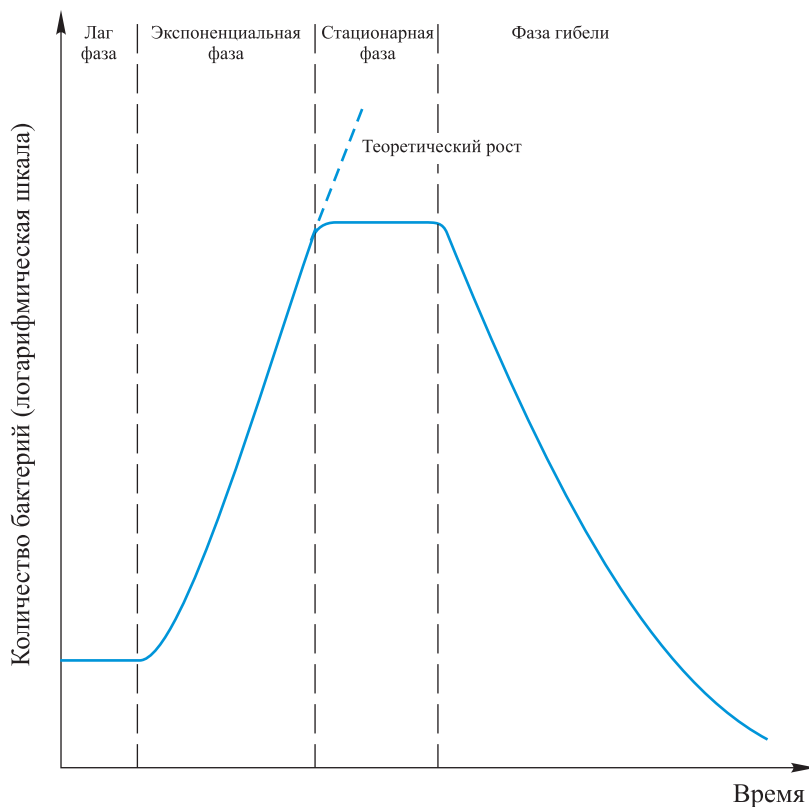


Рис. 3. Рост бактерий показан как функция $L = \log (\text{число бактерий} / \text{мл среды})$ и зависит от времени

3. Покоящиеся клетки. Структурный ответ на стресс. Внутриклеточная нанокристаллизация нуклеоида

При стрессе голодания поддержание упорядоченности динамическим способом становится невозможным (практически отсутствует метаболизм) и бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (ДНК) — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [Minsky, 2002]. Клетки становятся покоящимися. Большинство клеток (до 99,98 %) в долгое время голодаю-

щих популяциях, подвергаются автолизу. Остальные клетки развиваются в покоящиеся формы, которые существенно отличаются по структурной организации от растущих клеток. [Loiko, 2020].

Для покоящихся клеток можно ожидать обнаружения совершенно новых структур конденсированной ДНК, по сравнению с активно растущими клетками. Одним из механизмов структурного ответа на стресс голодания является внутриклеточная нано(био)кристаллизация ДНК с Dps. Механизм нано(био)кристаллизации ДНК обеспечивает защиту ДНК от повреждений и потенциальную способность возобновления метаболической активности бактериальных клеток в свежей среде. Другие виды структурного ответа на стресс голодания изложены в разделе 4.

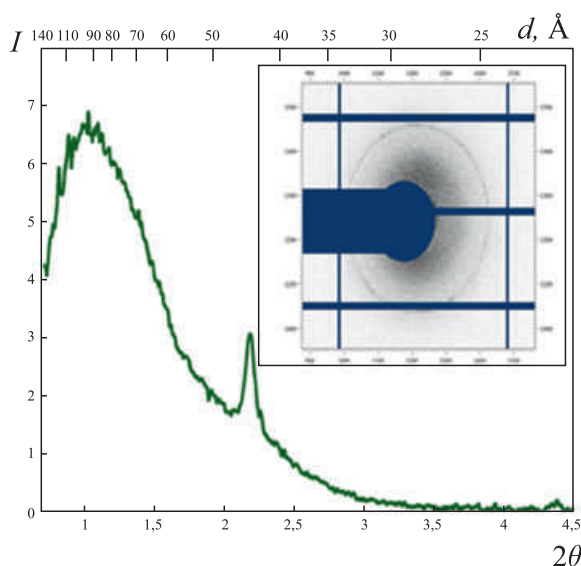


Рис. 4. Зависимость интенсивности рассеяния от угла 2θ для образца голодающих бактерий *E. Coli* штамма BL21-Gold(DE3). На врезке изображена дифракционная картина для этого образца. Повышенная интенсивность свидетельствует о наличии периодической упорядоченной организации (близкой к нанокристаллической) ДНК с ДНК-ассоциированными белками

Были проведены эксперименты по измерению рассеяния синхротронного излучения на образцах, содержащих клетки бактерий *E. Coli* штамма BL21-Gold (DE3), трансформированного плазмидой pET-Dps и подвергнутого индукции повышенной экспрессии белка Dps [Loiko, 2020; Krupyanskiy, 2018; Sinitsyn, 2017]. Для популяции клеток под действием стресса голодания зарегистрированы дифракционные картины вида, показанного на рис. 4 (врезка). С целью детального анализа этих данных построены зависимости интенсивности рассеяния

от угла рассеяния 2θ с помощью усреднения 2D-дифракционных картин по азимутальному углу. Обнаружены зоны повышенной интенсивности с периодами кристаллической структуры приблизительно 90 Å и 45 Å, в отличие от контрольных образцов растущих клеток, где областей повышенной интенсивности замечено не было. Первый широкий пик лежит в области 90–93 Å. Диаметр Dps додекамера около 90 Å, поэтому этот пик может соответствовать расстоянию между слоями Dps. Второй пик в 45 Å может соответствовать второму порядку дифракции Dps–Dps или расстояниям ДНК–ДНК в плотно упакованном ансамбле ДНК [Reich, 1994].

Приведенные на рис. 4 первые результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего нанокристаллической) нуклеоида бактерий с указанными выше периодами.

Просвечивающая электронная микроскопия позволяет визуализировать структуру конденсированной в нуклеоиде ДНК. Ниже приведены результаты исследований, полученные на сверхтонких срезах с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (Jeol, Япония) с ускоряющим напряжением 200 kV. Томограммы получали на полутолстых (300–400 нм) срезах. Аналитическую электронную микроскопию (энергодисперсионные рентгеновские спектры (ЭДС) и элементный анализ) проводили на аналитическом просвечивающем электронном микроскопе JEM-2100 (Jeol, Япония).

Электронная микроскопия и электронно-микроскопическая томография позволили добиться существенного прогресса в визуализации упорядоченных образований ДНК–Dps *in vivo*. В стационарной фазе при 24-часовом стрессе голодания ДНК образует тороидальные структуры (рис. 5, а). Для тороидов, возникающих в клетках *E. Coli* данные методы позволили определить форму и размеры тороидальных структур (внешний диаметр около 150 нм и внутренний диаметр около 50 нм, рис. 5, а) [Frenkiel-Krispin, 2004]. Далее (при 36-часовом стрессе голодания) наряду с тороидальными структурами появляются кристаллические структуры ДНК–Dps (рис. 5, б и в). Это позволило предположить, что тороиды играют роль подложки для последующего образования кристаллов ДНК–Dps. Авторами [Frenkiel-Krispin, 2004] выдвинута гипотеза о том, что ДНК локализована между гексагонально упакованными слоями Dps в кристалле (рис. 5, г). Это означает, что характерное расстояние между цепочками ДНК–ДНК будет около 90 Å, а не 45 Å, как предполагалось выше.

На рис. 6, а приведены результаты просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) для экспоненциально растущей клетки. Темные частицы обозначают рибосомы. Место, свободное от рибосом содержит хроматин [Frenkiel-Krispin, 2004]. Рис. 6, б содержит результаты ПЭМ для клетки, испытавшей стресс 48-часового голодания. Тороидальные структуры исчезают, наблюдаются достаточно большие кристаллы ДНК–Dps [Frenkiel-Krispin, 2004]. На рис. 6,

в показан срез томограммы клетки с нанокристаллической структурой. На врезке рис. 6, в представлен результат Фурье-анализа нанокристаллической области клетки, очерченной белой каймой [Loiko, 2020].

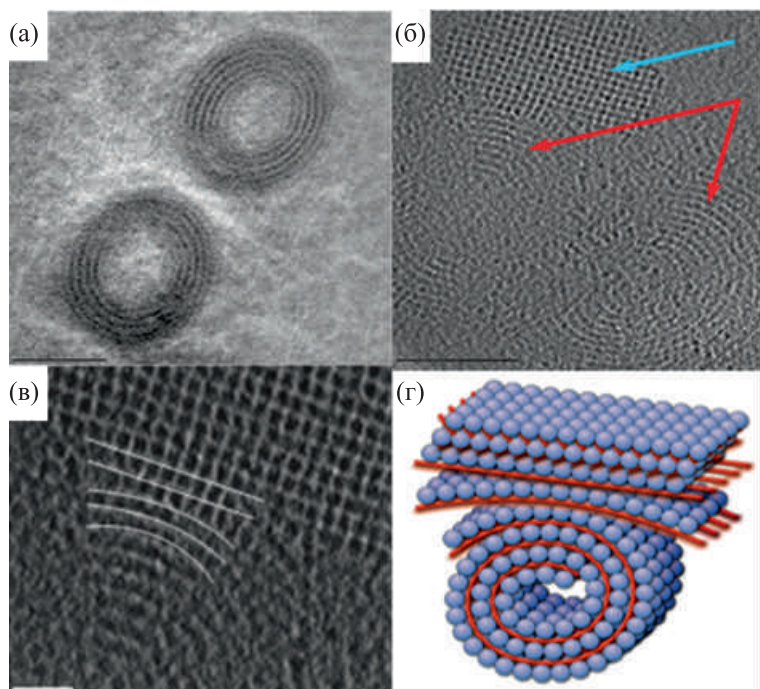


Рис. 5. ПЭМ. Последовательная внутриклеточная кристаллизация ДНК–Dps в клетках *E. coli* при стрессе голодания. (а) при 24 ч голодания (образование тороидов). (б) при 36 ч голодания — структуры ДНК (красные стрелки) в непосредственной близости от растущего кристалла ДНК–Dps (синяя стрелка). (в) Сильно увеличенная область из рис. (б), показывающая рост кристаллов (белые линии). Масштаб — 100 нм (а, б) и 25 нм в (в). (г) Модель внутриклеточной сборки ДНК–Dps, которая изображает первоначально сформированную тороидальную структуру, которая действует как шаблон для кристалла ДНК–Dps. Взято, с разрешения из [Frenkiel-Krispin, 2004]

Результат Фурье-анализа свидетельствует о наличии нанокристалла в этой области клетки [Loiko, 2020]. Отфильтрованный кристалл ДНК–Dps изображен на рис. 6, з. На белой вставке к рисунку изображен профиль интенсивности электронной плотности вдоль белой линии основного изображения. Черным выделены плотности, видимо, соответствующие межслойным цепям ДНК [Loiko, 2020]. Вопрос о точной локализации и форме укладки ДНК в нанокристаллах в комплексе с Dps, остается открытым. Приведенные результаты электронно-микроскопических исследований не визуализируют ДНК напрямую,

поэтому предполагаемая конформация ДНК в нанокристаллах является гипотетической.

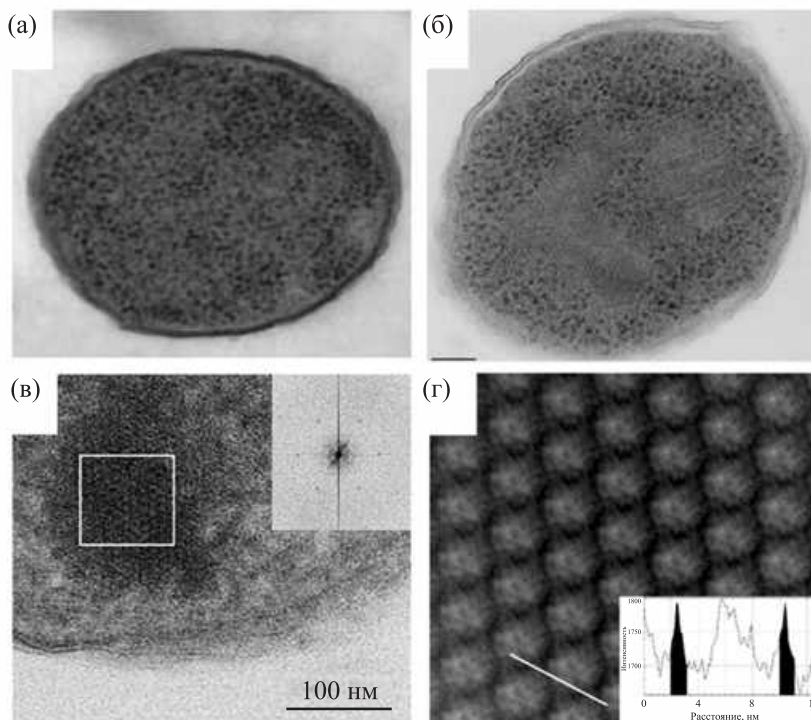


Рис. 6. Данные ПЭМ для клеток *E. coli*. а) Экспоненциально растущие клетки *E. coli*. Темные частицы — это рибосомы; пространство, свободное от рибосом, содержит ДНК. б) Просвечивающая электронная микроскопия клетки после 48 часов голодания, выявляющая плотно упакованные кристаллы ДНК–Dps. Взято с разрешения из [Frenkiel-Krispin, 2004]. в) полутолстый срез томограммы клетки *E. coli* с нанокристаллической структурой. Врезка — преобразование Фурье области с белой рамкой. г) отфильтрованный кристалл ДНК–Dps. Вставка — профиль интенсивности вдоль белой линии на основном изображении. Черным выделены плотности, соответствующие межслойным цепям ДНК

Экспериментальные данные, полученные с помощью дифракции синхротронного излучения и ПЭМ, не согласованы друг с другом полностью и не дают четкого ответа на вопрос о конформации ДНК в нанокристаллических областях клетки. Для того, чтобы найти ответ на этот вопрос было решено действовать следующим образом. Мы предположили, что ДНК–Dps легко образуют кристаллы *in vitro* и что конформация ДНК в этих кристаллах идентична конформации ДНК во внутриклеточных кристаллах. Для изучения конформации ДНК

в кристаллах *in vitro* были выбраны две методики: рентгеновская кристаллография, использующая в качестве источника синхротронное излучение и электронно-микроскопические исследования.

Опишем результаты, полученные методом макромолекулярной кристаллографии. Для проведения экспериментов были синтезированы кристаллические комплексы ДНК (длиной 3000 п.о.) с белком Dps. Синтезированные кристаллы оказались маленькими $\approx 3\text{--}7$ $\mu\text{м}$. Синтезированные малые монокристаллы плохо отражали излучение, обладали низкой симметрией и неизвестной пространственной группой. Поэтому автоматическая обработка данных, хорошо работающая в случае больших кристаллов, в данном случае оказалась неуспешной. Автоматическая обработка данных для синтезированных кристаллов выдала 6 пространственных групп, более или менее описывающие экспериментальные данные. Поэтому, основной задачей стала задача определения пространственной группы кристалла. Для продвижения дальше и определения пространственной группы пришлось объединять общие рефлексы от разных малых монокристаллов. Первым шагом вперед являлось определение кластера, состоящего из наиболее изоморфных монокристалльных данных. Для выбора удобного набора данных и их объединения был использован иерархический кластерный анализ с помощью программы ccCluster [Santoni, 2017]. Оказалось, что объединение данных, принадлежащих группе P1, наиболее успешно.

Таким образом, несмотря на малость размеров монокристаллов, низкую симметрию (P1), относительно большие параметры решетки и слабые рефлексы, программные комплексы Mesh & Collect и ccCluster, позволили определить структуру белка Dps [Kovalenko, 2020] (в процессе определения структуры оказалось, что ДНК не образовала комплекс ДНК–Dps, вышла из кристалла). Структура депонирована в Protein Data Bank как 6QVX [Kovalenko, 2020].

Для проведения электронно-микроскопических исследований *in vitro* были выращены тонкие монокристаллические комплексы из небольшой ДНК (длиной 165 п.о.) с белком Dps. Были изучены проекционные структуры кристаллов Dps–Dps и Dps–ДНК [Moiseenko, 2019]. Электронно-микроскопические исследования, позволяют увидеть следы ДНК в тонких (2D) кристаллах ДНК–Dps. Чтобы объяснить противоречие с данными РСА на массивных монокристаллах, мы предположили, что тонкие 2D-кристаллы ДНК–Dps имеют увеличенную по сравнению с массивным кристаллом постоянную решетки, поэтому в тонких кристаллах есть пространство для ДНК.

Однако, изучение кристаллов *in vitro* не оправдало ожиданий. Четкого ответа о конформации ДНК в монокристаллах ДНК–Dps получить не удалось. Остаются лишь гипотетические модели. Данные РСА и ПЭМ пока не дают согласованных результатов.

4. Альтернативные виды конденсации ДНК в клетке

До сих пор был рассмотрен один из основных механизмов структурного ответа, каким является внутриклеточная нано(био)кристаллизация ДНК с Dps. В этом разделе рассмотрим другие конденсированные состояния ДНК в клетке. Вспомним, что конденсация ДНК в нуклеоиде бактерий является промежуточным инженерным решением между практически свободной от белка упаковки ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковки ДНК в эукариотах [Teif, 2011].

Несколько слов об упаковке ДНК в вирусах. Обнаружено [Иса, 2019], что в вирусе-бактериофаге $\phi 6$ двойная спираль ДНК (dsDNA) хранится внутри капсида в виде катушки, которая имеет различные типы намотки, приводящие к различным типам жидкокристаллической упаковки. Упаковки могут меняться от гексагональной к холестерической и изотропной на разных этапах функционирования бактериофага $\phi 6$.

Перейдем к покоящимся бактериальным клеткам. Примечательно, что жидкокристаллические структуры были обнаружены во всех популяциях клеток *E. coli*: как с геном *dps*, так и без гена *dps* (Dps-null), то есть в отсутствие белка Dps в клетке. В некоторых клетках ДНК имеет вид холестерического жидкого кристалла (рис. 7). ДНК расположена в виде вложенных дуг, характерных для холестерической фазы, рибосомы выглядят как темные частицы и находятся на периферии клетки. Упаковка ДНК в жидкокристаллической фазе снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нуклеазы [Minsky, 2002].

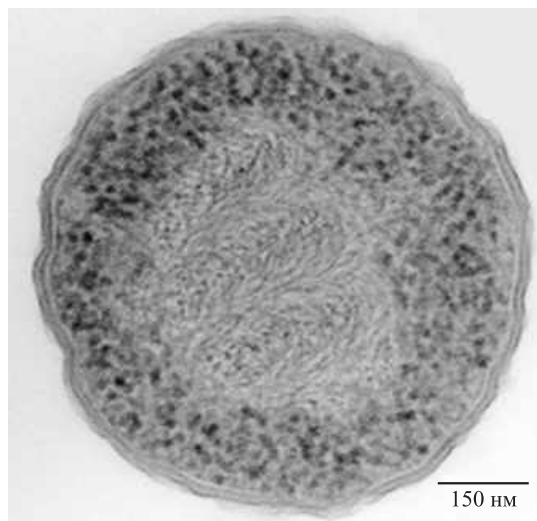


Рис. 7. Холестерическая жидкокристаллическая фаза ДНК. Шкала = 150 нм

Особый интерес представляет третий тип упорядоченной структуры, обнаруженный в покоящихся клетках *E. coli* впервые [Loiko, 2020]: свернутая нуклеосомоподобная структура. Во всех изученных популяциях (кроме мутанта *Dps*-null) как с избыточной продукцией *Dps*, так и без нее, цитоплазма от 5 % до 25 % клеток наполнена множеством сферических структур (рис. 8, а, б и в) со средним диаметром 30 нм. Томографические исследования (рис. 8, г) демонстрируют, что эти структуры не являются тороидами (см. рис. 5, а), но представляют собой почти сферические образования. Вспоминая, что бактериальный нуклеоид представляет собой промежуточное инженерное решение между свободной от белка упаковкой ДНК в вирусах и определяемой белками-гистонами упаковкой ДНК в эукариотах, данный тип конденсации ДНК был назван нами «свернутой нуклеосомоподобной» структурой [Loiko, 2020].

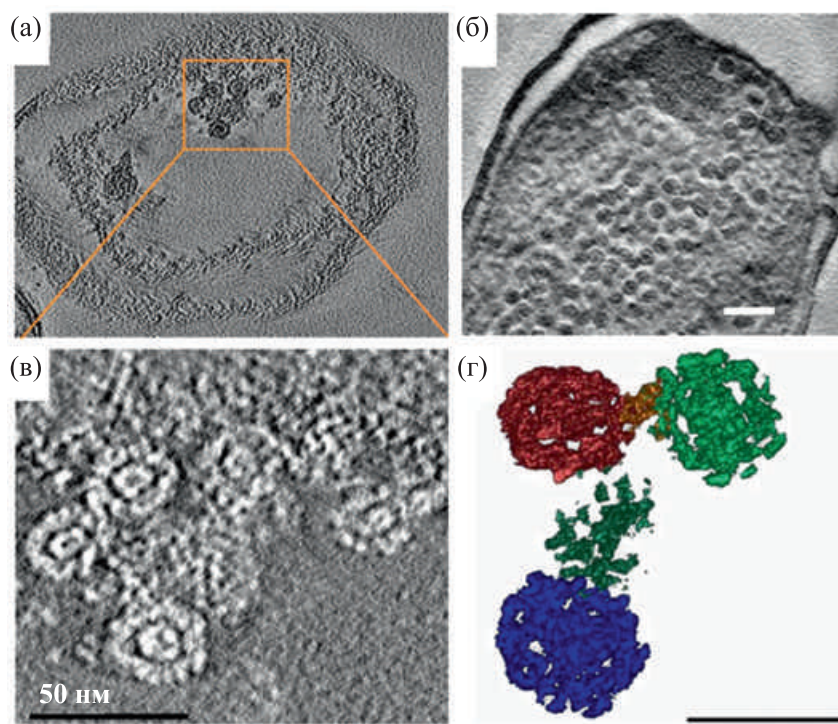


Рис. 8. Свернутая нуклеосомоподобная структура ДНК–Dps в покоящихся клетках *E. coli* cells. (а) Томограмма клетки *E. coli*, штамм Top10/pBAD-DPS, растущей на среде M9, без индукции производства Dps, возраст 7 месяцев. Масштаб — 500 нм. (б) Томограмма клетки *E. coli*, штамм BL21-Gold (DE3) /pET-DPS, растущий на среде M9, с индуцированной продукцией Dps в фазе линейного роста, возраст 7 месяцев. Масштаб — 100 нм. (в) Часть рис. (а) с большим увеличением. Масштаб — 50 нм. (г) Трехмерная реконструкция сферических ассоциатов Dps. Масштаб — 30 нм

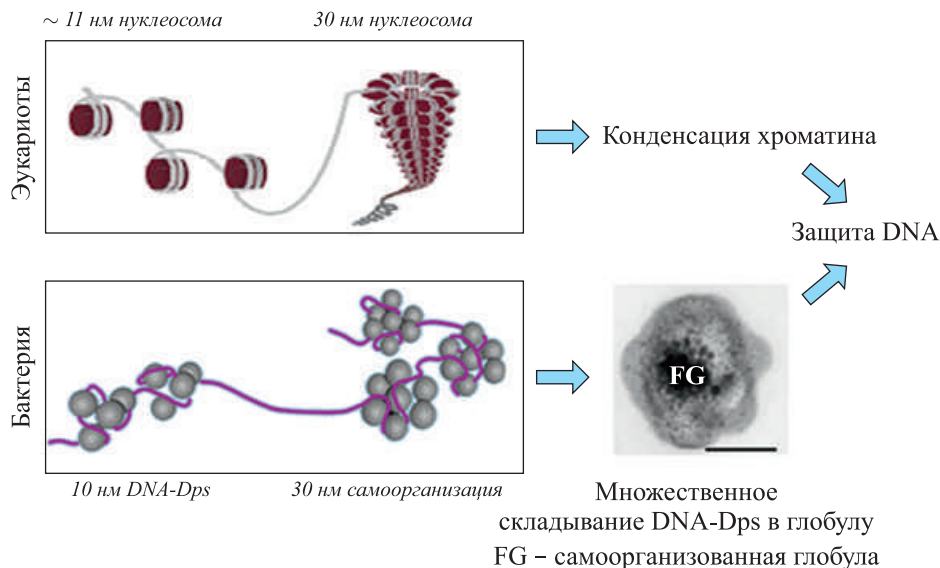


Рис. 9. Сравнение схем компактизации ДНК в прокариотических и эукариотических клетках. Схема сверху — нуклеосомы эукариот (гистоновые белки, обернутые ДНК) складываются в 30 нм фибриллы, которые, в свою очередь, складываются, образуя волокна и хроматин, защищая ДНК от внешних факторов. Нижняя схема — прокариоты не имеют гистонов, но ДНК обвивается вокруг молекул Dps или проходит через ассоциаты белков Dps, чтобы сначала сформировать «бусинки на нитке», которые затем могут складываться в сферические агрегаты 30 нм в диаметре и, далее, путем множественного складывания, переходит в глобулу ДНК-Dps-структуру, которая эффективно защищает нуклеоидную ДНК от внешних воздействий

Элементный анализ показал, что сферические агрегаты действительно содержат S и P (фосфор) пики, указывающие на присутствие ассоциатов ДНК–Dps [Loiko, 2020]. В бактериальных клетках сферические образования молекул Dps (см. рис. 9) могут действовать аналогично гистонам, на которые накручивается ДНК (гистоноподобное поведение). ДНК может также проходить сквозь сферические образования бусинок Dps, образуя «бусинки на нитке» (рис. 9). Для противодействия внешним стрессовым факторам эти образования должны располагаться на бактериальной ДНК достаточно плотно. Кроме того, как и в случае эукариотических клеток, где нуклеосомы сворачиваются, чтобы образовать фибриллы, которые, складываясь дальше, образуют хроматин хромосомы, бусинки на нити могут, путем множественного складывания, образовать компактную структуру, похожую на складчатую глобулу (рис. 9). Схематическое изображение образования свернутой нуклеосомоподобной структуры можно увидеть на рис. 9. Внешние молекулы Dps могут налипать на глобулу и дополнительно защищать ДНК [Loiko, 2020].

5. Обсуждение результатов и выводы

В кратком обзоре представлены оригинальные и литературные результаты по изучению архитектуры нуклеоида покоящихся клеток с помощью дифракции синхротронного излучения и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Результаты дифракционных экспериментов свидетельствуют о наличии периодической упорядоченной организации (скорее всего нанокристаллической) в нуклеоиде бактерий *E. coli*.

Более тонкую визуальную информацию о типе конденсации ДНК в нуклеоиде дает просвечивающая электронная микроскопия. В результате исследований с помощью ПЭМ удалось показать, что нет единого способа конденсации ДНК в популяции покоящихся клеток *E. coli*. В эксперименте наблюдались внутриклеточные нанокристаллические, жидкокристаллические и свернутые нуклеосомоподобные структуры ДНК. Доля специфической структуры зависит от штамма и условий культивирования. Свернутая нуклеосомоподобная структура наблюдалась и описана в оригинальных исследованиях авторов впервые [Loiko, 2020]. Конформация ДНК хорошо визуализируется в жидкокристаллических структурах, где нет экранирования ДНК белком Dps. В нанокристаллических и свернутых нуклеосомоподобных структурах ДНК визуализируется плохо, белок Dps не только снижает доступность молекул ДНК к различным повреждающим факторам, включая облучение, окислители и нуклеазы [Minsky, 2002], но и мешает визуализации ДНК.

В первом разделе описаны результаты почти пятидесятилетнего экспериментального изучения архитектуры нуклеоида бактерий, находящихся в стадии активного экспоненциального роста. Эти исследования не могли дать и не дали сведения с хорошим пространственным разрешением о структуре нуклеоида [Verma, 2019]. Однако, они показали, что конденсированная ДНК в нуклеоиде имеет иерархическую структуру [Verma, 2019], состоящую из трех уровней организации. Первый, низший уровень структурной организации, обеспечивается взаимодействием ДНК с ДНК-ассоциированными белками. На втором уровне структурной организации образуются плектонемичные сверхспиральные петли ДНК. На мегамасштабе ДНК образует шесть пространственно организованных доменов (макродоменов) с четкой территориальной организацией, на которые разделен бактериальный нуклеоид. Описана популярная теоретическая модель пространственной организации ДНК в клетке — фрактальная глобула, которая обладает поразительной территориальной организацией цепочки, как и ДНК в клетке на мега масштабе (шесть пространственно организованных доменов). Кроме этого, упаковка ДНК, описываемая фрактальной глобулой, позволяет практически безболезненно открыть любую петлю ДНК, открывая доступ к любому сайту ДНК, что важно для функционирования.

При переходе от активно растущих клеток к покоящимся клеткам, образующимся при стрессе голодания, ситуация радикально меняется. Химия и структура живых систем поддерживаются исключительно энергозависимым динамическим порядком [Шрёдингер, 2009; Minsky, 2002]. В растущей клетке (наличие метаболизма) упорядоченность поддерживается динамическим способом. При стрессе голодания поддерживать упорядоченность динамическим способом становится невозможным (практическое отсутствие метаболизма) и бактерии задействуют другой, энергонезависимый механизм поддержания упорядоченности и защиты жизненно важных структур (ДНК) — создание устойчивых молекулярных структур, как в неживой природе [Minsky, 2002]. Клетки становятся покоящимися. Изменения в окружающей среде должны влиять на архитектуру нуклеоида. Поэтому мы ожидали обнаружить в покоящихся клетках совершенно новые, по сравнению с растущими клетками, устойчивые молекулярных структуры, подобные тем, что встречаются в неживой природе. В эксперименте действительно обнаружены три новых вида стабильной конденсации ДНК в покоящихся клетках *E. Coli*, отличные от структуры ДНК в растущих клетках. Первые две: нанокристаллическая и жидкокристаллическая структуры типичны для неживой природы (рис. 5, 6, 7). Третий тип: свернутая, нуклеосомоподобная структура может быть результатом сложного взаимодействия и множественного сворачивания длинных молекул ДНК вокруг додекамеров Dps и их ассоциатов (рис. 8 и 9). Таким образом, новые структуры в покоящихся клетках обнаружены [Frenkiel-Krispin, 2006; Loiko, 2020; Krupyanskiy, 2018; Sinitsyn, 2017]. Изменения в окружающей среде повлияли на архитектуру нуклеоида. Однако, эти изменения, скорее всего, не затрагивают саму иерархию структуры ДНК в нуклеоиде. Возникает вопрос, структуры какого уровня были наблюдаемы в описанных экспериментах и приведены на рис. 5–9. Можно ли обнаружить структуры второго и третьего уровней компактизации методами, изложенными в данной работе? Методом ПЭМ изучается структура ДНК, находящаяся в тонких 2D-срезах. Этого, конечно, недостаточно, чтобы описать объемную 3D-структуру нуклеоида. Методом ПЭМ, использованным в работе, видимо, можно визуализировать лишь структуры, принадлежащие нижнему первому уровню компактизации ДНК.

С помощью синхротронного излучения извлекается информация о структуре целой клетки, однако, эта информация бедна, она говорит лишь о наличии или отсутствии упорядочения в клетке, позволяет грубо оценить размеры нанокристаллов. Затрагивают ли обнаруженные нанокристаллы макродомены? На эти многочисленные вопросы, исследования, приведенные в обзоре, не дают ответа.

6. Перспективы исследований

XX век был веком рентгеноструктурного анализа. С помощью рентгеноструктурного анализа была определена структура многих молекул, в том числе макромолекул белков и ДНК. Все молекулы, которые можно было закристаллизовать в сравнительно большие кристаллы исследованы и их структура определена. Однако, для макромолекул, образующих малые кристаллы размерами в несколько микрон, определение структуры уже представляет трудную задачу. Сейчас на первое место выходят исследования структур некристаллических объектов: вирусов и клеток. Последние достижения в методике визуализации дают надежду, что путь к трехмерной (3D) визуализации архитектуры нуклеоида *in vivo* с высоким разрешением будет найден и пройден в обозримое время. Методы нановизуализации и нанотомографии, используемые на синхротроне ESRF-EBS (Гренобль, Франция) позволяют количественно оценивать 3D-структуру и элементный состав образцов в их естественном состоянии [Procorio, 2019]. С помощью нанофлуоресцентной спектроскопии и нанотомографии можно изучать 3D-распределение фосфора P, а, следовательно, и ДНК, по всей клетке [Santos, 2019]. К сожалению, пространственное разрешение этого метода не превышает в настоящий момент 20 нм. Развитие метода нановизуализации ведет к созданию рентгеновского микроскопа. Пока это картина будущего, но исследователи в данной области уже сейчас вместо термина рентгеновская дифракция употребляют термин рентгеновская микроскопия.

Быстро развиваются методы электронной микроскопии. В них начинают использовать замораживание образцов под высоким давлением для сохранения естественной структуры. Такие образцы можно разделить на замороженные гидратированные срезы и анализировать их с помощью крио-ЭМ [Vanhecke, 2008]. Срезы можно также изготавливать сфокусированным ионным пучком после чего (срез за срезом) визуализировать архитектуру клетки в трех измерениях (3D) [Nagayan, 2015]. В работе [Ou, 2017], для визуализации хроматина *in situ*, был использован улучшенный метод обнаружения ДНК (с помощью флуоресцентного красителя). Метод получил название томография ChromEM или ChromEMT. ChromEMT позволил определить структуру и трехмерную (3D) организацию нитей хроматина, организацию крупномасштабных (мегабазных) доменов.

Очевидно, что наибольший успех принесет использование комбинации методов, использующих синхротронное излучение и электронную микроскопию. Описанные выше методические успехи обещают в ближайшем будущем визуализировать архитектуру нуклеоида с высоким разрешением. Сначала это будет сделано для активно растущей клетки. Далее будет дан ответ на один из наиболее интересных вопросов, каким образом внешняя среда (например, стресс голодания) влияет на 3D-архитектуру нуклеоида.

6. Благодарности

Автор приносит искреннюю благодарность своим постоянным соавторам Н. Г. Лойко, В. В. Коваленко, О. С. Соколовой, А. В. Моисеенко, К. Б. Терешкиной, Г. И. Эль-Регистан, Э. В. Терешкину, А. Н. Попову за совместное развитие данного направления исследований, И. В. Гордеевой за большую помощь при оформлении рукописи. Автор благодарит за финансовую поддержку Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание № АААА-А20-120031490003-7) в рамках которого был написан этот обзор.

Литература

- Бухарин О. В., Гинцбург А. Л., Романова Ю. М., Эль-Регистан Г. И. Механизмы выживания бактерий. — М.: Медицина, 2005.
- Крупянский Ю. Ф., Гольданский В. И. Динамические свойства и энергетический ландшафт простых глобулярных белков // УФН. — 2002. — Т. 172, № 11. — С. 1247.
- Шрёдингер Э. Что такое жизнь с точки зрения физики? — М.: РИМИС, 2009.
- Almirón M., Link A. J., Furlong D., Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* // *Genes. Dev.* — 1992. — Vol. 6. — P. 2646.
- Bloomfield V. A. DNA condensation // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 1996. — Vol. 6. — P. 334.
- Calhoun L. N., Kwon Y. M. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review // *J. Appl. Microbiol.* — 2011. — Vol. 110. — P. 375.
- De Martino M., Ershov D., van den Berg P. J., Tans S. J., Meyer A. S. Single-Cell Analysis of the Dps Response to Oxidative Stress // *J. Bacteriol.* — 2016. — Vol. 198. — P. 1662.
- Frenkiel-Krispin D., Ben-Avraham I., Englander J., Shimoni E., Wolf S. G., Minsky A. Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria // *Mol. Microbiol.* — 2004. — Vol. 51. — P. 395.
- Frenkiel-Krispin D., Minsky A. Nucleoid organization and the maintenance of DNA integrity in *E. coli*, *B. subtilis* and *D. radiodurans* // *J. Struct. Biol.* — 2006. — Vol. 156. — P. 311.
- Gennes P. G. D. Scaling concepts in polymer physics. — Ithaca: Cornell University Press, 1979.
- Grant R. A., Filman D. J., Finkel S. E., Kolter R., Hogle J. M. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA // *Nat. Struct. Biol.* — 1998. — Vol. 5. — P. 294.
- Grosberg A. Y., Khokhlov A. R. Statistical physics of macromolecules. — New York: AIP, 1994.
- Grosberg A. Y., Nechaev S. K., Shakhnovich E. I. The role of topological constraints in the kinetics of collapse of macromolecules // *J. Phys.* — 1988. — Vol. 49. — P. 2095.

- Ilca S. L., Sun X., El Omari K., Kotecha A., de Haas F., DiMaio F., et al. Multiple liquid crystalline geometries of highly compacted nucleic acid in a dsRNA virus // *Nature*. — 2019. — Vol. 570. — P. 252.
- Kovalenko V., Popov A., Santoni G., Loiko N., Tereshkina K., Tereshkin E., Krupyanskii Y. Multi-crystal data collection using synchrotron radiation as exemplified with low-symmetry crystals of Dps // *Acta Cryst.* — 2020. — Vol. F76. — P. 568.
- Krupyanskii Y. F. Architecture of nucleoid in the dormant cells of *Escherichia coli* // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. — 2021. — Vol. 2, No. S2. — P. 326.
- Krupyanskii Y. F., Loiko N. G., Sinitsyn D. O., Tereshkina K. B., Tereshkin E. V., Frolov I. A., et al. Biocrystallization in Bacterial and Fungal Cells and Spores // *Crystallogr. Reports*. — 2018. — Vol. 63. — P. 594.
- Lieberman-Aiden E., Van Berkum N. L., Williams L. et al. Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome // *Science*. — 2009. — Vol. 326. — P. 289.
- Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A. et al. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells // *PLoS ONE*. — 2020. — Vol. 15, No. 10. — P. e0231562.
- Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., El-Registan G. I., Sokolova O. S., Krupyanskii Y. F. Morphological peculiarities of DNA-protein complexes in dormant *Escherichia coli* cells, subjected to prolonged starvation Condensation of DNA in dormant cells of *Escherichia coli* // *bioRxiv Cell Biology*. — 2020.
- Minsky A., Shimoni E., Frenkiel-Krispin D. Stress, order and survival // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2002. — Vol. 3. — P. 50.
- Moiseenko A., Loiko N., Tereshkina K., Danilova Y., Kovalenko V., Chertkov O., Feofanov A. V., Krupyanskii Y. F., Sokolova O. S. Projection structures reveal the position of the DNA within DNA-Dps Co-crystals // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. — 2019. — Vol. 517, No. 3. — P. 463.
- Narayan K., Subramaniam S. Focused ion beams in biology// *Nat Methods*. — 2015. — Vol. 12, No. 11. — P. 1021.
- Ou H. D., Phan S., Deerinck T. J., Thor A., Ellisman M. H., O'Shea C. C. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells // *Science*. — 2017. — Vol. 357, No. 6349. — P. eaag0025.
- Procopio A., Malucelli E., Pacureanu A. et al. Chemical Fingerprint of Zn–Hydroxyapatite in the Early Stages of Osteogenic Differentiation // *ACS Central Science*. — 2019. — Vol. 5. — P. 1449.
- Reich Z., Wachtel E., Minsky A. Liquid-crystalline mesophases of plasmid DNA in bacteria // *Science*. — 1994. — Vol. 264, No. 5164. — P. 1460.
- Santoni G., Zander U., Muellder-Dieckmann Ch., Leonard G., Popov A. Hierarchical clustering for multiple-crystal macromolecular crystallography experiments: the ccCluster program // *J. of Appl. Crystallography*. — 2017. — Vol. 50. — P. 1844.
- Santos S., Yang Y., Rosa M. et al. The interplay between Mn and Fe in *Deinococcus radiodurans* triggers cellular protection during paraquat-induced oxidative stress // *Scienc*

- tific Reports. — 2019. — Vol. 9. — P. 17217.
- Sinitsyn D. O., Loiko N. G., Gularyan S. K., Stepanov A. S., Tereshkina K. B., Chulichkov A. L., et al. Biocrystallization of bacterial nucleoid under stress // *Russ. J. Phys. Chem. B.* — 2017. — Vol. 11. — P. 833.
- Teif V. B., Bohinc K. Condensed DNA: Condensing the concepts// *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 2011. — Vol. 105. — P. 208.
- Tereshkin E. V., Tereshkina K. B., Kovalenko V. V., Loiko N. G., Krupyanskii Yu. F. Structure of DPS Protein Complexes with DNA // *Russian Journal of Physical Chemistry B.* — 2019. — Vol. 13, No. 5. — P. 769.
- Tereshkin E., Tereshkina K., Loiko N., Chulichkov A., Kovalenko V., Krupyanskii Y. Interaction of deoxyribonucleic acid with deoxyribonucleic acid-binding protein from starved cells: cluster formation and crystal growing as a model of initial stages of nucleoid biocrystallization // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 2019. — Vol. 37. — P. 2600.
- Vanhecke D., Graber W., Studer D. Close-to-Native Ultrastructural Preservation by High Pressure Freezing // *Method Cell Biol.* — 2008. — Vol. 88. — P. 151.
- Verma S. C., Qian Z., Adhya S. L. Architecture of the Escherichia coli nucleoid // *PLoS. Genet.* — 2019. — Vol. 15, No. 12. — P. e1008456.
- Wolf S. G., Frenkiel D., Arad T., Finkel S. E., Kolter R., Minsky A. DNA protection by stress-induced biocrystallization // *Nature.* — 1999. — Vol. 400. — P. 83.
- Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F.M., van 't Riet K. Modeling of the Bacterial Growth Curve // *Applied and Environmental Microbiology.* — 1990. — Vol. 56, No. 6. — P. 1875.

Condensed DNA architecture in bacteria

Yu. F. Krupyanskii

Semenov Federal Research Center for Chemical Physics,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
E-mail: yufk@chph.ras.ru

The 3D architecture of the genome determines the function of the cell. The study of DNA condensation in a cell is also important for understanding the mechanisms of bacterial survival. For medicine, ordered DNA condensation ensures the resistance of pathogenic bacteria to antibiotics. In a dilute solution, DNA is several centimeters long. *Escherichia coli* is about 0,5 μm long. Such a dramatic decrease in the volume occupied by DNA is a consequence of its condensation. It was found that DNA is organized hierarchically in the nucleoid with three levels of DNA compaction: The lower level (small scale ≥ 1 kb bp) is provided by histone-like NAP proteins. Bacteria under starvation stress, unlike actively growing bacteria, use an energy-independent mechanism to maintain order and protect vital structures (DNA), as in inanimate nature. The study of the structure of DNA in the nucleoid of the bacterium *Esche-*

richia coli was carried out using synchrotron radiation diffraction and transmission electron microscopy (TEM). The experimental results made it possible to visualize the structures of the lower hierarchical level of DNA compaction in the nucleoid of resting cells. A series of diffraction experiments performed for the first time indicates the presence of a periodic ordered organization of DNA in all studied bacteria. TEM made it possible to extract finer visual information about the type of DNA condensation in the nucleoid of the bacterium Escherichia coli. Intracellular nanocrystalline, liquid-crystalline and folded nucleosome-like structures of DNA have been found. The folded nucleosome-like structure was observed for the first time and is the result of multiple folding of long DNA molecules around the Dps protein and its associates.

Keywords: DNA, bacterium Escherichia coli, starvation stress, dormant cell, intracellular nanocrystallization, liquid crystal structures, folded nucleosome-like structure, synchrotron radiation, electron microscopy and tomography.

МНОГОМЕРНАЯ ГЕОМЕТРИЯ РАСШИРЯЕТ ГОРИЗОНТЫ БИОФИЗИКИ. ПОЧЕМУ ЛИНЕЙНЫЕ ПОЛИМЕРЫ СМОГЛИ СТАТЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОСНОВОЙ ЖИЗНИ?

*К. В. Шайтан*¹

С использованием идей и методов многомерной геометрии и топологии на простых и наглядных примерах рассматриваются новые физические и математические идеи, лежащие в основе формирования уникальной пространственной структуры и конформационной динамики линейных биополимеров. Для понимания излагаемого материала не нужна специальная математическая подготовка — достаточно простейшего курса матанализа и линейной алгебры для биологов и понятия о комплексных числах. Дается ретроспективный взгляд на развитие идей о связи динамики и функции биомакромолекул. Описаны новые возможности для развития теоретических представлений и моделей для динамики макромолекул, которые связаны со статистическими свойствами функций в пространствах больших размерностей, топологией конфигурационного пространства линейных полимеров и ее последствиями для топографии многомерных поверхностей потенциальной энергии (ППЭ). Анализируются эффекты влияния вязкости среды на формирование коллективных степеней свободы в линейных полимерах, приводящих к формированию спиральных структур. Изучаются эффекты симметрии для ППЭ биополимеров вследствие инвариантности системы относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев или одинаковых блоков мономерных звеньев. Сформулирована гипотеза о возможном пути добиологической эволюции топографии ППЭ макромолекул, который мог привести к возникновению протоформ жизни.

Перед автором стояла сложная задача сделать изложение доступным для лиц, которые не занимаются профессионально теоретическими вопросами современной молекулярной науки и не имеют навыка прочтения математических формул. Поэтому в тексте мы стремились, с одной стороны, обойтись минимумом формул, но там, где этого избежать не удастся, даем, по возможности, подробные комментарии. Для улучшения восприятия мы используем также простые геометрические образы. Конечно, мы прекрасно понимаем, что за последние десятилетия во многом благодаря прогрессу технологий (основанных, никуда от этого не деться, на формулах) и распространению научных методов вширь во многих направлениях, например, биологии, выросло значительное число работников, которые не способны читать текст даже с простейшими математическими выкладками. Мы все же (а вдруг!) старались учесть и их интересы и дать в каждом разделе выжимку основных результатов простыми словами и без формул.

¹ Биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия.
E-mail: shaytan49@yandex.ru

Автор заранее приносит извинения за значительное число ссылок на собственные работы, которые мы все же старались минимизировать. Многие из этих текстов доступны на нашей странице в системе «ИСТИНА» (<https://istina.msu.ru/profile/ShaitanKV/>). Описанный в статье взгляд на проблему и результаты явились следствием почти 40-летних последовательных рассуждений, отдельные этапы которых фиксировались в наших статьях и нет ни возможности, ни нужды повторять многие детали этих рассуждений в данной работе.

Ключевые слова: структура и динамика линейных полимеров и биополимеров, законы сохранения в однородной вязкой среде и распределение энергии диссипации по степеням свободы при конформационных движениях, правила движения репрезентативной точки по многомерным энергетическим ландшафтам, топология конфигурационного пространства линейных полимеров и многомерные ряды Фурье для поверхности потенциальной энергии, парадокс сходимости для потенциальной энергии макромолекул, топография энергетических ландшафтов, принцип минимальной фрустрации для энергетической воронки, скрытые симметрии в биополимерах, механизмы фолдинга, свободная энергия биополимера и критическая температура денатурации, стрела молекулярной физико-химической эволюции.

*Моим родителям
и учителям...*

1. Введение

Физические принципы и закономерности, лежащие в основе формирования и функционирования огромного множества самых разнообразных уникальных пространственных структур в живой природе, представляют собой определенный вызов для современного естествознания. С одной стороны, мы хорошо знаем, что совокупность атомных и молекулярных частиц при заданной температуре в равновесии должна находиться в конфигурации, которая отвечает минимуму свободной энергии [1]. С другой стороны, эти структуры, сохраняя в целом близкую к равновесной конфигурацию, должны быть достаточно лабильны для выполнения своих функций. Сложность и многообразие взаимодействий множества различных макромолекулярных структур, приводящих к феномену жизни, вызывает естественное желание уложить основные факты в строгие рамки точных наук. Это в значительной мере определило направление развития идей в области молекулярной биофизики. В настоящее время мы имеем быстро, почти экспоненциально, нарастающий объем фактического материала в области структурной биологии и ее приложений. Но, как справедливо отмечает в недавней статье в *Nature* нобелевский лауреат, бывший Президент Лондонского Королевского общества Пол Нерс [2], большая проблема современной биологии состоит в том, что генерация огромного количества данных не сопровождается

генерацией и обсуждением новых идей. Эта мысль в полной мере относится и к фундаментальным проблемам формирования пространственной структуры биополимеров, базовым физическим принципам, которые в конечном счете привели к феномену жизни.

У нас здесь нет никакой возможности дать сколь-либо полное описание идей и результатов, которые были получены на этом пути, и автор оставляет за собой право выбора тех данных и тех авторов, которые оказали на него наиболее сильное влияние и привели к выводу о необходимости существенного расширения теоретического арсенала молекулярной биофизики для решения сложных и запутанных вопросов, к которым можно смело отнести таинство самоорганизации живых систем на самых различных уровнях. Есть и вопросы, о которых мы в настоящее время мало задумываемся, но которые несомненно станут весьма актуальными в обозримом будущем. Например, физические причины возникновения, отбора и эволюции макромолекул с уникальной пространственной структурой. Молекулярная физико-химическая эволюция и последующее формирование функционально способных и динамически лабильных структур (протоформ биополимеров) несомненно предшествовали возникновению живых систем. С вопросами молекулярной физико-химической эволюции связано и выяснение принципиальной возможности для реализации альтернативных молекулярных платформ для живых систем, что, по-видимому, может стать весьма актуальным в обозримой перспективе при изучении космических объектов.

Будет справедливо в начале статьи отметить ранние качественные теоретические представления типа «белок-машина», предложенные около полувека назад Л. А. Блюменфельдом [3] и Д. С. Чернавским [4], а также представления об электронно-конформационных взаимодействиях, предложенные М. В. Волькенштейном [5]. Развитие этих представлений, несомненно, было вызвано желанием найти закономерности в структурной организации и функционировании биомacroмолекул. Механизмы связи структуры и функции, в частности, белков на тот момент казались нагромождением случайностей, которые возникли в ходе эволюции в результате не очень понятных процессов. Несмотря на свою новизну и оригинальность эти представления не привели непосредственно к развитию четких теоретических моделей функционирования биомacroмолекул в виду ограниченности на тот момент необходимых знаний и отсутствия экспериментально обоснованных теоретических моделей динамических свойств биополимеров и, прежде всего, белковых глобул. Однако эти работы сыграли важную роль в привлечении внимания к проблемам динамики биомacroмолекул и ее связи с функционированием белков (см., например, А. Б. Рубин [6]). Продвижение техники современного физического эксперимента в область биологии, начавшееся в 70–80-х гг. прошлого века, дало толчок к переходу к более точным представлениям и моделям формирования структуры и динамического

поведения биополимеров. Здесь можно отметить принципиально новую на тот момент информацию, которая была получена о динамическом устройстве белков методами мессбауэровской спектроскопии [7] и спектральными кинетическими измерениями с использованием импульсных лазеров [8]. Температурные эффекты для формы мессбауэровского спектра белков оказались совершенно иными, чем для классических твердых тел или сильно вязких жидкостей. Преодоление этого парадокса оказалось возможным в рамках развитых нами представлений о конформационных движениях как ограниченной диффузии белковых групп [9]. Эти представления прошли традиционный путь признания от «этого не может быть» до «а кто же этого не знает?». Ограниченная диффузия для связанных частиц является следствием того, что силы трения при конформационных движениях на много порядков превосходят инерциальные силы. Такой характер конформационной динамики является общим и реализуется также и в других полимерных системах, что наглядно было продемонстрировано прямым восстановлением из мессбауэровских спектров зависимости среднего квадратичного смещения атомных групп от времени [10]. Большая серия работ группы Г. Фрауэнфельдера (недавно отметившего свое 99-летие) по спектрально-кинетическим измерениям рекомбинантного связывания оксида углерода с миоглобином также показала существенное отличие динамической организации молекулярных процессов в белковых глобулах от аналогичных процессов, которые имеют место, например, в растворах [8]. Имеют место сильно (экспоненциально) растянутые во времени кинетики связывания лигандов с активным центром, некрамерсовские зависимости скорости процессов от вязкости среды, влияние способа приготовления состояния молекулы белка на кинетику процессов. Эффекты влияния конформационной динамики на функционирование белковых структур оказалось удобным изучать и на примерах первичных стадий фотосинтеза [11]. Здесь также были обнаружены эффекты корреляции кинетических параметров реакций переноса электрона и параметров, связанных с конформационной подвижностью. Наблюдаемая совокупность эффектов нашла вполне рациональное полуколичественное объяснение с учетом моделей динамических свойств белковых глобул и послужила основой для создания полуколичественных моделей взаимосвязи конформационной подвижности и функции белков [12].

Отметим, что обсуждаемые теоретические представления о динамике и функционировании биополимеров не могут рассматриваться в отрыве от их пространственной структуры, которая определяет селективность и эффективность функциональных процессов. В частности, информация о пространственной структуре белков (ферменты, мембранные рецепторы, каналы и др.) имеет важнейшее практическое значение в современных науках о жизни. На установление и изучение этих структур тратятся огромные ресурсы. К 2022 году есть

информация о примерно 190 тысячах белковых структур, которые были определены экспериментально (этот список пополняется со скоростью порядка десятков тысяч структур в год) из более, чем 6 миллионов известных белковых последовательностей. Обратим внимание, что развитие компьютерных методов прогнозирования пространственной структуры белков, использующих алгоритмы искусственного интеллекта и основанных на статистическом анализе уже известных пространственных структур, начинает в последнее время конкурировать с экспериментальными методами [13] и в обозримом будущем, по-видимому, сильно изменит стиль и методы структурной биологии. С другой стороны, даже в этой ситуации технологического прорыва мы не приближаемся к разгадке тайны Природы о физических причинах и механизмах самопроизвольного формирования уникальных пространственных структур линейных биополимеров.

Процесс формирования уникальной пространственной структуры из цепи линейного биополимера называется фолдингом. Несмотря на огромное значение явления фолдинга для образования и функционирования живой материи, наши познания о физических механизмах регуляции фолдинга по признанию классиков этой науки далеки от полной ясности [14, 15].

Большую роль в развитии идей молекулярной биофизики сыграли работы школы И. М. Лифшица, работы А. Ю. Гроссберга и А.Р.Хохлова по переходу клубок-глобула в полимерных системах [16, 17]. Эти работы инициировали большой интерес к проблемам формирования пространственной структуры макромолекул. Важнейший для функционирования биополимеров процесс фолдинга или самосборки уникальной пространственной структуры имеет некие общие черты с переходом клубок-глобула, хотя в случае, например, фолдинга белков интерес к процессу сдвинут в сторону рассмотрения именно конкретных пространственных структур, которые формируются в результате сворачивания полипептидной цепи (см., например, О. Б. Птицын и А. В. Финкельштейн [18]).

Процесс фолдинга белковых структур в некотором смысле напоминает процесс кристаллизации, когда в зависимости от химического состава раствора и условий формируются определенные и разнообразные пространственные структуры. И в том и другом случаях, с точки зрения статистической физики и термодинамики, мы имеем дело со спонтанным переходом в состояние (или в пространственную конфигурацию), которое отвечает минимуму свободной энергии системы. Есть и существенные физические отличия этих двух процессов, но мы не имеем возможности на них останавливаться. Чтобы предсказать результат события самосборки пространственной структуры, нам, строго говоря, должна быть известна функция зависимости свободной энергии системы при заданных внешних условиях от взаимного положения атомов в пространстве. То есть наблюдаемый в трехмерном пространстве результат самосборки

(кристаллизации, фолдинга и пр.) определяется функцией (или поверхностью), которая зависит от огромного числа переменных. В случае кристаллов на помощь приходят соображения, связанные с плотностью укладки шаров различного размера. Впервые подобными задачами заинтересовался более 400 лет назад И. Кепплер, который опытным путем установил, что наиболее плотной упаковкой шаров одинакового радиуса является гранецентрированная упаковка. Л. Полинг использовал идеи плотной упаковки для выработки неких правил (пять правил Полинга), которые помогают с некоторой вероятностью предсказать пространственную структуру кристаллов для относительно простых соединений [19].

Несмотря на то, что полипептидная цепь чисто геометрически сложена из «шариков» примерно одинакового диаметра (порядка 3 Å) с маленькими «пупырышками» атомов водорода, соображения укладки шаров совершенно не работают в случае фолдинга таких цепей ввиду того, что подвижность этих атомов ограничена направленными связями. И это делает геометрические соображения плотной упаковки для таких объектов малопригодными. С другой стороны, удивительный феномен самосборки полипептидных цепей в уникальные пространственные белковые структуры, которые обеспечивают функционирование живых систем, бросает несомненный вызов современному естествознанию и, в частности, биофизике.

Общие физические идеи, которые были развиты для объяснения феномена фолдинга полипептидных цепей, были стимулированы очень известной короткой статьей или заметкой (опубликованной в малоизвестном французском журнале) Ц. Левинтала [20], в которой было обращено внимание на то, что поиск глобального минимума на многомерной поверхности свободной энергии в результате конформационных движений полипептидной цепи невозможен без особой (специальной) топографии этой энергетической поверхности. Дело в том, что конфигурация цепи изменяется за счет поворотов элементов цепи вокруг одинарных связей. Для цепи из N звеньев число возможных конфигураций цепи составляет порядка $10^{N/2}$. Это совершенно астрономически большая величина для реального биополимера. Если полагать, что эти повороты происходят независимо (это соответствует устройству ППЭ на рис. 1.1) и характерное время одного поворота составляет порядка 10^{-13} с, то времени жизни Вселенной ($\sim 10^{18}$ с) на много десятков и даже сотен порядков не хватит для поиска глобального минимума свободной энергии на такой поверхности.

Формальный обход этого противоречия мог бы состоять в том, что ППЭ устроена таким образом, чтобы к минимуму свободной энергии из развернутого состояния цепи вели некие пути или складки на многомерной энергетической поверхности подобно ущельям и рекам на гористой местности. Это можно представить схематически на рис. 1.2.

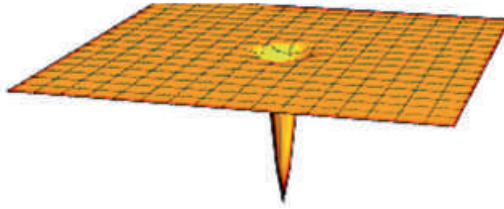


Рис. 1.1. Простейшая поверхность потенциальной энергии с глобальным минимумом в некоторой точке (конфигурации). В многомерном случае вероятность попасть в глобальный минимум исчезающе мала

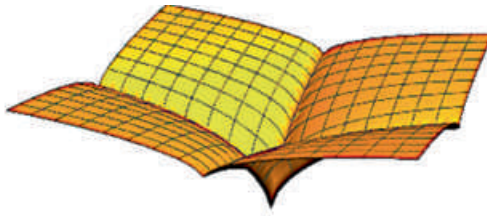


Рис. 1.2. Модификация ППЭ со складками поверхности, которые направляют репрезентативную точку в глобальный минимум

Реальная ситуация, конечно, не столь проста, как на рис. 1.2. На многомерной поверхности имеется, вообще говоря, экспоненциально большое число критических точек (т. е. точек, где все частные производные функции большого числа переменных равны 0). Эти точки соответствуют локальным минимумам, максимумам, седловым точкам различного индекса [21].



Рис. 1.3. Схематическое представление ППЭ, имеющей огромное число критических точек (минимумов, максимумов, седловых точек различного индекса)

Такая сложная топография многомерной энергетической поверхности обычно изображается в виде графов и даже для относительно простых систем имеет весьма сложный вид [22, 23]. При этом возникает вопрос — каким образом репрезентативная точка, двигаясь по столь сильно пересеченной многомерной поверхности (рис. 1.3), не «запутывается» по дороге и за разумное время

попадает в глобальный (или требуемый) минимум энергии? Коль скоро для, например, белков репрезентативная точка все-таки достигает глобального минимума за время эксперимента, то была высказана некая гипотеза — так называемый принцип «минимальной фрустрации энергетической воронки». Согласно этому принципу топография энергетических поверхностей для макромолекул, которые за разумное время сворачиваются в уникальные пространственные структуры, устроена по принципу воронки, стенки которой являются достаточно гладкими [24]. При этом вопрос о причинах такого столь удачного устройства топографии многомерных энергетических поверхностей для биополимеров, которые сворачиваются в уникальные структуры, остается, естественно, открытым. Как бы то ни было, совершенно загадочным выглядит наблюдаемое наличие четкой связи между первичной последовательностью биополимеров и их пространственной структурой [25]. С уровня имеющихся обычных представлений мы не понимаем, где и как может быть записана информация о топографии энергетической поверхности, каким образом возник или был произведен отбор химических структур, способных аккумулировать в себе такую информацию, можно ли такого рода принципами (если они есть) пользоваться за пределами класса химических структур, на которых построен имеющийся у нас вариант жизни?

Таким образом, обращаясь к физическим принципам формирования пространственной структуры и динамического поведения биомacroмолекул (что является фундаментальной основой для возникновения и функционирования живых систем), мы сталкиваемся с серьезными трудностями, которые могут показаться нам непреодолимыми на имеющемся уровне развития науки. С другой стороны, если мы вдруг поймем, каким образом положение глобального минимума энергетической поверхности биополимера связано с особенностями его химической структуры, то остается вопрос о реальном достижении этого минимума за разумное время с учетом возможной экспоненциальной сложности устройства рельефа многомерной энергетической поверхности. При этом нас не должны успокаивать отдельные успешные работы, например, по молекулярной динамике процессов фолдинга [26], когда для относительно небольших последовательностей получается вполне осмысленный результат. Ниже мы разберем эту ситуацию более подробно с точки зрения парадокса сходимости функции потенциальной энергии макромолекулы [27], под которым мы подразумеваем хорошие при определенных условиях результаты молекулярной динамики, в то время как имеется принципиальная и неустранимая ошибка при вычислении ППЭ и ее градиентов путем суммирования очень большого числа парных взаимодействий. Заметим, что сам факт успешности таких численных экспериментов многое говорит об особенностях динамики репрезентативной точки на ультрамногомерных энергетических ландшафтах.

Отсутствие явного прогресса в последние десятилетия в понимании физики процессов формирования пространственной структуры биополимеров (ситуация «замерзла» где-то в начале 90-х годов прошлого века) показывает, что необходим некий качественный скачок в методах исследования и привлечение новых математических идей к работе с многомерными энергетическими поверхностями и описанию динамики репрезентативной точки на таких сложных ландшафтах.

В дальнейшем изложении мы будем опираться на идеи и методы многомерной геометрии и топологии в приложении к ультрамногомерным энергетическим ландшафтам, которые развивались в наших работах с начала 1990-х годов и которые привели в последние годы к достаточно четкой картине динамики репрезентативной точки на многомерных ландшафтах. (Отметим, что префиксы «много» и «ультрамного» не должны заранее смущать читателя. Ниже мы увидим, что «ультрамного» часто оказывается проще и продуктивнее, чем «несколько».)

Вторая группа идей возникла у нас более 20 лет назад [12, 28–31] и связана с влиянием топологии конфигурационного пространства линейных полимеров на топографию энергетических поверхностей. Дело в том, что в случае линейных полимеров конфигурация макромолекулы изменяется за счет поворотов по торсионным углам и топология пространства, на котором задаются функции (в данном случае это поверхность потенциальной энергии — ППЭ), сильно ограничивает возможный вид этих функций. При определенных условиях эти ограничения могут стать решающими и создать условия для отбора пространственных структур линейных полимеров в интересном направлении.

2. Парадокс сходимости потенциальной энергии

Начиная с 80–90-х годов прошлого века теоретические исследования в области молекулярной биофизики в значительной мере переместились на поляну компьютерного и суперкомпьютерного молекулярного моделирования, когда стало возможным за разумное время решать сотни тысяч уравнений движения и визуализировать достаточно длинные траектории для систем из многих десятков тысяч атомов (иногда до миллиона атомов).

Ключевым вопросом для исследований методами молекулярной динамики является информация о силах, которые действуют между атомами. Определению и калибровке параметров силовых полей были посвящены огромные усилия, и процесс этот все время продолжается. За последние годы молекулярное моделирование превратилось в мощную ветвь современной биологии (а также химии, материаловедения и пр.). Как это часто бывает, технология, вырвавшись на простор массового практического использования, начинает жить своей жиз-

нию, отрывается от научных основ, которые ее породили, что приводит иногда к забавным ситуациям [32, 33]. Но мы сейчас о другом.

Наука делает существенные шаги вперед, когда возникают и разрешаются парадоксы. Биофизика и молекулярное моделирование не исключение. Стоит только задуматься о смысле совершенно привычных фактов, как вот он — появляется парадокс, который и двигает мысль и знание вперед. Казалось бы, простая и привычная вещь — силовое поле и решения уравнений молекулярной динамики в выбранном силовом поле. Красивые слайды, статьи, диссертации... Однако задумаемся над проблемой точности моделирования динамики системы из, например, 1000 атомов. В правой части уравнений движения стоят силы взаимодействия между частицами, которыми мы моделируем атомы. Эти силы есть отрицательные градиенты потенциальной энергии системы. Обычно вклад невалентных взаимодействий в потенциальную энергию задается (с некоторыми вариациями) как сумма парных атом-атомных взаимодействий

$$U \sim \sum_{i,j} u_{ij}. \quad (2.1)$$

Такое представление является приближением, точность которого заранее неизвестна. Поэтому параметры парных взаимодействий не являются универсальными константами (которые зависят только от сорта атомов), но должны тщательно калиброваться для каждого типа молекул (липиды, пептиды, нуклеотиды и т. п.). Понятно, что каждое из порядка миллиона слагаемых в (2.1) содержит некую ошибку (пусть, очень и очень оптимистично, порядка долей процента). С другой стороны, для каждой конфигурации сумма (2.1) есть сумма огромного числа относительно небольших знакопеременных слагаемых. Такие ряды, как известно в математике, сходятся к определенному значению очень плохо, и результат суммирования в (2.1) плохо предсказуем. При таких условиях надеяться, что сумма (2.1) дает правдоподобный рельеф энергетической поверхности (а тем более правдоподобные градиенты этой поверхности), вряд ли разумно. Почему же тогда технология молекулярного моделирования (это именно технология) при определенных условиях работает и молекулярная динамика биополимеров дает результаты, которые часто очень близки к эксперименту? Еще более трудный вопрос связан с динамикой фолдинга. Как так получается, что плохой ряд дает ППЭ, которая в ряде случаев приводит репрезентативную точку в конфигурацию, которая часто оказывается близка к реальной (например, к альфа-спирали)? И где, в конце концов, источник устойчивости (или робастности) такой динамической системы? По каждому из таких вопросов нужно писать отдельную статью, но мы не собираемся это делать. Наша задача показать путь, двигаясь по которому можно получить ответы на эти поставленные вопросы и не только.

3. Экстремальные принципы многомерной динамики в условиях диссипации

Мы начнем с конкретного примера. Начиная с работы Ц. Левинталя по проблеме фолдинга, неявно предполагалось, что репрезентативная точка двигается по энергетической поверхности неким случайным образом под действием тепловых флуктуаций. Тем самым предполагалось, что динамика системы происходит во флуктуирующей диссипативной (по-простому, вязкой) среде. Флуктуации и диссипация обязательно соседствуют вместе. Это две стороны одного и того же явления, что находит отражение в так называемой флуктуационно-диссипационной теореме [34], суть которой состоит в том, что интенсивность теплового шума (или автокорреляционная функция случайной силы) пропорциональна коэффициенту трения или вязкости. Как это ни странно, но в большинстве теоретических работ по проблемам фолдинга диссипация и вязкость среды в явном виде не присутствовали, хотя экспериментально влияние вязкости на динамику макромолекул изучалось [35]. Мы обращаем внимание и покажем, что диссипативные свойства среды (вязкость) являются важнейшим фактором, который определяет динамическую доступность определенных областей конфигурационного пространства линейных полимеров. Более того, мы увидим, что диссипация делает запрещенным для движения подавляющую часть объема многомерного конфигурационного пространства макромолекулы, который, в принципе, мог бы быть доступен по энергетическим соображениям.

Представим себе длинную шарнирно сочлененную цепь, помещенную в вязкую жидкость. Зададимся вопросом, как будут двигаться звенья такой цепи при поворотах вокруг связей, соединяющих узлы цепи? Задача кажется очень сложной (и это в самом деле так), если мы интересуемся детальным описанием движений звеньев. Подойдем к проблеме с другой стороны. Есть ли ограничения на движения узлов цепи (рис. 3.1)?

Будем поворачивать одно из звеньев цепи, которое расположено, например, горизонтально на рис. 3.1. Если вязкость среды нулевая, то вслед за этим звеном будет поворачиваться весь длинный участок до конца цепи. Однако, если вязкость большая, то свободный поворот длинного участка цепи будет невозможен. Скорость поворота звеньев цепи будет линейно расти по мере удаления от оси вращения и, соответственно, будет расти сила сопротивления (вязкого трения) этих звеньев цепи, которая пропорциональна линейной скорости частиц. Из дальнейшего рассмотрения будет видно, что в результате вынужденно начнутся взаимные согласования поворотов звеньев, чтобы минимизировать потери энергии на трение. Интуитивно это понятно, но нужно дать этому строгое математическое описание, из которого получатся и количественные выводы о характеристиках движения шарнирной цепи в вязкой среде. Изменение угла

зрения на проблему плюс математическая формализация дают интересный результат из серии «как же об этом не догадались ранее?».

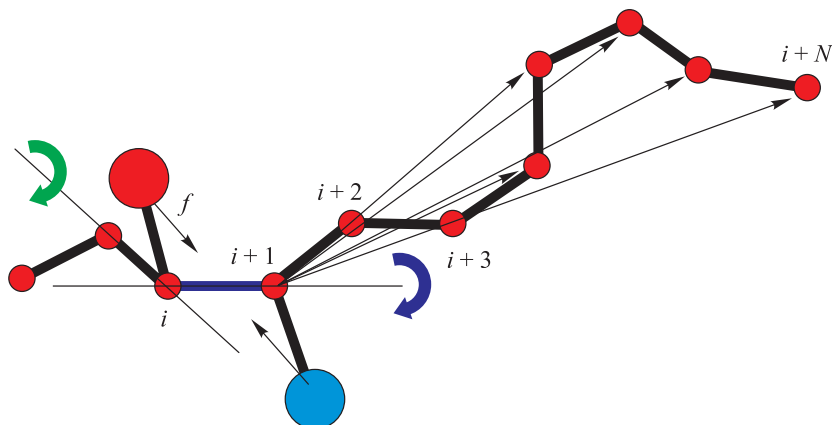


Рис. 3.1. Пространственная конфигурация макромолекулярной цепи. Повороты концевой группы (слева) не требуют корреляции с поворотами вокруг других связей и происходят при минимальном изменении положения «хвоста» цепи справа. Повороты вокруг связи в середине цепи под действием сил взаимодействия f_{12} между группами 1 и 2 приводят к перемещению удаленных от оси поворота групп. Линейные скорости движения удаленных групп пропорциональны соответствующим расстояниям от оси поворота и при заданной угловой скорости поворота потери энергии на преодоление сил трения становятся очень большими и не соответствуют выигрышу в потенциальной энергии цепи. Уменьшение скорости диссипации энергии и согласование этой скорости со скоростью убывания потенциальной энергии цепи возможно при уменьшении линейной скорости удаленных от оси вращения узлов за счет подстройки или корреляции поворотов по другим связям

Как хорошо известно, жидкости (включая воду) с точки зрения молекулярных движений с амплитудами более нескольких долей ангстрема являются сильно вязкими средами [9, 36]. Поэтому, рассматривая динамику движений шарнирно сочлененной цепи в жидкой среде, в уравнения движения можно пренебречь инерциальными членами (ускорением) и система уравнений выглядит так [37]:

$$\gamma_i \dot{\vec{r}}_i = - \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i}. \quad (3.1)$$

Напомним, что в механике точкой над вектором скорости i -го узла (или любой иной переменной) обозначается дифференцирование по времени. В (3.1) слева стоит произведение коэффициента трения узла на скорость (это сила трения с обратным знаком), справа отрицательный градиент потенциальной энергии

или сумма сил, которая действует на i -й узел за счет взаимодействия с остальными узлами цепи. При желании в уравнение (3.1) можно добавить силы реакции (если связи нерастяжимые) и тепловой шум. На окончательных результатах это принципиально не скажется [38]. Система уравнений (3.1) очень сложная, макромолекула совершает весьма разнообразные и, на первый взгляд, мало предсказуемые движения. На самом деле, из уравнений (3.1), как оказалось, можно получить информацию о некоторых общих характеристиках движения [37, 38], которые принципиально важны и указывают на наличие определенных коллективных степеней свободы при конформационных движениях полимерной цепи в результате поворотов по двугранным углам. Одно из прямых следствий системы уравнений (3.1) при конформационных движениях в однородной вязкой среде может быть получено путем суммирования уравнений (3.1) для всех узлов цепи

$$\sum_i \gamma_i \dot{\vec{r}}_i = 0. \quad (3.2.1)$$

Другое очевидное следствие получается суммированием уравнений (3.1), которые предварительно векторно умножены на соответствующие радиус-вектора

$$\sum_i \gamma_i [\dot{\vec{r}}_i \times \vec{r}_i] = - \sum_i \left[\frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \times \vec{r}_i \right] = 0. \quad (3.2.2)$$

Соотношения (3.2.1) и (3.2.2) могут быть получены из условий инвариантности системы относительно трансляций и поворотов макромолекулы как целого в однородной вязкой среде [37]. Эти соотношения отражают также то обстоятельство, что сумма всех внутренних сил в системе, а также сумма моментов внутренних сил равны 0. Далее удобно ввести обычным образом вектора угловых скоростей поворотов по двугранным углам или вокруг связей, соединяющих узлы, например, узлы i и $i + 1$ в соответствии со следующей формулой:

$$\dot{\vec{\phi}}_i = \frac{\vec{r}_{i+1} - \vec{r}_i}{|\vec{r}_{i+1} - \vec{r}_i|} \frac{d\varphi_i}{dt},$$

в которой вектор угловой скорости равен скалярному значению угловой скорости, умноженной на единичный вектор вдоль связи узлов с номерами i и $i + 1$. Тогда линейная скорость движения, например, узла i определяется как сумма вкладов от поворотов вокруг всех связей в соответствии с формулой

$$\dot{\vec{r}}_i = \sum_{k=1}^N [\dot{\vec{\phi}}_k \times (\vec{r}_i - \vec{r}_k)]. \quad (3.3)$$

Применяя формулы (3.2.1), (3.2.2) и (3.3) и пользуясь векторной алгеброй для цепи линейного полимера с жесткими валентными связями и валентными угла-

ми, можно получить интересный закон сохранения для векторов угловых скоростей поворотов:

$$\sum_i \dot{\vec{\phi}}_i = \sum_i \frac{\dot{\phi}_i \vec{b}_i}{b_i} = 0. \quad (3.4)$$

В этой формуле мы для упрощения обозначений использовали скалярные величины угловых скоростей и вектора $\vec{b}_i$, которые направлены вдоль связей между узлами цепи i и $i + 1$ и длина которых b_i равна длинам соответствующих связей. Реально выполнение условия (3.4) означает, что при релаксационном сворачивании полимерной цепи процесс идет таким образом, что направления поворотов вокруг связей неким образом чередуются так, чтобы в сумме компенсировать друг друга (это мы интуитивно чувствовали при разборе ситуации на рис. 3.1). В результате имеет место тенденция к формированию спиральных или спиралеподобных структур. Этот эффект мы наблюдали ранее при численном моделировании динамики сворачивания полипептидных цепей и модельных линейных полимеров в вязкой среде [39–42].

Дополнительную информацию о характере конформационных движений цепи можно получить, умножая (3.4), например, скалярно на специально сконструированные векторы. Так, например, если умножить (3.4) на вектор $\vec{l}$:

$$\vec{l} = \sum_i \vec{b}_i,$$

который соединяет концы цепи, то получим сумму произведений угловых скоростей поворотов вокруг связей на проекции этих связей на выбранный вектор

$$\sum_k \dot{\phi}_k l_k = 0; \quad l_k = \frac{\vec{b}_k \vec{l}}{b_k}. \quad (3.4.1)$$

Отметим, что обсуждаемые закономерности динамики полимерной цепи в однородной вязкой среде наиболее применимы к условиям, когда все узлы цепи экспонированы в раствор, т. е. в ситуации развернутого состояния или достаточно рыхлого клубка. Так, если цепь находится в развернутом состоянии, то скалярные произведения l_k в сумме (3.4.1) преимущественно положительные. Следовательно, угловые скорости должны часто менять знак для выполнения условия (3.4.1). По мере сворачивания цепи ориентация направления векторов связей относительно вектора $\vec{l}$ будет изменяться и чередование знаков угловых скоростей станет не столь выраженным. Эта ситуация также наблюдалась ранее при моделировании сворачивания длинных полипептидных цепей [39, 41].

Заметим, что при учете в уравнениях движения флуктуаций среды и переходе от уравнений (3.1) к уравнениям Ланжевена [34, 38] полученные выше соотношения выполняются лишь в среднем по ансамблю. С другой стороны, соотношения типа (3.4) могут дать идеи для проведения численных и обычных экспериментов для дополнительного выяснения механизмов самоорганизации пространственной структуры макромолекул и их комплексов в различных условиях.

Дополнительно, пользуясь приемами многомерной геометрии из системы уравнений (3.1), можно вывести ряд общих и полезных заключений о динамике репрезентативной точки на многомерных энергетических ландшафтах.

Умножим уравнения (3.1) на соответствующий вектор скорости и просуммируем по всем узлам:

$$\sum_i \gamma \dot{\vec{r}}^2 = - \sum_i \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \dot{\vec{r}}. \quad (3.5)$$

Слева в уравнении (3.5) получилась величина скорости диссипации энергии (или мощности, которая равна сумме произведений сил трения на скорости узлов) макромолекулярной цепи:

$$S = \sum_i \gamma_i \left(\dot{\vec{r}}_i \right)^2. \quad (3.6)$$

Справа, в соответствии с правилами вычисления полной производной для функции многих переменных, получаем скорость убыли потенциальной энергии этой цепи:

$$\frac{dU}{dt} = \sum_i \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \dot{\vec{r}}_i. \quad (3.7)$$

Соотношение (3.5) — это просто закон сохранения энергии, который перепишем в виде

$$\frac{dU}{dt} + S = 0. \quad (3.8)$$

В формулах (3.5)–(3.8), казалось бы, нет ничего нового. Но в случае большого числа измерений из них можно извлечь интересную информацию о конформационной динамике макромолекулы. Дело в том, что уравнения (3.6) и (3.8) можно свести к уравнениям для гиперсфер очень большой размерности. Такие гиперсферы обладают рядом интересных асимптотических свойств [43], которые позволяют устанавливать статистические закономерности для переменных в уравнениях (3.6) и (3.8). На этих свойствах гиперсфер основаны мно-

гие и широко известные закономерности в статистической физике и теории вероятностей. Приведем лишь один пример — распределение Максвелла для скоростей частиц при температуре T . Этот пример позволит понять суть наших дальнейших действий с формулами (3.6) и (3.8), используя свойства сфер большой размерности.

Как известно, для системы из большого числа взаимодействующих частиц, например, в жидкости или газе, при заданной температуре мы не можем определить траектории движения частиц, но мы можем определить распределение вероятности для скоростей частиц [34, 43]. Покажем, как это сделать, используя свойства многомерных сфер. Если имеется N частиц с массами m_i , то суммарная кинетическая энергия задана уравнением

$$E = \sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} \frac{m_i}{2} v_{i\alpha}^2 = \frac{3Nk_B T}{2}, \quad (3.9)$$

где мы сразу ввели среднее значение кинетической энергии на одну степень свободы, равную $k_B T/2$. Индекс $\alpha = 1, 2, 3$ отмечает декартовы компоненты вектора скорости.

Введем в (3.9) новые переменные:

$$V_{i\alpha} = \frac{v_{i\alpha} \sqrt{m_i}}{\sqrt{3Nk_B T}} \quad (3.10)$$

и перепишем (3.9) в виде уравнения гиперболы единичного радиуса в пространстве $3N$ измерений:

$$\sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} V_{i\alpha}^2 = 1. \quad (3.11)$$

Приставка «гипер» не должна смущать, это просто естественное обобщение трехмерной сферы на случай большого числа измерений.

Естественно, траектории движения каждой частицы неизвестны. Но набор скоростей частиц в каждый момент времени представлен репрезентативной точкой на поверхности гиперболы (3.11).

При движении частиц, в результате столкновений и обмена энергией и импульсом, состояние системы изменяется и репрезентативная точка движется по поверхности гиперболы (3.11). По прошествии определенного времени (времени релаксации скоростей частиц — в жидкости это порядка 10^{-13} с) траектории этих точек заматают практически всю поверхность гиперболы, и мы можем говорить о распределении плотности репрезентативных точек на этой многомерной поверхности.

На данном этапе рассуждений необходимо принять во внимание очень важное свойство многомерных сфер. Ключевым моментом здесь является известная теорема [43], смысл которой состоит в следующем. Если имеется физически разумная, например, в избыточном варианте дифференцируемая функция большого числа переменных $f(x_1, x_2, \dots, x_n)$ и мы рассматриваем значения этой функции на поверхности гиперсферы конечного радиуса a

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

то в пределе большой размерности n значения функции на поверхности гиперсферы будут практически постоянными. Когнитивный диссонанс, который вызывает это утверждение, может быть смягчен простым соображением. Если мы рассматриваем объем, ограниченный гиперсферой конечного радиуса, то при неограниченном возрастании размерности этот объем стремится к нулю. Это связано с тем, что в знаменателе формулы объема многомерного шара стоит гамма-функция и объем шара стремительно убывает при увеличении числа измерений

$$V_n = \frac{\pi^{n/2}}{\Gamma\left(1 + \frac{n}{2}\right)} a^n; \quad \Gamma(n) \sim n^n e^{-n}.$$

То есть гиперсфера при очень больших размерностях в некотором смысле вырождается в точку. Теорема о постоянстве значений функции на поверхности гиперсферы большой размерности, как уже отмечалось выше, имеет очень глубокие следствия в статистической физике и теории вероятностей [43].

Таким образом, возвращаясь к формуле (3.11), можно утверждать, что при большом числе измерений плотность распределения репрезентативных точек на поверхности многомерной сферы будет практически постоянной. Для вычисления плотности вероятности того, что значение переменной $V_{i\alpha}$ примет определенное значение, необходимо зафиксировать эту переменную и рассмотреть гиперсферу с размерностью на 1 меньшей, чем размерность гиперсферы (3.11) с уменьшенным квадратом радиуса на величину квадрата фиксированной компоненты

$$\sum_{\substack{i \neq i0 \\ \alpha \neq \alpha0}} V_{i\alpha}^2 = 1 - V_{i0, \alpha0}^2. \quad (3.12)$$

Для простоты обозначений мы объединили в (3.12) суммирование по всем индексам. Плотность вероятности найти конкретное значение переменной $V_{i0, \alpha0}$ будет, очевидно, равна отношению площадей поверхности гиперсфер (3.12) и (3.11). Площадь поверхности гиперсферы размерности n пропорциональна

радиусу в степени $n - 1$. Обращаясь к формулам для поверхности гиперсферы [43], видно, что при больших значениях $n \gg 1$ это отношение мало чувствительно к изменению величины размерности на 1 и для отношения площадей или плотности вероятности для переменной $V_{i\alpha}$ при больших N (мы здесь пользуемся известным предельным переходом для числа « e » и упрощаем обозначение индексов, так как это справедливо для любой переменной $V_{i\alpha}$) получаем:

$$\rho(V_{i,\alpha}) \sim (1 - V_{i,\alpha}^2)^{3N/2} = \left(1 - \frac{m_i v_{i\alpha}^2}{3Nk_B T}\right)^{3N/2} \sim \exp\left[-\frac{m_i v_{i\alpha}^2}{2k_B T}\right]; \quad N \gg 1. \quad (3.13)$$

То есть мы получили известное распределение Максвелла [34] для кинетической энергии (и для скоростей) частиц. Обратим внимание, что это распределение значений по каждой из координат гиперсферы зависит только от кинетической энергии частицы. И это распределение, переписанное в терминах кинетической энергии частиц, не зависит от сорта и массы частиц.

Обратимся далее к статистическим закономерностям, связанным с диссипацией энергии при конформационных движениях в вязкой среде и анализу формул (3.5)–(3.8). Во-первых, путем замены переменных представим (3.6) в виде уравнения единичной гиперсферы

$$\sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} Y_{i\alpha}^2 = 1, \quad (3.14)$$

где мы ввели переменные, пропорциональные компонентам скоростей узлов цепи

$$Y_{i\alpha} = \frac{\dot{r}_{i\alpha}}{\sqrt{\gamma_i S}}. \quad (3.15)$$

Далее обратим внимание, что уравнение (3.8) в этих переменных также является уравнением гиперсферы с радиусом $1/2$ и центром, который находится на расстоянии $1/2$ от начала координат (центра гиперсферы (3.14))

$$\sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} (Y_{i\alpha} - L_{i\alpha})^2 = \frac{1}{4}. \quad (3.16)$$

Мгновенное положение центра этой гиперсферы определяется набором компонент сил, действующих на узлы цепи

$$L_{i\alpha} = -\frac{\frac{\partial U}{\partial r_{i\alpha}}}{2\sqrt{\gamma_i S}}. \quad (3.17)$$

Заметим, что

$$\sum_{i=1}^N \sum_{\alpha=1,2,3} L_{i\alpha}^2 = \frac{1}{4}. \quad (3.18)$$

Переходя на язык многомерной геометрии в пространстве скоростей, масштабированных описанным выше способом (формулы (3.14) и (3.16)), можно представить очень сложное динамическое поведение длинной шарнирной цепи в вязкой среде в виде вращения гипербферы, отражающей закон сохранения энергии внутри гипербферы диссипации энергии. Решение уравнений механики (3.1) и значения скоростей движения узлов цепи в каждый момент времени определяются координатами точки касания этих гипербфер. Конечно, конкретная траектория движения точки касания по гипербфере диссипации энергии нам не известна. Для этого мы должны решить уравнения движения. Однако, если число степеней свободы велико, то мы можем сделать важные статистические выводы о характере движения рассматриваемой цепи аналогично тому, как это было сделано выше в случае вывода распределения Максвелла (3.13).

Пусть нам известна общая скорость диссипации энергии цепи в данный момент времени S и, соответственно, средняя скорость диссипации энергии $\sigma(t)$, которая приходится на одну степень свободы

$$\sigma(t) = \frac{S(t)}{3N}. \quad (3.19)$$

Принципиальный вопрос для понимания закономерностей конформационной динамики полимерной цепи состоит в следующем. Можно ли определить, как соотносятся между собой скорости диссипации энергии, приходящиеся на отдельные узлы цепи, которые можно выразить через величины $Y_{i\alpha}$? На первый взгляд, ответить на этот вопрос можно только после решения системы уравнений (3.1). Однако ситуация с вычислением *распределения вероятностей* для значений диссипации энергии по отдельным степеням свободы, которую мы обсуждали выше, с математической точки зрения выглядит совершенно аналогично только что рассмотренной задаче о распределении Максвелла. Физическая же сторона дела будет несколько иной.

При движении (поворотах вокруг связей) центр гипербферы сохранения энергии (3.16) — точка O — движется по поверхности гипербферы половинного радиуса. Координаты точки O определяются компонентами сил, которые действуют на узлы цепи, которые нормированы в соответствии с (3.17) и достаточно сложным образом меняются в диапазоне от $-1/2$ до $1/2$ как при изменении конфигурации цепи при движении, так и за счет столкновений с молекулами среды (если мы исходим из уравнений Ланжевена). В некотором смысле, эти флуктуации играют роль столкновений в примере, который был рассмотрен выше, и по

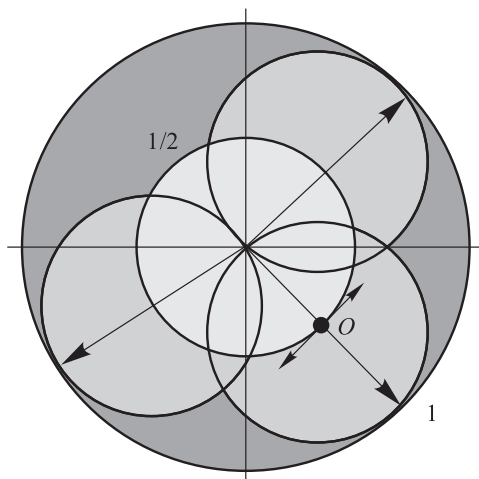


Рис. 3.2. Схематическое изображение единичной гиперсферы диссипации энергии (3.14) и гиперсфер (3.16) радиуса 1/2, которые касаются поверхности гиперсферы диссипации энергии и отражают закон сохранения энергии. Точка O — центр гиперсфер (3.16) имеет координаты $\{L_{i\alpha}\}$ и при движении звеньев цепи движется по поверхности гиперсферы радиуса 1/2 с тем же центром в нуле, что и гиперсфера диссипации энергии

тем же соображениям координаты точки O при больших N будут по прошествии определенного времени практически равномерно распределены по поверхности гиперсферы половинного радиуса. Репрезентативная точка состояния цепи в пространстве скоростей есть проекция точки O на поверхность гиперсферы диссипации энергии в точку касания гиперсфер (рис. 3.2). Аналогично, траектория движения репреzentативной точки со временем покрывает поверхность этой гиперсферы. Наличие тепловых флуктуаций дополнительно «размывает» траектории по гиперсфере [38]. Некоторые отличия в распределении скоростей репреzentативной точки можно ожидать для небольшого числа переменных, связанных с узлами на краях цепи, но в пределе больших N это принципиально не сказывается на общей физической картине конформационных движений цепи. В результате, при большом числе конформационных степеней свободы распределение плотности репреzentативных точек на гиперсфере диссипации энергии становится практически равномерным. Далее, фиксируя одну из переменных в уравнении гиперсферы (3.14) и вычисляя отношение площадей гиперсфер, получаем при $N \gg 1$ формулу для плотности вероятности скорости диссипации энергии по выделенной степени свободы:

$$\rho(Y_{i,\alpha}) \sim (1 - Y_{i,\alpha}^2)^{3N/2} = \left(1 - \frac{\gamma_i \dot{r}_{i\alpha}^2}{3N\sigma}\right)^{3N/2} \sim \exp\left[-\frac{\gamma_i \dot{r}_{i\alpha}^2}{2\sigma}\right]. \quad (3.20)$$

Примечательно, что это распределение для скоростей диссипации энергии не зависит от номера узла. То есть конформационные движения в вязкой среде устроены так, что диссипация энергии в среднем равномерно распределена по всем узлам и степеням свободы (естественно, большие отклонения можно ожидать для концевых участков). То есть *конформационные движения должны происходить таким образом, чтобы не было резких различий в скоростях диссипации энергии между различными узлами, что достигается определенной согласованностью поворотов вокруг связей между узлами цепи* (рис. 3.3).

Этот эффект можно также заметить, например, при визуализации траекторий молекулярной динамики линейных полимеров и биополимеров. Роль диссипативной среды при этом выполняют либо молекулы растворителя и/или алгоритмы термостатирования системы [32, 33, 44]. Всегда казалось удивительным, что наблюдается определенная согласованность движения молекулярных цепочек, которая напоминает некий «танец». Около 20 лет назад нами был обнаружен эффект динамического изоморфизма, который состоит в том, что зависимость от времени автокорреляционных функций для многих торсионных углов в олигопептидах ведет себя удивительно подобным образом [30, 45–48]. Мы тогда отнесли этот эффект на счет определенного устройства энергетической поверхности природных полипептидов. Вместе с тем, мы также обнаружили, что при моделировании динамики олигопептидов в воде (т. е. увеличении эффективной вязкости среды) этот эффект усиливается. Не снимая вопроса о специфическом устройстве энергетической поверхности пептидов (см. ниже), в настоящее время мы видим, что основная причина динамического изоморфизма состоит в корреляции конформационных движений за счет диссипативных сил и выравнивания средних скоростей диссипации энергии по различным конформационным степеням свободы. Так бывает, что экскурсы в многомерную геометрию неожиданно объясняют не очень понятные результаты 20-летней давности.

Смысл величины средней скорости диссипации энергии σ , приходящейся на одну степень свободы (3.19), которая присутствует в формуле (3.20), нуждается в пояснении. Эта величина зависит от конфигурации цепи (или времени). Корректность вывода формулы (3.20) требует достаточно полного представительства репрезентативных точек в пространстве скоростей на гиперсфере диссипации энергии. Это возможно по истечению некоторого времени релаксации, когда система «забывает» о мгновенных значениях скоростей узлов и действующих сил. Тепловые флуктуации среды способствуют более быстрой релаксации скоростей. Результирующие силы воздействия на узлы привязаны к мгновенной конфигурации цепи и весьма сложным образом изменяются при даже небольшом шевелении конфигурации длинной цепи. Нужно некоторое время, за которое за счет шевеления конфигурации цепи (в результате механического движения и флуктуаций) произойдет релаксация этого параметра.

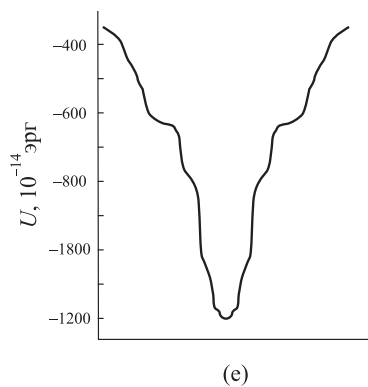
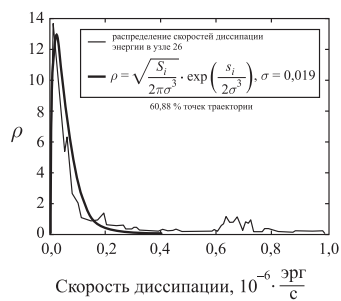
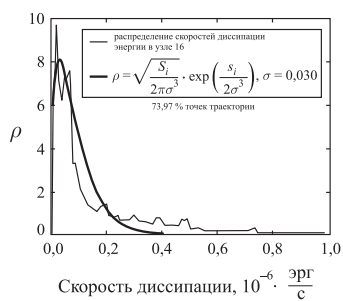
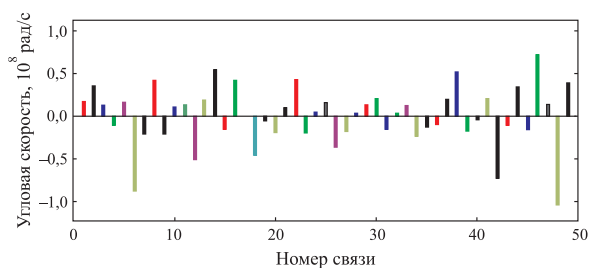
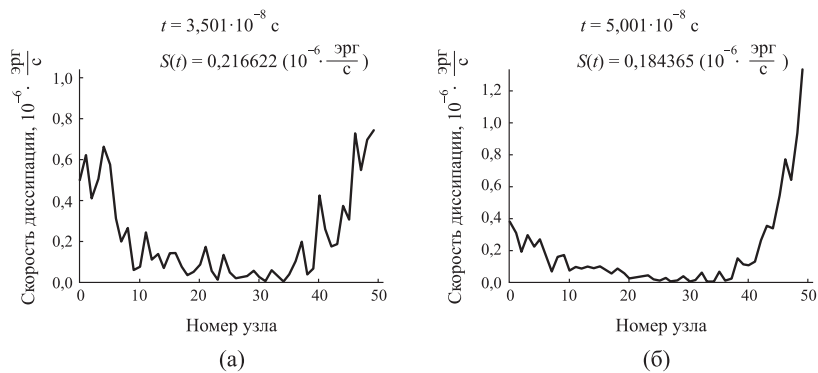


Рис. 3.3. Результаты численного моделирования динамики сворачивания цепи из 50 одинаковых узлов [41, 42]. (а), (б) Скорости диссипации энергии для различных узлов цепи для двух моментов времени. (в) Гистограмма угловых скоростей поворотов вокруг связей в момент времени 40 нс (общая длина траектории сворачивания цепи 340 нс). Обратим внимание, что наблюдаемое чередование направлений скоростей поворотов по двугранным углам находится в соответствии с формулами (3.4) и (3.4.1) [37]. (г), (д) Функции распределения (усредненные по времени) для скоростей диссипации энергии 16-го и 26-го узла соответственно. (е) Зависимость потенциальной энергии при сворачивании цепи от времени. Для наглядности график совмещен с зеркальным отображением, что дает представление о профиле энергетической воронки, в которой шарнирно соединенные узлы взаимодействуют посредством суммы парных потенциалов Леннарда–Джонса.

Можно грубо оценить диапазон этих времен релаксации. Как известно, время релаксации скорости в жидкости очень мало и составляет порядка 10^{-13} с. Время релаксации сил, действующих на узел цепи, можно оценить из молекулярно-динамических расчетов. По нашим оценкам это время составляет порядка 10 пс. Таким образом, в формуле (3.20) параметр средней парциальной скорости диссипации энергии имеет смысл усредненной величины на масштабе времени релаксации результирующих сил на узлы цепи. При значительном изменении конфигурации цепи этот параметр меняется и изменяются средние парциальные скорости диссипации энергии. Но важно, что принцип равномерного распределения средних скоростей диссипации по узлам цепи остается неизменным.

Мы уделили много внимания равномерности распределения средних скоростей диссипации энергии по узлам цепи. Это имеет принципиальное значение, так как скорости диссипации энергии равны также скоростям убыли потенциальной энергии по соответствующим степеням свободы. Это означает, что при сворачивании полимерная цепь будет избегать таких изменений конфигурации, когда потенциальная энергия будет резко уменьшаться (изменяться) только по относительно небольшому числу степеней свободы. Эту динамическую особенность движения на многомерном энергетическом ландшафте мы назвали принципом «начинающего горнолыжника» [38]. Как работает этот принцип, наглядно показано в [39, 40], где методами молекулярной динамики изучалось влияние вязкости на результат сворачивания полипептидных цепей длиной до 150 остатков. В вязкой среде при сворачивании цепи имеется очень четкая корреляция поворотов по торсионным углам ϕ и ψ , причем повороты по этим углам происходят, в основном, в противоположных направлениях, формируя спиральную пространственную структуру цепи («привет» формулам (3.4) и (3.4.1)). Уменьшение вязкости среды ниже некоторого порога приводит к полной дезорганизации сворачивания цепи и вместо альфа-спиральной структуры получается хаотическая укладка глобулы.

В результате выравнивая скоростей диссипации энергии при поворотах по торсионным углам репрезентативная точка выбирает на многомерной поверхности потенциальной энергии относительно гладкие маршруты. В этом смысле существенно уменьшается необходимость в гипотезе минимальной фрустрации энергетической воронки для ППЭ биополимеров, которые формируют уникальные пространственные структуры. Достижение глобального минимума и избегание репрезентативной точкой энергетических ловушек за счет низкой вероятности движения по траекториям с резким изменением потенциальной энергии по относительно небольшому числу степеней свободы не требует каких-то исключительных требований к гладкому устройству ППЭ (или идеализации принципа минимальной фрустрации) для, например, белков, хотя определенные требования к топографии ППЭ белков продолжают сохраняться. Этот вопрос мы обсудим несколько ниже.

В завершение данного раздела обсудим некоторые дополнительные особенности динамики системы, описываемой уравнениями механики с сильным трением (3.1), которые могут быть получены рассмотрением свойств решений (3.1) и условных экстремумов для скорости убывания потенциальной энергии и скорости диссипации энергии [38]. Эти свойства интуитивно очень понятны, но будучи применены к конкретной ситуации дают существенное дополнение к физической картине формирования пространственных структур в вязкой среде, в том числе и при сворачивании линейной полимерной цепи. Мы можем задать следующими двумя вопросами. Пусть репрезентативная точка движется в соответствии с системой уравнений (3.1). Вопрос первый — есть ли ограничения на скорость уменьшения потенциальной энергии в каждый момент времени (т. е. для каждой мгновенной конфигурации цепи)? Ответ состоит в том, что для каждой заданной конфигурации цепи *скорость убыли потенциальной энергии на механической траектории будет максимально возможной по сравнению со всеми другими виртуальными перемещениями*. То есть репрезентативная точка будет спускаться по самому крутому склону многомерной (!) ППЭ в том смысле, что суммарное (!) уменьшение потенциальной энергии по всем (!) N степеням свободы будет максимальным. Вопрос второй — есть ли ограничения на скорость диссипации энергии в каждый момент времени (т. е. для каждой мгновенной конфигурации цепи)? Ответ состоит в том, что для каждой заданной конфигурации цепи *скорость диссипации энергии на механической траектории будет минимальной по сравнению с другими виртуальными перемещениями!* Так как эти две величины — скорость убыли потенциальной энергии и скорость диссипации энергии равны друг другу, то эти два утверждения можно воспринять как парадокс! На самом деле никакого парадокса нет и рис. 3.3 объясняет данную коллизию. Дело в том, что скорость диссипации энергии и скорость убыли потенциальной энергии системы должны рассматриваться в различных

подпространствах скоростей узлов цепи. Эти утверждения могут быть доказаны аналитическими методами [38], но в данном контексте удобнее воспользоваться наглядными геометрическими образами.

Обратим внимание, что скорость уменьшения потенциальной энергии цепи есть скалярное произведение алгебраических векторов [49] со следующими компонентами:

$$-\frac{dU}{dt} = -\sum_i \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_i} \dot{\vec{r}}_i = -\left(\frac{1}{\sqrt{\gamma_1}} \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_1}, \frac{1}{\sqrt{\gamma_2}} \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_2}, \dots, \frac{1}{\sqrt{\gamma_N}} \frac{\partial U}{\partial \vec{r}_N} \right) * (\sqrt{\gamma_1} \dot{\vec{r}}_1, \sqrt{\gamma_2} \dot{\vec{r}}_2, \dots, \sqrt{\gamma_N} \dot{\vec{r}}_N). \quad (3.21)$$

Напомним, что это величина положительная. Первый вектор в (3.21) задает положение точки O — центра гиперсферы сохранения энергии (3.7) (или (3.16) в безразмерных переменных, рис. 3.2). Второй вектор — вектор в пространстве скоростей (точнее, приведенных скоростей). Если мы рассматриваем виртуальные движения узлов цепи, для которых выполняется закон сохранения энергии, то концы векторов скоростей должны лежать на гиперсфере сохранения энергии (рис. 3.4). Из геометрии рис. 3.4 видно, что максимум скалярного произведения (3.21) или проекции вектора типа 1 на рис. 3.4 на направление в точку касания гиперсфер (соответствует максимуму скорости убывания потенциальной энергии) будет реализован в случае коллинеарности обсуждаемых двух векторов. То есть это случай, когда вектор скоростей проходит по диаметру в точку касания гиперсфер сохранения энергии и диссипации энергии. Напомним, что именно эта точка касания и является решением уравнений механики (3.1), для которой скорость убывания потенциальной энергии, как мы сейчас показали, является максимальной.

Что касается скорости диссипации энергии, то мы должны рассмотреть всевозможные виртуальные изменения конфигурации цепи (в пространстве скоростей) при заданной максимальной скорости убыли потенциальной энергии. Заметим, что скалярное произведение (3.21) остается неизменным и максимально возможным, если вектор скоростей (вектор типа 2) будет выходить из точки касания гиперсфер (точки решения уравнений (3.1)) в гиперплоскость, которая перпендикулярна (нормальна) к вектору, соответствующему максимальной скорости убыли потенциальной энергии. Из рис. 3.4 видно также, что эта гиперплоскость является также касательной к гиперсфере диссипации энергии в точке решения уравнений (3.1). Любое отклонение вектора скоростей от точки решения уравнений механики увеличивает радиус гиперсферы диссипации энергии. То есть любые мыслимые сценарии движения цепи, которые отклоняются от механических траекторий (при условии выполнения закона сохранения энергии), увеличивают скорость диссипации энергии.

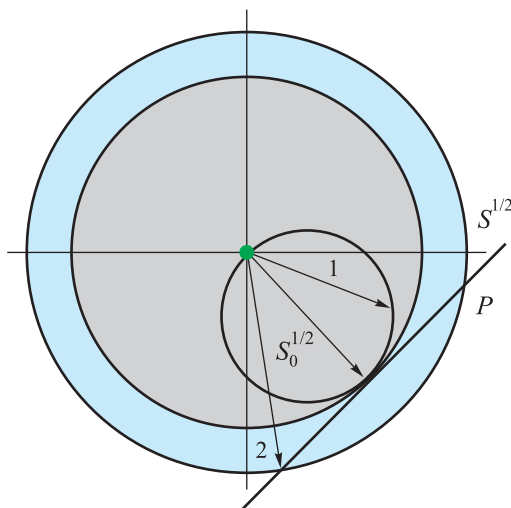


Рис. 3.4. Гиперсферы диссипации энергии (ДЭ) радиуса $S^{1/2}$ и гиперсфера сохранения энергии. Все вектора типа 1 соответствуют виртуальным движениям с сохранением энергии. Гиперплоскость P нормальна к радиус-вектору, проведенному в точку касания. Все вектора типа 2, лежащие на P , имеют одинаковые проекции на направление радиус-вектора в точку касания (соответствуют максимальному значению скорости уменьшения ПЭ), но принадлежат гиперсферам ДЭ с большим радиусом (скоростью диссипации энергии)

Итак, что нам дает многомерная геометрия для понимания динамики линейной полимерной (биополимерной) цепи в вязкой среде? Самое главное — мы увидели, что за нагромождением случайностей могут быть и определенные закономерности (3.4) и (3.20), но что еще важнее — это существенные ограничения на характер возможных движений узлов цепи. Эти ограничения связаны с низкой вероятностью таких движений узлов цепи, когда скорости диссипации энергии узлов цепи при их движениях резко различаются. Это означает также, что маловероятны и такие движения, когда изменение потенциальной энергии цепи будет резко различаться для разных степеней свободы. Репрезентативная точка в этой ситуации как бы выбирает относительно гладкие траектории движения на многомерном энергетическом ландшафте. Фактически, мы здесь встречаемся с весьма своеобразным механизмом формирования коллективных степеней свободы в линейных полимерах в вязкой среде, когда определенная согласованность в движениях узлов цепи является следствием действия диссипативных сил. (Нам в этой связи вспоминаются давние поиски и обсуждения неких коллективных (акцептирующих) мод для внутрибелковых движений в связи с концепцией «белок-машина».)

Возвращаясь к началу статьи, к парадоксу сходимости потенциальной энергии (2.1), обозначим мысль о том, что в условиях вязкой среды или имитирующих ее алгоритмов нам может быть и не нужно знать в деталях всю поверхность потенциальной энергии, а нужно быть уверенными в рельефе ППЭ только вдоль относительно гладких траекторий? К этой проблеме мы опять вернемся несколько ниже.

И последнее замечание. Вышесказанное применимо к разнообразным системам взаимодействующих частиц в достаточно вязкой среде (один из возможных примеров — заряженный коллоид). Необходимым условием является достаточно сильное взаимодействие между частицами, которое быстро перемешивает скорости и силы, которые действуют на частицы. Заметим, что может, например, возникнуть законный вопрос. Почему, скажем, цепи полиэтилена не формируют регулярной, в частности, спиральной структуры? Ответ здесь очень простой и состоит из двух компонентов. Во-первых, у нас нет разбавленного раствора полиэтилена и цепи мешают друг другу. Во-вторых, чтобы сформировать ту же спиральную структуру, нужно определенное устройство поверхности свободной энергии с выраженными минимумами энергии для соответствующих conformаций, а у полиэтилена этого не наблюдается.

4. Топология конфигурационного пространства и многомерные фурье-разложения для поверхности потенциальной энергии линейных полимеров

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

Таким образом, потенциальная энергия линейной полимерной цепи (точнее, ее часть, которая зависит от конформации) может быть представлена функцией N торсионных углов φ_i . Для полимера это функция большого числа переменных, каждое из которых циклически меняется от $-\pi$ до $+\pi$. Область определения каждого угла это точки окружности. Область определения множества N углов — это топологическое произведение окружностей или гипертор [50] (рис. 4.1). То есть функция потенциальной энергии задана в конфигурационном пространстве с топологией многомерного тора. Тор (и гипертор) можно развернуть, сделав в евклидовом пространстве соответствующей размерности ячейки

с периодическими граничными условиями (рис. 4.1, а). Такая развертка может быть более удобна для восприятия общих геометрических соотношений, и мы по умолчанию будем ей пользоваться ниже, обращая внимание на те моменты, где периодичность ячеек играет существенную роль.

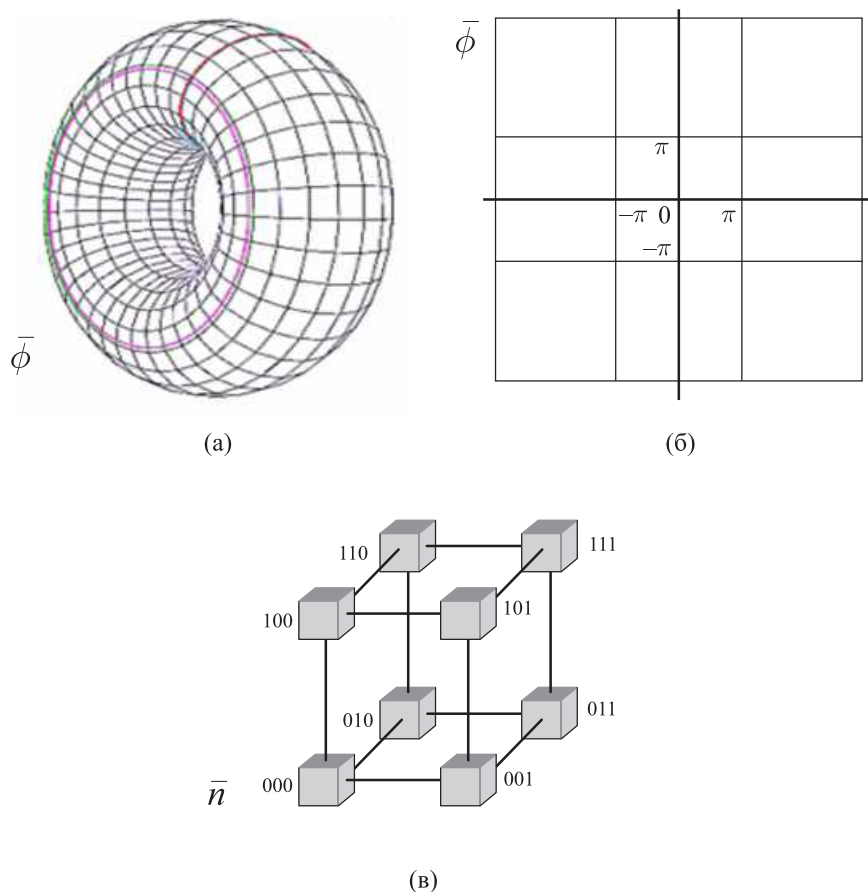


Рис. 4.1. Схематическое изображение: (а) топология конфигурационного пространства торсионных углов (для двух измерений); (б) развертка тора в евклидовом пространстве (пример двумерных ячеек с периодическими граничными условиями); (в) векторное пространство номеров гармоник (для трех измерений), показана единичная ячейка

Топология пространства, на котором заданы функции, оказывает существенное влияние на свойства этих функций. Как известно, функция, заданная на гиперторе, может быть разложена в многомерный дискретный ряд Фурье [51]:

$$U(\bar{\phi}) = \sum_{\bar{n}} A(\bar{n}) e^{i\bar{n}\bar{\phi}}, \quad (4.1)$$

где мы для сокращения записи ввели алгебраический вектор набора торсионных углов

$$\bar{\varphi} = (\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_i, \dots, \varphi_N) \quad (4.2)$$

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

$$\bar{n} = (n_1, n_2, \dots, n_i, \dots, n_N); \quad n_k = 0, \pm 1, \pm 2, \dots \quad (4.3)$$

Скалярное произведение векторов определено обычным образом:

$$\bar{n} \bar{\varphi} = \sum_{k=1}^N n_k \varphi_k. \quad (4.4)$$

Коэффициенты разложения (4.1) определяются интегралом

$$A(\bar{n}) = \frac{1}{(2\pi)^N} \int_{-\pi}^{\pi} \dots \int_{-\pi}^{\pi} U(\bar{\varphi}) e^{-i\bar{n}\bar{\varphi}} d^N \bar{\varphi}. \quad (4.5)$$

Заметим, что привычные нам межатомные потенциалы имеют сингулярность в нулевой точке. Однако эта сингулярность лежит в классически запрещенной области и не мешает пользоваться разложением в ряд Фурье для ППЭ. Более подробно это обстоятельство изложено в [52].

В коэффициентах разложения (4.1) содержится вся информация об устройстве многомерной ППЭ, которая связана с особенностями химического строения макромолекулы, ее электронном состоянии и свойствах ее окружения, взаимодействием с растворителем. Возможность учета таким образом вклада растворителя связана с тем, что время релаксации растворителя (для воды это порядка 10^{-12} с) много меньше, чем характерные времена конформационных движений цепи. Молекулы растворителя успевают подстраиваться под мгновенные конформации цепи. В некотором смысле это похоже на адиабатическое приближение при взаимодействии быстрой и медленной подсистем.

Комплексная форма представления разложения в ряд выбрана из соображений удобства. Так как функция потенциальной энергии вещественна, то для коэффициентов разложения имеем очевидные соотношения:

$$A(\bar{n}) = |A(\bar{n})| e^{i\theta(\bar{n})}; \quad A(-\bar{n}) = A(\bar{n})^* = |A(\bar{n})| e^{-i\theta(\bar{n})}. \quad (4.6)$$

Аргумент комплексной амплитуды $A(\mathbf{n})$ изменяется в пределах

$$-\pi < \theta(\bar{n}) \leq \pi. \quad (4.7)$$

Из вещественности суммы (4.1) приходим также к заключению, что амплитуды и фазы коэффициентов разложения связаны условиями

$$|A(-\bar{n})| = |A(\bar{n})|; \quad \theta(-\bar{n}) = -\theta(\bar{n}). \quad (4.8)$$

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

$$\theta(\pm\bar{n}) = \pm\pi h(\bar{n}) - \bar{C}(\bar{n})\bar{n}. \quad (4.9)$$

Здесь $h(\mathbf{n})$ принимает значение 0, если фаза θ лежит в правой комплексной полуплоскости (действительная часть амплитуды (4.5) положительна), или 1 в противоположном случае.

Эти почти очевидные соотношения весьма полезны для понимания общих свойств энергетической поверхности (4.1), заданной на многомерном торе множества углов поворотов вокруг химических связей. Так как в сумме (4.1) слагаемые для векторов $\mathbf{n}$ и $-\mathbf{n}$ встречаются всегда парой, получаем

$$U(\bar{\varphi}) = \sum_{\bar{n}} (-1)^{h(\bar{n})} |A(\bar{n})| \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{C}(\bar{n}))]. \quad (4.10)$$

Заметим, что в (4.10) мы учли соотношения (4.8) и (4.9) и то, что при суммировании по всем возможным векторам $\mathbf{n}$ в сумме (4.10) каждое слагаемое в разложении (4.1) встречается два раза.

Коэффициенты разложения $A(\mathbf{n})$ и фазы $\theta(\mathbf{n})$ членов ряда определяют сложное строение многомерной поверхности потенциальной энергии с огромным числом критических точек [21].

Отметим сразу важную особенность ППЭ, определяемой формулой (4.10) для зеркально симметричных структур (т. е. линейных полимеров без хиральных звеньев). Так как при зеркальном отражении знаки углов меняются на противоположные, то для зеркально симметричных структур (рис. 4.2)

$$U_S(\bar{\varphi}) = U_S(-\bar{\varphi}). \quad (4.11)$$

В этом случае коэффициенты разложения (4.1) являются вещественными и в формулах (4.9) и (4.10) мы должны положить

$$\bar{C}_S(\bar{n}) = 0 \quad (4.12)$$

для всех векторов гармоник многомерного фурье-разложения (4.1). В этом случае разложение для ППЭ сводится к виду

$$U_S(\bar{\varphi}) = \sum_{\bar{n}} (-1)^{h(\bar{n})} |A(\bar{n})| \cos[\bar{n}\bar{\varphi}]. \quad (4.13)$$

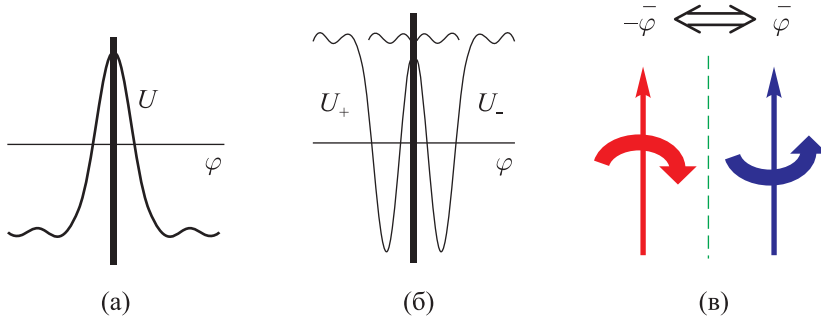


Рис. 4.2. Роль хиральности в формировании уникальных пространственных структур линейных полимеров. Отсутствие хиральных элементов гарантирует существование, как минимум, двух вырожденных по энергии состояний (а). Хиральные элементы приводят к несовпадению ППЭ для макромолекулы и ее зеркального отображения, создавая тем самым условия для существования единственного глобального минимума ППЭ для каждого изомера (б). Координаты этих глобальных минимумов отличаются знаком, так как направление вращения вокруг связей при отражении меняется на противоположное (в)

Среди множества теоретически возможных потенциальных поверхностей (4.1) или (4.10) выделяется класс поверхностей для хиральных [53] линейных полимеров, которые могут иметь единственный четкий глобальный минимум, отвечающий уникальной пространственной структуре (рис. 4.2). Для таких поверхностей значение фазы $\theta(\mathbf{n})$ в членах разложения может быть выбрано, например, следующим образом [27]:

$$\theta(\pm \bar{n}) = \pm \pi - \bar{n} \bar{\varphi}_m, \quad (4.14)$$

где $\bar{\varphi}_m$ — вектор торсионных углов для положения глобального минимума. Соотношения (4.8) и (4.9) для фаз $\theta(\mathbf{n})$ при этом, очевидно, выполняются. В этом случае поверхность потенциальной энергии может быть записана в виде

$$U(\bar{\varphi}) \sim \sum_{\bar{n}} |A(\bar{n})| \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m)]. \quad (4.15)$$

Необходимым условием существования такой ППЭ, как уже отмечалось, является хиральность полимерной молекулы. Если бы молекула была зеркально симметрична, то у нее должен наблюдаться, по меньшей мере, второй симметричный минимум с координатами в точке $-\bar{\varphi}_m$. Заметим также, что при зеркальном отражении, когда меняются знаки всех угловых переменных и мы переходим к структуре с другой хиральностью, значение потенциальной энергии (4.15) не изменяется.

Такой вид потенциальной поверхности (4.15) при определенных условиях является оптимальным для формирования уникальной пространственной структуры с точки зрения феномена фолдинга биополимеров в уникальные пространственные структуры. Поверхности, устроенные в соответствии с формулой (4.15), ниже мы будем называть идеальными поверхностями потенциальной энергии (ИППЭ). Возможные причины формирования и отбора в ходе молекулярной эволюции таких ИППЭ мы обсудим несколько ниже. Для реальных систем в сумме (4.15), конечно, могут присутствовать слагаемые, которые не укладываются в идеальную картину (4.14). Но общая структура ППЭ сохраняется, если вклад таких слагаемых не является определяющим.

При некоторых условиях для коэффициентов разложения (4.15) можно получить рациональное объяснение многим и весьма разнородным экспериментальным фактам, которые наблюдаются в процессе фолдинга и которые, на первый взгляд, никак не связаны друг с другом [54].

Структура приведенных выше многомерных разложений Фурье кажется безумно сложной (в общем случае она таковая и есть) и вызывает желание поскорее вернуться к привычной формуле (2.1) со всеми ее проблемами, которые кажутся ничтожными по сравнению с бесконечными многомерными рядами Фурье. Но не будем торопиться. Имеется ряд обстоятельств, которые позволяют получить полезные и обозримые результаты, основанные на этих разложениях для ППЭ. Конечно, это предполагает некий выход за привычный стереотип мышления. В качестве ближайшей награды за эти усилия получим достаточно общие и нестандартные результаты для топографии ППЭ, о которых в литературе можно найти только робкие предположения в связи с необычными эффектами, например, влиянием на результат рефолдинга белков особенностей процесса разворачивания нативной структуры [55, 56]. Так, например, интересную информацию о строении энергетических ландшафтов можно получить, используя методы АСМ для силового разворачивания белковой глобулы [55]. Оказывается, что сама возможность рефолдинга зависит от скорости и условий силового разворачивания [56]. Нам станет также более понятно, почему котрансляционное сворачивание белков [18, 57] играет столь большую роль.

Прежде чем переходить к более детальному анализу многомерных ППЭ, потренируемся на простых примерах для навыка восприятия топографии энергетических поверхностей. Рассмотрим две модельные системы с ППЭ, имеющими по два минимума различной глубины

$$U_{h2}(\bar{\varphi}) = -U_1 \exp \left[-\frac{(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_1)^2}{2\delta_1^2} \right] - U_2 \exp \left[-\frac{(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_2)^2}{2\delta_2^2} \right], \quad (4.16)$$

$$U_{H2}(\bar{\varphi}) = -\frac{1}{N} \sum_i U_1 \exp \left\{ -\frac{(\varphi_i - \varphi_{m1i})^2}{2\delta_1^2} \right\} - U_2 \exp \left\{ -\frac{(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_2)^2}{2\delta_2^2} \right\}, \quad (4.17)$$

$$\bar{\varphi}_1 = (\varphi_{m1}, \varphi_{m1}, \dots, \varphi_{m1}); \quad \bar{\varphi}_2 = (\varphi_{m2}, \varphi_{m2}, \dots, \varphi_{m2}). \quad (4.18)$$

Обратим внимание, что в этом примере выбор координат минимумов энергии в конформациях 1 и 2, определяемых векторами $\bar{\varphi}_1$ и $\bar{\varphi}_2$, соответствует двум разным спиральным конформациям, и ППЭ симметрична относительно перестановок торсионных углов. Это также будет полезно для восприятия дальнейших рассуждений. Поверхности (4.16) и (4.17) имеют по два глубоких минимума, но резко отличаются по топографии, особенно, в окрестности первого минимума (рис. 4.3).

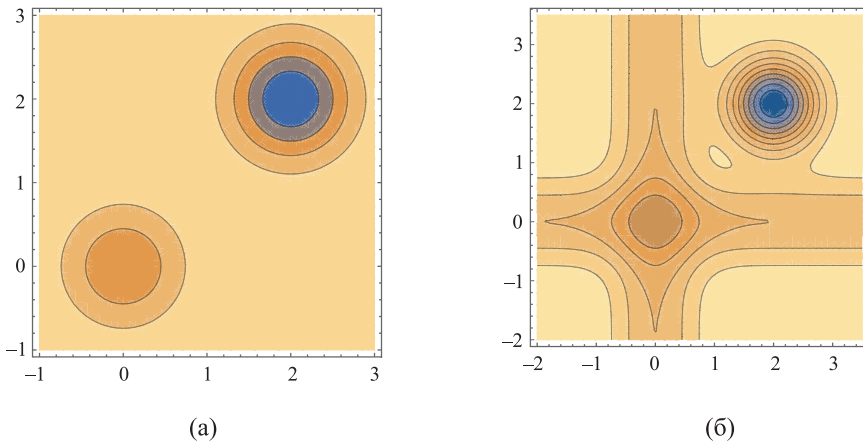


Рис. 4.3. Топография (линии уровней) поверхностей: (а) типа 1 — формула (4.16); (б) типа 2 — формула (4.17)

В случае поверхности (4.16) полимер кооперативно попадет в спиральную конформацию 1 или конформацию 2, если все мономеры сразу примут эту спиральную конформацию. Вероятность таких событий для макромолекул, состоящих из большого числа мономерных звеньев при случайных и не коррелированных движениях, крайне низка, на что и обратил внимание Ц. Левинталь [20]. В случае поверхности (4.17) у мономеров есть возможность независимо принимать спиральную конформацию 1 и полимер последовательно шаг за шагом имеет возможность принять конформацию спирали 1. Это существенно более вероятный механизм сворачивания полимерной цепи. Если на поверхности типа (4.17) имелся бы некий энергетический тоннель (многомерный овраг или складка) для перехода из конформации 1 в конформацию 2, которая является

более стабильной ($U_2 > U_1$), то можно было бы говорить, например, о формировании конфигурации 1, которая происходит на первом этапе за счет последовательной перестройки на уровне каждого мономера с последующей кооперативной стабилизацией и переходом в конформацию 2 (рис. 4.4). Подобные последовательные стадии формирования пространственной структуры обычно наблюдаются у биополимеров.

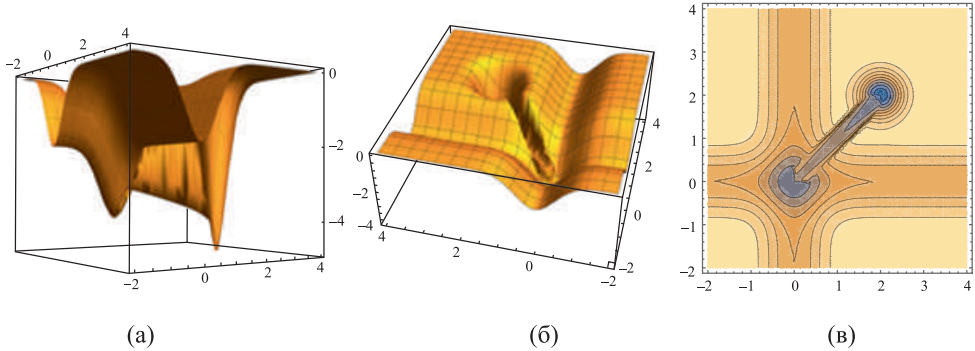


Рис. 4.4. Пример топографии двумерной поверхности типа (4.17) с тоннелем (складкой), соединяющей области минимумов: (а), (б) вид на поверхность с различных ракурсов; (в) линии уровня поверхности

Полагая эффективные ширины потенциальных ям $\delta \ll \pi$ и используя (4.5), получаем для коэффициентов разложения для поверхности (4.16)

$$A_{h2}(\bar{n}) \sim -\frac{U_1 \delta_1^N}{(2\pi)^{N/2}} e^{-\bar{n}^2 \delta_1^2 / 2} e^{-i\bar{n}\bar{\varphi}_1} - \frac{U_2 \delta_2^N}{(2\pi)^{N/2}} e^{-\bar{n}^2 \delta_2^2 / 2} e^{-i\bar{n}\bar{\varphi}_2}. \quad (4.19)$$

И, соответственно, коэффициенты разложения для поверхности (4.17)

$$A_{H2}(\bar{n}) \sim -\frac{U_2 \delta_2^N}{(2\pi)^{N/2}} e^{-\bar{n}^2 \delta_2^2 / 2} e^{-i\bar{n}\bar{\varphi}_2}; \quad n_i \neq 0; \quad n_j \neq 0; \quad i \neq j, \quad (4.20)$$

$$A_{H2}(n_i) \sim -\frac{U_1 \delta_1}{\sqrt{2\pi N}} e^{-n_i^2 \delta_1^2 / 2} e^{-in_i \varphi_{m1i}} - \frac{U_2 \delta_2^N}{(2\pi)^{N/2}} e^{-n_i^2 \delta_2^2 / 2} e^{-in_i \bar{\varphi}_2}; \quad n_i \neq 0; \quad n_j = 0; \quad i \neq j.$$

Формулы (4.19) и (4.20) демонстрируют все обсужденные выше свойства коэффициентов разложения. Подставляя эти коэффициенты в фурье-разложения для модельных ППЭ, получаем в первом случае ряд

$$U_{h2}(\bar{\varphi}) \sim -\frac{U_1 \delta_1^N}{(2\pi)^{N/2}} \sum_{\bar{n}} e^{-\bar{n}^2 \delta_1^2 / 2} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_1)] - \frac{U_2 \delta_2^N}{(2\pi)^{N/2}} \sum_{\bar{n}} e^{-\bar{n}^2 \delta_2^2 / 2} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_2)]. \quad (4.21)$$

Аналогично, во втором случае

$$U_{H2}(\bar{\varphi}) \sim -\frac{U_1 \delta_1}{\sqrt{2\pi}N} \sum_i \sum_{n_i} e^{-n_i^2 \delta_1^2/2} \cos[n_i(\varphi_i - \varphi_{m1i})] - \frac{U_2 \delta_2^N}{(2\pi)^{N/2}} \sum_{\bar{n}} e^{-\bar{n}^2 \delta_2^2/2} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_2)]. \quad (4.22)$$

Формулы (4.21) и (4.22) имеют сильно различную структуру, но они обе соответствуют потенциальной поверхности, которая описывает возможность формирования двух типов спиралей. Эти формулы можно также переписать и в каноническом виде ИППЭ (4.10) для линейных полимеров. Представляя, например, (4.19) в виде (4.6), получим:

$$|A_{h2}(\bar{n})| = \left\{ a_1^2(\bar{n}) + a_2^2(\bar{n}) + 2a_1(\bar{n})a_2(\bar{n})\cos[\bar{n}(\bar{\varphi}_1 - \bar{\varphi}_2)] \right\}^{1/2},$$

$$\theta_{h2}(\bar{n}) = \arctg \left[\frac{a_1(\bar{n})\sin(\bar{n}\bar{\varphi}_1) + a_2(\bar{n})\sin(\bar{n}\bar{\varphi}_2)}{a_1(\bar{n})\cos(\bar{n}\bar{\varphi}_1) + a_2(\bar{n})\cos(\bar{n}\bar{\varphi}_2)} \right], \quad (4.23)$$

где мы ввели обозначения для коэффициентов a_1 и a_2 :

$$a_1(\bar{n}) = -\frac{U_1 \delta_1^N}{(2\pi)^{N/2}} e^{-\bar{n}^2 \delta_1^2/2}, \quad a_2(\bar{n}) = -\frac{U_2 \delta_2^N}{(2\pi)^{N/2}} e^{-\bar{n}^2 \delta_2^2/2}. \quad (4.24)$$

Заметим, что эти коэффициенты (4.24) симметричны относительно перестановки компонент вектора номеров гармоник. Принимая во внимание, что векторы положений минимумов в (4.16) есть векторы с равными компонентами, приходим к выводу, что амплитуды и фазы коэффициентов канонического разложения (4.10) в данном случае также не зависят от перестановки компонент вектора $\mathbf{n}$. В терминах векторов $\mathbf{C}(\mathbf{n})$ это означает, что компоненты векторов $\mathbf{C}(\mathbf{n})$ переставляются в соответствии с перестановкой компонент вектора $\mathbf{n}$. Приведенный пример показывает, что относительно сложная зависимость фазы коэффициента разложения от вектора номеров гармоник может соответствовать очень простой ситуации нескольких минимумов на ППЭ и использование разложения Фурье в виде (4.21) также соответствует исходной формуле (4.10). Однако можно заметить, что такая топография ППЭ не очень подходит для формирования уникальных пространственных структур ввиду низкой вероятности попадания репрезентативной точки в область энергетической воронки.

Аналогично можно рассмотреть и ситуацию с разложением в ряд Фурье (4.22). Нужно принять во внимание, что в этом случае формулы типа (4.23) применяются только к нижней формуле (4.20) для поверхности (4.17). Это существенно более вероятная ситуация с точки зрения кинетики сворачивания цепи.

На рис. 4.4 в силу технических ограничений для рисунков на плоскости приведены топографии только двумерных ППЭ. Топография трехмерных поверхностей может быть изображена только в виде их двумерных сечений (рис. 4.5). Детально изобразить топографии ППЭ для более высоких размерностей не представляется возможным. Иначе нужно будет рассматривать очень большое число двух- или трехмерных сечений ППЭ, что вряд ли реально.

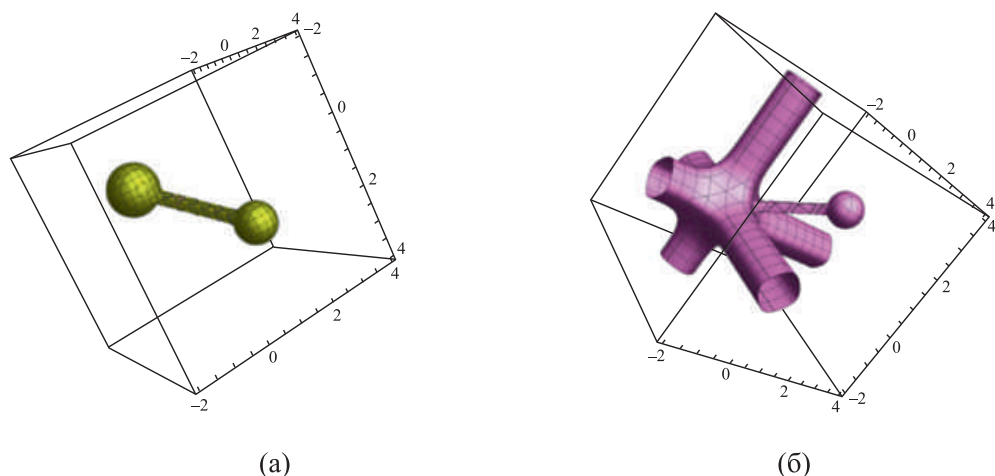


Рис. 4.5. Сечения и топографии трехмерных поверхностей, в которых минимумы соединены тоннелем: (а) типа (4.16); (б) типа (4.17)

Однако есть способ общего аналитического описания топографии поверхностей любой размерности, который основан на теории Морса [21]. У нас нет возможности останавливаться здесь на этом вопросе более подробно и мы отсылаем к нашим работам 20–25-летней давности на эту тему [28–31]. Приведем лишь наглядный образ топографии многомерной ППЭ (рис. 4.6).

Несмотря на схематичность рис. 4.6, мы можем понять важное обстоятельство. Репрезентативная точка при спуске в глобальный (или иной) минимум неизбежно встретит на своем пути некие локальные минимумы. Локальные минимумы отделены друг от друга седловыми точками ППЭ различного индекса. Индекс седловой точки — это, по-простому, число отрицательных элементов на диагонали гессиана (матрицы значений вторых производных в критической точке) после его приведения к диагональному виду. То есть индекс критической точки — это, фактически, размерность трубки [58], которая соединяет в рассматриваемом направлении области вокруг локальных минимумов. Хорошо знакомая седловая точка на двумерной поверхности имеет индекс 1 и два минимума соединены линией (трубка размерности 1), которая проходит через эту седловую точку. В многомерном случае имеются седловые точки различного

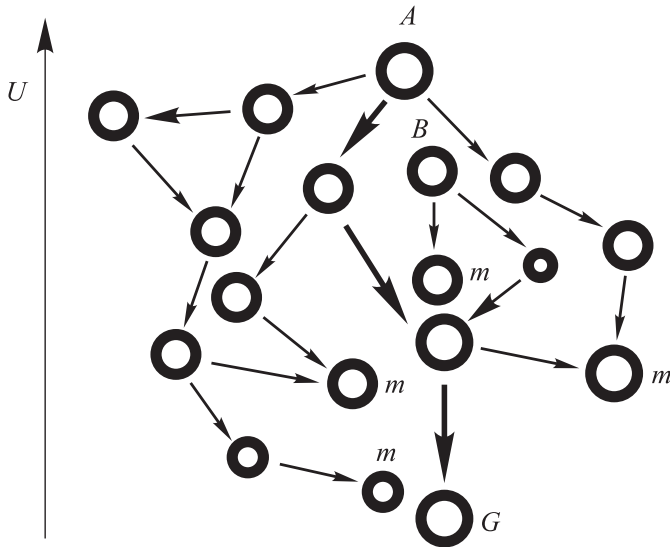


Рис. 4.6. Схематическое изображение топографии многомерной ППЭ. Области локальных минимумов соединены трубками. Размерность трубок пропорциональна толщине линии и определяется свойствами гессиана в седловых точках соответствующего индекса, которые отделяют локальные минимумы. Движение репрезентативной точки между локальными минимумами ППЭ в направлении глобального минимума в соответствии с принципами движения репрезентативной точки по многомерным ППЭ, вытекающими из (3.20), будет наиболее вероятным только по трубкам размерности близкой к N (размерности конфигурационного пространства). На рисунке показан оптимальный вариант пути из начальной точки A в точку глобального минимума G . Более тонкие стрелки показывают пути в локальные энергетические ловушки m с неправильной пространственной структурой. Переход из другой начальной конфигурации B будет более медленным и с большей вероятностью неправильного сворачивания

индекса и вместо линии мы имеем трубки соответствующей размерности. В соответствии с результатами предыдущего раздела и формулой (3.20) репрезентативная точка выбирает наиболее гладкие траектории, для которых изменение потенциальной энергии «размазано» по возможно большему числу степеней свободы. То есть движение между локальными минимума происходит по трубкам, размерность которых близка к общей размерности конфигурационного пространства. Поэтому вход и выход из локального минимума будет происходить предпочтительно по трубкам с максимальной размерностью. Можно представить существование макромолекул с различной топографией ППЭ, когда в отдельные минимумы есть вход из области с более высокой энергией по трубке с большой размерностью, а все выходы из этих минимумов в области с более низкой энергией — это трубки с низкой размерностью. Такие минимумы выполняют роль ловушек. Более оптимальным для спуска в глобальный минимум

является вариант примерно одинакового распределения индексов седловых точек для входа и выхода из областей локальных минимумов энергии. Но в любом случае в вязкой среде, в соответствии с обсужденными выше правилами движения репрезентативной точки по многомерной энергетической поверхности (см. также [38]), наиболее вероятные траектории спуска в глобальный минимум энергии должны происходить по трубкам с размерностью порядка максимальной размерности N .

5. Тайна формирования уникальных пространственных структур биополимеров

Тайна, связанная с отбором и формированием уникальных пространственных структур биополимеров, по своему масштабу сравнима с тайной зарождения жизни. Кажется абсолютно невероятным, чтобы в результате совершенно случайных физико-химических событий произошло нечто, что положило бы начало биологической эволюции. Даже возможное наличие в древних океанах в значительной концентрации необходимых субстратов в виде аминокислот, нуклеотидов и пр. [59] не дает видимых путей для сборки за разумное астрономическое время каких-то функционирующих биоподобных объектов. Иное дело, если имеются физические закономерности поэтапного формирования разнообразных и все усложняющихся молекулярных конструкций с уникальной и воспроизводимой пространственной структурой, которые объединяясь могут породить новое качество и дать толчок сначала молекулярной, а затем и биологической эволюции. Ключевое слово здесь — закономерности. Эти закономерности должны быть физически присущи неким типам макромолекул, которые принципиально способны формировать уникальные пространственные структуры. Рассуждения на тему о происхождении такого типа линейных полимеров, которые формируют в соответствии с формулой (4.15) уникальные пространственные структуры, неизбежно выводит нас на проблему физико-химической добиологической эволюции макромолекул и их энергетических ландшафтов, которая подготовила «строительный материал» для формирования в дальнейшем простейших форм жизни. В любом случае, огромное разнообразие низкомолекулярных субстратов на ранних этапах развития планеты претерпевало сложные и не очень понятные на данный момент физико-химические превращения, которые привели, в конечном счете, к появлению более высоко организованных форм. Очень серьезный вопрос связан с наличием закономерностей спонтанного возникновения высоко организованных форм макромолекул и их комплексов, которые имеют тенденцию к образованию уникальных пространственных структур. Чисто случайный вариант формирования биополимеров в современном виде, по имеющимся оценкам, крайне мало вероятен. Мы полагаем,

что интерес науки к этим вопросам будет существенно возрастать благодаря, например, задачам синтетической биологии, а также космическим исследованиям по мере расширения наших знаний о конкретной молекулярной эволюции на других космических объектах с существенно различными условиями.

Ниже мы обратим внимание, что ключевым моментом реализации энергетических поверхностей с четко выраженным единственным глобальным минимумом (4.15) является процесс формирования, отбора и эволюции линейных полимеров, фазы коэффициентов разложения которых (4.9) лежат, в основном, в левой полуплоскости, вектор $\mathbf{C}(\mathbf{n})$ не зависит от номеров гармоник и является практически постоянным вектором, определяющим положение глобального минимума в пространстве конфигураций в соответствии с соотношением (4.15). Во всяком случае, такая ситуация должна быть обеспечена для вкладов наиболее значимых членов ряда.

Анализ общей структуры энергетических ландшафтов линейных полимеров (4.10) показывает условия, при которых может возникнуть вполне определенная физическая закономерность, приводящая к такого рода энергетическим ландшафтам. С точки зрения общей структуры энергетической поверхности наиболее оптимальным было бы максимальное упрощение зависимостей $h(\mathbf{n})$ и векторов $\mathbf{C}(\mathbf{n})$ и превращение этих функций в константы для наиболее значимых членов разложения (4.10) в процессе физико-химического этапа эволюции линейных полимеров

$$\bar{C}(\bar{n}) = \bar{C}_m; \quad h(\bar{n}) = 1. \quad (5.1)$$

Такой результат эволюции ППЭ вряд ли мог осуществиться одномоментно и должен был проходить через некоторые стадии.

Рассмотрим возможные этапы формирования полимерных структур с энергетическими ландшафтами, которые могли бы быть предшественниками ППЭ со структурой типа (4.15). Обратим внимание на линейные полимеры, строение которых полностью симметрично относительно перестановки в цепи мономерных звеньев. Речь, очевидно, в первую очередь идет о циклических гомополимерах

$$| \underbrace{-L - L - \dots}_{\dots} \underbrace{\dots - L -}_{\dots} |. \quad (5.2)$$

Вместе с этими структурами можно также рассматривать очень длинные гомополимерные цепи. В этом случае можно считать, что система симметрична относительно перестановки мономерных звеньев вдали от концов цепи. (Удивительно, но этот тип симметрии совсем выпал из рассмотрения в молекулярной биофизике [37].) Каждое мономерное звено может содержать несколько элементов с соответствующими конформационными степенями свободы (как, например, у аминокислотных остатков или одинаковых групп аминокислотных

остатков). Для более компактного изложения мы будем обозначать набор из k внутренних торсионных углов в мономере L_i алгебраическим вектором

$$\bar{\psi}_i = (\psi_{i1}, \psi_{i2}, \dots, \psi_{ik}). \quad (5.3)$$

Соответствующий этому набору торсионных углов алгебраический вектор номеров гармоник обозначим так

$$\bar{m}_i = (m_{i1}, m_{i2}, \dots, m_{ik}). \quad (5.4)$$

В этом случае алгебраический вектор торсионных углов полимерной цепи определим как

$$\bar{\varphi} = (\bar{\psi}_1, \bar{\psi}_2, \dots, \bar{\psi}_N) \quad (5.5)$$

и, соответственно, вектор номеров гармоник для фурье-разложения потенциальной энергии

$$\bar{n} = (\bar{m}_1, \bar{m}_2, \dots, \bar{m}_N). \quad (5.6)$$

В случае циклического гомополимера потенциальная энергия симметрична относительно перестановок торсионных углов любых мономерных звеньев

$$U(\bar{\psi}_1, \bar{\psi}_2, \dots, \bar{\psi}_i, \dots, \bar{\psi}_j, \dots, \bar{\psi}_N) = U(\bar{\psi}_1, \bar{\psi}_2, \dots, \bar{\psi}_j, \dots, \bar{\psi}_i, \dots, \bar{\psi}_N). \quad (5.7)$$

В этом случае из формул (4.5) и (4.6) следует, что коэффициенты разложения потенциальной энергии в ряд Фурье инвариантны относительно любой перестановки номеров гармоник

$$\begin{aligned} |A(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_N)| &= |A(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_N)|; \\ \theta(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_N) &= \theta(\bar{n}_1, \bar{n}_2, \dots, \bar{n}_j, \dots, \bar{n}_i, \dots, \bar{n}_N). \end{aligned} \quad (5.8)$$

Аналогично, при перестановке компонент в векторе номеров гармоник не изменяются значения скалярного произведения векторов $\mathbf{nC}(\mathbf{n})$ и значения $h(\mathbf{n})$ (4.9).

Разобьем все множество векторов $\mathbf{n}$ на непересекающиеся подмножества $P_i(\mathbf{n})$, которые для некоторого вектора $\mathbf{n}$ объединяют тип векторов, которые отличаются друг от друга только перестановкой компонент. Тогда можем переписать для циклических гомополимеров разложение (4.10) в виде

$$U(\bar{\varphi}) = \sum_i (-1)^{h(\bar{n}_i)} |A(\bar{n}_i)| \sum_{\bar{n} \in P_i(\bar{n})} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{C}_i(\bar{n}))], \quad (5.9)$$

где $\mathbf{n}_i$ — один из векторов из множества $P_i(\mathbf{n})$. Элементы множества векторов $P_i(\mathbf{n})$, по которым ведется внутреннее суммирование, отличаются перестановкой компонент заданного вектора гармоник $\mathbf{n}$. Если все компоненты вектора гармоник $\mathbf{n}$ различны, то число таких элементов равно $N!$. Если в векторе $\mathbf{n}$ имеются совпадающие номера гармоник, то число элементов N_i получается делением $N!$ на произведение факториалов числа соответствующих одинаковых компонент k_i вектора $\mathbf{n}$

$$N_i = \frac{N!}{k_1! k_2! \dots}. \quad (5.10)$$

Максимально возможное число групп одинаковых номеров гармоник — это $N/2$ различных пар одинаковых чисел (если N четное). Если N не четное, то это целая часть от $N/2$ пар. Если данный номер гармоник встречается в векторе один раз, то $k_i = 1$. Если данный номер гармоник встречается N раз (вектор вида $(n, n, n, \dots, n)$), то $k_1 = N$, остальные $k_i = 0$ и т. д.

Вектор $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ в формуле (5.9) устроен следующим образом. Компоненты вектора $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ при перестановке компонент вектора $\mathbf{n}$ также переставляются таким образом, чтобы скалярное произведение этих векторов не изменялось. Для циклического гомополимера, построенного из не хиральных мономеров, вектор $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ просто равен 0. Заметим также, что внутренняя сумма в (5.9) симметрична относительно перестановки компонент вектора торсионных углов (5.3).

В общем случае внутренняя сумма в (5.9) содержит очень большое число осциллирующих слагаемых с одинаковой амплитудой, фазы которых не коррелированы. Такая сумма не выделяет четких экстремумов и линейный гомополимер, построенный даже из хиральных мономеров, может сформировать уникальную пространственную структуру только при специальных условиях. Это условие наглядно прослеживается из формулы (5.9). Необходимо, чтобы компоненты вектора $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ были одинаковы и не зависели от перестановок компонент в векторе $\mathbf{n}$. В этом случае во внутренней сумме (5.9) возникает корреляция фаз и резкое усиление (пропорциональное, максимум, в $N_i!$ раз) экстремума в конфигурации, определяемой векторами $\mathbf{C}_i(\mathbf{n})$ с одинаковыми компонентами. Так как эти вектора имеют одинаковые (для каждого типа торсионных углов) компоненты, то соответствующая конфигурация является спиралью. Таким образом, если химическая структура гомополимерной цепи такова, что при формировании спирали уменьшается потенциальная энергия, то внутренняя сумма в (5.9) дает четкий минимум ППЭ. Вид этой спирали может быть весьма разнообразный, особенно, если мономерное звено содержит много внутренних конформационных степеней свободы. Кроме того, если полимерная цепь получает некий выигрыш в энергии при формировании нескольких типов спиралей, обо-

значаемых ниже α , β и т. д. (совпадение обозначений с известными типами спиралей в полипептидах в данном случае не несет никакой смысловой нагрузки), то сумму (5.9) мы можем представить в виде

$$\begin{aligned}
 U(\bar{\varphi}) \sim & - \sum_{i=\alpha, \beta, \dots} |A(\bar{n}_i)| \sum_{\bar{n} \in P_i(\bar{n})} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{C}_i)] + \\
 & + \sum_{i \neq \alpha, \beta, \dots} (-1)^{h(\bar{n}_i)} |A(\bar{n}_i)| \sum_{\bar{n} \in P_i(\bar{n})} \cos[\bar{n}(\bar{\varphi} - \bar{C}_i(\bar{n}))], \quad (5.11) \\
 \bar{C}_i = & (\bar{C}_{im}, \bar{C}_{im}, \dots, \bar{C}_{im}).
 \end{aligned}$$

Напомним, что векторное обозначение компонент $C_{i,m}$ связано с тем, что оно отражает набор значений внутренних торсионных углов в мономерах. Первая группа слагаемых — это вклады в ППЭ от спиральных структур, каждая из которых имеет четко определенную фазу в пространстве конформаций и отрицательный знак. Вторая группа слагаемых не имеет четко определенной фазы и знака и воспринимается, скорее, как шум. Это приводит нас к выводу, что гомополимерные цепи в силу симметрии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев создают предпосылки (при определенном химическом строении) к формированию уникальных спиральных пространственных структур. Возможно, этот эффект мог быть первичным этапом эволюции энергетических ландшафтов, с чем может быть связано обилие спиральных структур в пространственной организации биополимеров (а также обилие кольцевых структур биополимеров в простейших организмах). Мы никак не связываем обсуждаемые возможные типы протоформ линейных полимеров с протеинами или нуклеотидами в живых системах. Модификация и настройка химических форм мономеров происходила, по-видимому, в ходе длительной физико-химической эволюции.

6. Топография поверхности потенциальной энергии, которая многое объясняет в явлении фолдинга и предсказывает возможные новые эффекты

Рассмотрим далее, что реально можно получить из вышеописанных представлений для понимания процессов фолдинга белков, которые все еще оставляют много загадок. В известной статье К. Дилла и Дж. Маккаллума, посвященной 50-летию проблемы фолдинга [14], отмечались не решенные вопросы, среди которых в данном контексте актуально следующее. Это практическое отсутствие экспериментальных данных об устройстве энергетического ландшафта, необходимого для фолдинга, и отсутствие количественной микроскопической картины в понимании физики и правил фолдинга для произвольных по-

следовательностей. Ниже мы покажем, что можно сделать в этих направлениях, используя описанные выше подходы и опираясь на соображения симметрии полимеров при перестановке одинаковых или почти одинаковых мономерных звеньев.

Одна из основных проблем состоит в том, что с точки зрения традиционных подходов непонятны основные особенности топографии многомерных ППЭ для макромолекул, которые формируют уникальные пространственные структуры. Непонятны и причины отличия этих макромолекул от множества других полимерных объектов, которые не имеют тенденции к формированию уникальных пространственных структур. Принцип минимальной фрустрации для ППЭ в виде гладкой энергетической воронки [24] и наличие энергетической щели между глобальным минимумом энергии и энергией ближайших конформаций [60] формулируют лишь некие необходимые и формальные условия для биополимеров, которые реально способны свернуться в уникальные пространственные структуры. Обычно используемый при молекулярном моделировании способ вычисления ППЭ через суммы атом-атомных потенциалов типа (2.1) [22, 23] уводит проблему в тупик, в сторону описания некоторых частных случаев, оставляя значительную неопределенность в связи с калибровкой параметров потенциалов. Использование представлений об аналитической структуре ППЭ (4.1), которые диктуются топологией конфигурационного пространства линейного полимера, позволяют сделать более строгой постановку задачи об особенностях и причинах различия топографии ППЭ для обсуждаемых типов макромолекул.

Мы исходим из общепринятой концепции, что ППЭ для макромолекулы, формирующей уникальную пространственную структуру, имеет глобальный минимум и процесс сворачивания устроен так, что репрезентативная точка имеет возможность достичь глобального минимума энергии за разумное время. Мы полагаем также, что общая структура устройства многомерной ППЭ близка к структуре, которая была условно названа идеальной (ИППЭ) и описывается формулой (4.15). В предыдущем разделе были высказаны соображения в пользу отбора таких форм ППЭ в ходе физико-химической эволюции. С другой стороны, было бы очень странным, если обширный класс линейных биополимеров с уникальной пространственной структурой, например, белков, которые синтезируются по единым физико-химическим механизмам, был бы представлен объектами, у которых глобальный минимум ППЭ сформирован для каждого объекта неким случайным образом. Обратим внимание, что, используя структуру ИППЭ (4.15), мы получим результаты, которые объединяют самые разнообразные эффекты для процесса фолдинга [27, 36, 54].

Обратимся далее к зависимости коэффициентов разложения в формуле (4.15) от векторов номеров гармоник. Со временем могут быть разработаны

методы калибровки этих коэффициентов для получения результатов с учетом последовательностей мономерных звеньев. В настоящее время у нас есть только достаточно общие соображения каким образом должны быть устроены эти коэффициенты разложения. Наш выбор конкретной (гауссовской) модельной функции для зависимости коэффициентов разложения от номеров гармоник будет продиктован соображениями, которые, строго говоря, на данный момент ни откуда не следуют, но находятся в согласии с общими требованиями (4.6) и (4.8). Мы используем также некоторые наводящие соображения. В частности, как мы видели ранее, коэффициенты разложения для ППЭ с несколькими минимумами (например, формулы (4.19), (4.21)) устроены, в основном, как функции одного из инвариантов векторов гармоник (точнее, квадрата нормы векторов гармоник). Предлагаемый выбор коэффициентов приводит к результатам, которые находятся в согласии с различными экспериментальными данными, и в функциональном отношении является одним из наиболее простых для демонстрации свойств ИППЭ (4.15).

Зависимость коэффициентов разложения в (5.9) или в регулярной части разложения (5.11) от векторов номеров гармоник также предполагает зависимость этих коэффициентов от некоторых инвариантов векторов гармоник (т. е. функций номеров гармоник, которые не изменяются при перестановке компонент векторов гармоник для одинаковых звеньев цепи).

В простейшем варианте, когда в мономере имеется только один торсионный угол, мы будем исходить из следующей гауссовской формы для коэффициентов разложения

$$|A(\bar{n})| = a_0 \frac{1}{2\lambda\sqrt{\pi}} \left\{ \exp\left[-\frac{1}{\lambda^2}(\bar{n} - \bar{a})^2\right] + \exp\left[-\frac{1}{\lambda^2}(\bar{n} + \bar{a})^2\right] \right\} \cdot \exp\left[-\sum_i \varepsilon_i |n_i|\right]. \quad (6.1)$$

Если в мономерных звеньях имеется k торсионных углов, то формула несколько усложняется в соответствии с обозначениями (5.3)–(5.6)

$$|A(\bar{n})| = \frac{a_0}{2^k \pi^{k/2}} \left\{ \prod_{j=1}^k \frac{1}{\lambda_j} \exp\left[-\frac{1}{\lambda_j^2}(\bar{m}_j - \bar{a}_j)^2\right] + \prod_{j=1}^k \frac{1}{\lambda_j} \exp\left[-\frac{1}{\lambda_j^2}(\bar{m}_j + \bar{a}_j)^2\right] \right\} \times \\ \times \exp\left[-\varepsilon \sum_i |n_i|\right]. \quad (6.2)$$

Поясним смысл и возможности этих формул. Если полимерная цепь симметрична относительно перестановки мономерных звеньев, то компоненты векторов $\mathbf{a}$ в формулах (6.1) и (6.2) должны быть одинаковыми в силу обсужденных выше соотношений (5.8). В этом случае глобальный минимум ППЭ соответствует спи-

ральной структуре. Последний сомножитель отражает то обстоятельство, что для физически разумной функции коэффициенты ряда Фурье асимптотически экспоненциально убывают с ростом номеров гармоник [51, 52]. Быстрота затухания коэффициентов с увеличением номера гармоники определяются параметрами ε . Ниже, в конечных формулах для ППЭ мы перейдем к пределу $\varepsilon \rightarrow 0$ и нам не важны различия в этом параметре для разных степеней свободы.

Сумма двух гауссовских экспонент и знак модуля в показателе последней экспоненты введены для обеспечения симметрии коэффициентов разложения при изменении знака вектора номеров гармоник в соответствии с общими требованиями (4.6) и (4.8). Отметим, что суммирование ряда (4.15) происходит по всем значениям номеров гармоник как положительным, так и отрицательным. Поэтому добавление второй гауссовской экспоненты в (6.1) и (6.2) носит декоративный характер. Параметры λ определяют масштаб допустимых отклонений разности величин в показателях гауссовских экспонент от 0. При стремлении λ к 0 гауссовские экспоненты превращаются в дельта-функции. Несмотря на относительную простоту формул (6.1) и (6.2), они дают большие возможности для генерации весьма разнообразных типов ИППЭ при вариации значений введенных параметров. Важно, что такие поверхности допускают изучение аналитическими методами. Ранее были подробно исследованы возможности аналогичных (6.1) и (6.2) зависимостей для описания топографии ППЭ и топографии поверхности свободной энергии [27, 36, 52, 54]. Предлагаемый ниже вариант более удобен для обсуждения общих эффектов влияния симметрии относительно перестановки в полимерной цепи мономерных звеньев на топографию ППЭ.

Эффективность формул типа (6.1) для получения аналитических результатов основана на применении интегрального представления

$$\exp\left[-\frac{(n_i \mp a_i)^2}{\lambda^2}\right] = \frac{\lambda}{2\sqrt{\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left[-\frac{\lambda^2}{4}t^2 \pm i(n_i \mp a_i)t\right] dt \quad (6.3)$$

и использовании суммы ряда

$$F_0(\varphi, \varepsilon) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{-\varepsilon|n|\pm in\varphi} = \frac{\operatorname{sh} \varepsilon}{\operatorname{ch} \varepsilon - \cos \varphi} \sim \frac{2\varepsilon}{\varepsilon^2 + 4\sin^2\left(\frac{\varphi}{2}\right)}; \quad \varepsilon \ll 1. \quad (6.4)$$

Подставляя коэффициенты (6.1) в формулу (4.15), выбирая для косинусов в (4.15) представление в виде суммы комплексных экспонент, представляя гауссовские экспоненты в (6.1) в виде произведения сомножителей (6.3), а также учитывая, что сумма всевозможных произведений равна произведению сумм и пользуясь формулой (6.4), получим для ППЭ

$$U(\bar{\varphi}) = -\frac{a_0}{2} \frac{\lambda^N}{2^N \pi^{N/2}} \prod_{i=1}^N \int_{-\infty}^{\infty} \exp \left[-\frac{\lambda^2}{4} t_i^2 - i a_i t_i \right] F_0(t_i + \varphi_i - \varphi_{m_i}, \varepsilon) dt_i + CC, \quad (6.5)$$

где CC обозначает комплексно сопряженное слагаемое. При $\varepsilon \ll 1$ основной вклад в интегралы дает окрестность нуля для аргумента функции F_0 и мы получаем

$$U(\bar{\varphi}) \sim -a_0 \lambda^N \pi^{N/2} e^{-\frac{\lambda^2}{4} \sum_i (\varphi_i - \varphi_{m_i})^2} \cos \sum_i a_i (\varphi_i - \varphi_{m_i}); \quad \lambda \varepsilon \ll 1. \quad (6.6)$$

По структуре выражения (6.6) видно, что целесообразно ввести две обобщенные переменные:

$$R^2 = \sum_i (\varphi_i - \varphi_{m_i})^2 = (\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m)^2; \quad Z = \frac{1}{\|\bar{a}\|} \sum_i a_i (\varphi_i - \varphi_{m_i}) = \frac{\bar{a}}{\|\bar{a}\|} (\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m). \quad (6.7)$$

Первая переменная по геометрическому смыслу задает гиперболы радиуса R в пространстве торсионных углов, описанных вокруг точки глобального минимума. Вторая переменная определяет гиперплоскости, перпендикулярные вектору $\mathbf{a}$ и находящиеся на расстоянии Z (с точностью до знака) от точки минимума. В результате, ППЭ (6.6) можно переписать в простом виде

$$U(\bar{\varphi}) = U(R, Z) = -U_0 e^{-\frac{\lambda^2}{4} R^2} \cos \|\bar{a}\| Z; \quad R \geq |Z|. \quad (6.8)$$

Соблюдение неравенства $R > Z$ в формуле (6.8) очень важно, так как в противном случае не существует такого набора угловых переменных, которые одновременно удовлетворяют условиям (6.7). Это наглядно видно из рис. 6.1.

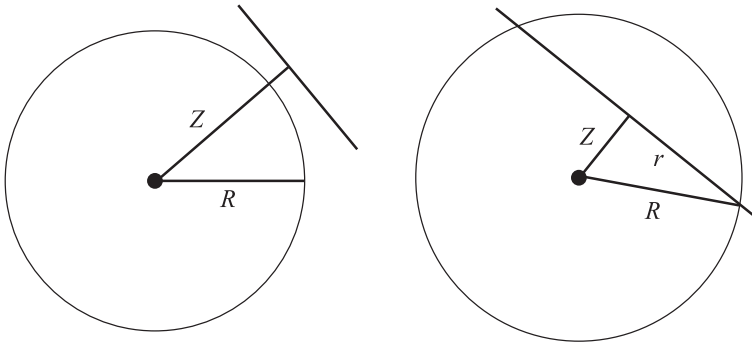


Рис. 6.1. Пояснение к выполнению условия $R > Z$. Слева — радиус сферы меньше расстояния до плоскости и нет точек пересечения угловых переменных, которые удовлетворяют условиям (6.8). Справа — радиус сферы больше расстояния до плоскости и есть множество точек пересечения, удовлетворяющих условиям (6.8), которое представляет собой сферу размерности меньшей на 1 и радиусом $r = (R^2 - Z^2)^{1/2}$

Если проделать все то же самое с формулой (6.2), то получим немногим более сложную формулу:

$$U(\bar{\varphi}) = U(R, Z) = -U_0 e^{-\frac{1}{4}R^2} \cos\|\bar{a}_\lambda\|Z; \quad R \geq |Z|. \quad (6.9)$$

Структура формулы (6.8) сохранилась, но входящие в нее параметры приняли вид

$$R^2 = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^k \xi_{ij}^2; \quad Z = \frac{1}{\|\bar{a}_\lambda\|} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^k \frac{a_{ij}}{\lambda_j} (\xi_{ij} - \xi_{ijm}); \quad \xi_{ij} = \lambda_j \psi_{ij}. \quad (6.10)$$

Индекс i нумерует в цепи мономеры, а индекс j нумерует в мономере типы торсионных углов. Видно, что топологическое устройство ППЭ сохраняется. Масштабным преобразованием угловых переменных мы перешли к знакомой ситуации сечения гиперболы размерностью $N * k$ гиперплоскостью, которая находится на расстоянии Z от центра — точки глобального минимума ППЭ и перпендикулярна вектору с компонентами (a_{ij}/λ_j) . Обозначения здесь понятны из контекста. То есть топологическое устройство и основные характеристики топографии ППЭ мы можем проследить и на более простом варианте поверхности (6.8). Заметим также, что наличие пары обобщенных угловых переменных (6.7) или (6.10) является универсальным следствием симметрии поверхности потенциальной энергии относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев безотносительно к конкретному виду зависимости коэффициентов разложения от инвариантов векторов номеров гармоник многомерного ряда Фурье.

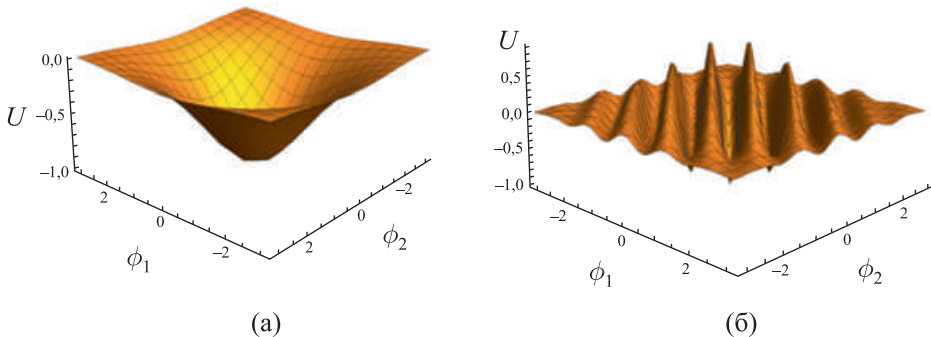


Рис. 6.2. Характерные топографии ППЭ в гауссовском приближении для двух угловых переменных $U(\bar{\varphi}) = -\exp\left[-\frac{1}{4}(\varphi_1^2 + \varphi_2^2)\right] \cos[\|a\|(\varphi_1 + \varphi_2)]$: (а) $\|a\| = 0$; (б) $\|a\| = 5$

Характерные топографии ППЭ на примере двух угловых переменных приведены на рис. 6.2. В простейшем случае вектор $\mathbf{a}$ равен 0, и мы имеем просто гауссовскую воронку для соответствующей спиральной структуры. Эта поверхность, очевидно, полностью удовлетворяет принципу минимальной фрустрации, который упоминался выше. Такое устройство воронки ППЭ должно приводить к очень быстрому фолдингу. В настоящее время известны полипептиды, которые сворачиваются за времена порядка наносекунд [35]. Если вектор $\mathbf{a}$ не равен 0, то топография ППЭ, как и в случае, описанном в [27], при выбранном варианте зависимости коэффициентов разложения от векторов номеров гармоник (6.1) или (6.2) представляет собой систему энергетических воронок (рис. 6.5). В обобщенных переменных R и Z имеется центральная и самая глубокая воронка, которая ведет к глобальному минимуму ППЭ. Имеется также множество сателлитных воронок, глубина которых уменьшается по мере удаления от центральной воронки. Сателлитные воронки отделены от центральной воронки и друг от друга потенциальными барьерами.

Внутри каждой воронки поверхность удовлетворяет принципу минимальной фрустрации. Дно центральной и самой глубокой воронки в случае одинаковых компонент вектора $\mathbf{a}$ соответствует спиральной структуре.

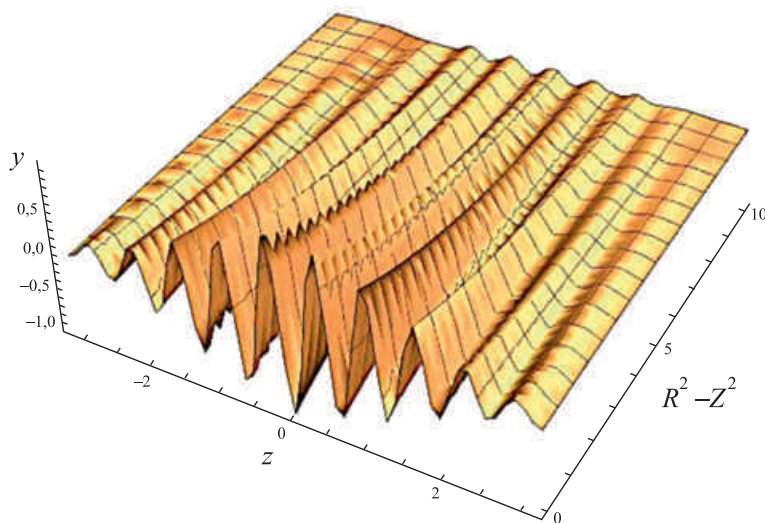


Рис. 6.3. Топография ППЭ (6.8) в обобщенных переменных Z и $R^2 - Z^2$. Модельное ППЭ вида $U(R, Z) = -\exp(-0,25R^2) \cos(10Z)$

Удобство полученных формул состоит также в том, что вне зависимости от числа угловых переменных мы можем изучать топографию ППЭ в терминах двух обобщенных переменных R и Z . Пример топографии ППЭ в переменных R

и Z приведен на рис. 6.3. Мы видим, что если норма вектора $\mathbf{a}$ больше 0, то пространство конфигураций полимерной цепи оказывается разрезанным на области с низкой конформационной энергией, которые отделены друг от друга потенциальными барьерами (рис. 6.4).

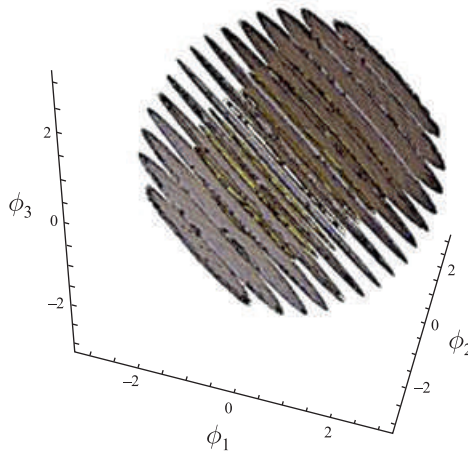


Рис. 6.4. Пространственное сечение трехмерной ППЭ. Пример расслоения конфигурационного пространства на разрешенные (в окрестности локальных минимумов) и запрещенные по энергии области (на рисунке не покрашены). Изображены разрешенные для движения репрезентативной точки слои для ППЭ модельного вида (рис. 6.3)

Координаты и значение энергии в минимуме сателлитной воронки определяются согласно формуле (58) соотношением

$$\|\bar{a}\|Z = \sum_i a_i (\varphi_i - \varphi_{im}) = 2\pi k; \quad k = \pm 1, \pm 2, \dots \quad (6.11)$$

Значение координаты R в точке минимума определяется согласно (6.7) значением $R = Z$ (или $R = -Z$). Соответственно, значения энергии в ложбинах сателлитных воронок определяется формулой

$$U_k = -U_0 \exp\left(-\frac{\pi^2 \lambda^2 k^2}{\|\bar{a}\|^2}\right) \cdot e^{-\frac{\lambda^2}{4} R^2}; \quad R \geq 2\pi k. \quad (6.12)$$

Смещения координат положений минимумов энергии в сателлитных воронках относительно положения глобального минимума составляют

$$\varphi_{ik} - \varphi_{im} = \frac{2\pi k a_i}{\|\bar{a}\|^2}. \quad (6.13)$$

Заметим, что число сателлитных воронок ограничено очевидным условием

$$|\varphi_{ik} - \varphi_{im}| < \pi; \quad |k| < \frac{\|\bar{a}\|^2}{2|a_i|}. \quad (6.14)$$

Значения энергии для высоты потенциальных барьеров между k и $k-1$ воронками (рассматриваем только положительные k больше или равно 1, для отрицательных k ситуация симметрична) определяются формулами

$$B_k(R) = U_0 \exp \left[-\frac{\pi^2 \lambda^2 (2k-1)^2}{4\|\bar{a}\|^2} \right] \cdot e^{-\frac{\lambda^2 R^2}{4}}; \quad R \geq (2k-1)\pi. \quad (6.15)$$

Вычитая из высоты барьера (6.15) значение энергии в ложбине сателлитной воронки (6.12), видим, что возможность перехода репрезентативной точки между соседними воронками быстро возрастает с увеличением номера воронки и значения обобщенной координаты R . Увеличение длины вектора $\mathbf{a}$ способствует более резкому рельефу ППЭ с более выраженными барьерами и более глубокими ложбинами. Увеличение параметра λ , напротив, сглаживает рельеф ППЭ, не изменяя глубину центральной воронки.

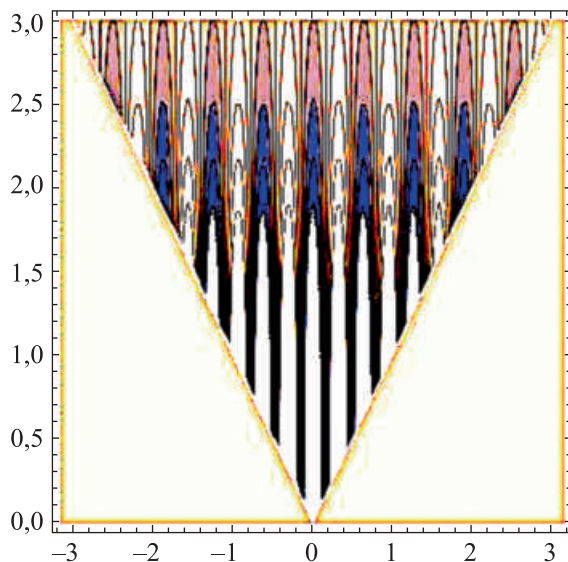


Рис. 6.5. Энергетические воронки для ППЭ (рис. 6.3) в обобщенных переменных R и Z . Ось Z — по горизонтали, $R^2 > Z^2$. Самая глубокая — центральная воронка, справа и слева сателлитные воронки с уменьшающейся глубиной. Воронки отделены друг от друга барьерами, высоты которых уменьшаются по мере удаления от точки глобального минимума

Обсудим далее в рамках рассматриваемого гауссовского приближения роль и значение вектора $\mathbf{a}$. Как уже отмечалось, если рассматриваемый полимер состоит из абсолютно одинаковых мономерных звеньев и поверхность симметрична относительно перестановки переменных торсионных углов одинакового типа, то по соображениям симметрии этот вектор должен быть либо равен 0, либо иметь одинаковые компоненты. В первом случае мы должны иметь ППЭ с простейшей топографией, как на рис. 6.2, *а*. Такая топография ППЭ идеальна для быстрого сворачивания в уникальную пространственную структуру, которая достижима из любой начальной конфигурации цепи. Второй вариант дает более сложную топографию ППЭ, но внутри каждой из воронок мы имеем гладкую поверхность.

Если мономерные звенья подвергаются модификациям, например, в области боковых групп, то идеальная симметрия для коэффициентов разложения нарушается. В этом случае компоненты вектора $\mathbf{a}$ не обязаны быть одинаковыми или все равными 0. Однако это усложнение зависимости коэффициентов разложения ППЭ в ряд Фурье не приводит к принципиально новым эффектам для топографии поверхности.

Заметим, что в рамках гауссовской модели, соблюдая общие условия симметрии для коэффициентов разложения (4.8), мы описываем возможные варианты изменений этих коэффициентов как смещения центра распределения коэффициентов разложения в пространстве номеров гармоник на вектора $\mathbf{a}$ и $-\mathbf{a}$ (рис. 6.6). Такое усложнение топографии ППЭ очень похоже на снятие вырождения многократно вырожденного состояния (если $\mathbf{a} = 0$) при включении дополнительного возмущения.

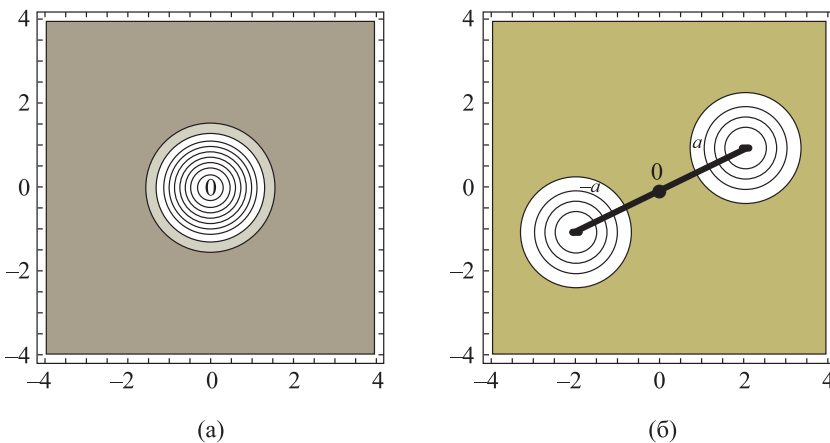


Рис. 6.6. Распределение вкладов от областей пространства номеров гармоник в случае идеальной симметрии полимерной цепи относительно перестановки мономерных звеньев (а) и слабой симметрии (б) в гауссовском приближении

В случае **a**, не равного 0, однозначность результата сворачивания полимера за разумное время требует соблюдения определенных условий для стартовых конфигураций цепи. Эти пространственные конфигурации для успешного сворачивания и перемещения репрезентативной точки в глобальный минимум должны принадлежать хоть и весьма обширному, но определенному множеству начальных состояний, которые находятся в области притяжения центральной энергетической воронки. В современных живых системах это может быть реализовано, по-видимому, за счет котрансляционного сворачивания [57], когда набор конфигураций полипептидной цепи определяется механизмами биосинтеза. Определенную роль в формировании таких стартовых конфигураций играют, по-видимому, также шапероны [60], которые фиксируют конформации, которые, возможно, выгодны для сворачивания цепи.

В реальных экспериментах по фолдингу при конечных температурах наблюдаемые эффекты определяются *поверхностью свободной энергии* макромолекул. В рамках развиваемых гауссовских моделей для ППЭ имеется достаточно простой и логичный переход от ППЭ к поверхности свободной энергии цепи (ПСЭ) в терминах обобщенных координат R и Z . Как известно, свободная энергия системы в состоянии равновесия при заданных условиях (значениях R , Z) определяется через сумму по состояниям [1]:

$$G(R, Z) = -k_B T \ln W(R, Z), \quad (6.16)$$

$$W(R, Z) = \int_{\{\bar{\varphi}\}} \exp \left[-\frac{U(\bar{\varphi})}{k_B T} \right] \delta(R - \|\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m\|) \delta \left(Z - \frac{\bar{a}(\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m)}{\|\bar{a}\|} \right) \theta(R - |Z|) d^N \bar{\varphi}.$$

Дельта-функции в интеграле (6.16) вырезают области N -мерного конфигурационного пространства торсионных углов, которые определяются уравнениями (6.7), а тета-функция Хевисайда вырезает значения переменных R и Z в соответствии с условием (6.9). Несмотря на сложный вид интеграла (6.16), его вычисление в рамках рассматриваемой гауссовской модели и ППЭ (6.9) не составляет труда. Дельта-функции и функция Хевисайда вырезают при заданном значении потенциальной энергии из фазового пространства объем гиперболы с радиусом $r = (R^2 - Z^2)^{1/2}$ (см. рис. 6.1) и для суммы по состояниям получаем

$$W(R, Z) \sim (R^2 - Z^2)^{(N-1)/2} e^{-U(R, Z)/(k_B T)} = e^{-G(R, Z)/(k_B T)}; \quad R \geq |Z| \quad (6.17)$$

и, соответственно, для свободной энергии

$$G(R, Z) = U(R, Z) - k_B T (N-1) \ln \sqrt{R^2 - Z^2}; \quad R \geq |Z|. \quad (6.18)$$

Энтропия состояния с фиксированными R и Z пропорциональна логарифму фазового объема этих состояний

$$S(R, Z) = k_B(N-1) \ln \sqrt{R^2 - Z^2}; \quad R \geq |Z|. \quad (6.19)$$

Численный множитель в (6.17) мы опустили, так как после логарифмирования он влияет лишь на начало отсчета энергии в (6.18). В формуле (6.18) есть проблема в точке $R^2 = Z^2$, где свободная энергия без учета квантовых поправок обращается в бесконечность, так как фазовый объем точки касания гиперсферы R и гиперплоскости Z оказывается равным 0. В этом случае нам необходимо будет учесть квантовые поправки и то обстоятельство, что при очень низких температурах остаются нулевые колебания по торсионным углам с конечной амплитудой и $(R^2 - Z^2)$ не может быть меньше некоторой конечной величины, пропорциональной квадрату амплитуды нулевых колебаний по торсионным углам. Оценим эти величины. Полагаем, что амплитуды нулевых колебаний одинаковы для всех углов, и согласно (6.7) имеем

$$\begin{aligned} \langle R^2 \rangle_0 &= \langle \|\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m\|^2 \rangle_0 = N \langle \varphi^2 \rangle_0, \\ \langle Z^2 \rangle_0 &= \langle \|\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m\|^2 \cos^2 \alpha [\bar{a}, (\bar{\varphi} - \bar{\varphi}_m)] \rangle_0 \simeq \frac{1}{2} N \langle \varphi^2 \rangle_0. \end{aligned} \quad (6.20)$$

Угол α в (6.20) формально есть угол между векторами и при усреднении происходит усреднение квадрата косинуса по всем ориентациям. Таким образом,

$$\langle R^2 - Z^2 \rangle_0 \simeq \frac{1}{2} N \langle \varphi^2 \rangle_0. \quad (6.21)$$

Оценим далее квадрат амплитуды нулевых колебаний по торсионным углам, следуя обычно используемой процедуре [62]. Полагая, что потенциальная энергия при повороте вблизи минимума имеет вид

$$U(\varphi) \sim \frac{1}{2} u (1 - \cos 3\varphi) \sim \frac{9}{4} u \varphi^2, \quad (6.22)$$

получим для квадрата амплитуды нулевых колебаний

$$\langle \varphi^2 \rangle_0 \simeq \frac{\hbar}{3l\sqrt{Mu}}, \quad (6.23)$$

где M — масса боковой группы, которая поворачивается при нулевых торсионных колебаниях; l — длина связи между узлом и этой группой. Полагая, что масса M составляет порядка 20 а.е.м., l — порядка 1,5 Å, u — порядка 3 ккал/моль, получаем для квадрата амплитуды нулевых колебаний значение

порядка 0,01 (квадратных радиан). То есть для устранения расходимости в формуле для энтропии (6.19) к значению радиуса гиперболы под знаком логарифма нужно добавить вклад от амплитуд нулевых колебаний по торсионным углам, определяемый из формулы (6.21). В результате получим

$$G(R, Z) = -U_0 \left\{ e^{-\frac{\lambda^2}{4} R^2} \cos \| \bar{a} \| Z + \frac{T}{T_0} \ln \left[1 + \frac{\sqrt{R^2 - Z^2}}{\sqrt{\langle R^2 - Z^2 \rangle_0}} \right] \right\}; \quad R \geq |Z|, \quad (6.24)$$

где мы ввели параметр характеристической температуры T_0

$$T_0 = \frac{U_0}{k_B N}, \quad (6.25)$$

который по смыслу пропорционален удельному уменьшению потенциальной энергии при сворачивании, приходящемуся на одну степень свободы. Пример поверхности свободной энергии приведен на рис. 6.7.

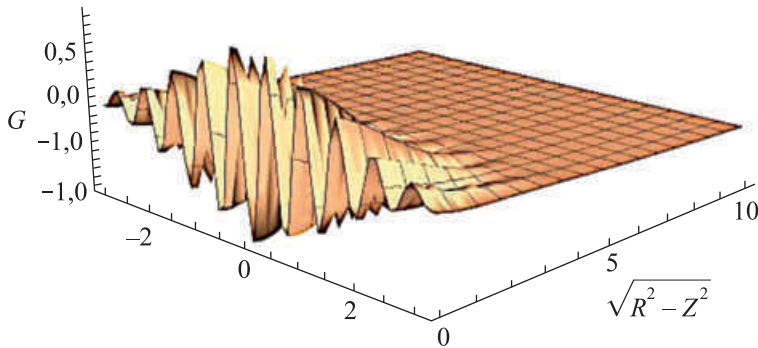


Рис. 6.7. Топография поверхности свободной энергии (6.24) в пространстве обобщенных переменных $G = -\exp(-0,25R^2) \cos(10Z) - 0,15 \ln(1 + \sqrt{R^2 - Z^2})$

При сделанных выше оценках о величине амплитуды нулевых колебаний множитель перед корнем под знаком логарифма составит порядка 1 при длине цепи порядка 200 остатков. Для приведенного выше значения квадрата амплитуды нулевых колебаний можно оценить порог температуры, при которой свободная энергия свернутого состояния будет ниже, чем полностью денатурированного состояния. Заметим, что предельное значение параметра R^2 составляет порядка $N\pi^2$, а предельное значение величины под знаком логарифма не зависит от N и составляет порядка 45. То есть при заданных значениях параметров

в рамках излагаемой гауссовской модели сворачивание оказывается термодинамически выгодным при $T < 0,26T_0$ (рис. 6.8).

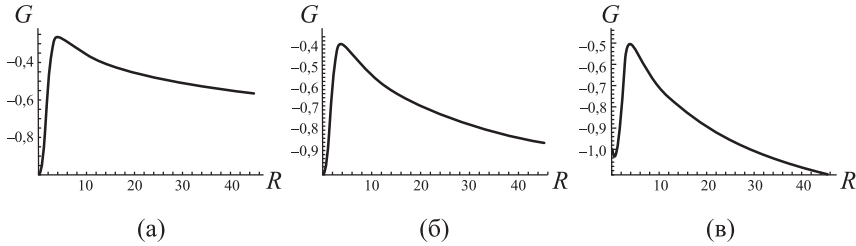


Рис. 6.8. Профиль свободной энергии (рис. 6.7) в центральной воронке ($Z = 0$, $\lambda = 1$): (а) $T/T_0 = 0,15$; (б) $T/T_0 = 0,23$; (в) $T/T_0 = 0,3$: (а), (б) свернутое состояние термодинамически выгодно; (в) свернутое состояние термодинамически не выгодно

Полагая, что температурный порог денатурации белка составляет порядка 60°C ($\sim 333\text{ K}$), оценим параметр T_0 , который составит около 1280 K . То есть данная модель предсказывает по температуре денатурации необходимый выигрыш в потенциальной энергии от невалентных взаимодействий макромолекулы, который приходится на одну степень свободы и составляет порядка $2,56\text{ ккал/моль}$ или энергия взаимодействия мономеров порядка 5 ккал/моль . Естественно, это ориентировочные значения, которые демонстрируют разумный порядок величин, которые появляются «на кончике пера» без каких-то дополнительных условий и предположений о конкретных полимерных структурах. Значение параметра λ не влияет на эту оценку, так как сравнение значений энергий происходит относительно точки $R = 0$. В принципе, пользуясь такого рода оценками, мы можем понять, в чем состоит уникальность температурных условий жизни на нашей планете.

Приведенная оценка энергии невалентных взаимодействий между мономерами цепи имеет вполне понятную химическую природу. Если мы зададимся, например, вопросом о возможности возникновения и физико-химической эволюции макромолекулярных объектов с уникальной пространственной структурой в диапазоне температур денатурации порядка 750 K (Венера), то получим, соответственно, значение удельной энергии взаимодействия мономеров порядка 11 ккал/моль . В этом случае можно прогнозировать структуры, в которых значительный вклад в энергию невалентных взаимодействий дают заряженные группы. Если перейти к диапазону температур порядка 120 K (некоторые спутники планет-гигантов), то оценка показывает значение энергии взаимодействия мономеров порядка 2 ккал/моль . И в том и другом случаях химический состав макромолекул, формирующих уникальные пространственные структуры, должен сильно отличаться от земных объектов.

На рис. 6.8 виден также характерный вулканообразный профиль свободной энергии, который наблюдается в экспериментах по фолдингу белков в растворах [14, 15, 63]. Область энергетической воронки, которая ведет к свернутому состоянию, отделена от денатурированного состояния барьером, который имеет энтропийную природу. Для сравнения рассчитанных высот барьеров с экспериментально измеряемыми нам нужно знать реальное значение параметра R для денатурированного состояния белка в растворе при заданных концентрациях реагентов. Состояние, которое отвечает на рис. 6.8 предельному значению обобщенной координаты R , — это состояние, для которого все торсионные углы отличаются от равновесных значений на величину π , что маловероятно. В принципе, сравнивая экспериментальные значения высот энтропийного барьера, которые дает формула (6.24), можно было бы при заданных значениях U_0 (зависят, в том числе, и от состава среды) оценить диапазон значений обобщенной координаты R и параметра λ для состояний денатурированного белка в растворе и их зависимость от условий денатурации.

7. О «стреле» молекулярной эволюции

Отметим далее очень важное обстоятельство, которое объединяет все изложенные выше соображения о топографии ППЭ, ПСЭ и правила движения репрезентативной точки по многомерной поверхности потенциальной энергии макромолекулы в вязкой среде. Все изложенные выше принципы могут работать в комплексе и быть направлены на решение задачи физико-химической молекулярной эволюции — отбору молекулярных конструкций, формирующих уникальные пространственные структуры в определенном диапазоне значений параметров внешней среды.

Как уже отмечалось, успешный результат фолдинга или попадание репрезентативной точки в глобальный минимум свободной энергии во многом определяется стартовым положением репрезентативной точки, которой очень желательно оказаться в области притяжения центральной энергетической воронки. Это легко достижимо для полностью симметричных относительно перестановки мономерных звеньев линейных полимеров в частном варианте, когда $\mathbf{a} = 0$ (рис. 6.2, *а*). При этом формируются спиральные структуры со строгой периодичностью значений двугранных углов в основной цепи. С другой стороны, мы видим (рис. 6.2, *б*, 6.3, 6.5, 6.7), что если $\mathbf{a}$ не равно 0 (есть, например, нарушение идеальной симметрии за счет химической модификации боковых групп) и возникли сателлитные воронки, то при неблагоприятном выборе стартовой конфигурации появляется возможность мисфолдинга. Мы также видим, например, на рис. 6.7, что поверхность свободной энергии (также как и ППЭ) для денатурированных состояний вдали от дна энергетических воронок (большие зна-

чения R) достаточно гладкая и попадание в центральную воронку даже при правильном выборе стартовой конфигурации в области притяжения этой воронки будет возможно при условии не слишком сильного изменения параметра Z при движении репрезентативной точки. То есть весьма полезным для процесса правильного фолдинга является условие

$$|\Delta Z| \sim \tau \left| \frac{dZ}{dt} \right| \ll \frac{1}{\|\vec{a}\|}, \quad (7.1)$$

где τ — среднее время фолдинга. Таким образом, у нас есть условие, которое сильно облегчает формирование уникальной пространственной конфигурации:

$$\left| \frac{dZ}{dt} \right| = \left| \sum_i a_i \dot{\phi}_i \right| \sim 0. \quad (7.2)$$

Здесь точка над торсионным углом означает дифференцирование по времени. То есть весьма благоприятным для правильного фолдинга является случай, когда линейная комбинация (7.2) угловых скоростей поворота по торсионным углам близка к 0. С похожей ситуацией мы практически сталкивались в формуле (3.4) при обсуждении влияния вязкости на правила движения репрезентативной точки по ППЭ для полимерной цепи (рис. 3.3, в), когда движение репрезентативной точки предполагает минимизацию потерь на диссипацию энергии [37, 38]. Если, например, все компоненты вектора $\mathbf{a}$ положительны, то вариант знакопеременного направления поворотов по двугранным углам (который ведет к формированию спиралей) оказывается благоприятным для достижения репрезентативной точкой глобального минимума. Этот вариант сворачивания подкрепляется эффектом вязкости, в частности напомним здесь формулу (3.4.1):

$$\sum_k \dot{\phi}_k l_k = 0; \quad l_k = \frac{(\vec{b}_k \vec{l})}{b_k}.$$

Именно такой вариант динамики сворачивания мы наблюдали для полипептидной цепи в вязкой среде [39, 40]. При этом мы должны помнить о важности выбора стартовой конфигурации цепи, которая определяется механизмом ее синтеза. То есть, с одной стороны, топография ПСЭ определяется компонентами вектора a_i в соотношении (7.2), которые отражают свойства симметрии цепи относительно перестановки мономерных звеньев и слабым нарушением симметрии, которое может быть вызвано небольшой химической модификацией боковых групп мономеров. С другой стороны, требование минимизации скорости диссипации энергии при конформационных движениях цепи в вязкой среде

и согласование скоростей поворотов вокруг связей (3.4) и средних скоростей диссипации энергии по узлам цепи (3.20) приводит к условию аналогичному (7.2), но в котором коэффициенты перед угловыми скоростями связаны с конфигурацией цепи, а также с величинами коэффициентов трения и, в конечном счете, с размером и, в меньшей степени, формой боковых групп. Сочетание этих факторов (формирование множества вложенных воронок, возможность репрезентативной точке стабилизировать свое положение в определенном узком слое гиперплоскостей в пространстве торсионных углов за счет эффектов вязкости, определяемых соотношением (7.2)) и возможность их согласования в результате химической модификации боковых групп линейного полимера дает, в принципе, шанс направить стрелу молекулярной добиологической эволюции в сторону образования набора макромолекул, которые спонтанно формируют уникальные пространственные структуры.

8. Заключение

Суммируем результаты, которые были получены при использовании подходов и методов многомерной геометрии к проблемам динамики и формирования пространственной структуры линейных полимеров и биополимеров. Что становится более понятным и как смещаются акценты в формулировках общих и принципиальных вопросов в этой области? Какие имеются дальнейшие возможности развития данной области науки с учетом полученной картины динамических свойств рассматриваемых объектов?

1. Роль вязкости. Обычно конформационные движения макромолекулярной цепи воспринимаются как полностью хаотические и с этой точки зрения формирование определенных коллективных степеней свободы в биополимерах может показаться неким случайным стечением обстоятельств. Вместе с тем, выше было показано, что в вязкой среде имеются, по меньшей мере, две причины для формирования коллективных движений. Во-первых, из уравнений движения системы связанных частиц в сильно вязкой среде (для конформационных движений водная среда является заведомо сильно вязкой) следует, что для угловых скоростей поворотов вокруг связей имеются определенные правила согласования: сумма векторов угловых скоростей поворотов вокруг связей равна 0. Причина этого кроется в симметрии уравнений движения относительно трансляций и вращения макромолекулы как целого в однородной вязкой среде. При учете тепловых флуктуаций и переходе от уравнений Ньютона к уравнениям Ланжевена этот закон сохранения будет выполняться лишь в среднем. Но проявление этой закономерности будет тем более значительным, чем больше будут силы взаимодействия между узлами цепи по сравнению с амплитудой тепловых флуктуаций. Это важно на начальных этапах сворачивания линейной

полимерной (биополимерной) цепи и приводит к формированию зародышей спиральных структур.

Во-вторых, обращаем внимание на очень важную статистическую закономерность, которая также следует из уравнений движения системы связанных частиц в вязкой среде. Распределение для скоростей диссипации энергии каждого узла цепи при сворачивании не зависит от положения этого узла (за исключением концевых участков). То есть средняя скорость диссипации энергии при конформационных движениях оказывается равномерно размазанной вдоль цепи. Это означает также, что скорость изменения потенциальной энергии при конформационных движениях также равномерно размазана по степеням свободы. Возникает правило для движения репрезентативной точки — движение происходит по максимально гладким участкам (траекториям) на многомерной энергетической поверхности. В этом случае становится более понятной принципиальная возможность калибровки параметров силовых полей, задаваемых атом-атомными потенциалами при молекулярном моделировании сложных многоатомных систем. Совершенно не решаемая задача аппроксимации всей многомерной энергетической поверхности сводится к аппроксимации ничтожно малой ее части только вдоль гладких траекторий. Этот вывод открывает новые пути для верификации численных экспериментов по динамике макромолекул и акцентирует внимание на зависимость качества результатов от параметров протоколов моделирования, которые связаны с учетом вязкости.

Таким образом, вязкость является фактором формирования коллективных степеней свободы линейных полимеров и приводит к тенденции формирования спиральных структур. Тем самым, имеется достаточно общий физический механизм формирования разнообразных спиральных структур для линейных полимеров в вязкой среде. Детали этого процесса вполне могут изучаться экспериментально в жидких и газовых средах с различной вязкостью с использованием техники атомно-силовой микроскопии для создания начальных состояний полимерной цепи и спектральным контролем за формированием вторичной структуры.

2. Топология конфигурационного пространства и энергетические ландшафты. Скрытая симметрия линейных биополимеров. Согласно базовым физическим принципам, пространственная структура и свойства биополимеров определяются топографией многомерной поверхности потенциальной энергии макромолекулы, которая зависит от координат всех атомов молекулы [8, 12, 17, 18, 22–24, 27–31, 37, 64]. Для макромолекул, содержащих уже порядка сотни атомов, задача вычисления (определения) такой поверхности с приемлемой точностью является не решаемой даже по чисто техническим причинам. Долгое время к этой проблеме не существовало адекватных подходов. Как от-

мечалось выше, сумма миллионов парных атом-атомных потенциалов, с помощью которых обычно аппроксимируют ППЭ макромолекулярной системы, имеет неконтролируемую ошибку и возникает парадокс, когда методы молекулярной динамики вроде работают, но поверхность потенциальной энергии, а тем более ее градиенты определены, мягко выражаясь, не очень хорошо. Выше мы отмечали, что разрешение этого парадокса возможно при включении эффектов вязкости (реальной среды или соответствующего термостата). При этом, как мы видели выше, работает не вся энергетическая поверхность, а лишь ничтожные (в процентном отношении) участки поверхности, которые являются достаточно гладкими и доступны для движения репрезентативной точки в условиях вязкой среды. Именно для этой очень ограниченной части потенциальной поверхности работают калибровки параметров силовых полей. Однако использование такого рода аппроксимаций не снимает вопроса о фундаментальных принципах, которые лежат в основе устройства топографии потенциальной поверхности. Основная проблема состоит в том, что традиционный вариант задания ППЭ заводит в тупик проблему выявления общих закономерностей формирования энергетических ландшафтов макромолекул. Мы исходим из настоятельной необходимости при решении этой проблемы максимально следовать правилам, которые диктуются топологией конфигурационного пространства линейных полимеров. При этом наиболее естественной аналитической формой для ППЭ является разложение в многомерный ряд Фурье. В принципе, в этом нет ничего необычного. В часто используемых силовых полях присутствуют отдельные члены такого разложения при описании вкладов в ППЭ от потенциалов торсионных углов. Разложения в ряд Фурье используются также для учета вклада кулоновских сил через суммы Эвальда [65] в системах с периодически граничными условиями. В этом отношении последовательное и строгое следование основным принципам задания функций на торе с помощью рядов Фурье является вполне естественным.

Таким образом, общие закономерности топографии ППЭ для линейных полимеров возникают из топологии конфигурационного пространства (топологии многомерного тора) и привязанного к этой топологии многомерного фурье-разложения ППЭ в пространстве двугранных углов. При этом вся информация о топографии ППЭ содержится в коэффициентах разложения, для анализа и параметризации которых могут применяться общие методы, основанные на соотношениях симметрии. Так, например, использование многомерного фурье-разложения для ППЭ добавляет новый акцент в известную проблему о возникновении хиральных структур для биополимеров в ходе молекулярной эволюции [53]. Этот новый акцент состоит в вопросе — а зачем вообще оказались нужны хиральные молекулы для функционирования живых систем и нельзя ли было обойтись молекулами с зеркальной симметрией? Принципиальный ответ состо-

ит в том, что для функционирования живых систем нужны макромолекулы, которые формируют уникальные (строго определенные) пространственные структуры. Для зеркально-симметричных молекул (как это следует из симметрии коэффициентов фурье-разложения ППЭ) глобальный минимум энергии, если он есть, будет по меньшей мере двукратно вырожден и уникальной структуры для биополимера не получится.

Природой, по-видимому, была отведена также особая роль линейным полимерным структурам, которые построены из одинаковых или почти одинаковых мономерных звеньев. У этих макромолекул есть не сразу заметная симметрия относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев. В этом случае коэффициенты разложения ППЭ в многомерный ряд Фурье зависят только от инвариантов алгебраических векторов номеров гармоник. Наиболее естественными инвариантами являются норма или длина вектора и сумма компонент вектора гармоник.

Опираясь на свойства фурье-разложения для ППЭ, мы показали, что в конформации глобального минимума потенциальной энергии линейный гомополимер, который симметричен относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев, формирует спиральную структуру, вид которой может быть достаточно сложным, если внутри мономерных звеньев также имеются конформационные степени свободы. Причем ППЭ при достаточно широких предположениях о зависимости коэффициентов разложения от инвариантов векторов номеров гармоник имеет форму энергетической воронки. В самом простом и максимально симметричном варианте возникает гладкая энергетическая воронка в пространстве торсионных углов. Нарушения симметрии приводят к топографии вложенных гладких энергетических воронок. В этом случае имеется основная или центральная воронка и множество сателлитных воронок с меньшими глубинами (рис. 6.2, б). Эти воронки отделены от центральной и друг от друга потенциальными барьерами.

3. Модели фолдинга. Обсуждаемые энергетические воронки полностью соответствует принципу минимальной фрустрации (рис. 6.2, а, б), который был сформулирован для преодоления парадокса Левинталя в теории фолдинга белков и который, по сути, оказывается следствием симметрии линейных полимеров относительно перестановки одинаковых мономерных звеньев. Заметим, что для поверхности с топографией вложенных энергетических воронок появляется возможная зависимость результата сворачивания от начальной конфигурации цепи. Получается так, что наиболее оптимальным для формирования нативной 3D-структуры, например, белка является формирование в процессе биосинтеза множества таких конформаций, которые находятся в зоне притяжения центральной воронки. Это в эволюционном плане приводит к возникновению об-

ратной связи между системой синтеза биополимеров и механизмом формирования уникальных пространственных структур. Эта связь, по-видимому, и лежит в основе явления котрансляционного фолдинга. Мягкая денатурация глобулы сохраняет множество конформаций, принадлежащих центральной воронке, и делает возможной обратимую ренатурацию в нативное состояние. Силовой же вариант разворачивания глобулы может перебросить конформации цепи в область притяжения сателлитных воронок и обратимость ренатурации будет нарушена. В этой связи было бы важно экспериментально и с использованием моделирования выяснить, для каких структур и при каких условиях конечное состояние при конформационной релаксации будет одинаковым, а для каких различным. Время достижения этих состояний также может зависеть от пути конформационного перехода, который может в значительной мере определяться стартовой конфигурацией. Таким способом можно было бы исследовать особенности топографии энергетических ландшафтов конкретных биополимеров.

В гауссовском приближении для топографии энергетических ландшафтов получается вполне конкретный и обозримый результат. Причем сложная многомерная поверхность может быть описана эффективной поверхностью в пространстве двух обобщенных переменных — одна из которых имеет смысл радиуса гипербол в пространстве углов с центром в точке глобального минимума, а другая — расстояние от центра до гиперплоскостей, проходящих также в пространстве угловых переменных. (Заметим, что существование двух таких обобщенных переменных является общим свойством для полимерных структур, которые симметричны относительно перестановки мономерных звеньев.) В рамках гауссовского приближения и использования этих двух обобщенных переменных могут быть получены компактные аналитические результаты для топографии энергетической воронки, которые дают вполне естественную интерпретацию многим известным, но разнородным экспериментальным наблюдениям для процессов фолдинга белковых последовательностей. Энтропия состояний вычисляется через конфигурационный объем при заданных значениях этих обобщенных переменных. Получаемая поверхность свободной энергии имеет характерный вулканообразный профиль в соответствии с экспериментальными наблюдениями.

Особо следует отметить, что следствием обсуждаемой топографии поверхности свободной энергии является наличие характеристической температуры для макромолекулы, формирующей уникальную пространственную структуру. Эта температура имеет наглядный смысл и соответствует выигрышу за счет невалентных взаимодействий в потенциальной энергии, приходящемуся на одну степень свободы или на одно мономерное звено при сворачивании макромолекулы. Возникает и пропорциональный этой температуре порог тепловой денатурации нативного состояния. Так, если принять температуру порога денатура-

ции порядка 60 °С, то оказывается, что выигрыш в потенциальной энергии на одно мономерное звено (одну конформационную степень свободы) должен составить порядка 2,5 ккал/моль. Это отвечает условиям образования водородной связи между парами мономеров, что вполне соответствует условиям на нашей планете. В принципе, задавая пороговую температуру денатурации в рамках рассматриваемых представлений, можно прогнозировать тип и энергетику взаимодействий мономерных звеньев цепи, которые необходимы для формирования уникальных пространственных структур в определенном диапазоне температур. В перспективе, это может оказаться полезным для понимания возможных условий молекулярной физико-химической эволюции и за пределами нашей планеты. В любом варианте представляет также интерес изучение возможностей для синтеза и условий формирования уникальных пространственных структур для линейных полимеров небиологической природы (см., например, [66]) при создании «умных» макромолекулярных систем.

4. Стрела молекулярной эволюции. В заключение кратко о тех идеях, которые могут дать развиваемые представления и методы для продвижения в понимании процессов, приводящих к возникновению жизни. Мы исходим из необходимости добиологического этапа молекулярной эволюции, когда в результате химических процессов и определенных физических закономерностей отбирались макромолекулы, которые способны стабильно формировать уникальные пространственные структуры. Подчеркнем, что мы не имеем в виду конкретные биополимеры в современном виде, механизмы образования и отбора которых являются отдельной и до конца не очень понятной задачей даже по своей постановке. Предыдущий этап формирования из некоего первичного «бульона» [67] неких молекулярных «конструкций» со стабильной пространственной структурой и функционалом видится в числе весьма возможных вариантов эволюционного перехода к простейшим формам комплексов макромолекул, имеющих некоторые признаки, свойственные живым системам. Принципиальный вопрос состоит в следующем — имеются ли и при каких условиях объективные физико-химические причины направленной эволюции макромолекул в сторону формирования объектов с уникальной пространственной структурой? Насколько этот процесс может быть устойчивым при определенных условиях внешней среды? Мы предлагаем рассматривать этот вопрос с точки зрения формирования и эволюции энергетических ландшафтов линейных полимеров в направлении формирования уникальных пространственных структур, т. е. пространственных структур с единственным глобальным минимумом, попадание в который возможно за разумное время и при вполне достижимых условиях. Формирование такого рода структур одномоментно маловероятно и, скорее всего, нужно рассматривать соответствующий процесс и условия его протека-

ния. Так, первый этап может состоять в формировании не хиральных простых гомополимеров, энергетический ландшафт которых по соображениям симметрии содержит, в самом простом варианте, двукратно вырожденный глобальный минимум, отвечающий правой и левой спиралью. Заметим, что формирование при сворачивании полимерных цепей разнообразных спиральных структур, напоминающих спирали в биополимерах, хорошо прослеживается в проведенных численных экспериментах с линейными полимерами не биологической природы [68, 69]. Химические превращения боковых групп мономеров могут сделать полимер хиральным и нарушить равновесие между правой и левой спиралью. Мы не рассматриваем в данном контексте проблему «хиральной катастрофы» [53], когда по не совсем пока понятным причинам произошел эволюционный выбор определенной хиральности для основных молекул, формирующих биополимеры. Этот вопрос и его история хорошо описаны в [70]. Здесь важно другое. Нарушение зеркальной симметрии в энергии правой и левой спиралей позволяет сместить равновесие в сторону определенной пространственной структуры, у которой появляются возможности для накопления и последующей модификации. В данном контексте обращает внимание устойчивость процесса формирования спиральных пространственных структур, которая является следствием эффектов вязкости при минимальных требованиях к топографии энергетического ландшафта. Вязкость вызывает антикорреляцию направлений вращения вокруг связей между узлами цепи как раз в направлении формирования спиральных структур. В этом отношении и симметрия цепи относительно перестановки мономерных звеньев, и эффекты вязкости (сумма векторов угловых скоростей равна 0, скорость диссипации энергии равномерно размазана по узлам цепи) подталкивают линейный полимер к формированию спиральных структур.

Эпилог

Итак, мы затронули весьма сложные проблемы, относящиеся к самым основам формирования пространственных структур, динамики и функциональной способности линейных полимеров, к которым относятся и многочисленные биополимеры. Многие годы, во всяком случае нам, было совершенно непонятно, каким образом интуитивные представления, которые возникают из совокупности экспериментальных наблюдений и численного моделирования, могут быть положены на некоторую общую математическую основу для анализа и выявления закономерностей, скрытых при обычном наблюдении. Логика рассуждений вывела нас на использование идей и методов многомерной геометрии при анализе фундаментальных закономерностей, которые лежат в основе динамики и формирования уникальных пространственных структур биополимеров. Психологически это не просто и может вызывать ощущение излишней громозд-

кости, сложности типа «никогда в этом не разобраться». Мы старались донести до читателя, что это ощущение ложное, труды для понимания необходимых знаний не так велики по сравнению с тем удовольствием, которое ощущаешь от вида красивых окрестностей, забравшись на гору точных наук.

Первый вариант рукописи был написан в конце 2021 года. Его прочитал А. Б. Рубин. Для автора это был принципиальный тест на стиль и понятность изложения концепций для читателя, искушенного многими годами размышлений о физической сути процессов в живых системах, но не имевшего ранее дела со многими математическими идеями и методами, которые использовались в данной статье. В результате обсуждения, за которое я очень благодарен, в текст были внесены некоторые правки, поясняющие трудные для восприятия моменты. Что получилось — судить читателям, среди которых, надеюсь, обязательно найдутся и те, кто пойдет дальше по пути расширения горизонтов применения идей и методов многомерной геометрии к изучению биополимерных систем. Это тем более важно ввиду того, что идеи и методы многомерной геометрии и симметрии в последние несколько десятков лет являются одним из основных инструментов при развитии базовых представлений о возникновении и строении Вселенной. В конце концов, мотивация, вызванная нашим любопытством и желанием понять, как мы появились во Вселенной и как мы с ней связаны на самом фундаментальном уровне, является одним из самых мощных побудительных факторов для развития науки.

Литература

1. Гиббс Дж. В. Основные принципы статистической механики. — М.: Наука, 1982.
2. Nurse P. Biology must generate ideas as well as data // *Nature*. — 2021. — Vol. 597. — P. 305.
3. Блюменфельд Л. А. Проблемы биологической физики. — М.: Наука, 1974.
4. Чернавский Д. С., Хургин Ю. И., Шноль С. Э. Об упругих деформациях белка-фермента // *Мол. биол.* — 1967. — № 3.
5. Волькенштейн М. В. Электронно-конформационные взаимодействия в биологических системах // *Изв. АН СССР, сер. биол.* — 1971. — Вып. 3.
6. Рубин А. Б. Биофизика. Т. 1. Теоретическая биофизика. — М.: Изд. МГУ, 2004.
7. Mossbauer R. L. Gamma-resonance and X-ray investigations of slow motions in macromolecular systems // *Hyperfine Int.* — 1987. — Vol. 33. — P. 199–222.
8. Frauenfelder H. The Physics of Proteins // *Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering* / S. C. Chan, W. S. Chan (eds.). — Springer, 2010. — DOI: 10.1007/978-1-4419-1044-8_12
9. Шайтан К. В., Рубин А. Б. Конформационная подвижность и эффект Мессбауэра в белках // *Мол. биол.* — 1980. — Т. 14, № 6. — С. 1323–1335.

10. Шайтан К. В., Михайлюк М. Г. Определение динамических характеристик молекулярных групп по данным мессбауэровской спектроскопии // Хим. физ. — 2001. — Т. 20, № 2. — С. 3–8.
11. Шайтан К. В., Упоров И. В., Лукашев Е. П., Кононенко А. А., Рубин А. Б. Фотоконформационный переход — причина температурных и световых эффектов при рекомбинации зарядов в реакционных центрах фотосинтезирующих бактерий // Мол. биол. — 1991. — Т. 25, № 3. — С. 695–705.
12. Шайтан К. В. Динамика электронно-конформационных переходов и новые подходы к физическим механизмам функционирования биомакромолекул // Биофизика. — 1994. — Т. 39, № 6. — С. 949–967.
13. Jumper J., Evans R. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // Nature. — 2021. — Vol. 596. — P. 583–589.
14. Dill K. A., MacCallum J. L. The Protein-Folding Problem, 50 Years On // Science. — 2012. — Vol. 338. — P. 1042–1046. — DOI: 10.1126/science.1219021
15. Финкельштейн А. В. 50+ лет самоорганизации белков // Усп. биол. химии. — 2018. — Т. 58. — С. 7–40.
16. Лифшиц И. М., Гросберг А. Ю., Хохлов А. Р. Объемные взаимодействия в статистической физике полимерной макромолекулы // УФН. — Т. 127. — С. 353–389.
17. Grosberg A. Y., Khokhlov A. R. Giant Molecules. Here, There, and Everywhere. — 2nd ed. — World Scientific, 2011.
18. Финкельштейн А. В., Птицын О. В. Физика белка. — М.: КДУ, 2012.
19. George J., Waroquiers D. et al. The Limited Predictive Power of the Pauling Rules // Angew. Chem. — 2020. — Vol. 132. — P. 7639–7645. — DOI: 10.1002/anie.202000829
20. Levinthal C. Are there pathways for protein folding? // J. Chim. Phys. — 1968. — Vol. 65, No. 1. — P. 44–45.
21. Милнор Дж. Теория Морса. — М.: URSS, 2011.
22. Wales D. J. Energy Landscapes. — Cambridge Univ. Press, 2003.
23. Stillinger F. H. Energy Landscapes, Inherent Structures, and Condensed-Matter Phenomena. — Princeton Univ. Press, 2016.
24. Onuchic J. N., Wolynes P. G. Theory of protein folding // Current Opinion in Str. Biol. — 2004. — Vol. 14. — P. 70–75. — DOI: 10.1016/j.sbi.2004.01.009
25. Afinsen C. B. Principles that govern the folding of protein chains // Science. — Vol. 181 (4096). — P. 223–230. — DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)64176-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64176-6)
26. Piana S., Klepeis J. L., Shaw D. E. Assessing the accuracy of physical models used in protein-folding simulations: quantitative evidence from long molecular dynamics simulations // Curr. Opin. Struct. Biol. — 2014. — Vol. 24. — P. 98–105. — DOI: 10.1016/j.sbi.2013.12.006
27. Шайтан К. В. Строение энергетических ландшафтов макромолекул, формирующих уникальную пространственную структуру // Биофизика. — 2018. — Т. 63, № 4. — С. 629–642.

28. Shaitan K. V. The topological structure of hypersurfaces of conformational energy levels and physical mechanisms of the internal mobility of proteins // *Macromol. Symp.* — 1996. — Vol. 106. — P. 321–335. — DOI: 10.1002/masy.19961060130
29. Шайтан К. В. Динамика электронно-конформационных переходов в белках и физические механизмы функционирования биомакромолекул // *Мол. биол.* — 1992. — Т. 26, № 2. — С. 264–284.
30. Shaitan K. V. Protein dynamics and new approaches to the molecular mechanisms of protein functioning // *Stochastic Dynamics of Reacting Biomolecules* / Ed. by W. Ebeling, L. Schimansky-Gefer and Y. M. Romanovsky. — Singapore: World Scientific, 2003. — P. 283–308.
31. Шайтан К. В. Энергетическая поверхность и конформационная динамика молекул // *Электрохимия.* — 2003. — Т. 39, № 2. — С. 220–227.
32. Голо В. Л. Шайтан К. В. Динамический аттрактор в термостате Берендсена и медленная динамика биомакромолекул // *Биофизика.* — 2002. — Т. 47, № 4. — С. 611–617.
33. Golo V. L., Salnikov V. N., Shaitan K. V. Harmonic oscillators in the Nose–Hoover Environment // *Phys. Rev. E.* — 2004. — Vol. 70. — P. 046130. DOI: 10.1103/PhysRevE.70.046130
34. Хир К. Статистическая механика, кинетическая теория и стохастические процессы. — М.: Мир, 1976.
35. Eaton W. A. Modern Kinetics and Mechanism of Protein Folding: A Retrospective // *J. Phys. Chem. B.* — 2021. — Vol. 125. — P. 3452–3467. — DOI: 10.1021/acs.jpcb.1c00206
36. Шайтан К. В., Сарайкин С. С. О влиянии амплитуды флуктуаций на коэффициент трения броуновского осциллятора в водной среде // *Биофизика.* — 2000. — Т. 45, № 3. — С. 407–413.
37. Шайтан К. В. Эффекты скрытой симметрии в динамике линейных полимеров и биополимеров // *Биофизика.* — 2022. — Т. 66, № 3. — С. 492–515. — DOI: [10.31857/S0006302922030085](https://doi.org/10.31857/S0006302922030085), EDN: ANNCQS
38. Шайтан К. В. Вариационные принципы в механике конформационных движений макромолекул в вязкой среде // *Биофизика.* — 2018. — Т. 63, № 1. — С. 5–15.
39. Шайтан К. В., Попеленский Ф. Ю., Армеев Г. А. Корреляция конформационных движений при формировании вторичной структуры полипептидов в вязкой среде // *Биофизика.* — 2017. — Т. 62, № 3. — С. 443–451. — DOI: 10.1134/S0006350917030186
40. Эрндженева А. А., Армеев Г. А., Шайтан К. В. Влияние вязкости среды на молекулярную динамику формирования вторичной структуры полипептидов (AlaGly)₂₅ и (AlaGly)₇₅ // *Биофизика.* — 2020. — Т. 65, № 5. — С. 860–864. — DOI: 10.31857/S0006302920050026
41. Шайтан К. В., Ложников М. А., Кобельков Г. М. Релаксационный фолдинг и принцип минимума скорости диссипации энергии для конформационных движений в вязкой среде // *Биофизика.* — 2016. — Т. 61, № 4. — С. 629–637.

42. Шайтан К. В., Ложников М. А., Кобельков Г. М. Динамика формирования коллективных конформационных степеней свободы при фолдинге макромолекулярной цепи в вязкой среде // *Биофизика*. — 2017. — Т. 62, № 2. — С. 249–257. [↗](#)
43. Зорич В. А. Геометрия и вероятность // *Теория вероятн. и ее примен.* — 2017. — Т. 62, № 2. — С. 292–310. — DOI: 10.4213/tvp5109
44. Lemak A. S., Balabaev N. K. // *Molecular Simulation*. — 1995. — Vol. 15. — P. 223.
45. Shaitan K. V., Ermolaeva M. D., Saraikin S. S. Nonlinear dynamics of molecular systems and the correlations of internal motions in oligopeptides // *Ferroelectrics*. — 1999. — Vol. 220. — P. 205–220. — DOI: 10.1080/00150199908216215
46. Шайтан К. В., Ермолаева М. Д., Сарайкин С. С. Корреляция флуктуаций, карты уровней свободной энергии и явление динамического изоморфизма в ряду модифицированных дипептидов // *Известия РАН, серия физическая*. — 1997. — Т. 61, № 9. — С. 1680–1686.
47. Шайтан К. В., Беляков А. А. Молекулярная динамика олигопептидов. 4. Динамические особенности часто и редко встречающихся дипептидных фрагментов белков // *Биофизика*. — 2002. — Т. 47, № 2. — С. 219–227.
48. Шайтан К. В., Ермолаева М. Д., Балабаев Н. К., Лемак А. С., Орлов М. В. Молекулярная динамика олигопептидов. 2. Корреляционные функции внутренних степеней свободы модифицированных дипептидов // *Биофизика*. — 1997. — Т. 42, № 3. — С. 558–566.
49. Розенфельд Б. А. Многомерные пространства. — М.: URSS, 2020.
50. Фоменко А. Т. Наглядная геометрия и топология. Математические образы в реальном мире. — Изд. 3-е. — URSS, 2018.
51. Зигмунд А. Тригонометрические ряды. Т. 2. — М.: Мир, 1965.
52. Шайтан К. В. Особенности топографии энергетических ландшафтов в пространстве торсионных углов для макромолекул, формирующих уникальные 3D-структуры // *Биофизика*. — 2018. — Т. 63, № 6. — С. 1057–1069. [↗](#)
53. Гольдманский В. И., Кузьмин В. В. Спонтанное нарушение зеркальной симметрии в природе и происхождение жизни // *УФН*. — 1989. — Т. 157, № 1. — С. 3–50. — DOI: 10.3367/UFNr.0157.198901a.0003
54. Шайтан К. В. О ландшафтах свободной энергии для макромолекул, формирующих уникальную пространственную структуру // *Биофизика*. — 2018. — Т. 63, № 5. — С. 850–858. [↗](#)
55. Edwards D. T., LeBlanc M.-A., Perkins T. T. Modulation of a protein-folding landscape revealed by AFM-based force spectroscopy notwithstanding instrumental limitations // *PNAS*. — 2021. — Vol. 118, No. 12. — P. e2015728118. — DOI: 10.1073/pnas.2015728118
56. Bordgia A., Williams P. M., Clarke J. Single-Molecule Studies of Protein Folding // *Annu. Rev. Biochem.* — 2008. — Vol. 77 (1). — P. 101–125. — DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.060706.093102
57. Kramer G., Boehringer D., Ban N., Bukau B. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins // *Nat. Str. Mol. Biol.* — 2009. — Vol. 16, No. 6. — P. 589–597. — DOI: 10.1038/nsmb.1614

58. Грей А. Трубки. — М.: Мир, 1993.
59. Никитин М. Происхождение жизни. От туманности до клетки. — ООО «Альпина нон фикшн», 2016.
60. Marchenkov V. V., Semisotnov G. V. // *Int. J. Mol. Sci.* — 2009. — Vol. 10. — P. 2066.
62. Волькенштейн М. В. Конфигурационная статистика полимерных цепей. — М.-Л.: Изд. АН СССР, 1959.
63. Rollins G. C., Dill K. A. General Mechanism of Two-State Protein Folding Kinetics // *J. Am. Chem. Soc.* — 2014. — Vol. 136. — P. 11420–11427. — DOI: 10.1021/ja5049434
64. Крупянский Ю. Ф., Гольдманский В. И. Динамические свойства и энергетический ландшафт простых глобулярных белков // *УФН.* — 2002. — Т. 172, № 11. — С. 1247–1269.
65. Lee H., Cai W. Ewald summation for Coulomb interactions in a periodic supercell. — *Lecture Notes.* — Stanford University, 2009. — http://micro.stanford.edu/mediawiki/images/4/46/Ewald_notes.pdf
66. Khokhlov A. R., Khalatur P. G. Protein-like copolymers: computer simulations // *Physica A.* — 1998. — Vol. 249. — P. 253–261. — DOI: 10.1016/s0378-4371(97)00473-1
67. Опарин А. И. Происхождение жизни на Земле. — М.: Изд. АН СССР, 1957.
68. Шайтан К. В., Федик И. В. Молекулярная динамика самоорганизации структуры модельных биомиметических полимеров // *Биофизика.* — 2015. — Т. 60, № 3. — С. 421–427. — DOI: 10.1134/S0006350915030161
69. Шайтан К. В., Федик И. В. Рефолдинг модельного полимера при взаимодействии с нанотрубкой // *Биофизика.* — 2008. — Т. 53, № 1. — С. 61–65.
70. Аветисов В. А. Хиральные «дефекты» // Академик Виталий Иосифович Гольдманский. Избранные статьи, воспоминания. — М.: Наука, 2007. — С. 204–217. — http://elib.biblioatom.ru/text/akademik-goldanskiy_2007/go,0/

Multidimensional geometry expands the horizons of biophysics
Why were linear polymers able to become the molecular basis of life?

K. V. Shaitan

M. V. Lomonosov Moscow State University

The ideas and methods of multidimensional geometry and topology, simple and illustrative examples are used to consider the new physical and mathematical approach underlying the formation of a 3D structure and conformational dynamics of linear biopolymers. To understand the material presented, you do not need special mathematical training. A simple course of mathematical analysis and linear algebra for biologists and the concept of complex numbers are enough. A retrospective view is given on the development of ideas about the relationship

between the dynamics and function of biomacromolecules. New opportunities for the development of theoretical concepts and models for the dynamics of macromolecules are described, which are related to the statistical properties of functions in high-dimensional spaces, the topology of the configuration space of linear polymers, and its implications for the topography of multidimensional potential energy surfaces (PES). The effects of the medium viscosity on the formation of collective degrees of freedom in linear polymers, which lead to the formation of helical structures, are analyzed. Symmetry effects are studied for the PES of biopolymers due to the invariance of the system with respect to the permutation of identical monomeric units or identical blocks of monomeric units. A hypothesis about a possible path of prebiological evolution of the PES topography of macromolecules, which could lead to the origin of protoforms of life is formulated.

The author had a difficult task to make the presentation accessible to people who are not professionally involved in the theoretical issues of modern molecular science and do not have the skill to read mathematical formulas. Therefore, in the text we tried, on the one hand, to get by with a minimum of formulas, but where this cannot be avoided, we give as detailed comments as possible. To improve understanding, we also use simple geometric images. Of course, we are well aware that over the past decades, largely due to the progress of technology (based, there is no escape from it, on formulas) and the spread of scientific methods in breadth in many areas, for example, biology, a significant number of scientists have grown who are not able to read the text even with the simple mathematical calculations. We nevertheless (and suddenly!) tried to take into account their interests and give in each section a summary of the main results in simple words and without formulas.

The author apologizes in advance for the significant number of references to his own work, which we nevertheless tried to minimize. Many of these texts are available on our page in the «ISTINA» system (<https://istina.msu.ru/profile/ShaitanKV/>). The view on the problem and the results described in the article were the result of almost 40 years of consistent reasoning, the individual stages of which were published in our articles, and there is neither the possibility nor the need to repeat many of the details of these reasoning in this paper.

Keywords: structure and dynamics of linear polymers and biopolymers, conservation laws and distribution of dissipation energy over degrees of freedom during conformational movements, rules for the motion of a representative point along multidimensional energy landscapes, topology of the configuration space of linear polymers and Fourier series for the potential energy surface, convergence paradox for potential energies of macromolecules, topography of energy landscapes, minimum frustration principle for the energy funnel, hidden symmetries in biopolymers, folding mechanisms, biopolymer free energy surface and critical denaturation temperature, arrow of molecular physicochemical evolution.

МЕДИЦИНСКАЯ БИОФИЗИКА

РЕЛЬЕФ НОВОЙ КОРЫ МОЗГА: ПОЧЕМУ ОБРАЗУЮТСЯ ИЗВИЛИНЫ И КАКОЙ БИОФИЗИЧЕСКИЙ СМЫСЛ ОНИ ИМЕЮТ?

Г. Р. Иваницкий¹

Показано на примере решения двух задач, как биофизика избавлялась от заблуждений в понимании, что такое разум и сознание человека. Цель непрерывной работы мозга повысить устойчивость организма в целом. Наш мозг работает, прежде всего, с информацией. Особую роль играют поверхности клеток, органов и связи между ними, представляющие новую кору головного мозга. На границах поверхностей разыгрываются конкурентные информационные процессы, позволяющие мозгу реагировать на внешние изменения.

Ключевые слова: продолжительность жизни живых систем, масса живых систем, новая кора мозга человека.

Жизнь — это общение с внешним миром. Новая кора мозга воспринимает то, что «говорит» ей внешняя среда, но не всегда понимает смысл сказанного. Труднее всего научиться общему с ней языку.

1. Введение

В начале XXI века с использованием Интернета в мире оформился проект EDGE (англ.: *лезвие* или *передний фронт*) [What we believe, 2006]. Идея проекта состояла из четырех пунктов.

- Наука развивается, выдвигая догадки, предположения и гипотезы, иногда под влиянием аналогий с красотой образов внешнего мира. Затем гипотезы пытаются подтвердить путем экспериментов. В этом и заключается красота самой науки — в ней есть стадия воображения. Наука — это главный движущий фактор человеческой цивилизации.
- Чтобы достичь переднего края мировых знаний, необходимо найти самые современные и оригинальные умы, собрать их вместе на полях Интернета, и пусть они зададут друг другу те вопросы, которые обычно задают самим себе. Во что они верят, но пока не могут доказать.

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290 Пущино Московской области, ул. Институтская, 3.
E-mail: ivanitsky@iteb.ru

- Великие умы на основе интуиции иногда угадывают истину задолго до того, как появятся факты или аргументы в ее пользу. Дидро назвал эту способность «духом прорицания».
- Развитие средств общения существенно ускоряет процесс развития знаний в человеческом обществе.

Заметим, что эти идеи родились до появления Интернета, новым было лишь развитие средств, существенно облегчающих и ускоряющих общение и обмен соображениями о возникающих проблемах. Так, с помощью Интернета и электронной почты возникли «университеты без границ».

Здесь явно просматривается аналогия с работой мозга отдельного человека. Наш мозг тоже не имеет границ благодаря рецепторным системам восприятия и способам передачи информации. Составляющие мозг клетки (нейроны и глия) тоже общаются друг с другом на биохимическом языке. У человека над старым мозгом существует развитая надстройка в виде новой коры, связи в которой позволяют нам формулировать вопросы и искать на них ответы. Например, какова цель, которую мы хотим достичь? Каков будет прогноз после ее достижения?

Однако объединение и создание научных школ не страхует от заблуждений. Коллектив тоже может заблуждаться в поисках истины. Развитие науки — это непрерывная смена парадигм, наука развивается скачками. Два афоризма констатируют подобную ситуацию: *«не всякое кипение дает навар»* или *«не весь коллектив хочет идти туда, так как многие уже там были»*.

В 2006 году в Великобритании для популяризации британской научно-игровой телепрограммы QI ведущим этой программы С. Фраем была опубликована серия книг под названием «Книги заблуждений». Первая из этих книг была переведена на русский язык. В них содержится в виде вопросов перечень ложных гипотез, которые были порождены недостатком знаний, но до сих пор пропагандируются в СМИ, поэтому часть людей считает их истинными. Приведем цитату из книги [Fry et al., 2006]: *«Биологи говорят, что человечеством движут три основные силы: еда, секс (продолжение рода) и самосохранение, т. е. нет никакой разницы с животным миром. Мы же говорим, что есть четвертая движущая сила, которая делает из нас человека, — любознательность»*. Человек с детства задает множество вопросов, пытаясь понять, как устроен окружающий его мир и он сам.

Однако *любознательность* (или *любопытство*) — это только начало четвертой движущей силы, отличающей нас от животных. *Любознательность* существует и у животных: у приматов и многих других млекопитающих (например, крыс, кошек, собак). Но только у человека *любознательность* выполнила функцию катализатора и скачком породила цепной процесс, передающийся от поколения к поколению:

любопытность → (знание → память → интуиция → критика → эксперимент) → (знание → память → интуиция → критика → эксперимент) и т. д.

Развитие новой коры мозга у человека обеспечило этот ускоряющийся процесс, который, возникнув, будет существовать, пока существует человечество.

Рассуждения о механизмах работы и физических возможностях нашего мышления и разума до сих пор носят поисковый характер и в полной мере не поняты, т. е. сохраняют выраженный философский оттенок. Это не случайность. Сам процесс осознания человеком самого себя и своего места во Вселенной носит оценочный характер. Он основан на антропоцентрическом принципе². Этот принцип представляет собой одно из наиболее последовательных выражений точки зрения телеологии, то есть приписывания эволюции детерминизма, который реализуется Внешними Силами по отношению к нашей Вселенной, т. е. наличием сверхразумного Творца. Однако не следует думать, что вера в Творца и вера в Науку это антиподы.

Вера свойственна всем, в том числе и исследователям материалистам. Мы верим в фундаментальные мировые константы. Верим в постоянную гравитации; в предел максимальной скорости передачи информации, равный скорости света в вакууме; в постоянную Больцмана; в постоянную Планка и т. д. Таких мировых констант порядка 30 [Физический энциклопедический словарь, 1963, с. 1]. В отличие от телеологии наша вера основана на экспериментах. Мировые константы ограничивают диапазон изменения физических параметров, таких как «бесконечность» или «ноль (абсолютная пустота)». В пределах этих ограничений мы формулируем законы, свойственные нашей Вселенной, и проверяем их работоспособность на практике.

С одной стороны, вся неживая и живая материя, включая нас самих, встроена в окружающий нас мир. Мы являемся наблюдателями и участниками всех процессов, которые происходят внутри Вселенной. *«Мы созданы большими временами ее эволюции и адаптированы к ее законам, поэтому мир нашей Вселенной есть для нас лучший из всех миров»*, — об этом говорит нам наш разум. Однако, когда мы пытаемся ответить на вопрос: что такое жизнь с точки зрения физики? — то неизбежно сталкиваемся с неопределенностями, порождаемыми нашим разумом [Иваницкий, 2010; Кляцкин, 2012; Иваницкий, 2012, 2021].

С другой стороны, не сложно предположить, что где-то в Космосе могут существовать и другие Вселенные, с отличающимся от нашей набором фундаментальных мировых констант, с другими, но тоже мыслящими существами.

² *Антропоцентризм* (от др.-греч. ἄνθρωπος — человек и лат. *centrum* — центр) — философское представление, согласно которому появление мыслящего человека есть главное событие и высшее достижение эволюции материи, совершившиеся во Вселенной.

Если утверждать, что процесс, подобный нашему мышлению, является абсолютным мировым стандартом, то мыслящие существа в той Вселенной будут уверены, что их Вселенная есть лучшая из всех миров. Хотя «прекрасное» для нас может оказаться «ужасным» для них и наоборот.

Однако можно и не обращаться к гипотезе о существовании других Вселенных с разумными существами, поскольку и в условиях Земли на сравнительно небольших временных интервалах мы наблюдали и наблюдаем подобную ситуацию. Различие понятий о «прекрасном» и «ужасном» в мозгу каждого человека зависит от традиций и культуры той среды, в рамках которой формировалось с детского возраста его отношение к окружающей внешней социальной среде. Эти различия на протяжении временной шкалы развития человечества часто приводили к военным конфликтам («религиозным войнам»). Они проявляют себя и в XXI веке в виде конкурентного противостояния между анклавами Запада и Востока, что приводит к спровоцированным, так называемым, «цветным революциям» и даже открытым военным столкновениям.

Человеческий головной мозг — это самая сложная из известных нам живых структур во Вселенной. Он работает как *нелинейная и открытая* система при восприятии информации и энергии из окружающей нас внешней среды. Наш мозг относится к классу конденсированных сред, которые содержат невероятное множество меняющихся под действием внешней среды обратных связей. Пожалуй, есть единственное правило, которому подчиняется работа такой системы: *«поменяешь одно, изменится все»*. Мозг содержит сеть из 86 млрд нейронов, 100 трлн синапсов, порядка 900 млрд глиальных клеток, формирующих его архитектуру, наполнен перемещающимся электролитом — лимфатической и спинномозговой жидкостями. Изучая мозг человека, мы погружаемся в мир гигантских чисел, комбинаторика которых на много порядков превышает оценку количества атомов во Вселенной [Иваницкий, 2018].

Тем не менее человек как животное во многом не совершенен. Он уступает другим млекопитающим в скорости перемещения в пространстве. Мировой рекорд человека в скорости бега на стометровку ниже скорости гепарда в 2,68 раза. В мировом рекорде по скорости плавания он уступает дельфину в 6 раз. В мировых рекордах по прыжкам в высоту уступает дельфину-афалине в 3 раза; гепарду более чем в 2 раза, кенгуру — в 1,5 раза. По прыжкам в длину человек уступает почти в 4 раза кенгуру и чернопятной антилопе импала, живущей в Африке. Понятно, что человек в процессе эволюции занял свою экологическую нишу, где все перемещения в пространстве за счет собственной физической силы стали не актуальны. Он, за счет развития своего мозга, сконструировал для этих целей машины, которые на многие порядки в скоростях обеспечили человеку преимущество в покорении пространства, по сравнению с животным миром.

Сложнее сравнивать человека с другими млекопитающими по подъему тяжестей, поскольку абсолютный выигрыш зависит от мышечной массы животного. В Книге рекордов Гиннесса зарегистрирован рекорд человека по отрыву от земли грузовой машины весом 2400 кг, что превышало вес атлета приблизительно в 12 раз. Однако мировые рекорды здесь принадлежат не млекопитающим, а насекомым. Поскольку они могут поднимать и переносить тяжести, в сотни раз превышающие их массу. По-видимому, сильнее всех — жук-носорог, который способен носить груз, в 850 раз превышающий массу его тела. Второе место, скорее всего, нужно отдать муравью, который способен носить на себе вес, в 50 раз превышающий его массу. Однако ветвь насекомых на древе эволюции отличается от нашей ветви млекопитающих. Сравнения можно продолжать, но главное не в том, что проиграл человек в сравнении с животным миром, а в том, что он выиграл благодаря развитию новой коры мозга. Главный выигрыш известен, это развитие мышления и сознание, но есть и второй выигрыш — это относительно большая продолжительность жизни человека.

Далее на двух конкретных примерах покажем, какие усилия предпринимала научная мысль, чтобы выбраться из болота заблуждений.

2. Изменение массы в пространстве и во времени, как способ оценки совершенства живого организма

Самый выдающийся долгожитель, регистрация возраста которого не вызывает сомнений, это француженка Жанна Кальман, которая умерла 4 августа 1997 года в возрасте 122 лет и 164 дней. Следует заметить, что в первой десятке долгожителей нет ни одного мужчины. Тем не менее мужской из верифицированных рекордов долгожителей достаточно высокий, он принадлежит японцу Дзироэмону Кимура, который прожил 116 лет и 54 дня. Гендерные отличия в продолжительности жизни людей составляют всего $\pm 2\%$, так что мужчины и женщины при прочих равных условиях имеют практически одинаковую максимальную продолжительность жизни.

Что касается самых долгоживущих млекопитающих, то здесь та же сложность, что и при сравнении с подъемом тяжестей, поскольку продолжительность жизни зависит от композиции — массы животного, развития его мозга и внутренних скоростей массопереноса, т. е. скорости метаболизма, но не только...

В абсолютных сроках продолжительности жизни среди млекопитающих выигрывает гренландский кит. Его рекорд 211 лет. В начале XX века немецкий физиолог Макс Рубнер (Rubner, 1908) [Большая советская энциклопедия, 1969, Макс Рубнер] сформулировал правило: *интенсивность основного обмена у теплокровных организмов тесно связана с массой их тела и с размерами поверхности. У животных, имеющих разные размеры тела, с 1 м^2 поверхности из*

внешней среды доставляется одинаковое количество энергии и рассеивается одинаковое количество тепла. Затраты энергии в процессах основного обмена в течение жизни приблизительно одинаковы у всех млекопитающих и составляют около 200 ккал на 1 г веса (840 Дж/кг). Другими словами, «энергетические затраты теплокровного организма пропорциональны массе его тела».

Один простой вопрос: что такое масса? Казалось бы, наивный вопрос и на него может ответить любой школьник 7-го класса. Однако это не так.

В быту *масса* — это синоним понятию *вес*, так как масса m и вес $\mathbf{P}$ в классической механике Ньютона связаны через сравнительно постоянную величину — *ускорение свободного падения тела* $\mathbf{g}$, создаваемую гравитацией Земли. Вес $\mathbf{P}$ — это вектор, т. е. сила, с которой тело массой m притягивается к Земле. Масса m — величина скалярная, а ускорение $\mathbf{g}$ в условиях Земли — величина векторная и почти постоянная. Ключевое слово здесь «*почти*». В условиях Земли масса аддитивна весу, т. е. если добавить массу равную существующей, то и масса, и вес увеличатся в два раза. Кроме того, численный аналог *массы* в механике Ньютона входит в выражение для импульса движения тела $\mathbf{p}$ и в выражения для энергии E . Импульс пропорционален скорости v свободного движения тела, а кинетическая энергия $E_{\text{кин}}$ пропорциональна квадрату скорости:

$$p = mv, \quad \text{или} \quad m = \frac{p}{v}, \quad (1)$$

$$E_{\text{кин}} = m \frac{v^2}{2}. \quad (2)$$

С математической точки зрения в механике Ньютона безразлично, принять ли массу за *отвлеченный размерный множитель* (на который надо помножить скорость или ускорение, чтобы получить, соответственно, *импульс движения* или *энергию*) или за *количество вещества*. Однако, с физической точки зрения, при рассмотрении переноса частей массы предпочтительнее второе определение. *Масса* — это *количество вещества в теле*, так как от расположения и силы связей между частями массы зависят не только механические, но и другие физические и химические свойства тела. Понятие *массы* в живых и неживых системах отличаются друг от друга. В живых системах масса всегда подвижна, и не только при перемещении тела в пространстве. Клетки, образующие все органы тела, делятся, перемещаются и отмирают.

Все основные величины в физике должны быть доступны непосредственному, возможно более точному, измерению. Вес $\mathbf{P}$ мы можем измерять, например, пружинным динамометром или с помощью рычажных весов. Весу *двух тел в условиях Земли* при равновесии на рычажных весах *соответствуют равные массы*.

В реальности при взаимодействии двух движущихся тел в гравитационном поле третьего тела, которое можно принять за неподвижное, всегда происходит изменение их притяжения, т. е. ускорение свободного падения тел меняется. В условиях Земли значение g изменяется за счет вращения Земли вокруг своей оси и Солнца, а также за счет вращения Луны вокруг Земли. Однако этими изменениями в быту пренебрегают. Закон всемирного тяготения Ньютона заключается в том, что два тела действуют друг на друга с силой ($\mathbf{F}$), которая обратно пропорциональна квадрату расстояния (r) между телами и прямо пропорциональна произведению их масс (m и M):

$$\mathbf{F} = G \frac{mM}{r^2}, \quad (3)$$

где m — масса какого-либо тела на Земле, M — масса Земли, G — гравитационная постоянная, $G = 6,6720 \cdot 10^{-11} \text{ Н} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{кг}^{-2}$.

Из выражения (3) получим, что вес тела на Земле $\mathbf{P}$ равен:

$$\mathbf{P} = G \frac{mM}{r^2}. \quad (4)$$

Поскольку $\mathbf{P} = mg$, то имеем значение ускорения свободного падения тела в условиях Земли:

$$g = G \frac{M}{r^2}. \quad (5)$$

Из выражения (5) очевидно, что при $r^2 \rightarrow \infty$ величина $g \rightarrow 0$. Возникает парадокс, так как в условиях Земли масса равна весу, деленному на ускорение, т. е. при $g \rightarrow 0$ масса тела $m \rightarrow \infty$. В реальности мы такого не наблюдаем. Этот парадокс возникает из-за того, что при $g \rightarrow 0$ и вес $\mathbf{P} \rightarrow 0$. Следовательно, парадокс исчезает, *поскольку вес и ускорение свободного падения тела связаны между собой* и по мере удаления от Земли меняются синхронно. Существует третий участник при взаимодействии двух тел — *сила связи между элементами массы*. Для твердых тел связи — сильные, для жидких в силу ее текучести — слабые. Приливы и отливы в морях вблизи полюсов Земли демонстрируют движение больших масс воды под действием гравитационного воздействия движения Луны.

Казалось бы, горы изменяют гравитационный ландшафт Земли. Однако это не так. Самая высокая гора Мауна-кеа на Гавайях имеет высоту около 10 км. Радиус Земли 6371 км. Следовательно, находясь даже на вершине этой высокой горы, сила гравитации изменится всего на $(10/6371)^2 \cdot 100 \% = 2,5 \cdot 10^{-4} \%$. Этой величиной можно было бы пренебречь, но для млекопитающих это не так, поскольку во всех процессах в живых организмах существенную роль играет дав-

ление и содержание кислорода. С подъемом над поверхностью Земли давление атмосферы вносит большой вклад. При подъеме на каждые 10,5 м атмосферное давление уменьшается на 1 мм рт. ст. Атмосферное давление, как и вес, — величина векторная. На земной поверхности давление во времени и по поверхности изменяется незначительно. Хотя отмечены колебания атмосферного давления на уровне моря от 641 до 816 мм рт. ст. Принято считать, что давление, равное давлению столба ртути высотой 760 мм при температуре 0 °С, является нормальным атмосферным давлением (1 мм рт. ст. = 133,3 Па).

Адаптационные возможности нашего организма к изменению давления ограничены, горная болезнь уже начинается на высоте около 2,5 км. Закон изменения давления атмосферы в условиях Земли можно записать как:

$$\downarrow \Delta p = g \rho \uparrow \Delta z, \quad (6)$$

где $\downarrow \Delta p$ — уменьшение приращения давления при увеличении высоты $\uparrow \Delta z$, g — ускорение свободного падения тела, ρ — плотность воздуха.

Это выражение отвечает реальной ситуации только, когда изменение высоты достаточно мало по отношению к приближенной толщине атмосферы. При больших скачках высот оно изменяется нелинейно, приближаясь к экспоненте. Почти все жидкие тела при уменьшении давления расширятся, при увеличении давления — сжимаются. Лишь вода является исключением. Она практически несжимаема и достигает максимальной плотности при атмосферном давлении при температуре 4 °С, при этом с понижением давления она станет льдом и расширится. Эти изменения зависят от силы и направления молекулярных связей внутри масс ее тела. Однако в живом организме чистой воды нет. Вся жидкость организма — это коллоидные электролиты на водной основе, и они сжимаемы [Иваницкий, 2014]. Например, при длительном пребывании космонавтов в условиях невесомости в силу расширения связанной жидкости между сегментами позвоночника и мышц их суммарный размер может увеличиться до 5 см. При возвращении на Землю потребуется длительное восстановление возможности передвижения космонавта, поскольку требуется адаптация к гравитационным условиям Земли.

Применение понятия *масса* в линейных законах Ньютона имеет логически очерченную область его использования. Это не только гравитация Земли, но и, прежде всего, — поведение неживой материи с разной силой связи между фрагментами массы при скоростях перемещения существенно меньших скорости света. Как показал А. Эйнштейн, масса покоя m эквивалентна энергии покоя E_0 , т. е.

$$E_0 = mc^2, \quad (7)$$

где c — скорость света в вакууме, величина постоянная [Окунь, 2008].

Теперь чуть подробнее о влиянии Луны на вес тел на Земле. В самой дальней от Луны точке на поверхности Земли притяжение уменьшается, а в точках Земли, ближних к Луне, увеличивается в соответствии с выражением (3). Причем на средней геодезической линии Земли (на экваторе) приращение веса тела изменяется меньше, чем вблизи полюсов Земли. Примем среднее значение ускорения силы тяжести на поверхности Земли $\bar{g} = 9,81 \text{ м/с}^2$, при этом на полюсах Земли оно будет равно $g = 9,832 \text{ м/с}^2$, а на экваторе — $9,78 \text{ м/с}^2$, т. е. изменение составит $\Delta g = \pm 0,026 \text{ м/с}^2$ или в процентах $(\Delta g / \bar{g}) \times 100 \% = \pm 0,26504 \%$. Для твердых тел влияние этого изменения на массу мало. Если принять, что сила связей внутри частей тела человека большая, то это явление может сказываться лишь в экстремальных условиях. Например, поскольку вес человека на экваторе меньше на 0,265 %, чем в северных широтах, то установление мировых рекордов в атлетических соревнованиях на стадионах северных широт должно бы быть более затруднено, чем при соревнованиях на стадионах, расположенных на экваториальных широтах. Однако это не так, поскольку другие факторы (ветер, колебания давления атмосферы, покрытие стадиона, влажность воздуха и т. п.) перекрывают гравитационные приращения массы за счет Луны. Следовательно, влиянием Луны в этом случае можно пренебречь. Однако мы практически состоим из жидкостей на водной основе и в этом плане далеки от твердых тел [Иваницкий, 2014, 2020]. Содержание воды, как основы растворов, в нашем организме весьма заметное. Организм взрослого человека на 65–70 % состоит из воды. Процентное суммарное уменьшение содержания воды в организме по мере его развития показано на диаграммах рис. 1 (левая диаграмма).

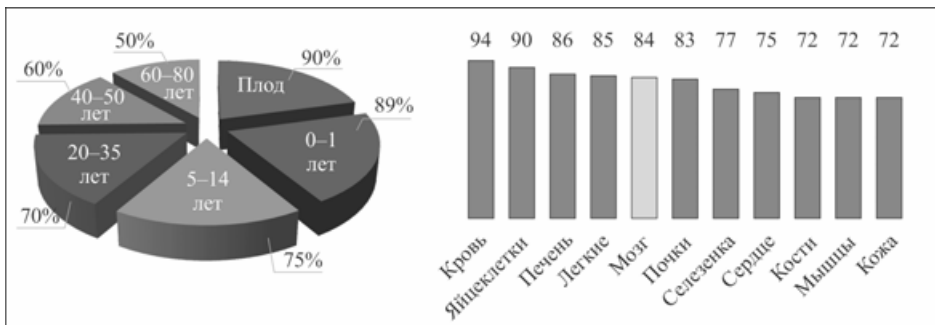


Рис. 1. Изменение общего суммарного процентного содержания воды в организме в онтогенезе (диаграмма слева). Процентное содержание воды в органах человека в зрелом возрасте (диаграмма справа) [Иваницкий, 2020]

Под влиянием Солнца вес тел на Земле также изменяется, но незначительно (конкретно в 2,17 раза меньше, чем от гравитационного поля Луны), так как

Солнце намного дальше от Земли, чем Луна. Если при определении массы через вес этими небольшими поправками пренебречь, то остаются другие причины (силы Архимеда, порождающая конвекцию, атмосферное давление, влажность атмосферы), приводящие к разбросам значений веса и массы тел. Однако они не большие, хотя и влияют при изменении на самочувствие, особенно пожилого человека.

Вывод банальный, а его истоки восходят к античности, к спорам философов древней Греции. Известен (если это не легенда), например, спор (V в. до н. э.) Зенона Элейского с Диогеном. Зенон утверждал, что движение *«есть только термин, данный целому ряду одинаковых положений, из которых каждое отдельно взятое есть покой»*. Диоген апеллировал к непосредственному чувству, что между состояниями покоя тоже есть движение, т. е. движение непрерывно, и оно есть основа жизни. А. С. Пушкин в своем стихотворении принял сторону Диогена: «Движенья нет, сказал мудрец брадатый. / Другой смолчал и стал пред ним ходить. / Сильнее бы не мог он возразить. / Хвалили все ответ замысловатый». Итак, вывод, к которому биофизика пришла уже в XX веке: масса живого организма — это всегда движущаяся масса.

3. Зависит ли продолжительность жизни животных от массы их тела?

Все, изложенное выше, было известно еще в XIX веке, и уточнено в начале XX века. В основе правила Рубнера лежит принцип аффинного преобразования. Примерами аффинных преобразований являются: *движения с постоянной скоростью, равномерные растяжения и преобразования подобия*. При аффинном преобразовании отрезок прямой линии переходит в другой отрезок прямой линии, отличающийся лишь своей длиной. Пропорции сохраняются. Казалось бы, что каждому увеличению массы млекопитающего животного на Δm , в соответствии с правилом Рубнера, должно соответствовать приращение продолжительности его жизни на Δt , т. е. должны также выполняться пропорции:

$$\frac{m}{t} = \frac{M}{T}, \quad (8)$$

где m и M — соответственно, масса (вес) маленького и большого млекопитающего, t и T — соответственно, продолжительность жизни маленького и большого млекопитающего.

Однако это не так. Биофизики в шутку стали называть закон Рубнера: *прямая «мышь — слон»*. Поскольку метаболизм организма зависит от массы, то к середине XX века была сформулирована гипотеза, что продолжительность жизни зависит от массы животного. Однако она при детальном рассмотрении

оказалась ошибочной. Для млекопитающих был построен график продолжительности жизни от веса (в терминах массы животного, рис. 2, б).

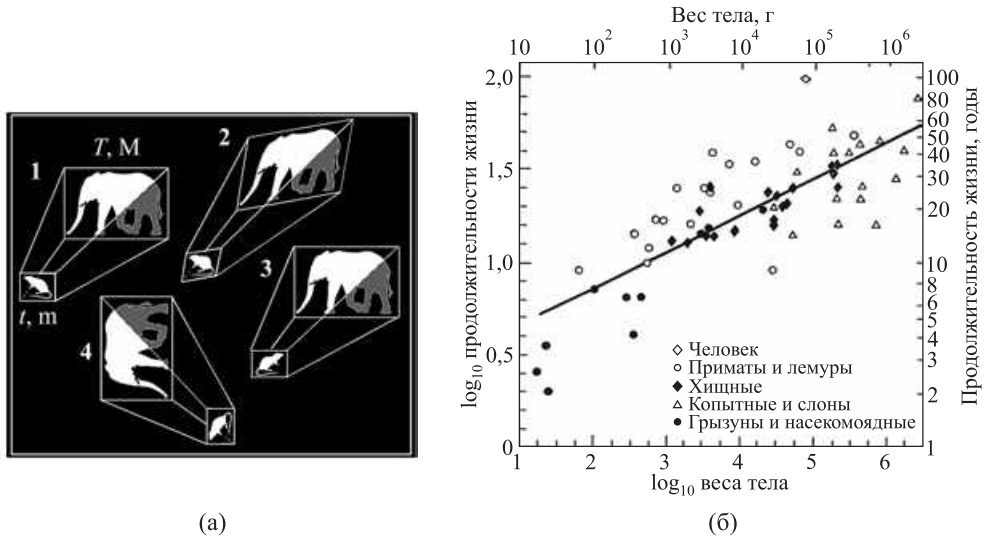


Рис. 2. Различные виды аффинных преобразований изображения «мышь $\leftrightarrow$ слон» (а): 1, 2 — проецирования, 3, 4 — повороты. При всех этих операциях пропорции отображений множества $\langle t, m \rangle$ в множество $\langle T, M \rangle$ сохраняются. Соотношение между продолжительностью жизни и весом (массой) тела для различных млекопитающих (б) [Lamb, 1980]

При этом ничего интересного не получилось. Во-первых, график напоминал широкое «облако» разбросов данных, наклон среднего значения «облака» уперся в 60 лет, а продолжительность жизни человека существенно отклонилась от среднего значения. Тем не менее было видно, что «облако» имеет наклон. Если взрослого человека в соответствии с его весом (70–100 кг) расположить на линии средней линии регрессии, то он должен был бы жить только 30 лет. Во-вторых, почти все приматы расположились выше среднего наклона линии регрессии (это противоречит практическим наблюдениям), т. е. длительность их жизни была преувеличена, а все грызуны оказались ниже линии, т. е. их продолжительность жизни не только преуменьшалась, но слишком отклонилась от линии регрессии. Естественно возник вопрос: как изменить наклон линии регрессии (при этом не отказываясь от использования массы), чтобы избавиться от недостатков графика рис. 2, б.

Из данных морфологии было известно, что вес всех органов тела коррелирует с весом тела. Исключением является масса головного мозга, поскольку его вес изменяется независимо от веса тела, например, у приматов он относительно

больший, чем у грызунов. У животных одинаковых размеров возможны 15-кратные различия в массе мозга.

Было решено определить зависимость продолжительности жизни не от веса тела, а от веса мозга. Как видно из графика на рис. 3, это позволило лучше предсказать продолжительность жизни организма, чем от веса тела. Однако человек по-прежнему сильно отклонился от линии регрессии. Если продолжительность его жизни спроектировать на линию регрессии, то он должен жить не более 55–60 лет.

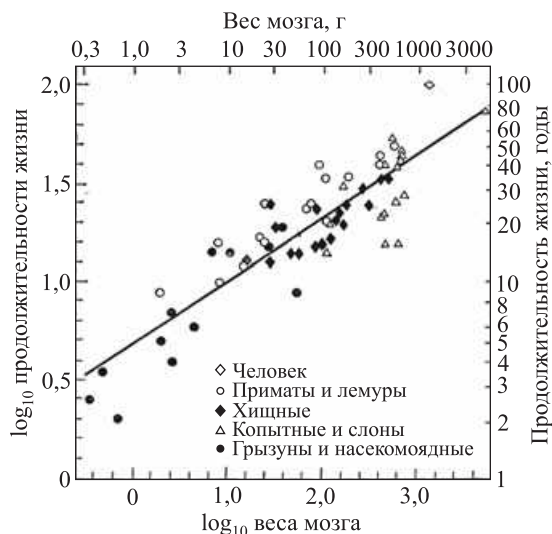


Рис. 3. Соотношение между продолжительностью жизни и весом (массой) мозга для различных млекопитающих [Lamb, 1980]

В середине 70-х годов прошлого века Сашер решил объединить оба параметра — вес тела и вес мозга, введя более сложную функцию регрессии [Sacher, 1959]:

$$x = \lg T = 0,636 \lg \frac{m}{M^{2/3}} + 0,198 \lg M + 0,471. \quad (9)$$

Конечно, эта формула выглядит странно, в ней m — это вес (масса) мозга, M — вес (масса) тела, а соотношение $\frac{m}{M^{2/3}}$ стало известно как индекс цефализации и являлось как бы относительной мерой вклада мозга в управление телом. На рис. 4 показан график зависимости максимальной продолжительности жизни $T = F(x)$.

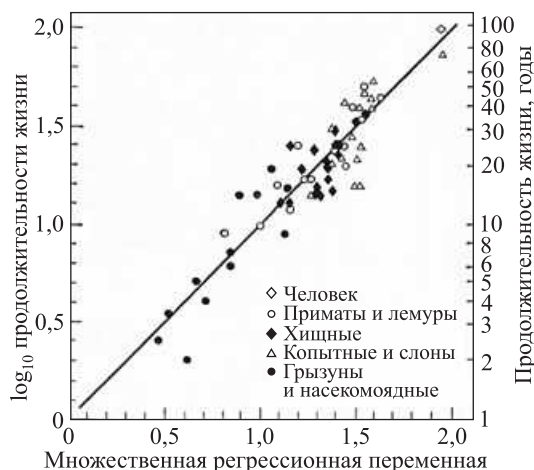


Рис. 4. Соотношение между продолжительностью жизни и комбинацией веса (массы) мозга и тела для различных млекопитающих [Sacher, 1959]

Как видно из графика, одновременный учет веса тела и индекса цефализации устранил группировку точек ниже линии регрессии для грызунов и выше нее — для всех приматов, а наблюдаемая максимальная длительность жизни человека стала почти соответствовать реально зарегистрированной на практике.

В целом результаты подтвердили гипотезу, что при одинаковом весе тела длительность жизни является возрастающей функцией веса мозга. Однако сохранился ряд исключений. Первое исключение было обнаружено для зимоспящих, например, для отряда рукокрылых: длительность жизни летучих мышей оказалась близкой к 20 годам, т. е. почти в три раза больше, чем ее ожидаемая величина, вычисленная лишь по весу тела и мозга.

Было высказано предположение, что вес тела важен, но связан отрицательной корреляцией с интенсивностью обмена. Так как неизбежны в процессе метаболизма и деления клеток мутации, повышающие вероятность смерти. У крупных животных их частота будет меньше благодаря меньшей интенсивности обмена, поэтому крупные организмы будут жить дольше, чем мелкие. Согласно Сашеру, у животных с большим мозгом должны быть более совершенные регуляторные механизмы адаптации.

Если интерпретация соотношения трех величин — веса тела, веса мозга и длительности жизни верна, то обнаруженная особенность летучих мышей не покажется неожиданной. У большинства летучих мышей бывают периоды даже дневного оцепенения, а не только периода длительной зимней спячки, которая длится несколько месяцев; в это время интенсивность обмена снижается. Таким образом, если долголетие находится в обратном отношении с интенсивностью

обмена, то следует ожидать, что летучие мыши будут жить дольше, чем другие млекопитающие, сравнимые по размерам тела и весу мозга.

Исследователям того периода еще повезло, поскольку они не знали о продолжительности жизни такого животного, как *голый землекоп* (лат. *Heterocephalus glaber*). Этот небольшой грызун, роющий для себя многоэтажные подземные «дворцы», входил в семейство землекоповых, но отличался от них уникальными для млекопитающих особенностями: сложной социальной организацией колонии, со сравнительно низкой и переменной внутренней температурой, с нечувствительностью к некоторым формам боли (термическим ожогам и химическим ожогам кислотами), с повышенным иммунитетом к раку, выносливостью к высоким концентрациям CO_2 . Главное отличие — это невероятная долгая жизнь по сравнению с другими грызунами той же массы. Вес голого землекопа в среднем 30–35 г, самки крупнее весят от 50 до 80 г. Продолжительность его жизни почти в 15 раз превышала продолжительность жизни грызунов той же массы и доходила до 28 лет.

Если на графике рис. 4 отложить продолжительность жизни голого землекопа, то положение точки его продолжительности жизни далеко уйдет за пределы «облака» разбросов. Линейной регрессией эту ситуацию не исправишь. Функция продолжительности жизни от любых комбинаций масс становится нелинейной функцией. Гипотеза Рубнера не позволяет объяснить различия в длительности жизни у разных видов. Были рассмотрены соотношение веса тела, веса мозга, интенсивности метаболизма и длительности жизни у 18 различных линий мышей, чтобы выяснить, сохраняется ли зависимость, установленная Сашером, в границах одного вида. Обнаружилось, что все происходит наоборот. Интенсивность обмена у долгоживущих линий не меньше, а больше.

В результате появилась другая интерпретация этого явления. Идея была простой: естественный отбор на большую продолжительность жизни и на большую величину мозга эволюционно происходил отдельно и независимо, но впоследствии удачные находки внутри организма оказались связанными. Приводились, например, доводы в пользу того, что у потенциально долгоживущих видов отбор будет способствовать увеличению размеров мозга, так как животные, обладающие большим мозгом, лучше обучаются. Животные, способные учиться на собственном опыте, имеют больше шансов дожить до старости, чем неспособные к этому, которые обходятся лишь врожденными рефлексам. Таким образом, давление отбора, способствующее долголетию, будет также приводить к увеличению размеров мозга, так как развитый мозг повышает шансы избежать гибели.

В 70-х годах XX века предложили несколько иное объяснение связи между весом мозга и долголетием [Sacher, Staffeldt, 1974]. Предположили, что про-

должительность внутриутробного развития должна сильно коррелировать с весом мозга при рождении. Для млекопитающих с развитым мозгом характерна длительная беременность. Было высказано предположение, что для развития большого мозга необходим длительный период беременности, а число детенышей в одном помете должно быть небольшим. Если это так, то ответом на результат отбора по увеличению массы мозга будет уменьшение плодовитости. В результате естественный отбор будет благоприятствовать увеличению продолжительности жизни, так как это позволит компенсировать замедленное размножение путем удлинения репродуктивного периода. Таким образом, большая продолжительность жизни млекопитающих с развитым мозгом могла бы быть вторичным следствием отбора, направленного на увеличение размеров мозга.

С возрастом величина основного обмена у всех млекопитающих, включая человека, неуклонно снижается [Иваницкий, 2020]. Продолжительность беременности у человека в норме 9 месяцев. Линейный переход «слон → мышь» пришлось выкинуть на свалку заблуждений, поскольку у человека отношение продолжительности жизни к сроку беременности (в единицах измерения времени — *месяц*) будет $1380/9 = 153,3$, у слона $840/21 = 40$, у лошади $744/11 = 67,63$, у мыши $42/0,7 = 60$. Что касается рождения детенышей при одной беременности, то у человека рождается 1 детеныш (редко 2, еще реже 3), у слона 1, у лошади 1, у мыши — от 3 до 10. Следовательно, лишь такой вариант оценки опять не дал хорошего результата.

Наконец, включили в рассмотрение *внешнюю среду*. Результат улучшился. Стало очевидным, что к продолжительности беременности необходимо добавить условия среды, в которых организм развивается сразу после рождения. Копытные животные, обитающие в основном в открытой местности, рожают хорошо развитых к перемещению детенышей, которые тотчас после рождения могут встать на ноги и самостоятельно передвигаться. Беременность хищных животных была короче, и их детеныши рождались слепыми, беззубыми и требовали особой заботы со стороны матери. Более того, продолжительность беременности варьировала у одного и того же вида животных в зависимости от времени года, пола зародыша, количества зародышей, а беременность бывала как одноплодная, так и многоплодная. Близнецы иногда были монозиготными. Человек при сравнении по этим показателям оказался в промежутке между травоядными и хищниками, но ближе к последним.

XXI век стал веком генетики, и естественно возникли новые вопросы. Было выяснено, что геном самого человека в половой клетке заключен в двадцати двух хромосомах и в паре половых хромосом X и Y, а также в ДНК митохондрий. Суммарно во всех этих органеллах клеток человека содержатся примерно 3,1 млрд пар оснований в ДНК. Полное секвенирование выявило, что челове-

ский геном содержит 20–25 тыс. активных генов [International Human Genome Sequencing Consortium, 2004], что значительно меньше, чем ожидалось (ожидалось порядка 100 тыс.) в начале проекта «Геном человека». Только 1,5 % всего генетического материала кодирует белки или функциональные РНК. Остальная часть является не кодируемой последовательностью нуклеотидов ДНК, которую часто не совсем правильно называют *мусорной* ДНК [International Human Genome Sequencing Consortium, 2001]. Гены неравномерно распределены по хромосомам. Каждая ДНК в хромосоме содержит богатые и бедные генами участки. Эти участки коррелируют с хромосомными бендами (полосы поперек хромосомы, которые видно в микроскоп) и участками, богатыми генами. В настоящий момент значимость такого неравномерного распределения генов пока не вполне оценена.

Все ли генетические свойства живого организма определяют развитие особей? Опять обратились к человеку. Однойцовые (монозиготные) близнецы, которые были по разным причинам разлучены в детстве и воспитывались разными приемными родителями, дали ответ на этот вопрос. Было выяснено, что у детей генетический вклад от их истинных биологических родителей в их поведение сначала невелик. В раннем возрасте поведение всех младенцев похоже друг на друга. Гены в этот период еще не являются существенным источником индивидуальных различий или сходства. Однако с двух лет генетический вклад в поведение младенцев растет. При формировании коры мозга близнецов обнаруживаются сходные стратегии поведения при активной ориентации на изменение окружающей среды. В конце 1980-х годов провели обследование более двухсот близнецов, в котором определялись различные показатели их умственного развития IQ (от англ. *intelligence quotient*). Одновременно были обследованы их биологические и приемные родители. Для детей от 1 до 3 лет такая корреляция с их приемными и биологическими родителями была выражена слабо, однако с возрастом у подростка она увеличивалась. Корреляция умственных способностей с биологическими родителями у детей в 3 года составляла 15 %, а в 7 лет выросла до 28 %. Корреляция же их умственных способностей с их приемными родителями, соответственно, уменьшалась. Корреляция умственных способностей между детьми этого возраста и родителями в обычных семьях составляла около 40 %. На основании полученных данных рассчитали, что у 7-летних детей умственные способности почти на 40 % обусловлены генетическими факторами. Коэффициент этой корреляции быстро растет до окончания формирования мозга, т. е. приблизительно до 13–14 лет [Fulker et al., 1988; Stallings et al., 2005].

Следовательно, можно утверждать, что вклад генетики в юношеском возрасте имеет приблизительно равные значения с воспитанием, но в зрелом возрасте может проявиться сильнее, выше 50 % и может достигать до 70 %.

Был изучен и генетический переход от мыши до человека. Согласно принятой гипотезе, ветвь эволюционного древа, разделившая человека и мышь (т. е. генетическая бифуркация), на генеологической шкале времени появилась давно, приблизительно 70–90 млн лет назад [Nei et al., 2001]. Для двух геномов компьютерными методами были выявлены консервативные последовательности идентичные или очень слабо отличающиеся в сравниваемых геномах в их некодированной части. Оказалось, что часть из них это не «мусор», поскольку они активно участвуют в механизмах регуляции генов для обоих организмов [Loots et al., 2000].

Таким образом, из изложенного выше следует ряд основных положений, которые позволяют избавиться от иллюзии, что можно найти простые линейные соотношения на основе регрессий. Можно сформулировать семь следующих правил:

1. Все индивидуальные оценки не перспективны, поскольку по любому параметру популяции дают широкие и плохо согласующиеся между собой оценки распределения.

2. Разумные результаты получаются при оценках средних значений биосистем при конкурентном циклическом взаимодействии: *внешняя среда* → (*тело + древний головной мозг*) → (*новая кора мозга*) → *внешняя среда*.

3. При этом внешняя среда описывается четырьмя параметрами — три пространственные координаты и координата времени (x, y, z, t).

4. Каждая из двух структур организма (*тело + старый головной мозг*) и (*новая кора мозга*), в свою очередь, также описывается четырьмя параметрами, соответственно, для (*тело + старый головной мозг*) три пространственные координаты (x_1, y_1, z_1), координата времени t_1 и для (*новой коры мозга*) три пространственные координаты (x_2, y_2, z_2), координата времени t_2 .

5. Перебор связей и с одновременным преобразованием структур организма позволяет, как из кубиков, собирать разные комбинации, которые отвечают изменениям четырехмерного континуума внешней среды.

6. Новая кора является интерфейсом между внешней средой и системой (*тело + старый головной мозг*).

7. Следовательно, она работает в 8-мерном пространстве, т. е. 4 координаты внешней среды и 4 координаты (*тело + старый головной мозг*), а параметры этого пространства путем отбора отражаются в модели внутри новой коры. В результате комбинаторики указанных взаимодействий организма и внешней среды мы имеем ситуацию, которую можно отобразить в виде таблицы 1.

Итак, выше на конкретном примере мы показали, с каким трудом исследователи XX века разбирали завалы *ошибочных заблуждений предыдущих поколений*. Теперь на конкретном примере поясним появление новой коры в мозге человека, ответив на вопрос, поставленный в заголовке этой статьи.

Таблица 1. Перечень некоторых результатов в цикле взаимодействия: внешняя среда → (тело + старый головной мозг) → (новая кора мозга) → внешняя среда

Внешняя среда	Цикл взаимодействий мозга с внешней средой			Внешняя среда
	Восприятие информации: внешняя среда → (тело + старый головной мозг)	Адаптационный (тело + старый головной мозг)	Обработка информации (новая кора мозга) → внешняя среда	
Внешняя среда	Зрение Слух Тактильные ощущения Обоняние Вкус	Дыхание Регулирование кровяного давления и температуры Регулировка положения тела Регулировка движения, например, локомоции Регуляция рефлексов, например, моргание Еда Питье Регулировка гормонального статуса Сон	Речь Обучение Письмо Рисование Чтение Созидание Анализирование Вычисление Решение Воображение Мечтание Сосредоточение Игнорирование Сновидения	Внешняя среда

4. Почему образуются извилины новой коры и какой биофизический смысл имеют?

Минимальную поверхность S по сравнению с объемом V имеет тело в форме шара с гладкой поверхностью. Для него поверхности S и масса m будут иметь выражения:

$$S\rho = 3\rho\frac{V}{R} = \frac{3}{R}m, \text{ или } S = \frac{3}{\rho R}m, \quad (10)$$

где R — радиус шара, ρ — плотность тела, кг/м^3 .

Для тел, форма которых отличается от шара, вклад поверхности по сравнению с объемом тела растет. При появлении складок величина поверхности при том же объеме может возрастать еще быстрее. В живых организмах масса не является постоянной величиной, поскольку объем и вес, например, человека от новорожденного до зрелого возраста увеличивается в 30–50 раз, а плотность массы внутри тела растет и перераспределяется в процессе формирования органов. Следовательно, все величины m , ρ , R , V и S есть величины во времени переменные.

В процессе онтогенеза наблюдается различная дифференцировка поверхности новой коры мозга человека. Еще в утробном периоде поверхность мозга становится складчатой с набором многочисленных извилин (рис. 5).

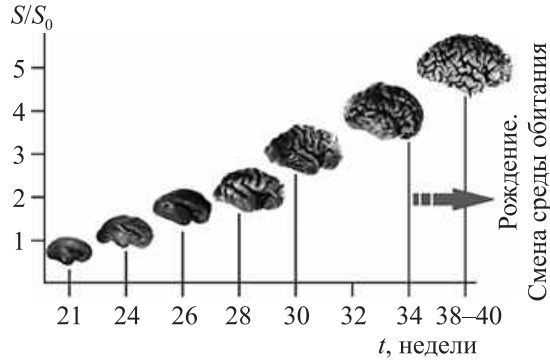


Рис. 5. Этапы формирования коры головного мозга на стадии эмбриона человека при его развитии в матке матери в осях время t и рост поверхности коры в относительных единицах S/S_0 : до 21 недели поверхность мозга — гладкая, в период с 21 до 28 недель поверхность коры приобретает ярко выраженную складчатую структуру. Форма и место складок у человека в течение его жизни сохраняется

По поводу механизма возникновения складчатости поверхности мозга, мне при приеме экзаменов у студентов, приходилось часто слышать ответ, что черепная коробка мозга не позволяет мозгу оставаться гладкой в процессе прироста его массы за счет деления нейронов и глии, поэтому возникают складки. Так ли это? Череп — это экзоскелет нашего мозга, и его рост синхронизирован с ростом мозга. Окостенение черепной коробки происходит медленно в несколько стадий: соединительная, хрящевая и костные стадии. В целом уменьшение текучести ткани черепа совпадает со скоростью роста объема мозга, т. е. делением и подвижностью его клеток. Если бы размер черепа был главной причиной, то складки носили бы случайный характер. Однако их форма и место расположения у эмбриона человека варьирует в сравнительно узких пределах. Следовательно, формирование складок детерминировано, т. е. определяется генетикой человека.

При формировании коры мозга на стадии эмбриона существенную роль играют три цикла: (1) энергетический цикл (поступление питательных веществ, необходимых для деления клеток мозга), (2) информационный цикл (обработка информации) и (3) цикл очистки системы от метаболических шлаков (рис. 6).

Здесь нас будут интересовать, прежде всего, два цикла: поступление питательных веществ и удаление отходов. Поступление всех питательных веществ,

при развитии мозга, происходит через артериальную систему кровотока, удаление отходов в конечном итоге — через венозную систему кровотока. Если отходы не будут удаляться, то система погибнет [Иваницкий, Морозов, 2020]. Ни один организм не может жить в среде, состоящей лишь из его фекальных отходов.

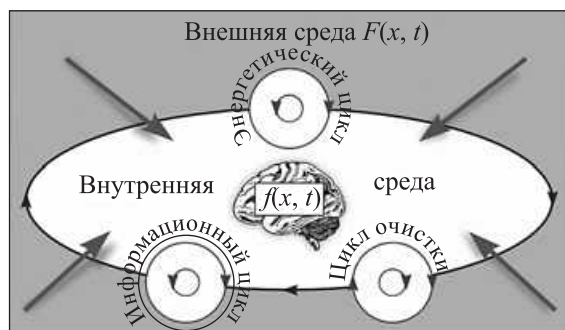


Рис. 6. Три колебательных цикла взаимодействия при отображении информации, получаемой из внешней среды $F(x, t)$ в виртуальную модель $f(x, t)$ внутри мозга. Три цикла образуют общий цикл длительностью в 24 ч. Циклы работы каждого из этих трех циклов сдвигаются по фазе и частично перекрываются внутри общего суточного периода, то затухая, то вновь возрастая по амплитуде и частоте [Иваницкий, Морозов, 2020]

Чтобы эмбрион мог развиваться первоначально должна быть сформирована сосудистая система мозга. При любом развитии живых систем первичным является система энергообеспечения. Сосудистая система должна быть замкнутая. Ее морфогенез задает будущую складчатость поверхности мозга, подобно тому, как кроны деревьев задают рельеф поверхности леса. Сосудистая система за счет бифуркаций формируется фрагментами *артерия* $\leftrightarrow$ *вена*, которые и закладывают основу будущих складок коры мозга (рис. 7).

Усредненный рельеф сосудистой сети мозга комплементарен внешней форме головного мозга и соответствует очертаниям внутренней поверхности черепа. У новорожденных и детей младшего возраста мозг короче и шире, чем у детей школьного возраста и взрослых. В таблице 2 показана динамика роста новой коры в онтогенезе от рождения ребенка до завершения роста объема мозга.

Основная закономерность в развитии клеточной структуры мозга во времени заключается в том, что развитие сначала идет снизу вверх — от спинного мозга к коре, от эволюционно более древних структур, которые обеспечивают жизненно важные функции, к структурам коры больших полушарий, которые занимаются обработкой информации. По горизонтали развитие происходит от проекционных отделов, обеспечивающих контакты с внешним миром с момента

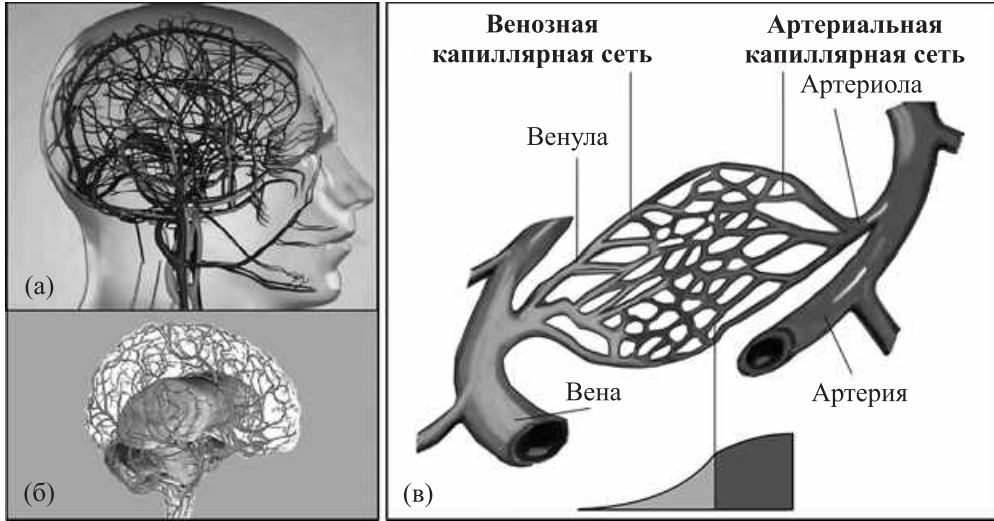


Рис. 7. Сердечно-сосудистая сеть задает складчатый рельеф новой коры мозга: (а) сосудистая сеть мозга, темным отмечена артериальная сеть, светлым — венозная сеть; (б) специально выделена только артериальная сеть мозга; (в) фрагмент артериально-венозной сети, на вершине складки расположена артериальная капиллярная сеть, в углублении складки — венозная капиллярная сеть. Естественно, что клетки коры (нейроны + глия) размножаются в тех местах, где больше поток подводимой энергии, т. е. на вершинах складок, поэтому в онтогенезе рельеф извилин мозга становится более контрастным

рождения, к ассоциативным областям, ответственным за сознание. Процесс формирования коры в общем виде можно записать как:

$$\frac{\partial n}{\partial t} + \frac{\partial m}{\partial t} = D_x \frac{\partial^2 (n-m)}{\partial x^2} + D_y \frac{\partial^2 (n-m)}{\partial y^2} + D_z \frac{\partial^2 (n-m)}{\partial z^2}, \quad (11)$$

где n — рождающиеся клетки, m — отмирающие клетки, t — время, D_x , D_y , D_z — коэффициенты диффузии, соответственно, по осям мозга x , y , z , характеризующие процесс перемещения нейронов.

Следует сразу отметить, что D_i — тензор и его приращение по осям x , y , z меняется в процессе онтогенеза. Как следует из описания морфогенеза мозга (табл. 2), при росте мозга соотношение между изменениями коэффициентов диффузии по осям определяют форму мозга и форму головы ребенка в переходном процессе ко взрослому человеку. Отношение вертикального размера головы к вертикальному размеру тела в онтогенезе меняется от 1/4 до 1/8 (рис. 8).

С одной стороны, при росте мозга чередуются этапы *округления* (с преобладанием роста по осям x и y) с этапами *вытягивания* (с преобладанием роста

по оси z) и так слой за слоем. Только после этого происходит окостенение ткани черепа. Эти низкочастотные пульсации при росте ткани мозга происходят со скоростью см/год, т. е. 10^{-10} м/с в раннем возрасте еще на стадии сравнительно мягкого черепа.

С другой стороны, наше тело в отличие от мозга формируется на эндоскелете (внутреннем скелете, включая позвоночник). При движении клеток тела вектор скорости вдоль тела по оси z преобладает перед движением по осям x и y .

Человек в начале жизненного цикла быстрее растет в длину, чем в ширину (табл. 3).

Таблица 2. Новая кора мозга человека — возрастная динамика развития

Форма и отделы			Клетки и связи		
До 4 лет	До 7 лет	До 15 лет и далее	До 2 лет	До 5 лет	До 15 лет
При рождении поверхность имеет все основные борозды и извилины, но неглубокие. Они углубляются в течение первого года жизни. Затылочная область имеет относительно большие размеры. К концу 1 года масса увеличивается в 2–2,5 раза, а к 3 годам — в 3 раза. До 4 лет головной мозг ребенка <i>растет равномерно в высоту, длину и ширину</i>	Преобладает <i>рост мозга в высоту</i> . До 5–6 лет извилины, их форма и положение слегка <i>изменяется</i>	Мозг <i>растет</i> медленно, и его масса составляет 4/5 массы мозга взрослых. К 15–16 годам <i>отмечаются все формы коры, характерные для взрослых</i> . К 20–29 годам масса коры и мозга в целом достигает максимального значения. К 55–60 годам масса мозга несколько уменьшается, и <i>изменяется поверхность новой коры</i>	Клетки коры специализируются. Сначала <i>созревают</i> веретенообразные клетки, переключающие передачу информации от подкорковых структур к пирамидным нейронам. Происходит <i>рост связей</i> (дендритов и аксонов)	Развиваются звездчатые и корзинчатые клетки, которые <i>обеспечивают</i> связи <i>нейронов и циркуляцию возбуждения внутри коры</i> . Заканчивается в 3–6 лет <i>начавшаяся</i> в первые месяцы жизни дифференцировка вставочных нейронов. Образуются <i>нейронные группировки</i> , включающие различные типы нейронов. <i>Продолжается</i> рост связей (дендритов и аксонов)	К 9–10 годам усложняется структура интернейронов и пирамид, формируются горизонтальные группировки, объединяющие вертикальные колонки. В 12–14 лет специализация достигает клеточного максимума

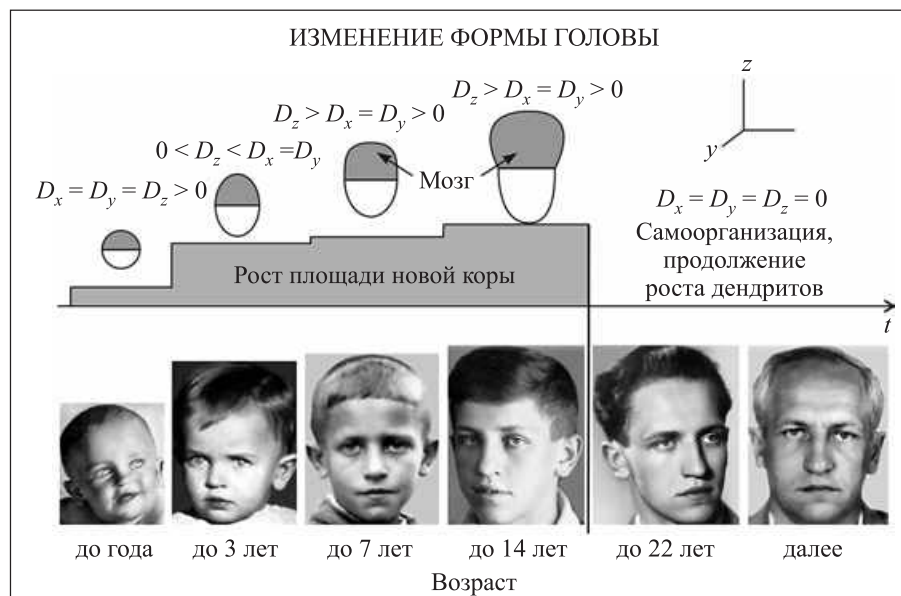


Рис. 8. Морфогенез мозга и формы головы с возрастом. Форма головы переходит от шара к овоиду, а затем к яйцеподобной форме. D_x , D_y и D_z — коэффициенты диффузии, соответственно, по осям мозга x , y , z , характеризующие процесс перемещения нейронов и соответствующий рост новой коры мозга. Основной рост поверхности коры приходится на последние месяцы беременности (еще до рождения) и идет интенсивно до 7 лет. Сначала преобладает рост коры в ширину по осям x , y , а затем начинает преобладать рост в высоту по оси z

Таблица 3. Относительные пульсации роста мозга

Возраст, годы	Пульсации векторов направления диффузий роста мозга	Отношение длины тела к длине головы
До 1 года	Равномерный рост: $D_x = D_y = D_z > 0$	4
От 1 до 3	Первое расширение: $(D_x = D_y) > D_z > 0$	5
От 3 до 7	Первое удлинение: $D_z > (D_x = D_y) > 0$	6
От 7 до 10	Второе расширение: $(D_x = D_y) > D_z > 0$	6,5
От 10 до 14	Второе удлинение: $D_z > (D_x = D_y) > 0$	7
От 14 до 22	Стабилизация — остановка роста: $D_x = D_y = D_z = 0$	8
Далее	Внутренняя самоорганизация	8

Вывод: наш организм в целом — это самоорганизующаяся изменяющаяся среда, далекая от равновесия [Иваницкий, 2017].

5. Заключение

Некоторые футурологи пытаются предсказать, как изменится скелет человека в будущем, в связи с развитием его мозга [Быстров, 1957; Татаринov, 1987] (рис. 9). Эти рисунки используются во многих изданиях, особенно научно-популярных.

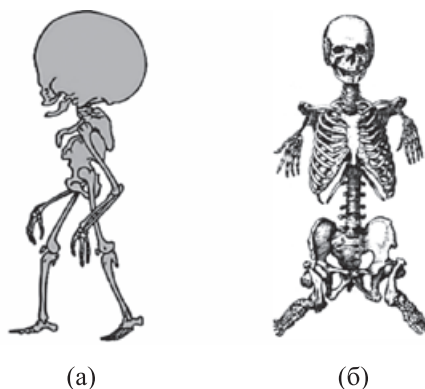


Рис. 9. Гипотетическое будущее скелета человека

Во-первых, такая интерпретация ошибочна, поскольку эволюция идет не по идее Ламарка, а по Дарвину. Пониженная нагрузка на конечности и большая нагрузка на мозг современного человека не может служить основанием для существенного изменения его морфологии. Кроме того, нет данных о том, что внутри человеческой популяции большой размер мозга увеличивает умственные способности человека. В среднем мозг человека весит 1375 г. Колебания веса по популяции довольно большие — от 900 до 2800 г. Среди людей с небольшим мозгом были замечательные представители науки и искусства. Например, мозг Анатоля Франса весил всего 1017 г. Известны случаи очень крупного мозга у ненормальных людей. Прогноз резкого увеличения объема мозга противоречит наблюдению, а, следовательно, лишен смысла.

Во-вторых, даже если и произойдет резкое увеличение объема головы, то человек со скелетом, показанным на рис. 9, а, не будет жизнеспособен в силу нарушения пространственной устойчивости тела. Существенный подъем центра тяжести в виде чрезмерно большой головы потребовал бы, по крайней мере, трех точек опоры, а не опоры на две ноги. Либо должно было бы произойти резкое увеличение поверхности ступней ног. В противном случае при попытках

пространственного перемещения такой монстр будет падать. Усиленный скелет человека, показанный на рис. 9, б, также вызывает возражения в силу большого веса организма. Чтобы перемещаться в пространстве на коротких ногах с большим весом, необходима затрата большой энергии. Следовательно, одновременно нужно было бы увеличить размеры желудка, сердца, печени, почек и т. д. В общем изменить всю морфологию тела. Такие монстры могли бы появиться лишь на очень небольших планетах с малым гравитационным полем.

Прогнозы развития нелинейных систем — дело неблагодарное, поскольку горизонт предсказания очень мал, а эволюционные возможности Природы до конца не поняты. Поэтому и возник афоризм: *никогда не говори «никогда»*. В связи с этим из истории развития биофизики в нашей стране можно напомнить, например, судьбу академика П. П. Лазарева, который в начале XX века предсказал и пытался доказать наличие в человеческой популяции «людей-X с необычным взаимодействием их рецепторных систем». В начале XX века это послужило поводом для травли ученого, в середине XX века его гипотеза подтвердилась, а в XXI веке *синестезия* превратилась в самостоятельное научное направление в мировой науке [Иваницкий, 2019].

За последние 20–30 лет удалось создать многие новые методы, включая методы фотоники, с помощью которых можно выявлять взаимодействия между различными частями мозга. Однако чувствительность этих методов (МЭГ, ФМРТ, ПЭТ) недостаточна [Brecht et al., 2004; Kerr, Denk, 2008; Callaghan, 1993; Stallings et al., 2005; Cohen, 1972], либо они инвазивные, например, лазерные методы [Доронина-Амитонова и др., 2015] или методы вживления микроэлектродной матрицы в мозг, которые требуют трепанации черепа. Инвазивные методы создают неопределенности, превращая прямую математическую задачу в обратную задачу физики, когда по следствиям необходимо вычислить причины, порождающие эти следствия.

Наш мозг работает во времени в миллисекундном диапазоне, а в пространстве — в нанометровом диапазоне. Чтобы не инвазивно и одновременно определять функцию, описывающую работу коры мозга в его трехмерном пространстве и во времени, необходимо, по крайней мере, увеличить пространственно-временное разрешение неинвазивных методов на 1–2 порядка.

Тем не менее изучение морфологической и функциональной организации деятельности мозга и его коры продвигается ускоренными темпами. Остается только позавидовать молодому поколению исследователей, живущему в эпоху быстрого накопления экспериментальных данных. Возможно, что новые данные породят и новые гипотезы, которые приблизят человечество к пониманию того, как работает мозг человека, а выстраданные и дорогие нам гипотезы старшего поколения отправятся на кладбище заблуждений.

Литература

- Быстров А. П. Прошлое, настоящее и будущее человека. — М.: Медгиз, 1957.
- Доронина-Амитонова Л. В. и др. Нейрофотоника: оптические методы исследования и управления мозгом // Успехи физических наук. — 2015. — Т. 185. — С. 371–392.
- Иваницкий Г. Р. XXI век: что такое жизнь с позиции физики // Успехи физических наук. — 2010. — Т. 180. — С. 337–369.
- Иваницкий Г. Р. Память о прошлом дает льготы в процессах выживания и размножения (Ответ на комментарий В. И. Кляцкина [УФН 182 1235 (2012)] к статье «XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики» [УФН 180 337 (2010)]) // Успехи физических наук. — 2012. — Т. 182. — С. 1238–1244.
- Иваницкий Г. Р., Деев А. А., Хижняк Е. П. Может ли существовать долговременная структурно-динамическая память воды? // Успехи физических наук. — 2014. — Т. 184. — С. 43–74.
- Иваницкий Г. Р. Самоорганизующаяся динамическая устойчивость биосистем, далеких от равновесия // Успехи физических наук. — 2017. — Т. 187. — С. 757–784.
- Иваницкий Г. Р. Робот и Человек. Где находится предел их сходства? // Успехи физических наук. — 2018. — Т. 188. — С. 965–991.
- Иваницкий Г. Р. Люди-Х, обладающие необычным взаимодействием рецепторных систем, конструируют внутри себя мир новых образов (к 140-летию со дня рождения академика П. П. Лазарева) // Успехи физических наук. — 2019. — Т. 189. — С. 759–784.
- Иваницкий Г. Р., Морозов А. А. Объект исследования — стареющий мозг // Успехи физических наук. — 2020. — Т. 190. — С. 1165–1188.
- Иваницкий Г. Р. Почему не прекращаются дискуссии на тему: что такое жизнь с точки зрения физики (ответ на статью А. М. Смоловича «Гипотеза о физической природе феномена жизни») // Биофизика. — 2021. — Т. 66, № 5. — С. 1022–1029.
- Кляцкин В. И. В стохастических динамических системах могут образовываться пространственные структуры, благодаря событиям, происходящим с вероятностью, стремящейся к нулю (Комментарий к статье Г. Р. Иваницкого «XXI век: что такое жизнь с точки зрения физики» [УФН 180 337 2010]) // Успехи физических наук. — 2012. — Т. 182. — С. 1235–1237.
- Окунь Л. Б. Формула Эйнштейна: $E_0 = mc^2$. Не смеется ли Господь Бог? // Успехи физических наук. — 2008. — Т. 178. — С. 541–555.
- Рубнер М. Большая советская энциклопедия: [в 30 т.] / Под ред. А. М. Прохорова. — 3-е изд. — М.: Советская энциклопедия, 1969.
- Татаринов Л. П. Очерки по теории эволюции. — М.: Наука, 1987.
- Физический энциклопедический словарь / Гл. ред. А. М. Прохоров. — М.: Советская энциклопедия, 1963.
- Brecht M. et al. Novel approaches to monitor and manipulate single neurons in vivo // J. Neurosci. — 2004. — Vol. 24, No. 42. — P. 9223–9227.

- Callaghan P. T. Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy. — Oxford: Clarendon Press, 1993.
- Cohen D. Magnetoencephalography: detection of the brain's electrical activity with a superconducting magnetometer // Science. — 1972. — Vol. 175. — P. 664–666.
- Fulker D. W., DeFries J. C., Plomin R. Genetic influence on general mental ability increases between infancy and middle childhood // Nature. — 1988. — Vol. 336. — P. 767–769.
- Fry S., Lloyd J., Mitchinson J. The book of general ignorance. — London: Faber and Faber, 2006. [Есть русский перевод: Фрай С., Лойд Дж., Митчинсон Дж. Книга всеобщих заблуждений. — М.: FantomPress, 2008.]
- International Human Genome Sequencing Consortium «Initial sequencing and analysis of the human genome» // Nature. — 2001. — Vol. 409, No. 6822. — P. 860–921.
- International Human Genome Sequencing Consortium «Finishing the euchromatic sequence of the human genome» // Nature. — 2004. — Vol. 431, No. 7011. — P. 931–945.
- Kerr J. N. D., Denk W. Imaging in vivo: watching the brain in action // Nature Rev. Neurosci. — 2008. — Vol. 9. — P. 195–205.
- Lamb M. J. Biology of Ageing. — Glasgow, London: Blackie, 1977. [Есть русский перевод: Лэмб М. Биология старения. — М.: Мир, 1980.]
- Loots G., Locksley R., Blankespoor C., Wang Z., Miller W., Rubin E., Frazer K. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons // Science. — 2000. — Vol. 288, No. 5463. — P. 136–140.
- Nei M., Xu P., Glazko G. Estimation of divergence times from multiprotein sequences for a few mammalian species and several distantly related organisms // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 2001. — Vol. 98, No. 5. — P. 2497–502.
- Sacher G. A. Relation of lifespan to brain weight and body weight in mammals // Ciba Foundation Colloquia on Ageing. V. The lifespan of Animals / G. E. W. Wolsteholme, M. O'Connor (eds.). — London, Churchill, 1959. — P. 115–153.
- Sacher G. A., Staffeldt E. P. Relation of gestation time to brain weight for placental mammals: implications for the theory of vertebrate growth // Am. Nat. Sci. USA. — 1974. — Vol. 108. — P. 593–615.
- Schmidt K. C. et al. Regional rates of brain protein synthesis are unaltered in dexmedetomidine sedated young men with fragile X syndrome: A L-[1-C] leucine PET study // Neurobiol. Dis. — 2020. — Vol. 143. — P. 104978.
- Stallings M. C., Corley R. P., Dennehey B. et al. A genome-wide search for quantitative trait loci influencing antisocial drug dependence in adolescence // Archives of General Psychiatry. — 2005. — Vol. 62. — P. 1042–1051.
- What we believe but cannot prove. Today's Leading Thinkers on Science in the Age of Certainty / Ed. by J. Brockman. — NY, London, Toronto, Sydney: Harper Perennial, 2006. [Есть русский перевод: Во что мы верим, но не можем доказать. Интеллектуалы XXI века о современной науке / Под ред. Дж. Брокмана. — М.: Альпина нон-фикшн, 2018.]

**The tortuous relief of the surface of the neocortex: how is it formed
and what biophysical meaning does it have?**

G. R. Ivanitskii

Institute for Theoretical and Experimental Biophysics RAS,
142290 Pushchino, Moscow region, st. Institutskaya, 3 Russia
E-mail: ivanitsky@iteb.ru

It is shown on the example of solving two problems, how biophysics got rid of delusions in understanding what the mind and consciousness of a person are. The purpose of the continuous work of the brain is to increase the stability of the organism as a whole. Our brain works primarily with information. A special role is played by the surfaces of cells, organs and the connections between them, representing the new cerebral cortex. At the edges of surfaces, competitive information processes are played out, allowing the brain to respond to external changes. The path of researchers to understanding these processes is tortuous and goes through many misconceptions.

Keywords: lifespan of living systems, mass of living systems, new cortex human brain.

БИОФИЗИКА МИЕЛИНА

Г. В. Максимов¹

Миелин — одна из главных структур нервной системы позвоночных. Особенная роль миелина заключается в осуществлении процесса быстрой передачи возбуждения посредством скачкообразного, сальтаторного проведения ПД, без которого нормальное функционирование нервной системы невозможно. Исследование высокоупорядоченной и регулярной структура миелина всегда было привлекательной задачей нейробиологии. В статье представлен обзор данных, полученных с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния (КР), свидетельствующих об особенностях морфологии миелина, а также ориентации и упорядоченности молекул каротиноидов и жирных кислот фосфолипидов миелина нативных нервных клеток. Представленные результаты свидетельствуют о возможности использования поляризационной КР спектроскопии для исследований миелина у функционирующих нервных клеток. Детальное описание анизотропии КР спектров позволило реализовать двумерное КР картирование молекул на миелине нервных волокон. Обсуждаются различия в распределении и конформации молекул каротиноидов и фосфолипидов, обусловленные морфологией и структурой миелина. В миелине молекулы каротиноидов расположены преимущественно перпендикулярно к поверхности липидного бислоя миелина, а фосфолипидов — под углом 45°. Предполагается, что *микродоменная* организация интернодальной области миелина обусловлена наличием участков, обладающих более высокой степенью насыщенности и упорядоченности жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов миелина. Представленный подход может использоваться при исследовании изменений морфологии и структуры миелина, а также молекулярного состава и конформации молекул миелина в нервных клетках как в норме, так и при патологиях, связанных с дисфункцией миелина (лейкодистрофия, рассеянный склероз в ЦНС, нейропатии в ПНС).

Ключевые слова: нервное волокно, миелин, спектроскопия комбинационного рассеяния, каротиноид, фосфолипид.

Введение

Миелин представляет собой сложную структуру, образованную плазматической мембраной олигодендроцита (ОД, в ЦНС) или Шванновские клетки (ШК, в ПНС). Именно в процессе миелинизации нервного волокна формируется состав и структура миелина [Trapp, Kidd, 2004]. В то время как ОД участвуют в создании миелиновой оболочки сразу в нескольких нервных волокнах, ШК

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, 119892 Россия, Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 12.
E-mail: gmaximov@mail.ru

ассоциируются только с одним волокном, формируя интернодальную область миелина (ИО) [Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects, 2006]. Проведение возбуждения (проведение серии потенциалов действия, ПД) в нервной клетке связано не только с деполяризацией аксолеммы в области перехвата Ранвье (ПР), но и с дальнейшим распространением ПД вдоль волокна (сальтаторное проведение). Очевидно, что особенности структуры миелина важны для реализации данной функции нервных клеток как в норме, так и при демиелинизации, а также патологий, связанных с дисфункцией миелина (лейкодистрофия, рассеянный склероз в ЦНС, нейропатии в ПНС) [Chance, 2001].

С помощью электронной микроскопии доказано, что миелин представляет собой периодическую структуру с чередующимися плотными (контрастными) и неплотными слоями [Kirschner, Hollingshead, 1980; Ducic et al., 2011]. Характерный период в структуре миелина составляет порядка 16–18,5 нм (ПНС) и 15–17 нм (ЦНС), а длина сегмента в ИО составляет 150–200 мкм (ЦНС) и может достигать 1 мм (ПНС) [Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects, 2006]. Между двумя участками нервного волокна, покрытого миелином (интернодальная область, ИО), локализованы свободные от миелина участки нервного волокна (перехват Ранвье, ПР). На границах между ПР и ИО формируется промежуточный участок миелина, паранодальная область (ПО). Высокое содержание липидов и низкое содержание воды в миелине обеспечивает электрическую изоляцию аксона, а уникальная сегментарная структура определяет высокую скорость проведения ПД [Baumann, Pham-Dinh, 2001].

С помощью сканирующей рентгеновской дифракционной микроскопии (СРДМ) установлено, что в ИО миелина существует как регулярная локализация ламелл (с периодом порядка 200 Å), так и их нерегулярное (гетерогенность) распределение, обусловленное различиями в ориентации ламелл относительно друг друга [Inoue et al., 2014]. Отметим, что характерный период ориентации ламелл в ПО (от 205 до 208 Å) выше по сравнению с ИО миелина. Для ПО миелина ориентация ламелл перпендикулярна оси волокна и упорядоченность упаковки ламелл относительно друг друга более гетерогенна.

Основными структурами миелина, приводящими к его локальной гетерогенности, являются насечки Шмидта–Лантермана (НШЛ): их присутствие искажает локальную концентрическую упаковку ламелл миелина. Данные электронной микроскопии свидетельствуют, что наличие в миелине НШЛ коррелирует с нерегулярным включением цитоплазмы между слоями миелина. Однако, данные рентгеновской дифрактометрии (РД) свидетельствуют о том, что деформации структуры миелина имеют более сложную природу и, вероятно, обусловлены другими причинами [Everall et al., 1996]. Отметим, что основные белки миелина гетерогенно распределены в пределах ИО и могут формировать зо-

ны (области), которые не связаны с динамикой латеральной диффузии молекул белков и липидов в миелине, а обусловлены формированием из них олигомерных структур (рафт).

Несмотря на многочисленные исследования, вопросы организации трехмерной структуры миелина и его химического состава остаются до сих пор открытыми. Очевидно, что комбинация методов аналитической спектроскопии и высокоразрешающего «имиджинга» миелина является наиболее подходящим подходом для исследования миелина. Например, с помощью метода мультимодальной рентгеновской микроскопии (МРМ) был проведен элементный анализ различных областей миелина: в ПР было обнаружено значительное содержание натрия и фосфора. Высокое содержание фосфора в ПО миелина может быть связано с более высоким содержанием богатых фосфором ганглиозидов или АТФ, АДФ и цАМФ [Ducic et al., 2011]. Известно, что около 30 % сухого веса миелина составляют белки, играющие важную роль в поддержании его структуры (P₀, MBP, MAG). С помощью метода инфракрасной спектроскопии (ИК) Ducic и соавт. исследовали вторичную структуру белков миелина и доказали, что наиболее распространенной является конформация белков бета-слоя в области компактного миелина [Ducic et al., 2011].

Итак, ряд современных исследований структуры миелина свидетельствуют о высокой степени гетерогенности в ИО. Вероятно, одной из причин гетерогенности миелина является различная ориентация участков БЛМ относительно друг друга вдоль нервного волокна [Kirschner, Hollingshead, 1980; Schmitt, Bear, Palmer, 1941]. Подобные результаты имеют большое значение для исследования роли структуры миелина в функционировании нервов и при патологии. Например, установлено, что при проведении ПД или активации ряда рецепторов ШК меняется не только структура миелина, но и содержание в его компартментах ионов калия и кальция [Trapp, Kidd, 2004]. Однако максимальную информацию о структуре и составе миелина нативных функционирующих нервов можно получить при исследовании миелина с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния.

Известно, что *метод спектроскопии комбинационного рассеяния* (КР) позволяет исследовать колебательные спектры молекул и анализировать химический состав, структуру и конформации биомолекул [Szalontai, Bagyinka, Horvath, 1977]. КР использовали для исследования состояния липидов миелина нервных волокон при проведении серии ПД [Maksimov, Churin, Paschenko, Rubin, 1990]. Однако при регистрации КР от различных отделов миелинового волокна (миелин, перехват ШК) возникает целый ряд неопределенностей. Наличие в миелине нервного волокна каротиноидов представляет собой не только научный интерес [Verdiyan, Bibineyshvili, Kutuzov, Maksimov, 2015], но и предоставляет возможность создания технологии тестирования состояния

БЛМ. Например, в зависимости от химической структуры каротиноидов молекулы могут быть ориентированы в БЛМ различным образом: как перпендикулярно, так и параллельно БЛМ. Важно, что ориентация молекулы каротиноидов может влиять (и/или зависеть от) на упорядоченность «хвостов» жирных кислот мембранных фосфолипидов и, таким образом, менять физико-химические свойства миелина [Baumann, Pham-Dinh, 2001; Chance, 2001]. Для исследования упорядоченности молекул каротиноидов и жирных кислот фосфолипидов миелина используется метод поляризационной спектроскопии КР (ПКР) [Suter, Nave, 1999; Inoue, 1951].

Спектроскопия КР не является единственным методом исследования нервных волокон, не требующим введения в клетки специальных меток, а использующим исключительно сигналы исходных компонентов клетки. Так, Wang и соавт. успешно применили метод когерентной антистоксовой КР (КАСКР) спектроскопии для исследования структуры миелина в ЦНС [Wang, Fu, Zickmund at al., 2005]. В данном исследовании в качестве сигнала («маркер») использовали колебания $-\text{CH}_2$ групп липидов и молекул воды. Отметим, что благодаря высокой интенсивности сигнала КАСКР могут быть использованы короткие времена сканирования и исследование быстрых процессов (например, генерация ПД). К недостаткам КАСКР относят сложность экспериментальной установки, включающую в себя два синхронизированных пикосекундных лазера, интегрированных в схему конфокального микроскопа. В связи с этим, был предложен альтернативный метод исследования морфологии миелина с использованием генерации третьей гармоники [Farrar, Wise, Fetcho, Schaffer, 2011].

Установлено, что КР-спектр миелинового нервного волокна представляет собой суперпозицию спектров β -каротина и лецитина (рис. 1) [Maksimov, Churin, Paschenko, Rubin, 1990; Maksimov, Kutuzov, Shutova, Orlov, 2019]. В области сканирования $900\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ выявлены полосы, характеризующие: изгибные колебания боковых метильных групп $-\text{CH}_3$ в молекулах каротиноидов (1004 см^{-1}); колебания $-\text{C}-\text{C}-$ связей каротиноидов (1160 см^{-1}); вращательные колебания $-\text{CH}_2-$ алкильных радикалов в составе липидов (1300 см^{-1}); изгибные колебания $-\text{CH}_2-$ алкильных радикалов в составе липидов (1440 см^{-1}); колебания $-\text{C}=\text{C}-$ связей каротиноидов (1527 см^{-1}); колебания $-\text{C}=\text{C}-$ связей алкильных радикалов ненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов (1655 см^{-1}). В области $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ были обнаружены симметричные колебания метиленовых групп липидов $-\text{CH}_2-$ (2850 см^{-1}); несимметричные колебания метиленовых групп липидов $-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2-$ ($2884\text{--}2885\text{ см}^{-1}$); колебания метиленовых групп липидов $-\text{CH}_2-$ и симметричных колебаний $-\text{CH}$ групп ($2932\text{--}2940\text{ см}^{-1}$) [Maksimov, Churin, Paschenko, Rubin, 1990]. Из всего набора перечисленных выше полос для анализа состояния липидов миелина использовали

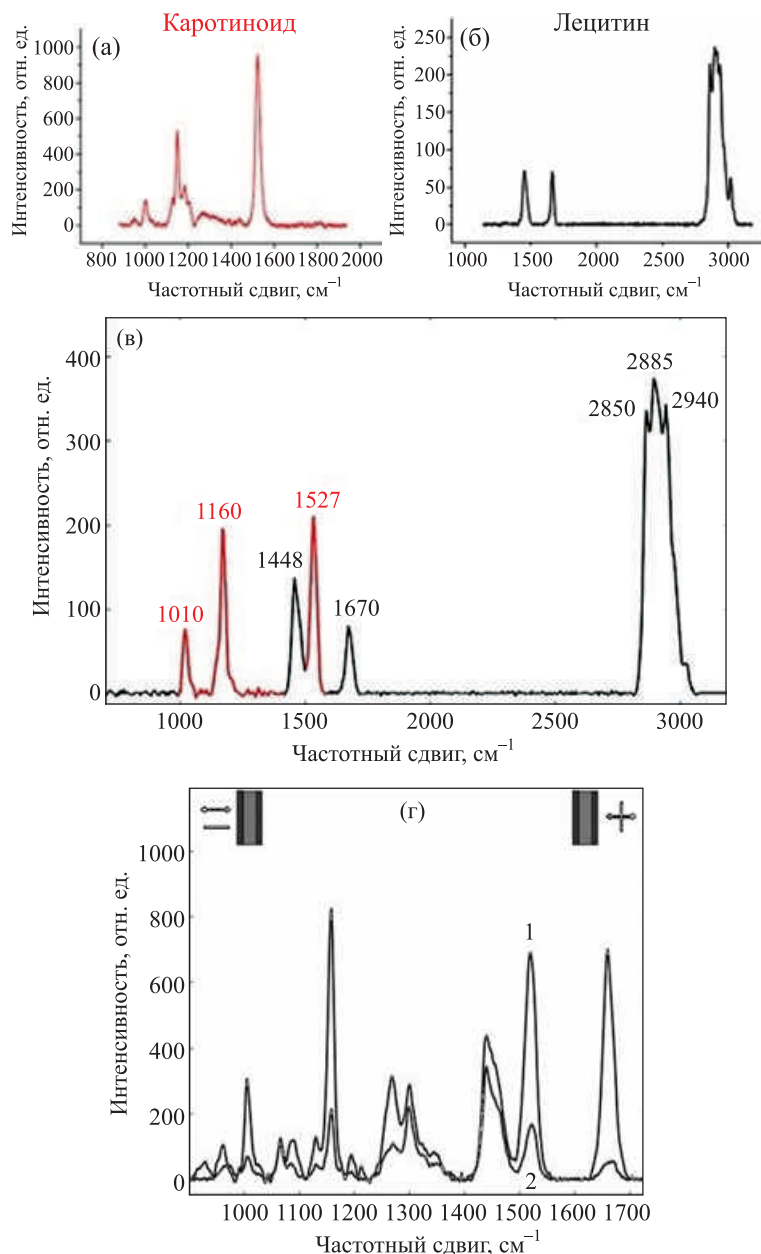


Рис. 1. КР-спектры каротиноидов (а), лецитина (б) и миелинового нервного волокна (в). (г) Спектры КР миелина в области 900–1700 см^{-1} при различных ориентациях поляризатора и анализатора относительно нервного волокна: поляризатор и анализатор параллельны (1) или перпендикулярны друг другу (2). По оси абсцисс — частотный сдвиг, см^{-1} ; по оси ординат — интенсивность, отн. ед. [Maksimov, Kutuzov, Shutova, Orlov, 2019]

следующие соотношения интенсивностей (рис. 1): (1) I_{1527}/I_{1160} (конформация каротиноидов БЛМ) — отношение возрастает при увеличении упорядоченности липидов (обозначается как I_1); (2) I_{1655}/I_{1440} — отношение возрастает при увеличении степени ненасыщенности жирных кислот фосфолипидов ЛБ (обозначается как I_2); (3) I_{2884}/I_{2932} (конформация «хвостов» жирных кислот фосфолипидов в ЛБ), отношение возрастает при увеличении упорядоченности липидов БЛМ (обозначается как I_3).

Для исследования структуры и молекулярной организации миелина нативного нервного волокна мы использовали сфокусированный через объектив микроскопа свет лазера и получали изображение в отраженном свете с помощью встроенной в конфокальный микроскоп CCD камеры. Морфология миелинового нервного волокна близка по форме цилиндру, сечение которого напоминает структуру кольцевого волновода (рис. 2), у которого совокупность БЛМ миелина можно рассматривать как его диэлектрическую сердцевину, а аксоплазму и экстраклеточную среду — как его обкладки. Показатель преломления миелина и окружающего раствора приблизительно равны 1,45 и 1,34 соответственно, вследствие чего на границе миелин/раствор возможно полное внутреннее отражение света [Ben Arous, Binding, Léger, et al., 2011; Brazhe, Brazhe, Rodionova, et al., 2008]. Распространение света внутри миелина нервного волокна (8–15 мкм) в эксперименте контролировали, регистрируя появление с противоположной стороны нервного волокна пятна от луча лазера (*фокальный дублет*, ФД). Для сопоставления мы сравнивали эффект на сферическом выпячивании нервного волокна и в капле масла аналогичного размера. В капле масла наблюдается аналогичный эффект, что свидетельствует в пользу предположения, что данное явление представляет собой так называемые моды *шепчущей галереи* (МШГ), наблюдаемые в различных объектах, в том числе диэлектрических микрорезонаторах [Matsko, Ilchenko, 2006; Maksimov, Kutuzov, Shutova, Orlov, 2019].

Итак, важной особенностью данного эффекта в миелине нативного нервного волокна является то, что на некоторых участках (тип ФД+) изображение ФД было обнаружено на противоположном краю миелина (рис. 2, а). На некоторых участках миелина (тип ФД–) не удавалось достоверно зарегистрировать ФД (рис. 2, б).

Для того чтобы количественно охарактеризовать обнаруженный эффект и исследовать его возникновение в различных участках нервного волокна, была разработана следующая последовательность действий.

1. Выбирается участок нервного волокна и лазерный луч фокусируется на краю миелина.
2. Положение фокуса варьируется до тех пор, пока не достигается максимум интенсивности ФД. Данная процедура позволяет убедиться, что лазер оптимально сфокусирован в область миелина.

3. Изображение сглаживается с помощью фильтра Гаусса ($\sigma = 1$ мкм). Для увеличения контраста проводили нормировку гистограммы интенсивности изображения.
4. Для каждого положения фокуса вдоль волокна, показанного в виде черного квадрата на рис. 2, а, б, на противоположной стороне миелина фиксировался участок (5×5 мкм), внутри которого выявляли максимальную интенсивность КР.
5. Получали распределение интенсивности ФД вдоль волокна (по длине нервного волокна, с шагом в 2 мкм) (рис. 2, в).

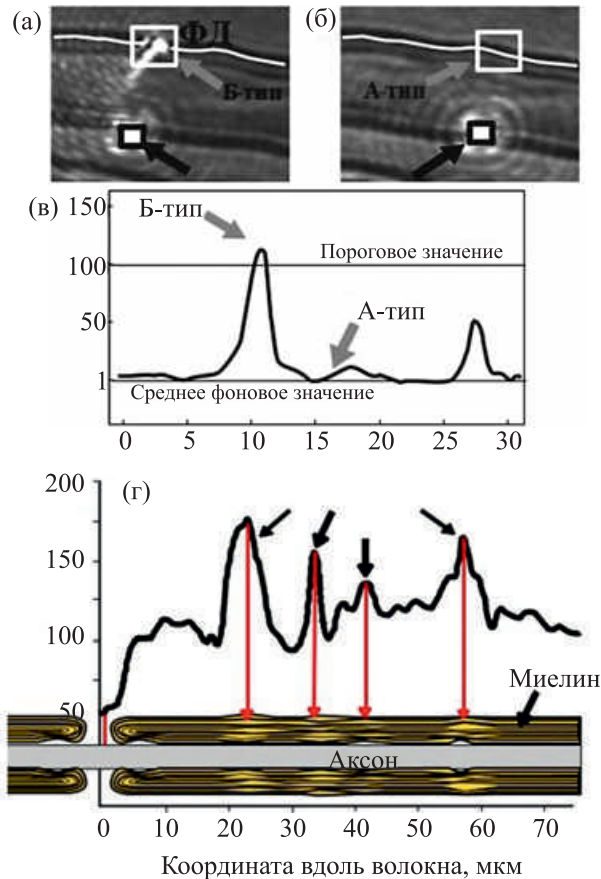


Рис. 2. Распространение луча лазера в разных областях БЛМ миелина (а, б). Профиль распределения интенсивности фокального дублета (ФД) вдоль волокна (в). Профиль ОРХ по длине волокна (г). Стрелки (черные) и квадраты обозначают место фокусировки лазера, стрелки (серые) и белые квадраты — ожидаемое место регистрации ФД. По оси абсцисс — интенсивность полосы КР-спектра (в) и величина ОРХ (г); по оси ординат — расстояние вдоль волокна, мкм

Участок нервного волокна обозначался как тип ФД+, если значение интенсивности ФД было на 2 порядка выше уровня фона. С другой стороны миелина регистрировали участки с минимальной интенсивностью ФД, наиболее близко расположенные к участку типа ФД+ (рис. 2). Вероятно, что возникновение ФД связано с «потерями» света в структурах миелина. Действительно, в случае если бы миелин был идеальным оптическим резонатором, то свет циркулировал внутри и снаружи миелина сигнал не регистрировался. Тот факт, что выявлены участки миелина типа ФД+, в первую очередь, с тем, что при данной кривизне поверхности миелина угол падения световой волны может не соответствовать углу полного внутреннего отражения, а во вторую очередь — с рассеянием света на гетерогенных структурах миелина.

Отсутствие ФД может быть обусловлено целым рядом причин:

1. Падающий луч проходит преимущественно через миелин насквозь.
2. Свет циркулирует внутри мембран миелина, но мы не наблюдаем ФД на изображении. Данная ситуация может возникнуть, если свет распространяется не по кольцевой траектории, а по спирали, в результате чего свет может выходить под углом относительно оптической оси микроскопа и не регистрироваться в объективе.
3. Миелин на данном участке ведет себя как высокоэффективный резонатор, потери которого настолько малы, что мы не можем их зарегистрировать. Данный вариант маловероятен, ввиду неоднородной структуры миелина, которая должна приводить к светорассеянию и потерям интенсивности, а также за счет того, что сфокусированный свет падает на границу миелин/раствор под широким диапазоном углов (объектив фокусирует свет в пределах угла, определяемого численной апертурой), что должно приводить к уменьшению доли света, циркулирующего внутри миелина.

Таким образом, с помощью различной фокусировки луча лазера на поверхности миелина можно исследовать как структуру, так и молекулярный состав гетерогенных участков миелина нервного волокна (локальные свойства и структуру миелина). В связи с этим, мы использовали метод КР спектроскопии для того, чтобы выяснить, могут ли макроскопические различия в наблюдаемых оптических свойствах участков типов ФД– и ФД+ быть проявлением физико-химических особенностей гетерогенной структуры миелина. В этих экспериментах, при регистрации КР плоскость поляризации возбуждающего лазера была параллельна оси нервного волокна, а в других опытах ФД регистрировали при перпендикулярной поляризации луча света лазера (рис. 1, з). При этом в спектрах КР полосы молекул (как каротиноидов, так и жирных кислот фосфолипидов), что позволяло рассчитывать три основных соотношения интенсивностей полос КР спектра. Полученные результаты свидетельствуют о том, что

участки миелина (типа ФД+) характеризуются более высокой степенью упорядоченности липидов и жирнокислотных хвостов (рис. 3). В первом случае ФД не регистрируется (левое нервное волокно на рис. 3) при отсутствии эффекта циркулирующего света в миелине, в то время как во втором случае (центральное нервное волокно на рис. 3) миелин выступает в качестве эффективного резонатора падающего света.

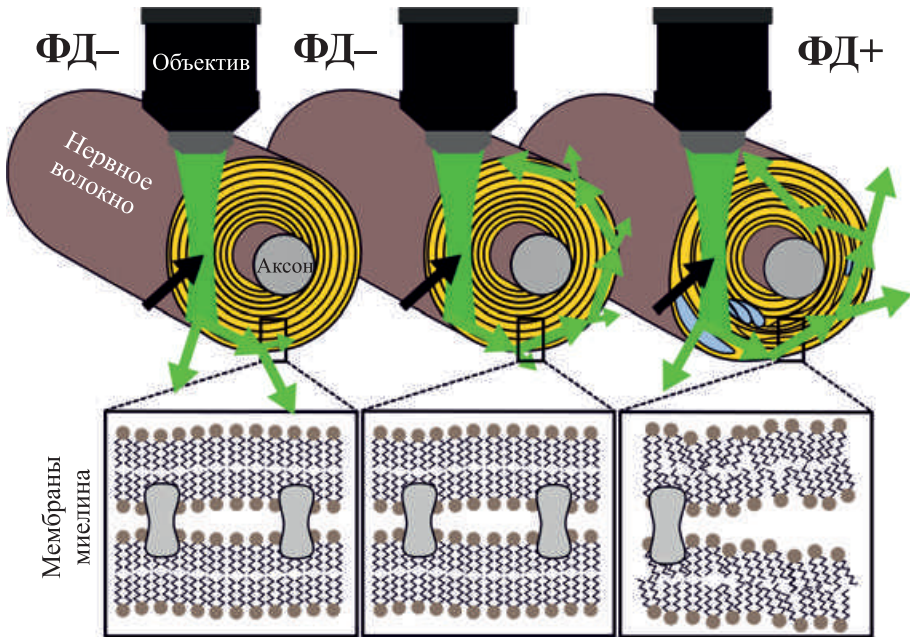


Рис. 3. Участки ФД+ и ФД- в структуре миелина

Вероятно, что для БЛИМ с высокой степенью упорядоченности жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов формирование плотных контактов между соседними слоями миелина затруднено, по сравнению с более упорядоченными мембранами типа ФД-. Гетерогенная упорядоченность БЛИМ миелина может приводить к формированию неоднородных оптических свойств участков, которые становятся центрами рассеяния света, распространяющегося внутри миелина. Как мы отмечали, для структуры миелина свойственны различные локальные неоднородности, такие как, например, насечки Шмидта–Лантермана (НШЛ) [Hall, Williams, 1970]. Аргументом против такого объяснения является отсутствие видимых неоднородностей миелина при контроле за распределением в миелине участков типа ФД+, несмотря на то, что НШЛ хорошо видны на оптических изображениях нервных волокон. Кроме того, известно, что расстояния между соседними НШЛ в миелиновом нервном волокне значительно превыша-

ют расстояния между участками ФД+ миелина [Gould, Byrd, Barbarese, 1995]. В таком случае НШЛ могут совпадать только с частью участков типа ФД+.

Для того, чтобы сопоставить различия в структуре мембран миелина с макроскопическими свойствами миелина, использовали метод лазерной интерференционной микроскопии (ЛИМ), который успешно применялся для исследований как морфологии, так и распределения оптической разности хода (ОРХ) вдоль миелина нервного волокна (рис. 2) [Brazhe, Brazhe, Rodionova et al., 2008]. Установлено, что минимальное значение ОРХ соответствует перехвату Ранвье, где практически отсутствует миелин, что приводит к уменьшению значению ОРХ по сравнению с другими областями волокна. Далее следует ПО — место, где локализованы так называемые петли миелина — граничные слои ШК, отделяющие ПР от остальной части волокна. Наконец, ИО занимает основную часть поверхности миелина волокна. В пределах данной области значение ОРХ варьируют: изменения ОРХ скорее всего связаны с изменением показателя преломления миелина в данной точке миелина нервного волокна (рис. 2, з).

Если предположить, что диаметр аксона в ИО постоянен и толщина слоя миелина (h), а Δn — различия величины показателя преломления, то можно оценить разницу в ОРХ по соотношению:

$$\Delta \text{ОРХ} = h \Delta n.$$

Для величины ОРХ в 50 нм показатели преломления двух областей миелина должны отличаться на $\approx 1,7 \times 10^{-2}$. Если считать, что для аксоплазмы показатель преломления равен $n_a = 1,34$, а толщина составляет h (3 мкм), то можно рассчитать изменение в ОРХ между двумя областями:

$$\Delta \text{ОРХ} = h n_a.$$

Очевидно, что для достижения ОРХ в 50 нм толщина дополнительного слоя аксоплазмы должна достигать всего ≈ 37 нм. Данная оценка позволяет предположить, что флуктуации ОРХ могут быть связаны с наличием включений аксоплазмы в миелин (рис. 3).

Вероятно, что в пределах ИО свойства миелина, такие как степень насыщенности жирных кислот и конформация липидов, могут локально варьировать. Для идентификации участков с разными свойствами достаточно сфокусировать лазер на миелине и выявить ФД, а ЛИМ позволяет найти локальные отличия в ОРХ, которые могут быть обусловлены локальным изменением показателя преломления миелина или цитоплазмы. Оба варианта могут приводить к локальному увеличению ОРХ. Однако мы не располагаем данными, которые бы позволили связать участки типа ФД+ с данными областями. Аналогия между участками типа ФД+ и областями с высоким значением ОРХ заключается в плотности их распределения по длине миелина волокна. Допустим, что их по-

ложение в действительности совпадает. Тогда данные участки являются более эффективными резонаторами, концентрирующими внутри себя свет, изменение ОРХ может быть интерпретировано как изменение показателя преломления миелина. Последнее возможно, если его состав или конформация липидов изменяется. Для дальнейшего исследования данного эффекта необходимо измерение ОРХ в различных участках нервного волокна при параллельном наблюдении возникновения ФД.

С помощью спектроскопии КР исследовали ориентации молекул каротиноидов и жирных кислот фосфолипидов в миелине при различных положениях плоскости поляризации луча лазера относительно волокна и фиксированной плоскости поляризации при регистрации полученного сигнала. Полосы КР-спектра каротиноидов (1160 и 1527 см^{-1}) и полосу 2885 см^{-1} липидов использовали для расчета отношений интенсивностей: $\langle J_{zz} \rangle / \langle J_{zy} \rangle$ и $\langle J_{yy} \rangle / \langle J_{yz} \rangle$ и построения функции распределения ориентации молекулы (ОФР) (доля частиц, ориентированных с определенным углом) (рис. 4). Для симметричной трехмерной системы (растянутый полимер или мембрана) с молекулами, обладающими цилиндрической симметрией, ОФР $N(\theta, \varphi, \psi)$ является функцией только одного аргумента — угла θ между осью молекулы и нормалью к мембране, который можно разложить в ряд полинома Лежандра [Nobbs, Bower, Ward, 1979]:

$$N(\theta) = \sum_{i=0}^{\infty} \left(i + \frac{1}{2} \right) \cdot \langle P_i \rangle P_i(\cos \theta).$$

Наличие C_{2h} -симметрии у молекул каротиноидов позволяет использовать только четные члены уравнения. Регистрируя спектры КР с различными положениями поляризатора и анализатора, были получены данные и рассчитаны величины коэффициентов $\langle P_2 \rangle$ и $\langle P_4 \rangle$, которые использовали для построения ОФР. Установлено, что молекулы каротиноидов локализованы преимущественно перпендикулярно к поверхности БЛМ, а ее ориентация зависит от химической структуры молекулы и состава мембраны [Inoue, Liu, Makowski, et al., 2014].

Для каждого набора спектров КР коэффициенты упорядоченности могут быть рассчитаны и использованы для построения ОФР (рис. 4). Нулевой угол соответствует направлению, перпендикулярному мембране. ОФР, построенная с использованием средних значений параметров упорядоченности, представлена в виде сплошной линии. Серым фоном обозначен диапазон изменения ОФР при варьировании параметров упорядоченности в пределах стандартной ошибки среднего (СОС). Установлено, что каротиноиды миелина локализованы преимущественно перпендикулярно к поверхности БЛМ. Отметим, что, говоря об ориентации, мы подразумеваем угол между направлением дипольного момента

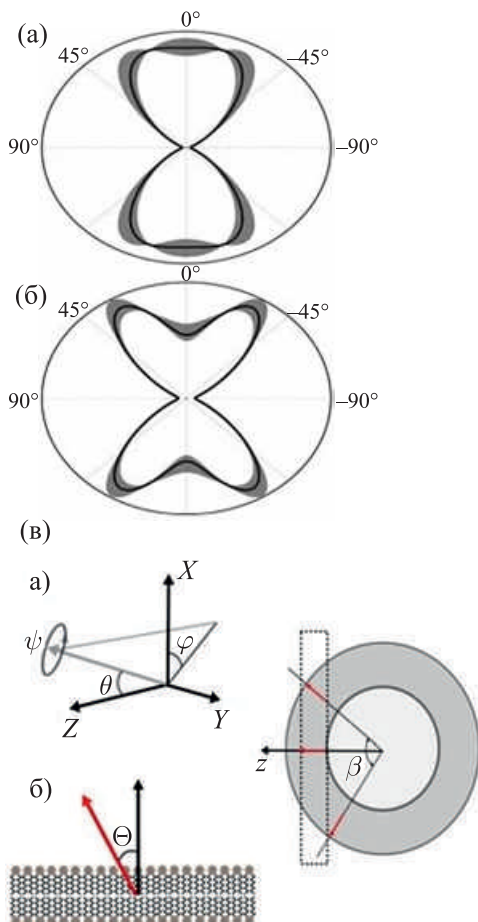


Рис. 4. Ориентационные функции распределения (ОФР) для каротиноидов (а) и фосфолипидов (б) миелина. Нулевой угол соответствует направлению, перпендикулярному мембране. ОФР рассчитана с помощью средних значений параметров упорядоченности (в виде сплошной линии). Серым фоном обозначен диапазон изменения ОФР при варьировании параметров упорядоченности в пределах стандартной ошибки среднего. (в) Ориентация молекул, рассчитанная с помощью пространственных углов (а, б). Ввиду конечной кривизны мембран миелина в пределах фокального объема (обозначен пунктиром) идеально ориентированные молекулы (стрелки) будут казаться расположенными в пределах угла β

перехода (ДМП) молекулы (в случае каротиноидов) и осью Z лабораторной системы координат (ЛСК). Итак, построенная ОФР описывает вероятность нахождения молекулы каротиноида с углом θ между ДМП и нормалью к мембране. Анализируя эти данные, можно предположить, что существуют два различных типа ОФР для каротиноидов в составе мембран миелина:

1. ОФР с единственным максимумом при $\theta = 0$.
2. ОФР с двумя симметричными максимумами (по отношению к $\theta = 0$), положение которых зависит от исходных соотношений интенсивностей и ограниченных углами $\pm 35^\circ$.

Как упоминалось ранее, ориентация каротиноидов существенным образом зависит от их химической структуры и свойств окружающих их молекул [Gruszecki, Sielewiesiuk, 1990]. Каротиноиды с конечными полярными группами, такие как зеаксантин, обычно ориентируются перпендикулярно к поверхности мембраны, вдоль жирнокислотных хвостов липидов, благодаря электростатическим взаимодействиям с полярными головками липидов. Неполярные каротиноиды, такие как β -каротин, могут ориентироваться как перпендикулярно, так и параллельно нормали БЛМ. Важно отметить, что различные типы каротиноидов отличаются значением угла между углеродным скелетом и направлением ДМП. Исследование величины данного угла для полиеновых молекул разной структуры показали, что они могут варьировать от $\approx 30^\circ$ до нижнего предела в $\approx 6\text{--}11^\circ$ для бесконечно длинных цепей [Birge, 1999]. Для природного каротиноида (ликопин) подобный расчет позволил получить значение угла $< 14,9^\circ$. Наклон ДМП по отношению к оси молекулы может быть причиной появления двух симметричных максимумов ОФР.

Другое возможное объяснение появления двух симметричных максимумов связано с несовпадением длины молекулы каротиноида и толщины БЛМ. Известно, что в некоторых случаях длина молекулы каротиноидов превышает толщину мембраны, что делает невозможным ее перпендикулярную ориентацию. В этом случае, молекула каротиноида ориентируется под наклоном к мембране, что позволяет ее полярным концевым группам с большей вероятностью находиться на обеих поверхностях мембраны («заякориться»). При этом угол между осью молекулы каротиноида и нормалью к мембране может превышать 20° [Gruszecki, Sielewiesiuk, 1990]. Важно отметить, что ориентированные таким образом каротиноиды могут влиять на ориентацию и упорядоченность жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов [Subczynski, Markowska, Gruszecki, Sielewiesiuk, 1992]. В результате жирнокислотные «хвосты» фосфолипидов могут менять ориентацию в БЛМ за счет дополнительного наклона оси молекулы, что приводит к локальному уменьшению толщины БЛМ миелина. На рис. 4, а, б представлена ОФР липидов, имеющая два максимума, расположенных примерно под углом $\pm 30^\circ$. Очевидно, что величина этого угла может быть больше, так как определяется не только индуцированными каротиноидами снижением размера БЛМ, но и изомеризацией жирнокислотных «хвостов» фосфолипидов миелина. Это может объяснить положение полученных максимумов ОФР липидов. В то же время необходимо учитывать, что точность в оценке ОФР липидов ниже таковой у каротиноидов, из-за сложности структуры $2800\text{--}3000\text{ см}^{-1}$ региона

с множеством перекрывающихся полос, а также упрощающих допущений, использованных для построения тензора поляризуемости (ТП).

Как отмечалось выше, в качестве основных элементов гетерогенности структуры ИО миелина рассматривали только НШЛ (рис. 5). Мы установили, что структура миелина включает дополнительно радиальные области плотного

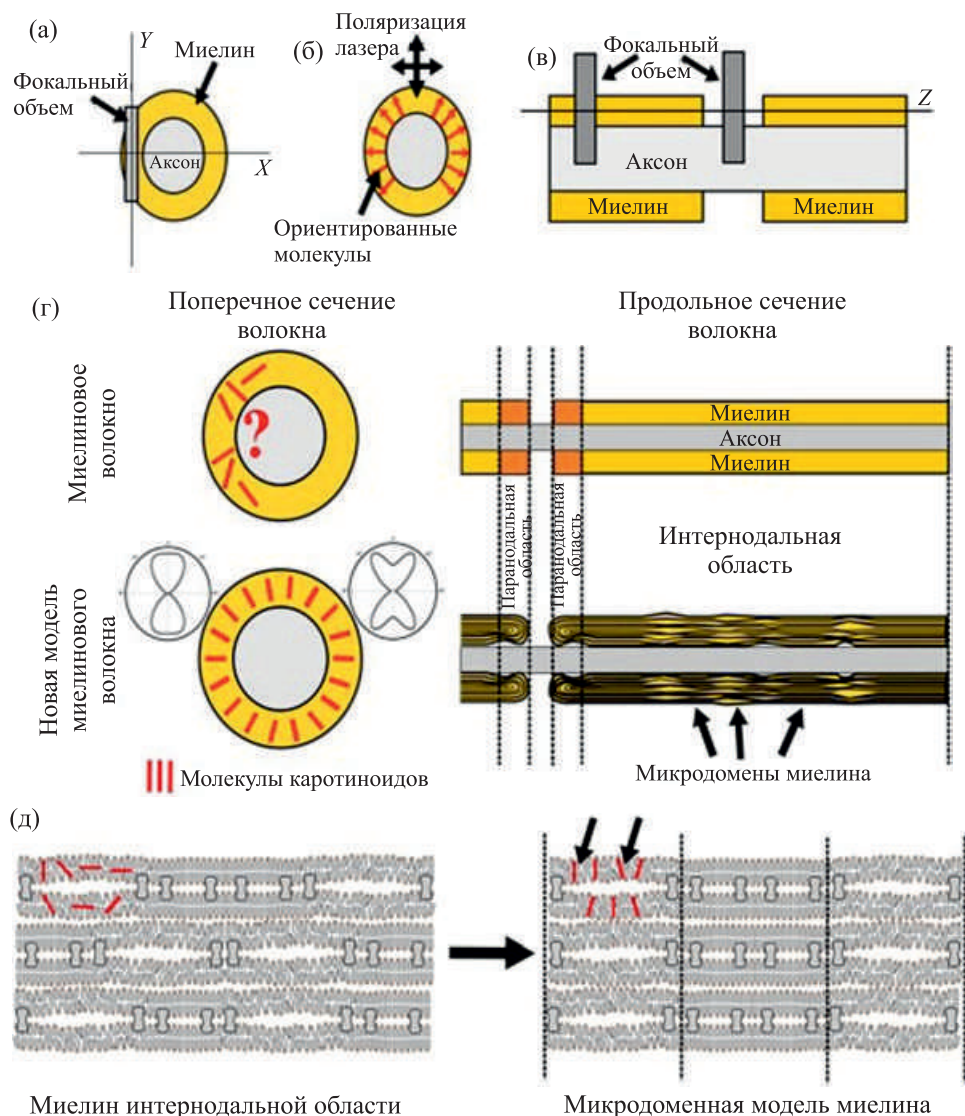


Рис. 5. Особенности измерений спектров КР с одиночных нервных волокон (а–в, комментарии в тексте). Изменения в БЛМ миелина нервного волокна (г). Модель структуры миелина (д)

миелина волокна (рис. 5, д). Вероятно, подобная организация структуры миелина обусловлена совокупностью локальных свойств морфологии соседних БЛМ. Отметим, что в отличие от НШЛ обнаруженные нами структурные различия («микродомены») не могут быть выявлены с помощью оптической микроскопии.

Как мы отмечали, ориентация каротиноидов в миелине зависит от их химической структуры и состава мембраны. Основную часть миелина составляют липиды, асимметрично распределенные в БЛМ, или разнообразные структурные белки. Сложность структуры миелина не дает возможности произвести исследования ориентации каротиноидов в модельных системах (плоских слоях или липосом). Поэтому наиболее подходящим методом исследования являются измерения ОФР с миелина нативных нервных волокон.

Различия между ОФР каротиноидов и липидов (рис. 6) можно использовать для описания механизма взаимодействия молекулы каротиноидов «хвостов» жирных кислот фосфолипидов БЛМ миелина. Очевидно, подобные свойства каротиноидов могут влиять на упорядоченность фосфолипидов, структуру и свойства миелина. В ряде исследований, посвященных свойствам каротиноидов, авторы подчеркивали, что различные концентрации каротиноидов могут оказывать существенное влияние на толщину мембраны, ее вязкость, проницаемость для малых неполярных молекул и ионов, а также на температуру и корпоративность фазового перехода [Socaciu, Jessel, Diehl, 2000]. Отметим, что полярные каротиноиды оказывают более выраженное влияние на БЛМ по сравнению с неполярными [Castelli, Caruso, Giuffrida, 1999].

На рис. 6 представлены изображения распределения молекул при поперечном сканировании миелина нервных волокон и различных направлениях поляризации луча лазера. Для визуализации распределения молекул каротиноидов и липидов луч лазера был поляризован по z и y соответственно. Изображения, полученные с использованием различного диаметра пинголов, не отличаются между собой. Низкий уровень сигнала не позволил нам получить изображения для другой поляризации лазера. Важной деталью изображений каротиноидов является отсутствие сигнала на верхней и нижней границах волокна. Из изложенных ранее результатов следует, что каротиноиды ориентированы преимущественно перпендикулярно к БЛМ. Очевидно, что на верхней и нижней границах миелина молекулы вектор электрического поля лазера перпендикулярен направлению ДМП, что приводит к отсутствию сигнала. Противоположная ситуация имеет место на левой и правой границах миелина, где оба вектора практически сонаправлены, с чем и связано появление максимумов интенсивности. Отметим, что в связи с тем, что ФО вытянут в аксиальном направлении, на левом и правом краях волокна достигается максимальное перекрытие ФО и миелина, что также приводит к более высокому уровню сигнала благодаря большей плотности источников сигнала.

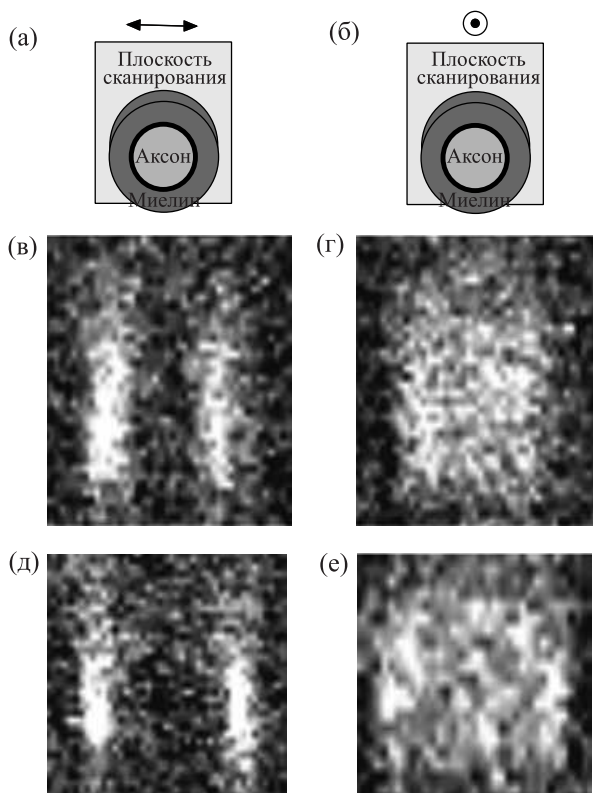


Рис. 6. Относительная ориентация плоскости сканирования и поляризации лазера для визуализации каротиноидов (а) и липидов (б). КР изображения каротиноидов (слева) и липидов (справа). Изображения (в, г) получены, используя пинхол диаметром 100 мкм, (д, е) — с пинхолом 50 мкм

Конфокальные изображения, соответствующие липидам, демонстрируют приблизительно гомогенное распределение интенсивности, несмотря на наличие ориентационной упорядоченности. Данный результат связан с тем, что максимальная интенсивность сигнала КР наблюдается, когда направление поляризации лазера перпендикулярно оси локализации «хвостов» жирных кислот фосфолипидов. Таким образом, если свет поляризован по оси y , то вне зависимости от угла θ оба направления будут оставаться перпендикулярными друг другу. В результате распределение интенсивности должно быть симметрично, что и следует из характера распределения (рис. 6, *з, е*).

В последнее время миелин и миелинизация стали центром исследований, в которых используются методы молекулярной генетики [Trapp, Kidd, 2004]. Эти исследования предоставили ряд важных данных, свидетельствующих о существовании молекул, которые экспрессируются только в миелинизирующих

клетках и используются специально для формирования нативной структуры миелина. Многие из этих молекул являются миелин-специфическими белками, которые составляют важные структурные элементы миелиновой оболочки; другие, по-видимому, участвуют в сборке миелина. Некоторые из этих молекул действуют на ранних стадиях развития миелинизирующих клеток и могут быть регуляторами экспрессии гена миелина. В этой статье мы представили ряд примеров, свидетельствующих о возможности использования поляризационной КР спектроскопии для биофизических исследований миелина живых нервных клеток. Детальное описание анизотропии КР спектров позволило нам реализовать двумерное КР картирование молекул в миелине нервных волокон. В будущем данный подход может использоваться при исследовании роли липидов или липид-белковых взаимодействий в изменении морфологии и структуры БЛМ миелина, а также молекулярного состава и конформации молекул миелина при возбуждении и патологии ПНС.

Литература

- Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. — 7th ed. // American Journal of Neuroradiology. — 2006. — Vol. 27, No. 2. — P. 465–466.
- Baumann N., Pham-Dinh D. Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System // Phys. Reviews. — 2001. — Vol. 81, No. 2. — P. 871–927.
- Berestovskaya Y. Y., Gerasimenko L. M., Yusipovich A. I., Maksimov G. V., Rubin A. B., Levin G. G., Shutova V. V. New possibilities of studying microbial objects by laser interference microscopy // Biophysics. — 2011. — Vol. 56, No. 6. — P. 1063–1068.
- Ben Arous J., Binding J., Léger J. et al. Single myelin fiber imaging in living rodents without labeling by deep optical coherence microscopy // J. of Biom. Optics. — 2011. — Vol. 16, No. 11. — P. 116012–116012–9.
- Birge R. R. Transition dipole orientation of linear polyenes: Semiempirical models and extrapolation to the infinite chain limit // J. of Phys. Chemistry A. — 1999. — Vol. 103, No. 14. — P. 2251–2255.
- Brazhe A. R., Brazhe N. A., Rodionova N. N. et al. Non-invasive study of nerve fibres using laser interference microscopy // Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. — 2008. — Vol. 366, No. 1880. — P. 3463–3481.
- Bulygin F. V., Dracheva O. E., Kutuzov N. P., Lyaskovskii V. L., Maksimov G. V., Nikolaev Yu. A. Determination of the metrological characteristics of the near-field scanning optical microscope in the study of biological objects // Measurement Techniques. — 2014. — Vol. 56, No. 1. — P. 1173–1180.
- Castelli F., Caruso S., Giuffrida N. Different effects of two structurally similar carotenoids, lutein and β -carotene, on the thermotropic behaviour of phosphatidylcholine liposomes. Calorimetric evidence of their hindered transport through biomembranes // Thermochimica Acta. — 1999. — Vol. 327, No. 1–2. — P. 125–131.

- Chance P. F. Molecular basis of hereditary neuropathies // *Physical medicine and rehabilitation clinics of North America*. — 2001. — Vol. 12, No. 2. — P. 277–291.
- Cho Y., Kobayashi M., Tadokoro H. Raman band profiles and mobility of polymethylene chains // *J. Chem. Phys.* — 1986. — Vol. 84, No. 8. — P. 4636–4642.
- Ducic T., Quintes S., Nave R-N. et al. Structure and composition of myelinated axons: A multimodal synchrotron spectro-microscopy study // *J. of Struct. Biol.* — 2011. — Vol. 173, No. 2. — P. 202–212.
- Everall N., Chalmers J., Mills P. Use of polarized resonance Raman spectroscopy of a polyene probe, and FT-IR dichroism, to probe amorphous-phase orientation in uniaxially drawn poly(ethylene) // *Applied Spectroscopy*. — 1996. — Vol. 50, No. 10. — P. 1229–1234.
- Farrar M. J., Wise F. W., Fetho J. R., Schaffer C. B. In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy // *Biophys. J.* — 2011. — Vol. 100, No. 5. — P. 1362–1371.
- Gruszecki W. I., Siewiesiuk J. Orientation of xanthophylls in phosphatidylcholine multibilayers // *BBA – Biomembranes*. — 1990. — Vol. 1023, No. 3. — PP. 405–412.
- Gould R. M., Byrd A. L., Barbarese E. The number of Schmidt–Lanterman incisures is more than doubled in shiverer PNS myelin sheaths // *Journal of Neurocytology*. — 1995. — Vol. 24, No. 2. — P. 85–98.
- Hall S. M., Williams P. L. Studies on the Incisures of Schmidt and Lanterman // *J. of Cell Science*. — 1970. — Vol. 6, No. 3. — P. 767–791.
- Inouye H., Liu J., Makowski L. et al. Myelin Organization in the Nodal, Paranodal, and Juxtaparanodal Regions Revealed by Scanning X-Ray Microdiffraction // *PLoS ONE*. — 2014. — Vol. 9, No. 7. — P. e100592.
- Inoue S. A Method for measuring small retardations of structures in living cells // *Experimental Cell Research*. — 1951. — Vol. 2, No. 3. — P. 513–517.
- Kirschner D. A., Hollingshead C. J. Processing for electron microscopy alters membrane structure and packing in myelin // *J. Ultrastructure Research*. — 1980. — Vol. 73, No. 2. — P. 211–232.
- Kutuzov N. P., Brazhe A. R., Maksimov G. V., Lyaskovskiy V. L. Orientational ordering of carotenoids in myelin membranes resolved by polarized Raman microspectroscopy // *Biophys. J.* — 2014. — Vol. 107, No. 4. — P. 891–900.
- Kutuzov N. P., Brazhe A. R., Lyaskovskiy V. L., Maksimov G. V. Laser beam coupling into nerve fiber myelin allows one to assess its structural membrane properties // *J. Biomed. Optics*. — 2015. — Vol. 20, No. 5. — P. 050501.
- Kutuzov N., Gulina A., Lyaskovskiy V., Natochenko N., Maksimov G. ATP-mediated compositional change in peripheral myelin membranes: A comparative Raman spectroscopy and time-of-flight secondary ion mass spectrometry study // *PLoS ONE*. — 2015. — Vol. 10, No. 11. — P. e0142084.
- Llinas R., Precht W. *Frog Neurobiology: A Handbook*. — 1 ed.. — Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1976.
- Maksimov G. V., Churin A. A., Paschenko V. Z., Rubin A. B. Raman spectroscopy of the «potential sensor» of potential-dependent channels // *Gen. Physiol. and Biophys.* — 1990. — Vol. 9, No. 4. — P. 353–360.

- Maksimov G. V., Kutuzov N. P., Shutova V. V., Orlov S. N. Microdomain Organization of Internodal Myelin // *Biochemistry (Moscow), Suppl. Series A: Membrane and Cell Biology*. — 2019. — Vol. 13, No. 3. — P. 260–267.
- Matsko A. B., Ilchenko V. S. Optical resonators with whispering-gallery modespart I: basics // *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*. — 2006. — Vol. 12, No. 1. — P. 3–14.
- Mishra N. N., Liu G. Y., Yeaman M. R., Nast C. C., Proctor R. A., McKinnell J., Bayer A. S. Carotenoid-related alteration of cell membrane fluidity impacts *Staphylococcus aureus* susceptibility to host defense peptides // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2011. — Vol. 55, No. 2. — P. 526–531.
- Nobbs J. H., Bower D. I., Ward I. M. Comparison of polarized fluorescence with polarized raman and infrared dichroism measures of orientation in uniaxially drawn poly (ethylene terephthalate) // *J. Polymer Science: Polymer Physics Edition*. — 1979. — Vol. 17, No. 2. — P. 259–272.
- Sarycheva A. S., Semenova A. A., Polyakov A. Y., Kozmenkova A. Y., Grigorieva A. V., Goodilin E. A., Parshina E. Y., Brazhe N. A., Maksimov G. V. Ultrasonic-silver-rain preparation of SERS substrates // *Materials Letters*. — 2014. — Vol. 121. — P. 66–69.
- Schmitt F. O., Bear R. S., Palmer K. J. X-ray diffraction studies on the structure of the nerve myelin sheath // *J. Cell. and Compar. Physiol*. — 1941. — Vol. 18, No. 1. — P. 31–42.
- Snyder R. G., Strauss H. L., Elliger C. A. Carbon-hydrogen stretching modes and the structure of n-alkyl chains. 1. Long, disordered chains // *J. Phys. Chem*. — 1982. — Vol. 86, No. 26. — P. 5145–5150.
- Socaciu C., Jessel R., Diehl H. A. Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: Effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy // *Chemistry and physics of lipids*. — 2000. — Vol. 106, No. 1. — P. 79–88.
- Subczynski W. K., Markowska E., Gruszecki W. I., Siewewiesiuk J. Effects of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study // *BBA – Biomembranes*. — 1992. — Vol. 1105, No. 1. — P. 97–108.
- Suter U., Nave K.-A. Transgenic Mouse Models of CMT1A and HNPP // *Ann. New York Academy of Sciences*. — 1999. — Vol. 883, No. 1. — P. 247–253.
- Szalontai B., Bagyinka Cs., Horvath L. I. Changes in the raman spectrum of frog sciatic nerve during action potential propagation // *Biochem. and Biophys. Res. Comm*. — 1977. — Vol. 76, No. 3. — P. 660–665.
- Trapp B. D., Kidd G. J. Structure of the Myelinated Axon // *Myelin Biology and Disorders*. — San Diego: Academic Press, 2004. — P. 3–27.
- van de Ven M., Kattenberg M., van Ginkel G., Levine Y. K. Study of the orientational ordering of carotenoids in lipid bilayers by resonance-Raman spectroscopy // *Biophys. J*. — 1984. — Vol. 45, No. 6. — P. 1203–1209.
- Verdian E., Bibineyshvili E., Kutuzov N., Maksimov G. Role of Schwann cell in regulation of myelin sheath properties during nerve fiber excitation and activation of purinergic receptors // *GLIA Bilbao*. — 2015. — P. E76–E469.
- Wang H., Fu Y., Zickmund P. et al. Coherent anti-stokes Raman scattering imaging of axonal myelin in live spinal tissues // *Biophys. J*. — 2005. — Vol. 89, No. 1. — P. 581–591.

Biophysics of Myelin

G. V. Maksimov

Moscow Lomonosov State University, Biology Department,
Leninskie gory, 1, build. 12, 119892 Moscow, Russia
E-mail: gmaksimov@mail.ru

Using Raman spectroscopy, the orientation and ordering of carotenoid and fatty acid molecules of myelin phospholipids was investigated. A method for the quantitative description of molecular ordering of molecules in the myelin lipid bilayer has been developed. It is established that the differences in the distribution of the molecules of carotenoids and phospholipids are associated with the morphology of myelin and nerve fiber. The molecules of carotenoids are predominantly perpendicular to the surface of the lipid bilayer of myelin, and phospholipids are located at an angle of 45° . In conclusion, the microdomains revealed optically in this work point at the heterogeneity of the internodal myelin, the lipid phase of which presumably contains rafts enriched with saturated fatty acids and/or highly ordered phospholipids.

Keywords: myelin, Raman spectroscopy, carotenoid, phospholipid.

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ КАЛИЙ-СВЯЗАННЫХ НЕЙРОНОВ

Д. Э. Постнов¹

Вычислительная нейронаука традиционно оперирует семейством математических моделей, основанных на парадигме изолированного нейрона, что предполагает наличие окружающей среды с неизменными концентрациями ионов. В живой системе такие условия невыполнимы, коммуникация нейронов путем изменения концентраций различных веществ в межклеточном пространстве известна как «объемная передача» (volume transmission) и лежит в основе таких явлений, как распространяющаяся кортикальная депрессия или волны нейронной гиперактивности при мигрени. По указанным причинам представляется полезным дополнить известные модельные системы нейродинамики их вариантом, учитывающим взаимодействие с межклеточным пространством в самой упрощенной форме. Решению этой задачи и посвящена данная работа. На примере двух расширенных модельных систем разного уровня (за основу взяты модели Ходжкина–Хаксли и Фитсхью–Нагумо) показано, как учет изменения внеклеточной концентрации калия влияет на динамику последовательно усложняющихся модельных систем: от одноклеточного нейрона до дискретно-непрерывной активной среды.

Ключевые слова: модели нейронов, внеклеточная концентрация калия, волны деполаризации, возбуждимо-бистабильная активная среда, объемная передача.

1. Введение: Почему не бывает изолированных нейронов

Работы Ходжкина и Хаксли с соавторами в середине XX века [Hodgkin, 1952; Schwinning, 2012] принесли им Нобелевскую премию 1963 года по физиологии, а биофизике — модель-парадигму нейрона. Несколько позднее исходная модель из четырех уравнений подверглась дальнейшим упрощениям и родилось семейство моделей нейронов на базе двух уравнений, описывающих возбуждающую динамику на фазовой плоскости [Izhikevich, 2007]. Эти и еще более упрощенные спайковые модели составили основу вычислительной нейронауки и, в числе прочего, стали базовым элементом для моделирования довольно сложных систем [Lobov, 2020; Бажанова, 2020]. Однако обнаружился и класс задач, для которых такой подход оказался не самым удачным. В частности, было установлено, что такие явления, как распространяющаяся кортикальная депрес-

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, Россия.
E-mail: postnov@info.sgu.ru

сия [Charles, 2013], зрительные нарушения при мигрени [Dahlem, 2013, 2015], области распространяющейся гиперактивности нейронов при инсульте или травмах [Eikermann, 2014], опосредованы не синаптическими связями нейронов, и прежде всего — их совместным влиянием на ионную композицию жидкости, заполняющей внеклеточное пространство. В работах [Agnati, 1995; Zoli, 1998] было предложено разделять эти два типа коммуникации нейронов, для чего были введены термины *wired transmission* для традиционного сигнального механизма, опосредованного синаптическими связями, и *volume transmission* — для сигнальных путей, образующихся за счет выброса клетками различных веществ в межклеточное пространство.

Здесь уместно вспомнить, что математическая модель нейрона Ходжкина–Хаксли была выведена при довольно серьезных допущениях. А именно, она описывает ситуацию, когда генерация импульса нейроном не меняет значений равновесных потенциалов для ионных токов, входящих в модели, — это токи натрия, калия и некий обобщенный «ток утечки». На практике такие условия могут быть выполнены, когда нейрон помещен в неограниченно большой объем внеклеточной среды («ванна»), диффузия в котором мгновенно восстанавливает равновесные концентрации ионов. При этом предполагается, что нейронных спайков сгенерировано немного, а лучше всего — один, так что внутриклеточные концентрации ионов остаются постоянными, несмотря на наличие перетоков ионов через мембрану. Как альтернативный вариант таких условий — можно допустить, что натрий-калиевые насосы мембраны мгновенно восстанавливают нарушенное соотношение ионных концентраций.

Оба описанных выше варианта не очень реалистичны. В реальности межклеточный объем, например, для паренхимы мозга, составляет не более 30 % от общего объема нервной ткани [Nicholson, Syková, 1998; Syková, 2008], и ни о какой «ванне» говорить не приходится. Диффузия в тканях мозга заметно осложнена как сложной геометрией среды распространения, так и наличием в ней больших молекул. Работа же натрий-калиевых насосов по восстановлению ионных градиентов не настолько интенсивна. Так, в работе [Nicholson, Sykova, 1998] указывалось, что внеклеточная концентрация калия легко увеличивается в 2–2,5 раза при физиологически обыденном увеличении активности нейронов.

Таким образом, модель Ходжкина–Хаксли описывает процесс генерации спайка нейроном в таких условиях, которые навряд ли возможны при его функционировании в составе организма, *in situ*. В реальности активность нейрона (генерация им импульсов-спайков) меняет состояние окружающей его среды, а это, в свою очередь, меняет свойства как его собственные, так и соседних нейронов. Можно сказать, что «изолированный» — т. е. функционирующий вне зависимости от окружения нейрон — это идеализация, приемлемая для анализа

динамики одиночного нейрона в простейшей ситуации, но ограниченно годная при моделировании малых и тем более — больших нейронных ансамблей.

По этой причине есть все основания пересмотреть подход к базовому модельному представлению нейрона, включая и минималистичные безразмерные модели. Данная глава посвящена именно такому подходу: сначала будет рассмотрено, как можно учесть наиболее существенные аспекты *volume transmission* в модели Ходжкина–Хаксли без ее значительного усложнения. Далее будет предложена соответствующая модификация безразмерной модели нейрона на основе широко используемой системы Фитсхью–Нагумо. Наконец, с использованием усовершенствованных моделей будет показано, какие новые черты динамики обретут такие модифицированные модели в случае одного, двух, четырех нейронов и, наконец, что нового можно ожидать от модели активной среды, построенной на этой основе.

2. На одно уравнение больше. Почему именно калий?

На рисунке 1, а схематично изображены основные процессы, сопровождающие генерацию спайка нейроном. А именно, направленный внутрь нейрона ток ионов натрия несколько уменьшает их концентрацию во внеклеточном пространстве и увеличивает — внутри клетки. Напротив, ток калия уменьшает количество его ионов внутри нейрона и увеличивает — снаружи. В предположении диффузионного обмена прилегающей к нейрону части внеклеточного пространства с отдаленными локациями — для описания переменных ионных концентраций требуется добавить четыре уравнения, что многовато для «минималистичной» модели. Есть, однако, способ упростить картину, который проиллюстрирован на панели (б). А именно, учтем тот факт, что в изменение равновесного потенциала основной вклад вносит изменение меньшей из двух концентраций, внеклеточной — для ионов калия, и внутриклеточной — для ионов натрия. Поэтому пренебрежем изменениями внутриклеточной концентрации калия и внеклеточной концентрации натрия. Кроме того, как мы увидим чуть ниже, при сравнении моделей на рисунке 3 изменение внутриклеточной концентрации натрия меняет амплитуду спайка, но практически не влияет на порог возбудимости нейрона. Поэтому равновесный потенциал по натрию можно оставить константой, как в исходной модели Ходжкина–Хаксли. Таким образом, для минималистичного описания взаимодействия нейрона с окружающим пространством можно ограничиться добавлением всего лишь одного уравнения, описывающего изменение во времени концентрации калия в межклеточном пространстве.

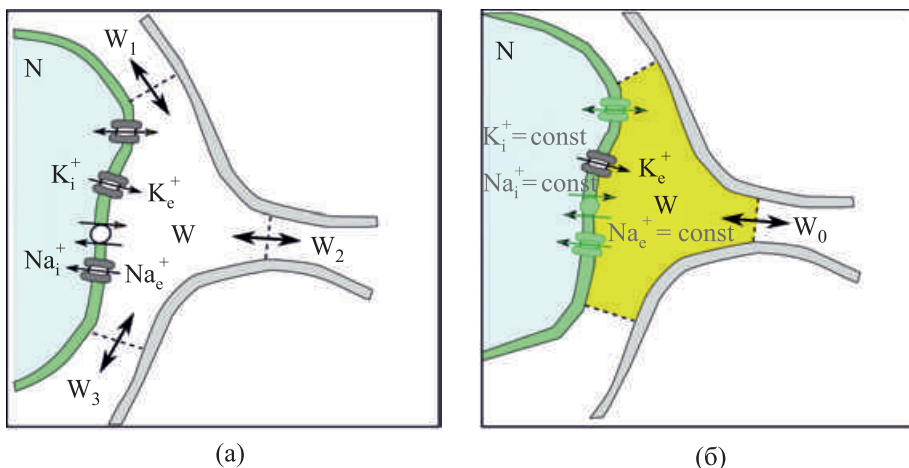


Рис. 1. Как нейроны влияют друг на друга посредством межклеточного пространства

2.1. Модель А: в одном шаге от классической модели Ходжкина–Хаксли

Приводимая ниже форма модели использована в работах [Postnov, 2006, 2007; Постнов, 2008] и представляет собой модификацию одного из вариантов модели Ходжкина–Хаксли, адаптированного для описания активности *P*-нейрона ганглия пиявки.

Предположим, имеется N нейронов, прилегающих к одному и тому же элементу межклеточного пространства. Для i -го нейрона уравнение для мембранного потенциала и выражения для ионных токов имеют вид:

$$C_m \frac{dV_i}{dt} = -I_{i,K} - I_{i,Na} - I_{i,l} + I + I_{i,g}, \quad (1)$$

$$I_{i,K} = g_K (n_i)^2 (V_i - V_{i,K}), \quad (2)$$

$$I_{i,Na} = g_{Na} (m_i)^4 h_i (V_i - V_{Na}), \quad (3)$$

$$I_{i,l} = g_l (V_i - V_l). \quad (4)$$

Здесь C_m — удельная емкость мембраны, I_K , I_{Na} , I_l — описывают ток калия, ток натрия и ток «утечки» соответственно, I — внешний приложенный ток g_K , g_{Na} , g_l — проводимости по ионам калия, натрия и остальным ионам, вносящим вклад в изменение трансмембранного потенциала соответственно.

Как обсуждалось выше, нам требуется учесть изменения внеклеточной концентрации калия как новой переменной модели. Равновесный потенциал по

калию (потенциал Нернста) определяется следующим соотношением [Keener, 2009]:

$$V_{i,K} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K]}{[K]_i}, \quad (5)$$

где $[K]$ — внеклеточная концентрация калия, $[K]_i$ — внутриклеточная концентрация калия в i -м нейроне (считаем константой для каждого нейрона), R — универсальная газовая постоянная, T — температура, F — число Фарадея.

Безразмерные переменные активации модели удовлетворяют стандартной кинетике Ходжкина–Хаксли:

$$\frac{d\xi}{dt} = \alpha_\xi(V_i)(1 - \xi) - \beta_\xi(V_i)\xi, \quad (6)$$

где $\xi = n_i, m_i, h_i$. Конкретный вид нелинейных функций $\alpha_\xi(V_i)$ и $\beta_\xi(V_i)$ приведен в таблице.

Таблица

ξ	α_ξ	β_ξ
n_i	$0,024(V_i - 17) / (1 - e^{-(V_i - 17)/18})$	$0,2e^{-(V_i + 48)/35}$
m_i	$0,03(V_i + 28) / (1 - e^{-(V_i + 28)/15})$	$2,7e^{-(V_i + 53)/18}$
h_i	$0,045e^{-(V_i + 58)/18}$	$0,72 / (1 + e^{-(V_i + 23)/14})$

В простейшем случае, когда межклеточный объем принимается небольшим и пространственно однородным, баланс внеклеточной концентрации калия описывается одним уравнением:

$$W \frac{d[K]}{dt} = \frac{1}{F} \sum_i^N I_{i,K} + \gamma([K]_0 - [K]), \quad (7)$$

где W — удельная величина внеклеточного объема на единицу площади мембраны клетки; $I_{i,K}$ — калиевые токи каждого из N нейронов; $\gamma([K]_0 - [K])$ — выражение, описывающее диффузионный процесс выравнивания концентрации калия с окружающей средой. При вычислениях использовался следующий набор параметров: $V_{Na} = 60,5$ мВ, $V_l = -49,0$ мВ, $C_m = 1,0$ мкФ/см²; g_K , g_{Na} и g_l принимались равными 6,0, 350,0 и 0,5 мСм² соответственно; $R = 8,315$ Дж/(моль К),

$T = 293,15 \text{ K}$, $F = 96,49 \text{ кКл/моль}$, $[K]_i = 60,0 \text{ ммоль/л}$, $[K]_0 = 4,0 \text{ ммоль/л}$. $[K]$ — переменная модели, измеряется в ммоль/л; W имеет размерность нл/см²; γ — нл/(мс·см²).

Воздействие шумоподобного информационного сигнала (см. ниже, подраздел 2.3) на нейрон моделировалось с помощью шумовой добавки в токе I , характеризующей интенсивностью D с размерностью мкА²/см⁴:

$$I_i = I_{i,0} + \sqrt{D}\xi_i(t). \quad (8)$$

2.2. Модель Б: Расширенная версия нейрона Фитсхью–Нагумо

В работах [Postnov, 2009, 2012; Verisokin, 2018] предложено несколько вариантов модельной системы на основе широкоизвестной модели нейрона Фитсхью–Нагумо [FitzHugh, 1961; Izhikevich, 2007]. Структура модели и ее уравнения приведены на диаграмме рисунка 2.

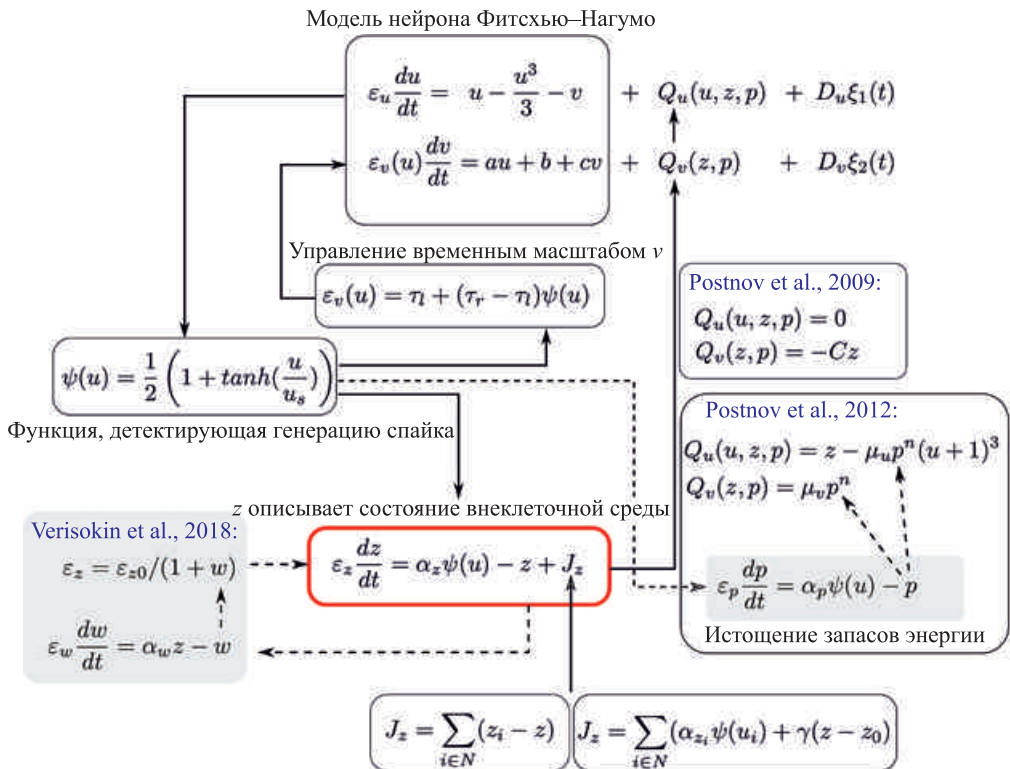


Рис. 2. Диаграмма, поясняющая взаимосвязь уравнений функциональной модели неизолированного нейрона. Серой заливкой выделены элементы, которые не рассматриваются в данной работе

Модель нейрона Фитсхью–Нагумо состоит из двух уравнений с сильно различающимися временными масштабами, первое из которых описывает быстрые движения на фазовой плоскости и может быть ассоциировано с динамикой мембранного потенциала нейрона, а второе характеризует относительно медленные процессы изменения проводимости ионных каналов. Предложенная «надстройка» модели заключается в добавлении уравнения для переменной z , которое упрощенно описывает баланс внеклеточной концентрации калия. С этой целью вводится нелинейная функция $\psi(u)$, которая принимает близкие к единице значения в ходе генерации спайка, при положительных u , и равна нулю во всех остальных случаях. Таким образом, переменная z получает приращение при каждом событии генерации спайка нейроном, а в их отсутствии — уменьшается, что качественно воспроизводит эффект работы натрий-калиевого насоса. Слагаемое J_z описывает другие источники притока либо оттока z и различается в зависимости от конфигурации исследуемой системы. Ключевым элементом модели является то, каким образом реализовано обратное влияние z на возбудимую подсистему. В модели Ходжкина–Хаксли основным эффектом заключается в том, что выброс калия во внеклеточное пространство имеет деполяризующий эффект по отношению к самому нейрону. В модели Фитсхью–Нагумо добиться похожего эффекта можно либо добавляя z в уравнение для u , либо вычитая его из уравнения для v . Оба эти варианта рассматривались в упомянутых выше работах и показали схожий эффект. Кроме того, в работе [Postnov, 2012] ставилась задача имитации и другого эффекта — потери возбудимых свойств нейроном при его длительной активности, что соответствует физиологической картине распространяющейся кортикальной депрессии. С этой целью в модель было добавлено еще одно уравнение для медленно меняющейся переменной p , а также эмпирически подобраны нелинейные функции Q_u , Q_v , обеспечивающие потерю свойств возбудимости модельным нейроном при его длительной активности. Наконец, в работе [Verisokin, 2018] был предложен способ учета авторегуляции объема клетки при существенном нарушении баланса ионов. А именно, существенный рост z приводит к уменьшению ε_z . В дальнейшем мы не рассматриваем расширения модели, выделенные серой заливкой, и ограничиваемся рассмотрением основного, трехмерного варианта, который и будем называть «модель Б».

Важной особенностью данной модели является зависимость постоянной времени медленной переменной v от текущего значения переменной u . А именно, положительным значениям u соответствует $\varepsilon_v = \tau_r$, а отрицательным $\varepsilon_v = \tau_l$, причем $\tau_r < \tau_l$. Это позволяет независимо менять характерное время генерации спайка и время — аналог времени реполяризации биологического нейрона.

Описанные выше модификации модели Фитсхью–Нагумо призваны привести в ее динамику черты, характерные для биологического нейрона. Закономерен вопрос, что можно считать мерой такой похожести? В работе [Verisokin, 2018] такое сопоставление проведено с использованием редукции исходных уравнений модели А до двумерного варианта способом, описанным в [Keener, 2009]. Переход к модели на фазовой плоскости позволяет использовать метод нульклин.

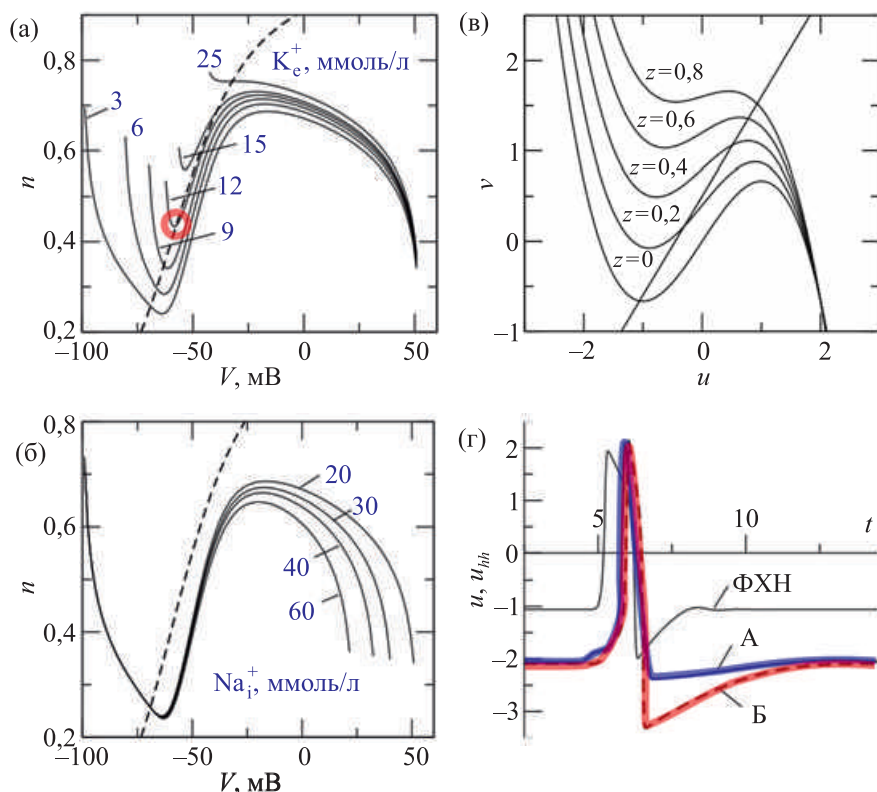


Рис. 3. Семейства нульклин двумерной редукции модели Ходжкина–Хаксли (а, б) и безразмерной модели Фитсхью–Нагумо (в). На панели (г) сопоставлены формы генерируемого спайка

На панелях (а, б) рисунка 3 можно видеть изменение во взаиморасположении нульклин для быстрой (мембранный потенциал V) и медленной (воротная переменная для тока калия n) переменных при различных значениях внеклеточной концентрации калия (а) и внутриклеточной концентрации натрия (б). Как можно видеть, рост концентрации калия приближает точку пересечения нульклин (т. е. состояние равновесия системы) к минимуму V -нульклин, что соот-

ветствует уменьшению порога возбудимости. Характерно, что безразмерная модель В (панель (в) демонстрирует очень похожее поведение при увеличении «замороженной» и превращенной в параметр переменной z : точка пересечения линейной и кубической нульклин перемещается на участок с положительной производной последней, что, как известно, соответствует переходу к автоколебательному режиму. Таким образом, переменная z безразмерной модели действительно играет роль аналога внеклеточной концентрации калия с точки зрения ее влияния на порог возбудимости нейрона. Анализ панели (б) позволяет заключить, что рост внутриклеточной концентрации натрия в диапазоне от 20 до 60 мМ крайне слабо влияет на состояние равновесия, однако заметно меняет правую часть кривой таким образом, что амплитуда генерируемого моделью спайка уменьшается.

Наконец, панель (г) позволяет сопоставить форму спайков, генерируемых обеими моделями. Как можно видеть из сравнения утолщенной и пунктирной линий, правильный подбор параметров τ_l и τ_r безразмерной модели дает форму импульса, весьма близкую к таковой у модели А. Так как поведение этих двух моделей — количественной и безразмерной — весьма схоже, ниже мы будем использовать обе модели, указывая для какой из них получен данный конкретный результат.

2.3. Синаптический шум

Типичный биологический нейрон *in situ* имеет от 1000 до 100 000 синаптических контактов [Abbott, Dayan, 2005]. По этой причине анализировать поведение модели нейрона при возбуждении его одиночным импульсом так же нереалистично, как и считать, что он висит в одиночестве в безграничной питательной среде. Ранее было предложено понятие о «синаптическом шуме» [Hubbard et al., 1967; Calvin, Stevens, 1967; Brunel et al., 2001]. Поэтому в обе описанные выше модели включены флуктуационные добавки. Применительно к рассматриваемым здесь моделям можно считать, что постоянно действующий шум есть имитация обрабатываемого им информационного сигнала, который по статистическим свойствам подобен шуму.

3. Одиночный неизолированный нейрон: «память спайка»

Главная особенность описанных выше моделей в том, что событие генерации спайка модельным нейроном на какое-то время меняет уровень его возбудимости.

Так, в модели А ток калия за время генерации спайка увеличивает его внеклеточную концентрацию обратно пропорционально объему W . В модели Б тот же процесс упрощенно представлен накоплением переменной z пропорциональ-

но времени нахождения модельного нейрона в возбужденном состоянии, причем роль доступного внеклеточного объема играет параметр ε_z . Далее, возросший уровень внеклеточной концентрации калия приводит к изменению равновесного потенциала по калию V_K , что, в свою очередь, увеличивает значение потенциала покоя и, тем самым, деполяризует модельный нейрон, облегчая генерацию последующего импульса. В безразмерной модели Б этот процесс представлен включением переменной z в уравнение для v [Postnov, 2009] или u [Postnov, 2012], что приводит к схожему эффекту — порог возбудимости уменьшается до тех пор, пока исходные значения концентрации калия (или переменной z в модели Б) не восстановятся.

При возбуждении модели одиночным импульсом и в отсутствие шума описанные выше механизмы себя практически не проявляют. Однако наличие шумового сигнала на входе кардинально меняет ситуацию: модельный нейрон демонстрирует выраженную тенденцию к генерации последовательности спайков различной длительности — основным режимом становится спайк-берст режим. На рисунке 4 даны характеристики и механизм такого поведения применительно к модели Б.

Панель (а) рисунка 4 схематично показывает рассматриваемую конфигурацию: одиночный нейрон взаимодействует с некоторым прилегающим к нему объемом. Панель (б) показывает зависимость вероятности генерации очередного спайка в зависимости от его номера в генерируемой последовательности для различной интенсивности шума в условиях, когда самый первый спайк запускается в заданное время коротким деполяризующим импульсом [Postnov, 2010].

Вероятность первого спайка $p_s(1) = 1$, так как он индуцирован стимулом. Если предположить, что каждый последующий спайк появляется с одинаковой (зависящей от шума) вероятностью p_s^* , то для n -го всплеска следует ожидать $p_s(n) = p_s^{*(n-1)}$. Предполагая, что p_s^* не зависит от n , оценим его как равное $p_s(2)$. Тогда указанная гипотеза дает предсказание спада вероятности появления спайка с увеличением его номера. На рисунке эта гипотеза отражена прямыми линиями 11, 12 и 13, которые соответствуют $D = 0,002, 0,004$ и $0,008$.

Очевидно, эта гипотеза не работает. Вместо этого после 5–6 всплесков процесс показывает ожидаемые характеристики, но с существенно меньшим наклоном (линии k_1, k_2 и k_3). Таким образом, $p_s > p_s(2)$: если уже сгенерированы первые 4–6 спайков в последовательности, то последующие появляются с большей вероятностью.

Такое поведение есть следствие накопления калия (соответствующей ему переменной z) в окружающем нейрон пространстве. После генерации нескольких спайков достигается стационарное распределение z , и условная вероятность $(n+1)$ -го всплеска снова становится независимой от n .

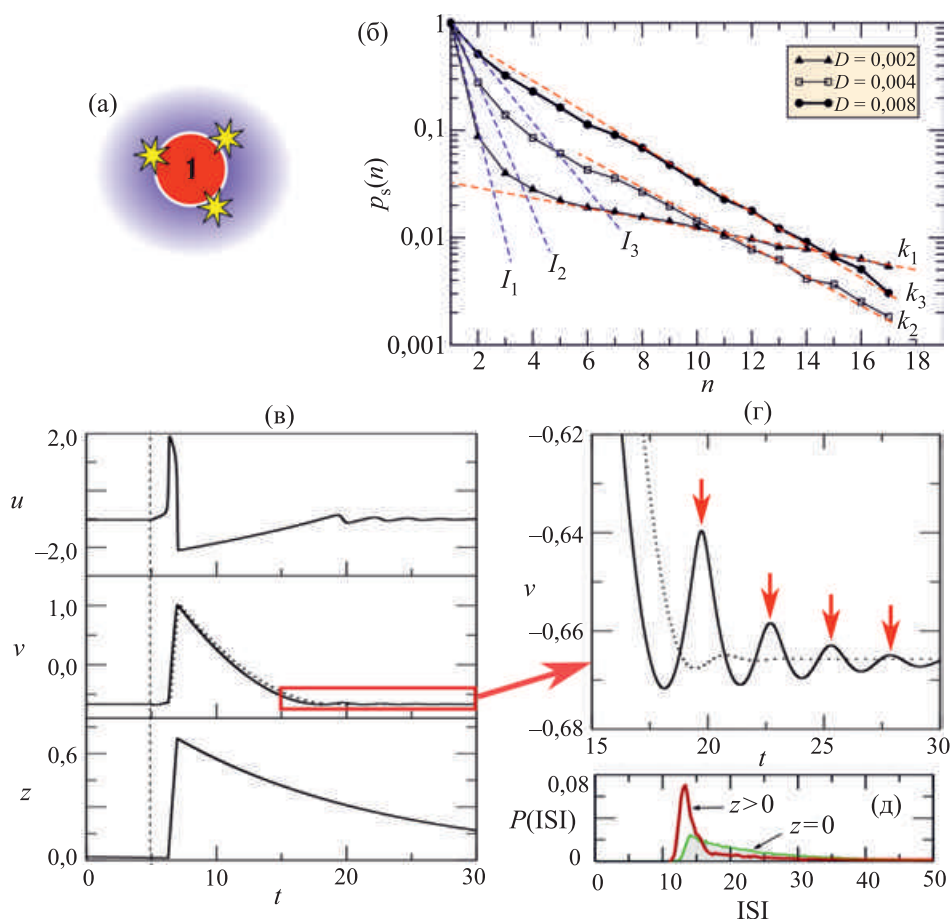


Рис. 4. Модель Б. Вероятность появления очередного спайка в последовательности. Наличие окружающей среды увеличивает вероятность длинных последовательностей спайков и структурирует процесс их генерации во времени

Интересно, что наклон прямой k_1 значительно меньше, чем наклон для k_2 и k_3 . Парадоксальным образом, более слабый шум способствует генерации более длинных последовательностей спайков. Это можно объяснить, если принять во внимание, что шум может не только деполяризовать, но и гиперполяризовать нейрон и, тем самым, прекратить генерацию. В случае более слабого шума $D = 0,002$ деполяризующее действие среды относительно сильнее и поддерживает более длинные последовательности спайков.

Панели (в), (г) и (д) рисунка 4 вскрывают детали описанного выше процесса. Здесь сопоставляются два случая: когда действие внешней среды влияет на процесс ($z > 0$) и когда оно искусственно заблокировано ($z = 0$). Как можно видеть, траектории переменных модели в этих двух случаях похожи, однако де-

тальный анализ участка реполяризации (панель (г) позволяет увидеть различие). Каждый локальный максимум переменной v (отмечены красными стрелками) — это момент, провоцирующий генерацию следующего спайка при наличии в системе шума. Панель (д) показывает, к чему это приводит с точки зрения распределения межспайковых интервалов (ISI): в случае $z > 0$ имеется выраженный максимум ISI, значение которого соответствует генерации последующего спайка на первом или втором пике деполяризации.

Описанное выше поведение хорошо коррелирует с представлениями о нейронах-резонаторах [Izhikevich, 2000], к классу которых относятся прототипы обеих рассматриваемых моделей.

4. Два нейрона рядом: взаимно обусловленные спайки и конкуренция каналов связи

Как мы видели, для модели одиночного нейрона главный эффект заключается в самодеполяризации и облегчении генерации последующего спайка. Заметим, что это может произойти только после окончания состояния рефрактерности нейрона. Однако внеклеточная концентрация калия за это время также падает существенно, что ослабляет эффект. По-иному ситуация складывается, если рассмотреть два нейрона, взаимодействующих с одним и тем же элементом объема межклеточного пространства (рис. 5, а). В этом случае выброс калия одним из нейронов немедленно деполяризует соседний нейрон и легко вызывает его отклик. На рисунке 5 показано, как выглядит такой процесс для модели А. Для сравнения, на панели (б) приведены временные реализации мембранных потенциалов для случаев, когда внеклеточная концентрация калия постоянна (достигается выбором достаточно большого значения y). Как можно видеть, при выбранной интенсивности шума спайки редки и возникают независимо в двух нейронах.

На панели (в) приведены временные реализации переменных в случае существенной модуляции внеклеточной концентрации калия (150–200 % от базального уровня, для значений всех параметров модели (см. [Postnov, 2006, 2007])). При той же интенсивности шума активность обоих нейронов значительно выше, спайков больше и они организованы в пачки-берсты, как и в одиночной модели. Если рассмотреть детали появления спайков внутри такой пачки (панель (г)), то обнаружится, что, как правило, спайк одного из нейронов вызывает ответный спайк соседа с задержкой в 3–5 мс, это время нужно, чтобы успела вырасти внеклеточная концентрация калия, создающая «окно деполяризации» как описано в предыдущем разделе. При этом, в условиях слабого шума (когда спайки относительно редки) оба нейрона легко меняются местами, как показано на рисунке — «отстающий» нейрон становится лидирующим и наоборот. В итоге, статистика межспайковых интервалов такого ансамбля обо-

гашается пиками на временах $\Delta t = 3 - 5$ мс — это время задержки между спайками, а также комбинационными временами $ISI \pm \Delta t$, где ISI — типичный межспайковый интервал одиночного нейрона.

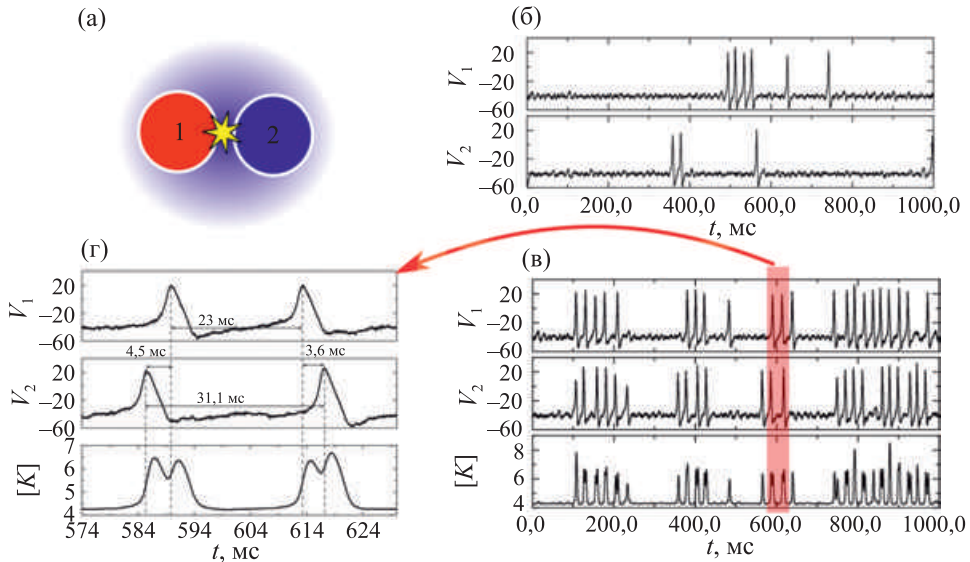


Рис. 5. Модель А. Каждый из двух расположенных рядом нейронов, генерируя спайк, увеличивает вероятность такого же события у соседа

Если возбуждать генерацию спайков не шумом, а постоянным деполяризующим током одинаковым или различным для двух нейронов, то паттерн генерации спайков оказывается существенно иным. На панели (в) рисунка 6 приведена диаграмма режимов, которая показывает, что при слабом диффузионном обмене с внешней средой-«ванной» (область малых γ) нейроны предпочитают генерировать спайки в противофазе.

По мере увеличения γ наблюдается жесткий переход от противофазного к синфазному режиму, довольно сложно устроенный с точки зрения бифуркационных переходов (для деталей см. [Postnov, 2006]), а далее — область синхронной генерации спайков имеет максимальную ширину при некотором оптимальном значении γ .

В ряде ситуаций соседние нейроны взаимодействуют посредством так называемых электрических синапсов — (электротоническая) связь. Математически такое взаимодействие описывается аналогично закону Ома: перетекающий между нейронами 1 и 2 ток пропорционален проводимости и разности мембранных потенциалов: $J_{12} = g_g (V_1 - V_2)$. Этот дополнительный ток добавляется в уравнения для мембранных потенциалов.

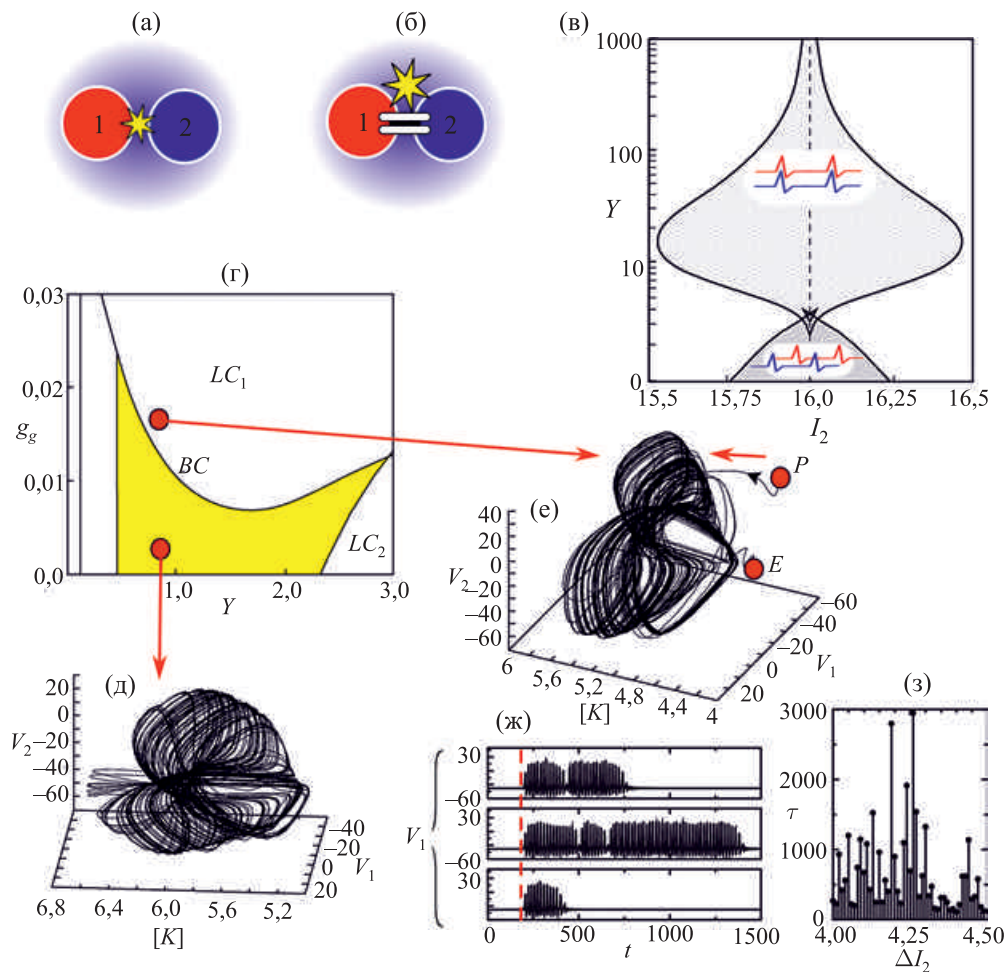


Рис. 6. Модель А. В пейсмейкерном режиме при отсутствии шума два соседствующих нейрона демонстрируют синхронизацию в противофазе, как только связь через внеклеточное пространство становится достаточно сильна (область малых γ). Наличие одновременно как электротонической связи посредством электрических синапсов, так и взаимодействия через концентрацию калия в межклеточном пространстве кардинально меняет режим генерации двух близкорасположенных нейронов. Пейсмейкерный режим становится хаотическим, а возбудимому режиму соответствует движение по траектории седлового хаотического множества с непредсказуемой длительностью отклика. На рисунке все потенциалы даны в мВ, концентрации в ммоль/литр, а время — в мс

Так как наличие электрических синапсов автоматически предполагает малое расстояние между мембранами, а значит — сильную модуляцию внеклеточных концентраций ионов, интересно рассмотреть ситуацию, в которой действу-

ют оба канала взаимодействия. Такой анализ выполнен в работе [Postnov, 2006], наиболее интересный результат которого следующий:

- при достаточно сильном разбросе значений приложенных токов два калий-связанных нейрона переходят в режим хаотического аттрактора;
- попытка стабилизировать (привести к регулярной генерации) этот режим посредством введения электротонической связи приводит к исчезновению хаотического аттрактора путем кризиса — аналога гомоклинической бифуркации;
- выше линии указанного кризиса оба нейрона находятся в возбуждимом режиме, не демонстрируя спонтанных колебаний, однако их реакция на стимуляцию коротким импульсом разительно отличается от «нормальной»: малые изменения в амплитуде приложенного стимула приводят к скачкообразным и немонотонным изменениям длительности отклика.

Все вышесказанное иллюстрируют панели (б), (г)–(з) рисунка 6. В частности, на панели (г) приведена диаграмма на плоскости параметров $\gamma - g_g$, где закрашенная область соответствует хаотическому режиму, а два кружка — избранным режимам, фазовые траектории для которых показаны на панелях (д) и (е) соответственно. На панели (д) можно видеть устойчивый (в смысле притягивающего множества) хаотический режим, тогда как панель (е) визуализирует хаотическое седло [Grebogi, 1987] на примере траектории, выпущенной из точки P и завершившейся приходом к состоянию равновесия E . В силу структуры такого непритягивающего хаотического множества, малейшее смещение начальной точки может привести к значительному изменению траектории от P до E , панели (ж) и (з) рисунка. Для наблюдателя это будет выглядеть как практически непредсказуемая реакция такой системы на внешний стимул при его малейших отклонениях от «стандарта». Широко известный принцип отклика нейронных систем «все или ничего» оказывается совершенно не применим в рассмотренной ситуации.

5. Несколько нейронов в близком соседстве: коллективный разряд и пространственно упорядоченные паттерны генерации

Если участки мембран нескольких нейронов граничат с одним и тем же элементом межклеточного пространства, можно говорить об их глобально связанном ансамбле (связь типа «каждый с каждым»). Очевидно, такая модель реалистична для ограниченного числа нейронов. В работе [Postnov, 2007] рассмотрен случай 4 и 8 нейронов, каждый из которых возбуждается собственным источником шума (см. рис. 7).

Как и для 2 нейронов, первый же индуцированный шумом спайк вызывает рост концентрации калия в общем пространстве, что резко увеличивает вероят-

ность генерации последующих. Второй спайк усиливает эффект. В результате все нейроны ансамбля разряжаются за небольшой промежуток времени — происходит их *индуцированный шумом коллективный разряд*. При этом наблюдаются как минимум два сценария, проиллюстрированные на панели (б) рисунка. Слева показан вариант, при котором отклики на первый спайк возникают подобно рассмотренному выше случаю двух нейронов, с отставанием от нейрона-лидера на 3–5 мс, и выстраиваются в хорошо видимую последовательность. Поскольку нейронов больше, чем два, то результирующая деполяризация сильнее, и первые два нейрона успевают выдать по два спайка. Второй сценарий, показанный справа на панели (б), наблюдается, когда первый спайк возникает почти одновременно в двух нейронах. Это вызывает удвоенный всплеск концентрации калия и остальные нейроны разряжаются практически одновременно.

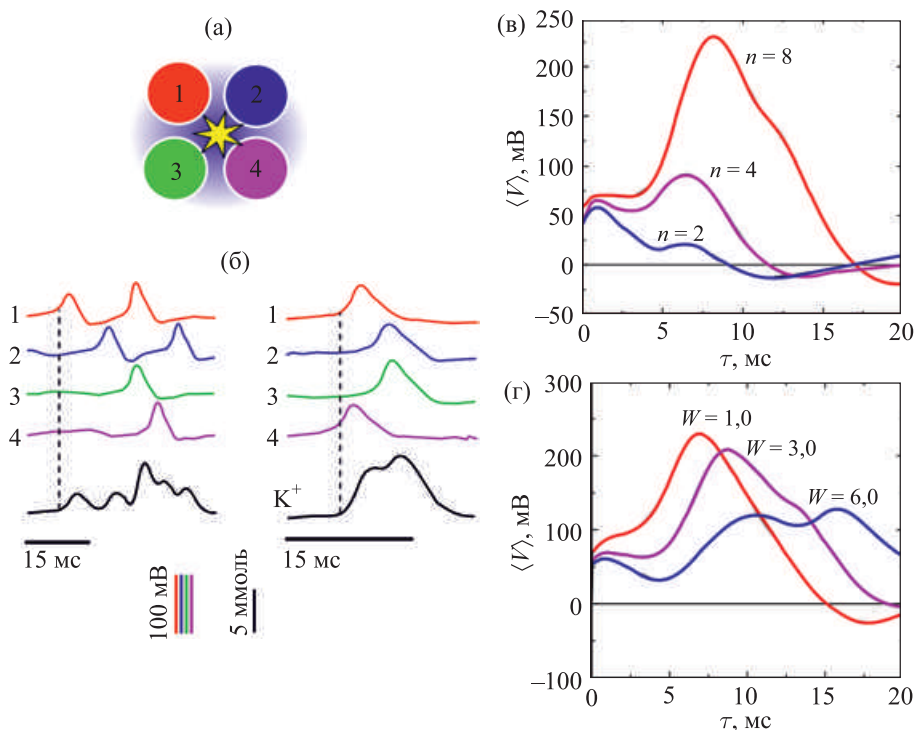


Рис. 7. Модель А. Индуцированный шумом коллективный разряд глобально связанного ансамбля нейронов

Панели (в) и (г) рисунка 7 показывают зависимость усредненного по большому числу коллективных разрядов суммарного электрического потенциала (аналог внеклеточной записи) от количества нейронов (в) и от объема общего межклеточного пространства (г). Стартовые точки на графиках одинаковы, так

как отрезки для усреднения выбирались от начала первого спайка. Очевидно, что увеличение числа нейронов, равно как и уменьшение объема общего межклеточного пространства, способствует формированию более выраженного и компактного во времени коллективного разряда.

Следует отметить, что упрощенная и безразмерная модель Б в равной степени воспроизводит описанные выше и подобные эффекты, поскольку их механизм основан на сочетании действия флуктуаций и наличия положительной обратной связи, когда каждый нейронный спайк поддерживает дальнейшую их генерацию. Рисунок 8 иллюстрирует более сложное, чем коллективный разряд, поведение ансамбля из четырех нейронов, которое возникает, когда попарное влияние нейронов сильнее, чем связь через общее пространство.

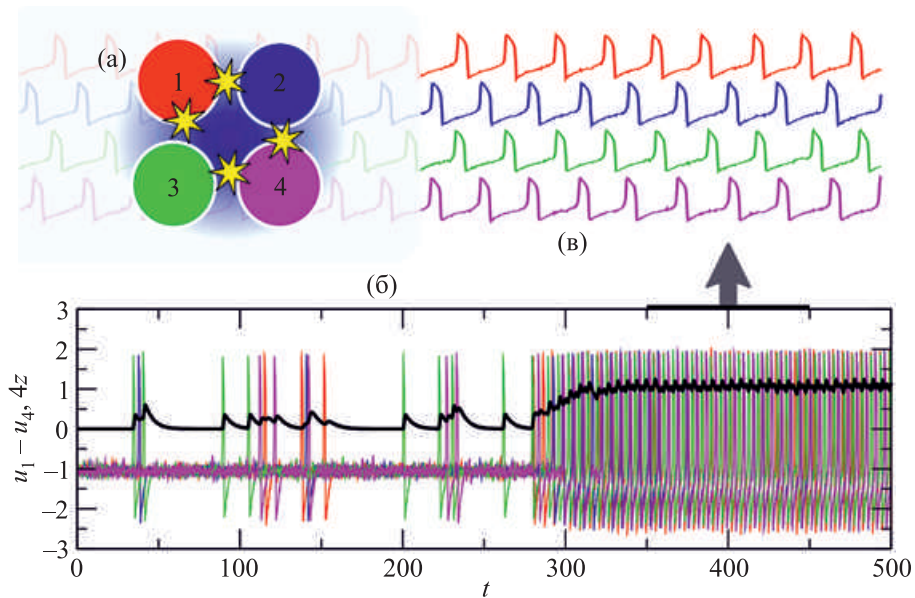


Рис. 8. Модель Б. Спонтанно возникший пространственно-упорядоченный режим генерации импульсов в ансамбле из 4 нейронов

При компактном расположении четырех клеток на ограниченном пространстве расстояние между их мембранами будет неизбежно меньше, нежели характерный размер просвета в центре. Поэтому, помимо рассмотренного выше ансамбля с глобальной связью имеет смысл рассмотреть и случай, когда модельные нейроны объединены как центральным объемом, так и попарными связями, как показано на панели (а) рисунка. Такая конфигурация исследовалась как для модели А [Postnov, 2008], так и для модели Б [Verisokin, 2018], которая и обсуждается ниже. На панели (б) приведены графики для переменных нейро-

нов u_{1-4} , а также для переменной z (напомним, это аналог концентрации калия) в центре ансамбля. Как и ранее, на каждый из модельных нейронов действует свой источник шума.

Начальный этап соответствует всему тому, что обсуждалось выше, — спайки нейронов группируются в нерегулярные пачки, каждой из которых соответствует умеренный рост графика z . Однако в момент времени $t = 280$ режим всей системы кардинально изменяется, последовательность спайков становится непрерывной, а график z растет до уровня, гораздо большего, чем всплески ранее. Детальный анализ порядка следования спайков (панель (с)) показывает, что это не случайная генерация, а упорядоченная последовательность. В показанном случае нейроны разряжаются попарно: 1 и 3 одновременно, затем 2 и 4, затем снова 1 и 3.

Объяснение такого упорядоченного поведения заключается в том, что при столь высокой степени деполяризации нейронов (высокий уровень z) они готовы генерировать спайки непрерывно, так, как если бы изначально находились в режиме спонтанной генерации. В этих условиях паттерн генерации самоорганизуется так, как было рассмотрено выше для двух нейронов на рисунке 6, панель (с), — каждая пара производит спайки в противофазе. Однако в работе [Postnov, 2008] была продемонстрирована и другая ситуация — когда разряд нейронов происходит последовательно, по шаблону «-1-2-3-4-1-». Когда такой режим установился, вспышка каждого из нейронов деполяризует обоих соседей, но, так как один из них недавно сам сгенерировал спайк и все еще находится в состоянии рефрактерности, возбуждение передается однонаправленно.

Описанные выше паттерны генерации импульсов высоко упорядочены и, как кажется, должны бы существовать бесконечно долго. В действительности время их жизни неопределенно велико, но конечно. В работе [Postnov, 2010] было показано, что такая упорядоченная генерация может разрушиться так же неожиданно, как возникла. Для этого достаточно, чтобы один из спайков последовательности произошел «не в такт» в силу особенно «неудачного» значения шумовой добавки в уравнения одного из модельных нейронов.

6. От ансамблей к дискретно-непрерывной активной среде: пятна активности, бистабильные фронты и автономные пейсмекеры

В предыдущих разделах были рассмотрены простейшие конфигурации, в которых проявляются особенности поведения калий-связанных нейронов. Естественный следующий шаг — вооружась пониманием механизмов этих эффектов, обобщить модель на случай неопределенно большого количества нейронов, что хорошо соответствует, например, слою клеток, выращенных в чашке Петри. Важно, что такая модель не сводится к традиционным моделям непрерывных

активных сред, так как в них не реализуется одно из основных предположений, лежащих в основе нашего рассмотрения, — способность каждого нейрона генерировать спайки самостоятельно и независимо от соседей (например, в противофазе). Реальная культура нейронов дискретна, но связана непрерывным межклеточным пространством. Именно такой и должна быть наша модель. Применительно к модели Б это означает, что имеется решетка активных элементов (переменные u_{ij} , v_{ij} , где индексы i и j задают позицию элемента), а также непрерывное пространство для переменной z , которое, однако, также удобно при расчетах дискретизовать с шагом, привязанным к нейронам. Пространственное взаимодействие осуществляется исключительно за счет перетоков z между ячейками. Такая структура схематично изображена на панели (а) рисунка 9.

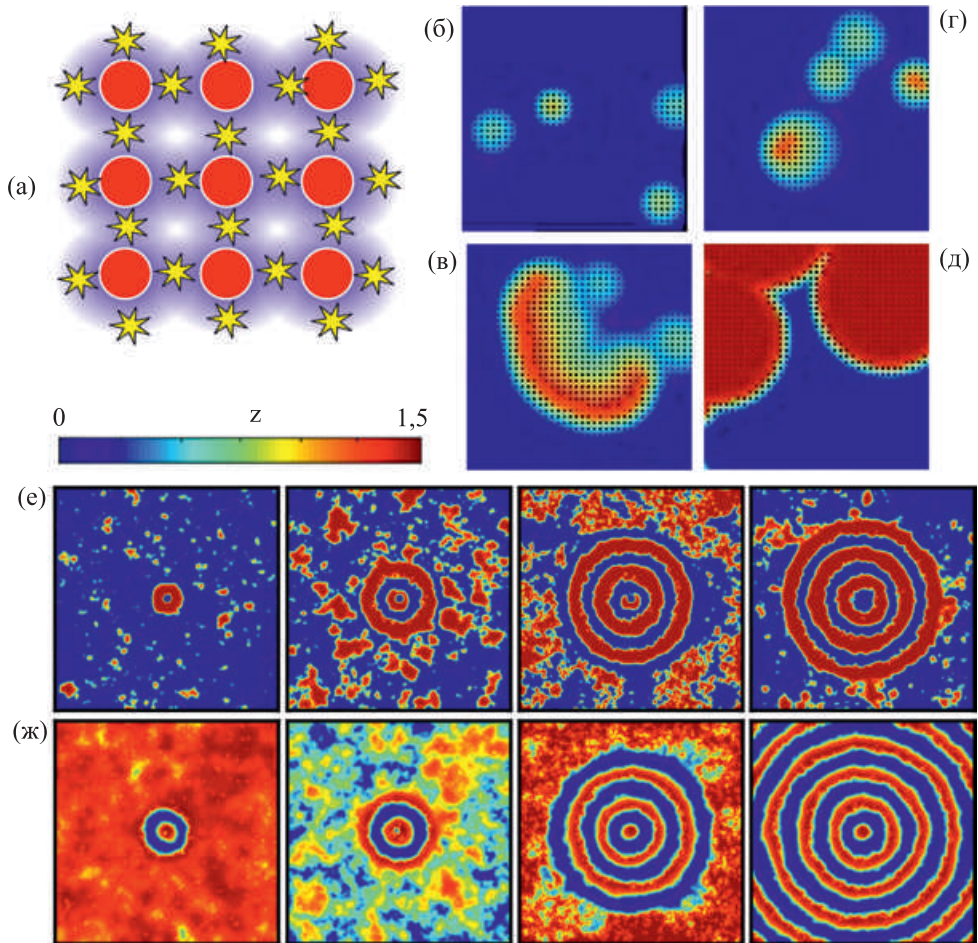


Рис. 9. Формирование индуцированного шумом автономного пейсмекера в бистабильной среде

Так как нейронов много (на панелях (б)–(д) рисунка 9 их видно как темные точки), то имеет смысл следить за пространственно-временным распределением z , которое отражает уровень их активности. Наиболее типичные режимы такой системы исследованы в работах [Postnov, 2009; Verisokin, 2017; Verisokin, 2018]. При не слишком большой диффузии, медленной локальной диссипации z и относительно слабом шуме активность имеет форму долгоживущих неподвижных пятен, как на панели (б) рисунка. При более сильном шуме может возникнуть ситуация, когда такое пятно начинает двигаться в сторону еще не охваченной активностью части среды, так как в «тылу» нейроны длительно находятся в состоянии рефрактерности и не торопятся восполнять убыль z . Такие структуры могут быть долгоживущими и перемещаться на значительные расстояния (панель (г)). Однако при исчезновении шума они немедленно исчезают, так как среда является субвозбудимой и не поддерживает волновую активность сама по себе.

Классические волны в возбудимой среде здесь также присутствуют. Они возникают в том случае, когда диффузии переменной z в какую-либо ячейку самой по себе достаточно, чтобы вызвать спайк расположенного там нейрона (панель (в)).

Наиболее интересной особенностью пространственно-временной динамики такой модельной среды является ее свойство демонстрировать как возбудимое поведение, так и бистабильность, в зависимости от достигнутого уровня z . На панели (д) рисунка 9 видно, как фронты переключения в состояние максимально высокой активности (красным) захватывают модельное пространство и обратного перехода не наблюдается. Интересно, что тенденция к бистабильному поведению при включении в описание нейрона изменяющихся ионных концентраций была продемонстрирована на примере оригинальной модели Ходжкина–Хаксли в работе [Hubel, 2014]. Таким образом, это не «вычислительная экзотика», но реальный тип поведения для нейронной среды, правда, в довольно экстремальных условиях.

Бистабильная динамика, т. е. возникновение и движение фронтов переключения между двумя устойчивыми состояниями, порождает особенно интересные пространственно-временные режимы при взаимодействии с границами среды.

В двух нижних рядах панелей рисунка 9 как показательный пример проиллюстрировано формирование индуцированного шумом автономного пейсмейкера — источника кольцевой волновой структуры высокой регулярности. Обычно такие структуры возникают в возбудимых или автоколебательных средах за счет наличия лидирующего центра — одного или нескольких элементов, имеющих некоторое преимущество: меньший порог возбуждения, либо более высокую частоту спонтанной генерации. В рассмотренном случае, однако, среда одно-

родна и находится под воздействием пространственно-некоррелированного шума одинаковой интенсивности в каждой точке. Однако в центре присутствует островок-«дефект», в пределах которого z зафиксировано на низком уровне (панели ряда (е)), либо на высоком уровне (панели ряда (д)).

На примере (е) исходно все нейроны неактивны и z мало (синий цвет). Шум порождает множество расширяющихся зон высокой активности (красным). Волна высокой активности доходит до островка — и «отражается» от него, меняя направление на противоположное (детальный анализ явления дан в [Müller, 2011]). Распространяющаяся отраженная кольцевая волна переустанавливает нейроны в низкий уровень активности, «зачищая» все в своем тылу. Однако шум вновь генерирует пятна активности и процесс повторяется. Как можно видеть на рисунке, описанный механизм работает при довольно высоком уровне шума. Самый нижний ряд панелей (ж) показывает, что аналогичный механизм работает и в том случае, если островок в центре переустанавливает среду в состояние с высоким уровнем активности.

7. Перспективы

Очевидная и весьма привлекательная область применения описанных выше систем — это моделирование физиологии нейронов мозга. Физиологам достаточно давно известно, что именно выброс калия в межклеточное пространство лежит в основе формирования очагов активности при эпилепсии [Bazhenov, 2004], распространения кортикальной депрессии [Charles, 2013], мигрени с аурой [Dahlem, 2013], волн деполяризации при инсультах и травмах [Eikermann, 2014]. В этой связи описанный модельный подход представляется весьма адекватным. Следует, однако, помнить, что клеточные структуры мозга устроены куда сложнее, чем просто большая популяция нейронов. Нейроны — не самые многочисленные клетки в тканях мозга, их значительно превосходят числом глиальные клетки-астроциты, в функции которых входит, в числе прочего, контроль за концентрацией ионов калия и перераспределение их по сети. Главным действующим лицом при кортикальной депрессии и мигрени является не отдельный нейрон сам по себе, но так называемая нейроваскулярная единица, которая включает нейрон, контактирующий с ним астроцит, а также участок кровеносного сосуда. Известные к настоящему времени разработки модели нейроваскулярной единицы содержат несколько десятков дифференциальных уравнений и вряд ли могут считаться простыми физическими моделями. Разработка биофизической модели нейроваскулярной единицы приемлемой сложности, пригодной для содержательного анализа динамики, но сохраняющей связь с основными физиологическими характеристиками — вот настоящий вызов для продолжения работ в этой области.

8. Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность всем соавторам работ, на основе которых написана эта глава: Е. Mosekilde (Датский технический университет), О. Sosnovtseva (Ун-т Копенгагена, Дания), L. Shimansky-Geier и F. Muller (Гумбольдский университет, Берлин), А. Верисокин и Д. Вервейко (Курский государственный университет), Л. Рязанова, Р. Жирин, Ю. Сердобинцева (Саратовский государственный университет).

Литература

- Бажанова М. В., Крылова Н. П., Казанцев В. Б., Храмов А. Е., Лобов С. А. Синхронизация в сети импульсных нейронных генераторов с пластичными связями // Изв. вузов. Радиофизика. — 2020. — Т. 63. — С. 330–343.
- Постнов Д. Э., Жирин Р. А., Сердобинцева Ю. А. Индуцированные шумом когерентные режимы генерации в малых ансамблях нейронов с ионной связью // Известия вузов. Прикладная нелинейная динамика. — 2008. — Т. 16, № 4.
- Abbott L. F., Dayan P. Theoretical neuroscience: computational and mathematical modeling of neural systems. — MIT press, 2005.
- Agnati L. F. et al. Intercellular communication in the brain: wiring versus volume transmission // Neuroscience. — 1995. — Vol. 69, No. 3. — P. 711–726.
- Charles A. C., Baca S. M. Cortical spreading depression and migraine // Nature Reviews Neurology. — 2013. — Vol. 9, No. 11. — P. 637.
- Bazhenov M. et al. Potassium model for slow (2–3 Hz) in vivo neocortical paroxysmal oscillations // J. of neurophysiology. — 2004. — Vol. 92, No. 2. — P. 1116–1132.
- Brunel N. et al. Effects of synaptic noise and filtering on the frequency response of spiking neurons // Phys. Rev. Lett. — 2001. — Vol. 86, No. 10. — P. 2186.
- Calvin W. H., Stevens C. F. Synaptic noise as a source of variability in the interval between action potentials // Science. — 1967. — Vol. 155, No. 3764. — P. 842–844.
- Dahlem M. A., Isele T. M. Transient localized wave patterns and their application to migraine // The Journal of Mathematical Neuroscience. — 2013. — Vol. 3, No. 1. — P. 1–28.
- Dahlem M. A. et al. Understanding migraine using dynamic network biomarkers //Cephalalgia. — 2015. — Vol. 35, No. 7. — P. 627–630.
- Eikermann□Haerter K. Spreading depolarization may link migraine and stroke // Headache: The Journal of Head and Face Pain. — 2014. — Vol. 54, No. 7. — P. 1146–1157.
- Feng J. (ed.). Computational neuroscience: a comprehensive approach. — CRC press, 2003.
- FitzHugh R. Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane // Biophysical J. — 1961. — Vol. 1, No. 6. — P. 445–466.
- Grebogi C., Ott E., Yorke J. A. Basin boundary metamorphoses: changes in accessible boundary orbits // Nuclear Physics B-Proceedings Supplements. — 1987. — Vol. 2. — P. 281–300.

- Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // *The J. of Physiology*. — 1952. — Vol. 117, No. 4. — P. 500–544.
- Hodgkin A. L., Huxley A. F. Propagation of electrical signals along giant nerve fibres // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*. — 1952. — Vol. 140, No. 899. — P. 177–183.
- Hubbard J. I., Stenhouse D., Eccles R. M. Origin of synaptic noise // *Science*. — 1967. — Vol. 157, No. 3786. — P. 330–331.
- Hübner N., Schöll E., Dahlem M. A. Bistable dynamics underlying excitability of ion homeostasis in neuron models // *PLoS Comput. Biol.* — 2014. — Vol. 10, No. 5. — P. e1003551.
- Izhikevich E. M. Neural excitability, spiking and bursting // *International Journal of Bifurcation and Chaos*. — 2000. — Vol. 10, No. 06. — P. 1171–1266.
- Izhikevich E. M. *Dynamical systems in neuroscience*. — MIT press, 2007.
- Keener J. P., Sneyd J. *Mathematical physiology 1: Cellular physiology*. — 2009.
- Laming P. R. Potassium signalling in the brain: its role in behaviour // *Neurochemistry international*. — 2000. — Vol. 36, No. 4–5. — P. 271–290.
- Lecar H. Morris-lecar model // *Scholarpedia*. — 2007. — Vol. 2, No. 10. — P. 1333.
- Lindner B. et al. Effects of noise in excitable systems // *Physics Reports*. — 2004. — Vol. 392, No. 6. — P. 321–424.
- Lobov S. A. et al. Competitive learning in a spiking neural network: towards an intelligent pattern classifier // *Sensors*. — 2020. — Vol. 20, No. 2. — P. 500.
- Müller F., Schimansky-Geier L., Postnov D. E. Interaction of noise supported Ising–Bloch fronts with Dirichlet boundaries // *Ecological Complexity*. — 2013. — Vol. 14. — P. 21–36.
- Nicholson C., Syková E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis // *Trends in neurosciences*. — 1998. — Vol. 21, No. 5. — P. 207–215.
- Schwiening C. J. A brief historical perspective: Hodgkin and Huxley // *The J. of Physiology*. — 2012. — Vol. 590, No. Pt 11. — P. 2571.
- De Schutter E. Why are computational neuroscience and systems biology so separate? // *PLoS Comput. Biol.* — 2008. — Vol. 4, No. 5. — P. e1000078.
- Shilnikov A., Kolomiets M. Methods of the qualitative theory for the Hindmarsh–Rose model: A case study — a tutorial // *International Journal of Bifurcation and Chaos*. — 2008. — Vol. 18, No. 08. — P. 2141–2168.
- Tsumoto K. et al. Bifurcations in Morris–Lecar neuron model // *Neurocomputing*. — 2006. — Vol. 69, No. 4–6. — P. 293–316.
- Syková E. Extracellular K⁺ accumulation in the central nervous system // *Progress in biophysics and molecular biology*. — 1983. — Vol. 42. — P. 135–189.
- Syková E., Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space // *Physiological reviews*. — 2008. — Vol. 88, No. 4. — P. 1277–1340.
- Postnov D. E., Ryazanova L. S., Mosekilde E., Sosnovtseva O. V. Neural synchronization via potassium signaling // *International Journal of Neural Systems*. — 2006. — Vol. 16, No. 2. — P. 99–109.

- Postnov D. E., Ryazanova L. S., Zhirin R. A., Mosekilde E., Sosnovtseva O. V. Noise controlled synchronization in potassium coupled neural models // *International Journal of Neural Systems*. — 2007. — Vol. 17, No. 2. — P. 105–113.
- Postnov D. E., Muller F., Schuppner R. B., Schimansky-Geier L. Dynamical structures in binary media of potassium-driven neurons // *Phys. Rev. E*. — 2009. — Vol. 80. — 031921 (12 p.).
- Postnov D. E., Chetverikov A. P., Postnov D. D. Stimulus-induced response patterns of medium-embedded neurons // *Eur. Phys. J.* — 2010. — Special Topics 187. — P. 241–253.
- Postnov D. E., Postnov D. D., Schimansky-Geier L. Self-terminating wave patterns and self-organized pacemakers in a phenomenological model of spreading depression // *Brain Research*. — 2012. — Vol. 1434. — P. 200–211.
- Verisokin A. Y. et al. Noise-sustained patterns in a model of volume-coupled neural tissue // *Chaos: An Interdisciplinary Journal of Nonlinear Science*. — 2018. — Vol. 28, No. 10. — P. 106326. — DOI: 10.1063/1.5039854
- Verisokin A. Yu., Verveiko D. V., Postnov D. E. Turing-like structures in a functional model of cortical spreading depression // *Phys. Rev. E*. — 2017. — Vol. 96. — P. 062409.
- Zoli M. et al. The emergence of the volume transmission concept // *Brain Research Reviews*. — 1998. — Vol. 26, No. 2–3. — P. 136–147.

Mathematical models of potassium-coupled neurons

D. E. Postnov

Saratov National Research State University named after N. G. Chernyshevsky, Saratov, Russia
E-mail: postnov@info.sgu.ru

Computational neuroscience typically operates with a family of mathematical models based on the isolated neuron paradigm, which assumes an environment with constant ionic composition (a bath). Such a condition is impracticable in a living system, the communication of neurons by means of various substances in the intercellular space is known as «volume transmission» and underlies such phenomena as spreading cortical depression or waves of neural hyperactivity in migraine. Thus, there is an urgent task to propose simple models of neurons, which take into account intercellular communication. This work is devoted to the solution of this problem. Using two well-known model systems of different levels (one is based on the Hodgkin–Huxley model and another — on Fitzhugh–Nagumo system), it is shown how taking into account changes in the extracellular potassium concentration affects the dynamics of a hierarchical set of model systems: from a single neuron to a discrete-continuous active medium.

Keywords: neuron models, extracellular potassium, depolarization waves, excitable-bistable active medium, volume transmission.

РАЗМЫШЛЕНИЯ О ВОЗМОЖНОМ БУДУЩЕМ (КУДА И КАК ИДЕМ?)

А. С. Соболев¹

Автор фокусируется на сфере своих научных интересов и выделяет два направления исследований, которые могут быть перспективными с его точки зрения: (i) экспериментальное подтверждение/опровержение предсказанного теоретически влияния изменяемых размеров пространства в живой клетке на скорость реакций, которые в нем протекают; (ii) обнаружение/создание макромолекул, способных к эффективному и избирательному проникновению через плазматическую мембрану различных заранее определенных клеток-мишеней в их гиалоплазму. Автор указывает на две проблемы, которые препятствуют научному прогрессу (i) в настоящее время: отсутствие обратной связи между соискателем проекта и его экспертами в процессе оценки грантовой заявки, и (ii) исторически: отсутствие глубоко укоренившейся потребности в фундаментальной науке в обществе.

Ключевые слова: будущее науки, биологические мембраны, фракталы, размерность пространства мембраны, клетка-мишень, нанотранспортер, экспертная оценка, потребность в познании природы.

«Будущее управляет нашим сегодняшним днем»².
Фридрих В. Ницше

Сразу оговорюсь, что словом «наука» для краткости буду обозначать только естественные, эмпирические науки, следуя за К. Поппером³; в их число не входят, например, история, филология и даже чистая математика, которую некоторые математики причисляют к лингвистике⁴.

Относительно целей и глубины «предвидения» будущего наук. Если целью, как это бывает в ряде стран, является переориентация или, точнее, смещение акцентов высшего образования, чтобы заранее подготовить научных работников или иных специалистов под возникающие в будущем или растущие потребности, то глубину предвидения можно оценить в 10–20 лет; назовем это ближайшим будущим. Если такая цель не ставится, то глубина может быть «неопределенно далекой».

¹ Кафедра биофизики биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия; Институт биологии гена РАН.
E-mail: alsoboloev@yandex.ru

² Ницше Ф. Человеческое, слишком человеческое // Ницше Ф. Полное собрание сочинений. Т. 3 / Под ред. Ф. Зелинского и др. — М.: «Московское книгоиздательство», 1911. — С. 10.

³ Поппер К. Р. Предположения и опровержения: Рост научного знания / Пер. с англ. — М.: ООО «Издательство АСТ», 2004. — 638 с.

⁴ Manin Yu. I. Mathematics as profession and vocation // Mathematics: Frontiers and Perspectives / Ed. by V. Arnold et al. — Amer. Math. Soc., 2000. — P. 153–160.

Вопросами ближайшего будущего биологии, физики, химии и фармакологии — группы наук, на стыке которых находятся читаемые мной в МГУ уже больше 25 лет курсы: биофизика регуляторных процессов, медицинская биофизика и ядерная медицина — занимается большое число профессионалов-футурологов. Вот, к примеру, несколько журналов из тех, что входят в 1-й квартиль по Web of Science (Journal Citation Index) и публикуют статьи на эту тему: «Medical Education», «Anatomical Sciences Education», «Studies in Science Education», «Science Education», «Higher Education», «European Physical Education Review». Для решения этих вопросов разработаны специальные методики, на результаты, полученные с их помощью, ориентируются руководители университетов. В общем, это неплохо возделываемое поле, во всяком случае за рубежом. Понятно, что таким непрофессионалам в области футурологии, как я, не стоит давать оценки ближайшего будущего наук. Поэтому перейду на поле, не столь заселенное профессиональными планировщиками будущего: попробую порассуждать о «неопределенно далеких» перспективах тех разделов биофизики, которые мне близки. В эту область с неясными временными границами также попадают формулировки задач, решения которых — по мнению тех, кто их формулирует, — окажут определенное влияние на развитие науки в будущем.

Думаю, что многие согласятся с мнением нобелевского лауреата Френсиса Крика, что «в природе гибриды обычно бесплодны, но в науке часто бывает наоборот. Гибридные направления нередко удивительно плодотворны, тогда как дисциплина, остающаяся слишком чистой, обычно увядает»⁵. Более того, как биофизика сама есть гибрид, возникший ближе к концу XIX века, и это запечатлено в самом ее названии, так еще более «гибридны» появившиеся позднее те направления биофизики, которыми мы с коллегами занимаемся и о которых я рассказываю студентам. Сопоставив вышеприведенные слова Ф. Крика с «непреложным законом бытия», гласящем что «все, что имеет начало, имеет конец»⁶, мы должны будем прийти к умозаключению о «конце» биофизики в некоем неопределенном будущем. Полагаю тем не менее, что речь никак не может здесь идти об ее исчезновении, но о слияниях с другими дисциплинами и об отпочкованиях новых направлений. Так что ничего принципиально отличного от других наук тут не предвидится, поскольку конвергенция наук и технологий⁷ и их разделения — естественный процесс. Значит, отдаленная перспектива более или менее определилась... Попробую ответить на вопрос, что же можно ожидать ДО момента ее наступления.

⁵ Crick F. *What Mad Pursuit: A Personal View of Scientific Discovery*. N.Y.: Basic Books Inc., 1988. — P. 150.

⁶ Шестов Л. И. Афины и Иерусалим. Сочинения в 2-х т. — М.: Наука, 1993. — С. 637.

⁷ Bainbridge W. S., Roco M. C. The Era of Convergence // *Handbook of Science and Technology Convergence* / Ed. by W. S. Bainbridge, M. C. Roco. — Cham: Springer, 2016. — P. 1–14.

Остановлюсь на двух направлениях работ, которые представляются перспективными (очевидно, что вряд ли стоит ожидать абсолютно непредвзятого мнения по этому вопросу), и на некоторых препятствиях на пути быстрого развития близких мне научных направлений.

Некоторые перспективные направления

«Будущее — это время, о котором говорят, когда не могут решить проблему в настоящем»⁸.

Вальтер Хессельбах, немецкий менеджер

Сейчас трудно не заметить растущего интереса к биологическим объектам как фракталам: например, при поиске статей в Google Scholar по сочетанию ключевых слов «fractal» и «biomembranes», опубликованных в 1980–1990 гг., можно найти порядка 60 публикаций, в 1990–2000 гг. — 298, в 2000–2010 гг. — 679, а в 2010–2020 гг. — около 1100. Это, конечно, не означает, что в каждой из этих статей биологические мембраны рассматриваются как фракталы, но, как минимум, говорит о возрастающем интересе к фракталам у биологов и, наоборот, — к биологии у тех, кто занимается фракталами. Недаром главный труд выдающегося математика Б. Мандельброта, предложившего сам термин «фрактал», называется «Фрактальная геометрия природы»⁹ [обратите внимание на последнее слово]. Еще в 1981 году швейцарская группа микроскопистов, руководимая проф. Э. Вайбелем, опубликовала свои исследования, показавшие, что клеточные мембраны — фракталы¹⁰. Дальше — больше (статей на эту тему). Заметим, что скорости диффузионно-контролируемых реакций при прочих равных условиях зависят от размерности пространства, как в евклидовых пространствах, так и на фракталах¹¹. Возможность влиять на скорость процессов в варианте «катализа без катализатора» в применении к клеточному ядру допустил Р. Копельман¹² в статье, анализирующей работу О. Бенишю и др.,¹³ которая была целиком посвящена «геометрически-контролируемой кинетике» [я специально подчеркнул слово «геометрически»]. Добавим, что живые клетки способны изменять форму своих мембран, меняя при этом их фрактальную размерность¹⁴, и это наводит на мысль о том, что, например, диффузионно-контроли-

⁸ <https://www.dictionary-quotes.com/zukunft-die-zeit-von-der-man-spricht-wenn-man-in-der-gegenwart-mit-einem-problem-nicht-fertig-wird-walter-hesselbach/>

⁹ Мандельброт Б. Фрактальная геометрия природы. — М.: Институт компьютерных исследований, 2002. — 656 с.

¹⁰ Paumgartner D. et al. // J. Microsc. — 1981. — Vol. 121. — P. 51–63.

¹¹ Kopelman R. // Science. — 1988. — Vol. 241 (4873). — P. 1620–1626.

¹² Kopelman R. // Nature Chem. — 2010. — Vol. 2. — P. 430–431.

¹³ Bénichou O. et al. // Nature Chem. — 2010. — Vol. 2. — P. 472–477.

¹⁴ Bizzarri M. et al. // Histol. Histopathol. — 2013. — Vol. 28. — P. 155–174.

руемые взаимодействия в биомембранах (скажем, взаимодействие рецепторов с эффекторными белками в плазматической мембране клеток) могут регулироваться самой клеткой путем изменения размерности фрактального объекта — биомембраны, в которой эти взаимодействия происходят. Что означало бы различные варианты ответа клетки, зависящие от размерности пространства ее мембран. Такая возможность — пока сугубо гипотетическая — сразу может превратить в наших глазах живую клетку, как будто бы столь ограниченную в своих ресурсах повлиять на протекание процессов (разве что снабженную большим набором катализаторов-ферментов, но резко ограниченную в диапазоне варьирования температурой, давлением, pH и пр., что так хорошо умеют делать химики в пробирках и колбах), в объект, легко ускоряющий и замедляющий протекающие в нем реакции изменением пространства, в котором они осуществляются. Но чтобы опровергнуть или подтвердить справедливость таких предположений, нужны эксперименты, в которых можно было бы одновременно и влиять на «геометрически-контролируемую кинетику» процесса, и получать как характеристики кинетики самого процесса, так и пространства, в котором он происходит. Дело за оптимальным дизайном такого рода проверки.

Представляется важным взять на вооружение и экспериментальную проверку упомянутого выше подхода О. Бенишú и Р. Копельмана в отношении взаимодействия макромолекул в ядре и особенно — транскрипционных факторов с ДНК, так как и эти взаимодействия по целому ряду характеристик не могут быть описаны в рамках привычных подходов¹⁵.

И еще одно направление, правда, нуждающееся в несколько более обширном пояснении. Все мы либо потенциальные больные, либо уже представляем собой пациентов, пользующихся лекарствами, пусть даже делаем это время от времени. Поэтому с интересом следим за появлением новых лекарств. При этом целый пласт будущих лекарств пока остается не только недоступным, но и несозданным. Поясню. Современный тренд в разработке лекарств — создание малых молекул, вмешивающихся в белок-белковые взаимодействия, тем самым влияющих в желаемую сторону при патологически измененных процессах. Таких разрешенных к применению в клинике лекарств, малых молекул, уже немало; примерами могут служить рекомендованные для лечения ряда злокачественных новообразований Idasanutlin® (мол. масса 616,5), ингибирующий взаимодействие белков MDM2 и p53, и Venetoclax® (мол. масса 868,4), препятствующий взаимодействию белка Bcl-2 с белками Bax и Bak¹⁶. Однако белок-

¹⁵ Интерес к этой тематике появился (см., например, Ghorbani M. et al. // *Front. Physiol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 1446; Woringer M., Darzacq X. // *Biochem. Soc. Trans.* — 2018. — Vol. 46. — P. 945–956 или Izeddin I. et al. // *Elife.* — 2014. — Vol. 3. — P. e02230) вплоть до того, что некоторые журналы ей посвящают специальные номера (*Int. Rev. Cell Mol. Biol.* — 2014. — Vol. 307).

¹⁶ Bojadzic D., Buchwald P. // *Curr. Top. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 18. — P. 674–699.

белковые взаимодействия часто характеризуются большими площадями порядка 1500–3000 Å², при этом с незначительными «карманами» для малых молекул или отсутствием таковых. Малые молекулы нередко оказываются существенно менее эффективными для ингибирования этих взаимодействий по сравнению с макромолекулами. Если учесть, что по имеющимся оценкам лишь около 700 белков доступно для современных лекарств — есть даже термин «druggable», в смысле «поддающийся воздействию лекарств», — а в интерактоме человека насчитывается более 650 000 различных белок-белковых взаимодействий¹⁷, то следует ли из этого, что подавляющая их часть обречена оставаться «undruggable»? К решению этой проблемы можно подойти с иной позиции, если отказаться от малых молекул: хорошо известно, что можно получить антитела и их миметики¹⁸ к белковым поверхностям, не имеющим «карманов», при этом с очень высокой специфичностью и аффинностью. Но тут мы упрямся в другую проблему: эти специфичные и высокоаффинные макромолекулы, в отличие от малых молекул, практически не могут самостоятельно проникать в живые клетки, а уж тем более избирательно, т. е. в заданный тип клеток. Учитывая эти столь привлекательные свойства антител и их миметиков — специфичность, аффинность, «узнавание» антигенов на белковых поверхностях без «карманов», — многие авторы пытаются создать их варианты, способные к функционированию внутри живых клеток-мишеней¹⁶. Мы с коллегами тоже решили принять участие в этих попытках, основываясь на собственных разработках по созданию искусственных полипептидов, способных не только проникать в нужные клетки *in vitro* и *in vivo*, но и попадать в их наперед заданный компартмент. Суть нашего подхода^{16, 19} состоит в том, чтобы использовать естественные процессы клеточного транспорта для доставки разного рода «грузов» в нужную часть клетки. В ходе этих процессов одни специализированные клеточные белки «опознают» определенные аминокислотные последовательности как адреса доставки, а другие осуществляют перемещения всей молекулы с этими адресами в место назначения. Исходя из этого, мы сделали химерные полипептидные макромолекулы, модульные нанотранспортеры, с набором нужных адресов в виде заменяемых модулей. Нанотранспортеры вместе со своим «грузом» доставляются молекулярной машинерией клеток-мишеней в заданный ее компартмент. А доставляемый «груз» может быть практически любой, в том числе миметики антител. Ими удалось снабдить наши модульные нанотранспортеры,

¹⁷ Slastnikova T. A. et al. // Front. Pharmacol. — 2018. — Vol. 9. — P. 1208.

¹⁸ Другие названия этих природных антител: «альтернативные каркасные белки», «скафолды». Примеры миметиков антител: аффибоди, нанободи, монободи и др. Они характеризуются высоким сродством к антигену, меньшим размером и более простым получением по сравнению с полноразмерными антителами.

¹⁹ Sobolev A. S. // Acta Naturae. — 2020. — Vol. 12 (4). — P. 66–75.

которые, как оказалось, вполне справились с такой задачей, т. е. сделали эти миметики антител проникающими в живые клетки, «ныряющими», как мы их называли¹⁸. Модульные нанотранспортеры, как и многие другие искусственные векторные молекулы или надмолекулярные ансамбли (например, наночастицы), «опознают» клетку-мишень и проникают в нее за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза. Этот многостадийный транспортный процесс объединяет в себя и специфическое связывание с рецептором, представленным на клетке-мишени («узнавание»), и последующие этапы проникновения внутрь клетки рецептора, связавшего вектор с «грузом», в составе эндоцитозных везикул. Казалось бы, очень удачное сочетание «узнавания» и проникновения внутрь клетки-мишени. Тем не менее тут есть и недостатки, иногда становящиеся серьезной проблемой. Так, лишь про относительно небольшой набор эндоцитируемых рецепторов можно сказать, что они представлены исключительно на таких клетках-мишенях, как раковые клетки. У большинства же раковых клеток наблюдается сверхэкспрессия тех или иных рецепторов, представленных и на нормальных клетках, но в значительно меньшем числе. В этом случае трудно рассчитывать на абсолютно селективную доставку вектором, сориентированным на такой тип рецептора. Попавший внутрь клетки вектор с «грузом» оказывается не в гиалоплазме, а внутри эндоцитозной везикулы, так что если эта везикула не является конечной целью доставки, то из нее вектору нужно выйти. Для этого, например, наш нанотранспортер снабжен специальным модулем, образующим поры в эндоцитозных везикулах для выхода в гиалоплазму. И тут сталкиваемся с другой проблемой — потерями на этом этапе, снижением количества вектора и доставляемого им «груза». Добавим, что скорость рецептор-опосредованного эндоцитоза имеет для каждого типа рецепторов свои пределы, что ограничивает потенциальную возможность клетки «закачать» внутрь себя молекулы, связывающиеся с данными рецепторами. Известные к настоящему времени так называемые «пептиды, проникающие в клетки» (cell-penetrating peptides)²⁰ малоспецифичны в отношении типа клеток и эффективность доставки с их помощью невысока. Кроме того, их желательно применять в паре с порообразующими компонентами, которые увеличивают эффективность их проникновения в гиалоплазму клеток. Памятуя, как много различных лабораторий и фирм заинтересовано в создании средств доставки лекарств, в том числе антител или их миметиков, думаю, что обнаружение/создание макромолекул (а точнее — полипептидов), способных

а) эффективно и

б) высокоизбирательно

проникать через плазматическую мембрану

²⁰ Langel Ü. CPP, Cell-Penetrating Peptides. — Singapore: Springer, 2019. — 470 p.

- в) различных
 - г) наперед заданных
- клеток-мишеней
- д) в их гиалоплазму,

было бы желанным результатом для многих. Это — на мой взгляд — интересное направление, требующее, как и предыдущее, широкого набора знаний из разных наук.

О препятствиях

*«От развития наук зависит непосредственно
все развитие рода человеческого.
Кто задерживает первое, тот задерживает последнее»²¹.*

Иоганн Г. Фихте

Говоря о будущем, имеет смысл не только высказывать предположения о потенциально интересных направлениях, имеющих шансы стать точками роста, но и порассуждать о том, что может замедлять научный прогресс. Этих моментов тоже немало, остановлюсь на двух из них.

Есть определенные установки, методологии научного исследования, которыми мы пользуемся в ходе своей работы, даже не всегда отдавая себе в этом отчет. В постсоветскую эпоху у студентов и аспирантов естественных факультетов МГУ появились новые предметы, такие как «Философские проблемы естествознания» и «История и философия науки», чего ранее не было, так что в этом плане современное обучение стало лучше. В последнем курсе особое внимание уделено таким авторам, как К. Поппер, И. Лакатос и др., составивших в XX веке целую эпоху в осмыслении методологии научного познания природы. На меня в свое время большое впечатление произвели работы этих авторов, особенно в отношении создания и обоснования научных теорий. Позволю себе напомнить несколько важных моментов из К. Поппера и И. Лакатоса. Во-первых, «результаты науки остаются гипотезами, которые могут быть хорошо проверены (tested), но не могут быть неопровержимо установлены (established): нельзя показать, что они истинны»²². А во-вторых, говоря о смене новых теорий старыми, можно утверждать, что старая теория Т опровергнута (я бы тут добавил: или границы ее применимости сужены), «если и только если предложена другая теория Т' со следующими характеристиками: (1) Т' имеет добавочное эмпирическое содержание по сравнению с Т, т. е. она предсказывает факты *новые*, невероятные с точки зрения Т или даже запрещаемые ею; (2) Т' объясняет предыдущий успех Т, т. е. все неопровергнутое содержание Т (в пределах ошибки наблюде-

²¹ Фихте И. Несколько лекций о назначении ученого. — Минск: «Попурри», 1997. — С. 42.

²² Поппер К. Р. Мир предрасположенностей // Эволюционная эпистемология и логика социальных наук: Карл Поппер и его критики. — М.: Эдиториал УРСС, 2000. — С. 179.

ния) присутствует в Т'; (3) какая-то часть добавочного содержания Т' подкреплена»²³. Обращаю внимание на то, что по И. Лакатосу новая теория Т' включает в себя отнюдь не всю старую Т, а лишь ее неопровергнутую часть. То есть, как и К. Поппер, и ряд других философов науки, он не приемлет принцип кумулятивного развития науки; вот формулировка этого принципа по М. Бунге: «Любая историческая последовательность научных теорий является возрастающей в том смысле, что каждая новая теория включает <...> предшествующие теории. И в этом процессе ничто и никогда не теряется»²⁴. И пусть работы Поппера, Лакатоса представляются многим (в том числе и мне) достаточно убедительными, стоит отдавать себе отчет, что имеют право на существование — и существуют — иные взгляды, поскольку в данной области трудно представить себе что-либо незыблемое и навсегда утвердившееся. Вооружившись этим небольшим набором представлений, проанализируем некоторые известные ситуации. Вот, например, положения, которые известный и уважаемый автор²⁵ считает настолько очевидными, что кладет их — наряду с другими — в основу демаркации науки и псевдонауки: «Развитие науки происходит не посредством отбрасывания добытых ею истин, но путем включения их в более общие и широкие концепции» (с. 62) и «Дискуссии подлежат лишь те проблемы, которые еще не решены наукой» (с. 63). А далее уже переходит к конкретным примерам того, что, исходя из сформулированных им позиций, является псевдонаукой. Из сопоставления приведенных в этом абзаце цитат трудно прийти к заключению, что в основе такого подхода к демаркации лежат положения самоочевидные и, тем более, являющиеся непреложными истинами. Следовательно, и демаркация, построенная на этих положениях, не обязательно будет восприниматься как убедительная. Не пытаюсь обсуждать оценку автором объектов его анализа, хочу лишь привлечь внимание к значимости критериев демаркации наука/псевдонаука или новое/неновое и к возможным последствиям ошибок экспертных оценок из-за неполных или ошибочных критериев в контексте основной задачи этой главы — рассмотрения возможного будущего интересующих нас наук.

Проблеме прогресса наук, обеспечению научных прорывов или хотя бы попыткам понять, что этим прорывам может способствовать, посвящена обширная литература, эта тема важна практически всем странам. Среди исследований факторов, влияющих на научно-технический прогресс, мое внимание привлекла относительно недавно опубликованная книга²⁶. Одна из ее глав, десятая, цели-

²³ Лакатос И. Фальсификация и методология исследовательских программ // Лакатос И. Методология исследовательских программ. — М.: «Изд-во АСТ», 2003. — С. 50.

²⁴ Цит. по: Липкин А. И. // Вопросы философии. — 2006. — № 6. — С. 89–104.

²⁵ Волькенштейн М. В. // Наука и жизнь. — 1977. — № 7. — С. 62–66.

²⁶ Stefik M., Stefik B. Breakthrough. Stories and Strategies of Radical Innovation. — Cambridge MA: MIT Press, 2004. — 294 p.

ком посвящена препятствиям на пути радикальных нововведений; в ней есть перечень основных таких препятствий и среди них названы «опасности экспертной оценки». Именно через сито экспертных оценок должны пройти все работы, авторы которых считают их новыми или даже прорывными. Здесь и таится опасность постановки преград потенциально прорывным проектам, причем вовсе не обязательно, что такие преграды могут быть поставлены сознательно. Все мы убеждены в необходимости экспертной оценки. Вопрос в том, что положено в ее основу; пример неочевидных утверждений, использованных для оценок, приведен выше. На демаркацию научного/ненаучного может оказывать субъективное воздействие²⁷, например, то, что автор рецензируемой работы наряду с «научными» взглядами разделяет «ненаучные» (хотя сейчас вряд ли кто-то заговорит о Ньютоне, посвятившему оккультным исследованиям 30 лет своей жизни, или о Бутлере с его интересом к спиритизму, как о псевдоученых) или исходит из представлений, ставших «ненаучными», как например, Максвелл, выводивший свои знаменитые уравнения, исходя из представлений о «светоносном эфире». В этой связи стоит подкорректировать систему проведения экспертных оценок наших научных фондов, например, таких как РФН, хотя бы следующим образом. Почему бы не дать авторам проектов право — не в порядке исключения, а в виде нормы — один раз ответить на замечания рецензентов? Ошибаться или неадекватно что-то интерпретировать могут не только авторы, но и рецензенты. Предлагаемое изменение уже апробировано и практикуется, например, в системе грантов Национальных институтов здоровья США. Лышу себя надеждой, что после принятия таких поправок нашими государственными фондами возрастет вероятность появления большего числа новых научных достижений, в том числе в биофизике.

Наряду с общими для большинства стран проблемами, стоящими перед наукой, у России есть и свои особенные проблемы, правда, присущие не только нам; среди них, назовем это так: невыраженная потребность у значительной части населения в познании природы, которая отражается во взглядах и научной политике властей предрежащих. В свое время мной была сделана попытка²⁸ хотя бы начать анализ некоторых причин этого явления. Чтобы не злоупотреблять вниманием читателя, приведу здесь сжатую и броскую формулировку этих соображений, сделанную А. Торгашевым²⁹:

«Наука никогда не была любимой игрушкой нашего народа. Ее инсталлировал в Россию Петр I указом 1724 года — через два века после трудов Коперника, через 80 лет после смерти Галилея и через 75 лет после смерти Декарта. В 1725-м привезли в страну немецких и французских профессоров, и академия

²⁷ Благодарю А. Н. Паршина, обратившего мое внимание на эту сторону вопроса.

²⁸ Соболев А. С. // Вестник РАН. — 2004. — Т. 74. — С. 792–801.

²⁹ Торгашев А. // Русский репортер. — 2013. — № 22 (300). — С. 38–40.

зажила своей жизнью чужеродного растения. Так через Эйлера, Ломоносова, Менделеева и Мечникова наука дотянула до XX века, но народ никогда особо не понимал этих барских забав. Потом стало полегче, поскольку выяснилось, что наука — это не только ценные мозги, но и электричество, военная сила и космические полеты. Но до сих пор первейший вопрос, который слышишь после рассказа о новых открытиях: «А зачем это нужно?» <...> Мне нравится гипотеза нашего биолога Александра Соболева. Она состоит в следующем. Когда-то давно католические теологи обосновали тезис, что всякий человек должен постичь замысел Бога. Потом это переняли и протестанты. Тезис постоянно развивался, и теперь у любого правоверного католика не возникает вопроса «а зачем?». Ясно зачем — замысел Бога постигать. В России такой теологии не случилось, вот и маемся: вроде наука нужна, а зачем — не знаем. Но со времен Петра прошло триста лет, и пора бы уже найти основания за пределами утилитарных потребностей. И эта мировоззренческая задача, наверное, — самый сложный вызов для фундаментальной науки».

Не со всеми деталями этой цитаты я готов согласиться, но главные положения, на мой взгляд, переданы верно. Замечу лишь, что проблему вижу не в различиях конфессий, а в различиях степени доведения значимости изучения природы до каждого человека. Так, потребность «постижения Божьего замысла» научным путем формировалась в тех странах, откуда Петр I «импортировал» науки и ученых, с самого раннего детства, при ознакомлении ребенка с базовыми религиозными представлениями, чего не было в России. А поскольку у нас это не было привито в поколениях и «с пеленок», то не удивительно, что так легко пропал интерес к наукам после развала СССР, несмотря на все предшествовавшие усилия пропаганды в послевоенное время. Кстати, эти усилия были обусловлены не внутренними побуждениями, а стали осуществляться лишь после успешных решений советскими учеными военных вопросов (ядерное оружие, ракеты), но не раньше. Здесь не место вдаваться в более ранние периоды нашей истории. Зададимся лишь вопросом, лучше ли было бы положение дореволюционной Академии наук, если бы она была не Императорской, а ее контролировала, скажем, Государственная Дума Российской империи?

Времена почти поголовной религиозности российского населения остались в прошлом. Тем не менее путь видится по сути своей все тем же: привитие потребности познавать природу с раннего детства, не ограничиваясь популяризацией науки для взрослых и старших школьников, что тоже необходимо, но, как уже видим, недостаточно. В противном случае условия научной работы у нас будут по-прежнему хуже, чем в западных странах, сколько бы ни гнались за индексами Хирша.

Автор искренне признателен акад. РАН А. Н. Паршину и акад. РАН А. Б. Рубину за ценные рекомендации при работе над этой статьей.

Reflections on possible future: where and how are we going?

A. S. Sobolev

Department of Biophysics, Faculty of Biology, Moscow State University;
Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

The author focuses on the field of his scientific interests and emphasizes two areas of research which might be prospective from his point of view: (i) experimental verification/disproof of theoretically predicted influence of modifiable space dimensions in the living cell on reactions' rates which take place within these spaces; (ii) detection/creation of macromolecules capable of effective and selective penetration through the plasma membrane of various predetermined target cells into their hyaloplasm. The author points to 2 problems which impede scientific progress (i) at present: absence of feedback between a project applicant and his experts within the process of grant proposal evaluation, and (ii) historically: absence of deeply-rooted requirement in basic science within the general Russian public.

Keywords: future of science, biological membranes, fractals, membrane space dimension, target cell, nanotransporter, expert assessment, requirement in basic science.

ФЛАВОПРОТЕИНОВЫЕ СЕНСОРНЫЕ ФОТОРЕЦЕПТОРЫ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ: БИОФИЗИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Г. Я. Фрайкин, А. Б. Рубин¹

В обзоре рассмотрены биофизические аспекты функционирования флавопротеиновых фотосенсоров — криптохромов, light, oxygen, voltage (LOV) и blue light sensing using flavins (BLUF) белков. В течение последних двух десятилетий изучение молекулярных механизмов восприятия синего света посредством этих фоторецепторов стало приоритетным направлением фотобиологических исследований. Флавопротеиновые фоторецепторы вызывают все возрастающий научный интерес в связи с их специфическими фотохимическими свойствами, большой вариабельностью сигнальных доменов или взаимодействующих белков и расширяющимся применением в оптогенетических системах. Фундаментальное свойство всех этих фотосенсорных белков заключается в том, что они содержат флавиновые хромофоры (ФАД или ФМН), которые при поглощении света подвергаются физико-химическим изменениям и фотохимическим превращениям разного типа. Фотохимические реакции хромофоров инициируют фотосенсорные процессы и приводят к разнообразным изменениям в хромофор-белковых взаимодействиях. Эти конформационные переходы в структуре белка, непосредственно окружающего хромофоры, впоследствии усиливаются посредством аллостерических сетей внутри фоторецепторов. Возникающие изменения в динамике и структуре белков составляют молекулярную основу сигнальной активности фоторецепторов в живых системах. Познавание первичных механизмов отмеченных фотосенсорных процессов значительно возросло за последние несколько лет. В этом обзоре мы обсуждаем в основном биофизические аспекты действия криптохромов, LOV- и BLUF-белков. Особое внимание уделяется специфике фотохимических реакций их флавиновых хромофоров, механизмов фотоактивации и ранних стадий трансдукции сигнала. Мы также обращаем внимание на некоторые пока нерешенные спорные вопросы и перспективы дальнейших исследований в этой привлекательной области молекулярной фотобиологии и биофизики.

Ключевые слова: флавопротеиновые фотосенсоры, криптохромы, LOV- и BLUF-белки, фотохимические реакции, сигнальная активность.

Свет электромагнитного спектра солнца — ключевой стимул окружающей среды, который воспринимается многочисленными организмами из всех царств жизни. Помимо его роли как основного источника энергии в фотосинтезе, свет

¹ Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12.
E-mail: GFraikin@yandex.ru, rubin@biophys.msu.ru

несет жизненно важную информацию о пространстве и времени, способствуя организмам адаптироваться в условиях среды обитания. Важными и широко распространенными видами физиологической адаптации к поглощению света являются поведенческие реакции, процессы развития и запуск циркадных ритмов.

Живые системы детектируют световые стимулы посредством сенсорных фоторецепторов, которые конвертируют физический сигнал в биохимические сигнальные каскады и последующие фотобиологические ответы. Сенсорные фоторецепторные белки обычно содержат молекулы хромофоров, чувствительных к фотонам разной энергии. Поглощение фотона хромофором фоторецептора в адаптированном к темноте состоянии инициирует серию фотохимических реакций («фотоцикл»), которые связывают хромофор с окружающей белковой структурой. Возникающие изменения проявляются в переходе фоторецептора из «темнового» (неактивного) состояния в адаптированное к свету или «сигнальное» конформационное состояние. Такой переход означает фотоактивацию фоторецептора. Обычно фотоцикл полностью обратим, т. е. метастабильное сигнальное состояние спонтанно распадается в термальной реакции в исходное темновое состояние.

На основе конкретной природы и фотоцикла хромофора сенсорные фоторецепторы подразделяются на несколько различных классов. К ним относятся фитохромы — сенсоры красного/дальнего красного света (600–750 нм), криптохромы, light-oxygen-voltage (LOV) белки и blue light sensing using flavins (BLUF) белки — сенсоры УФА/синего света (320–500 нм), а также белок UV resistance locus8 (UVR8) — сенсор фотонов в УФВ области (290–320 нм) [Fraikin et al., 2013]. Следует отметить, что белок UVR8, в отличие от всех других фоторецепторов, не содержит специального хромофора: у него эту функцию выполняют два остатка триптофана уникальной белковой структуры. За исключением UVR8, каждый фоторецептор может быть функционально разделен на фотосенсорный модуль, который содержит хромофор и обеспечивает поглощение света, и эффекторный модуль, опосредующий физиологический ответ. Часто фотосенсорный и эффекторный модули находятся в различных доменах фоторецептора и поэтому могут быть физически отделены друг от друга в его разных частях.

В настоящем обзоре рассматриваются три класса сенсорных фоторецепторов, чувствительных к синему свету: криптохромы, LOV-белки и BLUF-белки. Эти фоторецепторы объединяет то, что все они являются флавопротеинами, связывающими в качестве хромофоров флавиномононуклеотид (ФМН) или флавинадениндинуклеотид (ФАД), которые в окисленном состоянии максимально поглощают синий свет при 440–450 нм. При поглощении фотона флавиновые хромофоры вступают в фотохимические реакции разного типа, которые инициируют сигнальные процессы по разнообразным механизмам. Фотохимическая инициация фотосенсорного процесса приводит к ряду изменений в хромо-

фор-белковых взаимодействиях. Возникающие конформационные переходы в структуре белка, непосредственно окружающего хромофоры, впоследствии распространяются посредством аллостерических сетей внутри фоторецепторов. Образующиеся изменения в структуре и динамике белков обеспечивают молекулярную основу сигнальной активности фоторецепторов в живых системах.

После прекращения светового воздействия сигнальные состояния хромофоров и адаптированные к свету конформации фоторецепторов переходят обратно в исходные неактивные состояния. Времена релаксации этих процессов широко варьируют у разных фоторецепторных систем и у конкретных белков из разных семейств. Эти структурно-функциональные вариации способствуют выяснению механизмов процесса реверсии. Важно отметить, что LOV- и BLUF-фоторецепторы в фотоактивированном состоянии могут быть подвергнуты реверсии в темновое состояние путем воздействия света длин волн, поглощаемых хромофорами в фотовозбужденном сигнальном состоянии. Такие фоторецепторы могут, очевидно, действовать как фотохромные переключатели.

Познание механизмов отмеченных выше фотосенсорных процессов значительно возросло за последнее время. Различные аспекты функционирования отдельных классов сенсоров синего света рассмотрены в ряде недавних обзорных статей [Ahmad, 2016; Fujisawa, Masuda, 2018; Kottke et al., 2017; Losi, Gartner, 2017; Vechtomova et al., 2020; Wang et al., 2018]. В этом обзоре мы обсуждаем биофизические аспекты действия всех трех классов флавопротеиновых фоторецепторов, сосредоточив внимание на особенностях фотохимических реакций их флавиновых хромофоров, механизмов фотоактивации и ранних стадий трансдукции сигнала.

Криптохромы

Общие сведения. Первыми были идентифицированы криптохромы из растения *Arabidopsis thaliana* (CRY1 и CRY2). Позднее гены родственных им белков были найдены в геномах многих организмов из разных филогенетических групп — бактерий, водорослей, грибов и животных [Chaves et al., 2011; Losi, Gartner, 2012; Ozturk, 2017]. Все криптохромы объединяет значительное структурное сходство с фотолиазами — светочувствительными ферментами, которые содержат кофактор ФАД, непосредственно участвующий в фотовозбужденном состоянии в репарации УФ-индуцированных повреждений ДНК. Ферменты, репарирующие циклобутановые пиримидиновые димеры (cyclobutane pyrimidine dimers, CPD) или пиримидин (6-4), пиримидиновые фотопродукты (pyrimidine 6-4 pyrimidone photoproducts, 6-4PP), названы, соответственно, CPD-фотолиазами или (6-4)-фотолиазами. Принято считать, что криптохромы эволюционировали от фотолиазного предшественника, причем разделение генов крипто-

хромов и фотолиз произошло до дивергенции прокариот и эукариот. В пользу этого свидетельствуют данные о наличии генов как фотолиз, так и криптохромов в бактериальных геномах. Подтверждением общих эволюционных корней фотолиз и криптохромов может служить открытие у гриба *Aspergillus nidulans* гена, кодирующего белок с двойной функцией — фотолиазной и регуляторной. Белки с комбинированной функцией обнаружены также у диатом и зеленых водорослей [Konig et al., 2017; Vechtomova et al., 2020].

Криптохромы, как и фотолиазы, содержат в качестве основного хромофора ФАД, однако, в отличие от его каталитической функции у фотолиз, у криптохромов ФАД определяет главным образом их фотосенсорные свойства. Большинство криптохромов не способны катализировать фоторепарацию ДНК. Однако отдельные их представители, относящиеся к семейству криптохромов/фотолиз (cryptochrome/photolyase family, CPF), сохраняют эту способность [Franz et al., 2018; Kottke et al., 2017]. Эти криптохромы обладают как ДНК-репарирующей активностью, так и фоторегуляторными свойствами.

Согласно современной филогенетической и функциональной классификации [Ozturk, 2017; Vechtomova et al., 2020], белки CPF подразделяются на четыре класса. Среди них отметим два основных: растительные криптохромы и подобные им белки (plant-like, pCRY) и криптохромы животных и схожие с ними белки (animal-like, aCRY). Криптохромы растений и зеленых водорослей (например, CPN1 *Chlamydomonas reinhardtii*) действуют в основном как сенсорные фоторецепторы, тогда как криптохромы животных могут выполнять функции либо фоторецепторов (тип I), либо не реагирующих на свет регуляторов циркадных ритмов (тип II). Криптохромы типа I найдены у насекомых (их прототипом считается криптохром *Drosophila melanogaster*, dCRY), а криптохромы типа II — у млекопитающих (mCRY). Недавно у птиц, рыб, земноводных и пресмыкающихся открыт еще один тип криптохромов (CRY4), которые содержат ФАД и обладают фотохимической активностью [Michael et al., 2017].

Все криптохромы определяются по их схожей двухдоменной структурной организации, включающей N-концевой α/β -домен, который содержит β -лист и C-концевой α -спиральный домен, связывающий хромофор ФАД. Вместе они составляют высококонсервативную гомологичную фотолиазе область (photolyase homology region, PHR), называемую также PHR-доменом. Кроме того, в структуру криптохромов входит различающееся по числу аминокислотных остатков C-концевое удлинение (CRY C-terminal extension, CCE), называемое также CCE-доменом [Zoltowski, 2015]. У CRY1 и CRY2 CCE-домен состоит из 180 и 110 аминокислотных остатков соответственно. В темноте CCE-домен сильно связан PHR-доменом, но после фотоактивации высвобождается из ядра PHR и переходит в неупорядоченное состояние. Деструктурированная часть CCE из 80 аминокислотных остатков становится затем доступной для взаимо-

действия с некоторыми белками — компонентами сигнальных путей криптохромов. У фотолиаз ССЕ-домен отсутствует, а у криптохромов играет роль эффекторного домена. Ранее считалось, что PHR криптохромов растений действует только как фотосенсорный домен. Однако полученные недавно данные о физическом взаимодействии большинства известных в настоящее время сигнальных белков с PHR-доменом криптохромов позволяют считать, что PHR, как и ССЕ, тоже может выполнять функцию эффекторного домена [Wang et al., 2018].

Впервые определенная кристаллическая структура PHR-домена CRY1 *Arabidopsis* проявляет удивительное сходство со структурой ДНК-фотолиазы *Escherichia coli*, несмотря на их эволюционную отдаленность. Однако кристаллическая структура растительного криптохрома полной длины из-за технической трудности кристаллизации белка с большим внутренне неупорядоченным ССЕ-доменом пока не получена. У криптохромов дрозофилы и мыши, содержащих сравнительно малый ССЕ-домен, удалось определить не только кристаллическую структуру полной длины, но и их комплексов с соответствующими сигнальными белками. Результаты этих исследований демонстрируют центральную роль ФАД-связывающего кармана и физических взаимодействий между PHR- и ССЕ-доменами в функционировании криптохромов животных. Существует общее согласие в том, что и у криптохромов растений светозависимые изменения во взаимодействии между PHR- и ССЕ-доменами могут объяснить фотоиндуцированные конформационные переходы. Однако конкретные сайты взаимодействия между PHR и ССЕ еще предстоит идентифицировать.

По современным представлениям, фотоактивация криптохромов растений начинается с поглощения фотона синего света хромофором ФАД и его фотовосстановления. Это приводит к конформационным изменениям, вызывающим разобщение PHR- и ССЕ-доменов и последующий переход фоторецептора из конформации с закрытым ССЕ-доменом в конформацию с открытым ССЕ-доменом. Такие изменения сопровождаются формированием гомодимеров и гомотетрамеров криптохромов, которые необходимы для образования их комплексов с различными сигнальными белками. Взаимодействия в этих комплексах изменяют активность сигнальных белков, обеспечивая тем самым регуляцию ими экспрессии генов и программ развития растений. При изучении перечисленных процессов в последние годы получены новые результаты, на анализе которых сфокусировано внимание в данном разделе обзора.

Фотовозбужденные состояния и редокс-формы флавиновых хромофоров. Фотофизические, фотохимические и спектроскопические свойства флавинов определяются системой сопряженных двойных связей их изоаллоксазинового кольца (рис. 1, а). При поглощении фотона УФА/синего света происходит перераспределение заряда в изоаллоксазиновом кольце и изменение редокс-потенциала флавина, что инициирует его фотохимические превращения, вовле-

кающие перенос электрона/протона и образование радикальных форм. Результаты теоретического изучения изоаллоксазинового кольца свидетельствуют, что как первое синглетное (S_1), так и триплетное (T_1) возбужденные состояния флавинов соответствуют $\pi\pi^*$ -переходам. Однако свойства этих состояний ФАД и ФМН отличаются. У хромофора LOV-фоторецепторов, ФМН, T_1 -состояние формируется с высоким квантовым выходом ($\varphi = 0,5\text{--}0,7$). При этом эффективное заселение T_1 -уровня ФМН, ответственное за фотохимическую активность этого хромофора, определяется исключительно внутренним свойством изоаллоксазинового кольца. Хромофор криптохромов ФАД отличается от ФМН тем, что на проявление свойств фотовозбужденного изоаллоксазина влияет пространственная близость второго гетероцикла — аденина. Создаваемое ими стэкинг-расположение (стопочная U-образная конфигурация) обуславливает фотоиндуцированный внутримолекулярный перенос электрона, приводящий к тушению S_1 -состояния, снижению интенсивности флуоресценции с максимумом при 520–530 нм и значительному ослаблению формирования T_1 -состояния ФАД.

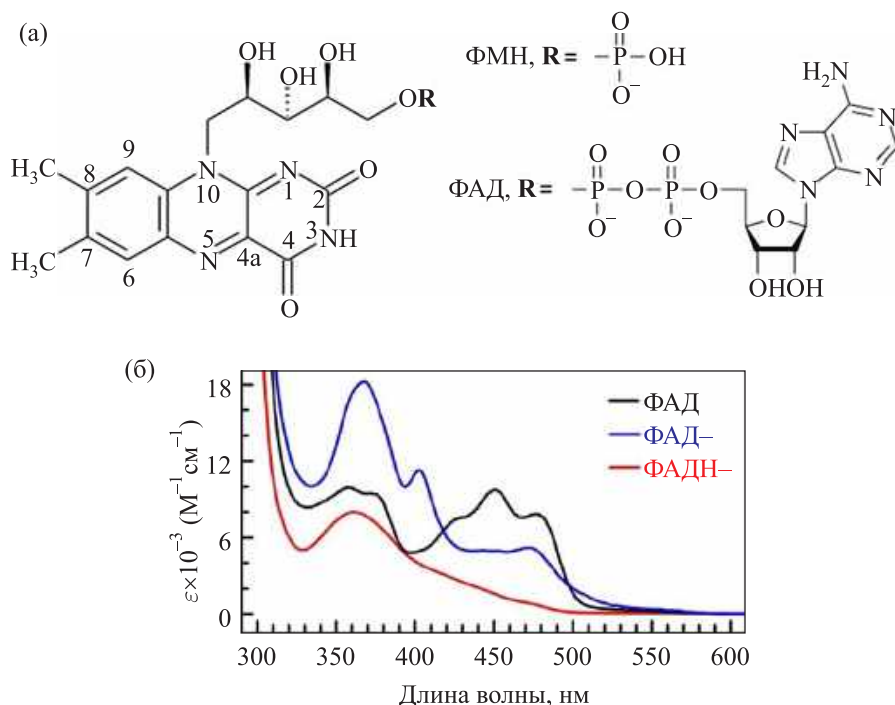
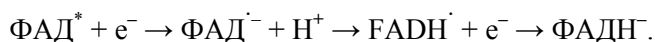


Рис. 1. Изоаллоксазиновое кольцо флавинов определяет их спектроскопические, а также фотофизические и фотохимические свойства, отличающиеся у ФАД и ФМН (а). Абсорбционные спектры трех редокс-форм ФАД криптохрома; нейтрально-радикальная форма ФАДН', в отличие от указанных редокс-форм, имеет поглощение в области 500–650 нм (б)

У криптохромов растений ФАД может существовать в четырех формах: полностью окисленной (ФАД), анион-радикальной (ФАД^{•-}), нейтральной радикальной (FADH[•]) и анион-восстановленной (ФАДН⁻). Фотовозбужденный флавин (ФАД*) восстанавливается в следующих реакциях:



Молекулярная орбиталь, вовлекаемая в переход ФАД → ФАДН⁻ после последовательного присоединения второго электрона, является антисвязывающей между N₅–C_{4a} и связывающей между C_{4a}–C_{10a}. Это трансформирует связи N₅ = C_{4a} – C_{10a} = N₁ у полностью окисленной формы флавина в связи N₅–C_{4a} = C_{10a}–N₁ у анион-восстановленной формы (ФАДН⁻) [Schwinn et al., 2020].

Согласно теоретически рассчитанным абсорбционным электронным спектрам с колебательно разрешенной структурой, у всех редокс-форм ФАД энергетически наинизший максимум представлен одним электронным переходом типа $\pi\pi^*$, сосредоточенным в центре изоаллоксазинового кольца. Анализ этих спектров показывает, что в целом они согласуются с экспериментальными абсорбционными спектрами ФАД (рис. 1, б). Все редокс-формы ФАД имеют в спектрах поглощения максимум в области УФА при 360–370 нм. У анион-восстановленной формы ФАДН⁻ максимум в этой области единственный (видимый свет ФАДН⁻ поглощает очень слабо). У полностью окисленной формы ФАД максимум в видимой области спектра расположен при 450 нм, анион-радикал ФАД^{•-} имеет максимумы при 410 и 470 нм. У ФАДН[•] максимумы сильно сдвинуты из синей области в зеленую и красную области спектра между 500 и 650 нм; это принципиальное отличие нейтрального радикала от ФАД и ФАД^{•-} [Liu et al. 2010]. Как видно из приведенных данных, каждая редокс-форма ФАД характеризуется специфическими максимумами в спектрах поглощения. Поэтому абсорбционные спектры в области УФА и видимой области предоставляют важную информацию о редокс-состояниях хромофора ФАД в фоторецепторных белках.

Фотохимия ФАД-хромофора и фотоактивация криптохромов. Структурное сходство между PNR-доменом криптохромов и фотолиазами, особенно в белковом кармане, связывающем флавин, определяет общий принцип их реагирования на свет: у обоих типов белков фотоиндуцированное возбуждение хромофора инициирует реакции переноса электрона. Однако механизмы фотохимических процессов у криптохромов и фотолиаз фундаментально различаются. Это, в частности, выражается в редокс-формах хромофора ФАД в ходе его фотоциклов. Активация светом фотолиаз происходит с участием двух хромофоров: каталитического ФАД, существующего в основном состоянии в анион-восстановленной форме ФАДН⁻, и антенного хромофора. У большинства фотолиаз

функцию антенного хромофора выполняют 5,10-метенилтетрагидрофолат (5,10-methenyltetrahydrofolate, МТНФ) или 8-гидроксидезафлавин (8-hydroxy-deazaflavin, 8-HDF). Указанные хромофоры имеют более высокие коэффициенты молярного поглощения в области УФА ($\epsilon_{370 \text{ нм}} = 29\,000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ у МТНФ или $\epsilon_{440 \text{ нм}} = 40\,000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ у 8-HDF) по сравнению с ФАДН⁻ ($\epsilon_{370 \text{ нм}} = 8000 \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$). Это увеличивает количество поглощенных фотонов, используемых для фотофизического переноса энергии возбуждения к ФАДН⁻. Кроме того, может значительно повышаться скорость репарации ДНК, что важно в условиях слабой освещенности. При связывании фотолиазы с участком ДНК, содержащим CPD или 6-4PP, образуется стабильный комплекс, в котором эти фотопродукты оказываются в тесном (в пределах действия ван-дер-ваальсовых сил) контакте с ФАДН⁻. В каталитическом акте происходит перенос электрона от ФАДН⁻ в синглетно-возбужденном состоянии к повреждению ДНК, что приводит к образованию нейтрального радикала флавина (ФАДН[•]) и анион-радикала CPD или 6-4PP. После их расщепления на мономеры пиримидинов избыточный электрон переносится обратно к ФАДН[•], регенерируя исходное состояние флавина (ФАДН⁻), участвующего в последующих фотокаталитических циклах. Помимо циклического переноса электрона от фотовозбужденного ФАДН⁻, в ходе которого происходит репарация повреждений ДНК, у фотолиз существует второй путь переноса электрона. Он вовлекает три консервативных остатка триптофана, известных как Три-триада. Этот путь, называемый фотохимической активацией, не требуется для репарации ДНК, но, как полагают, важен для поддержания заселенности возбужденного состояния ФАДН⁻ [Vechtomova et al., 2020].

Большинство данных по фотохимии криптохромов получено при изучении CRY1/CRY2 *A. thaliana*, CPH1 *C. reinhardtii*, dCRY *D. melanogaster* и aCRY *C. reinhardtii* [Ahmad, 2016; Kottke et al., 2017; Lacombe et al., 2019; Oldemeyer et al., 2016, 2020; Paulus et al., 2015]. В отличие от фотолиз, эти криптохромы в основном состоянии содержат ФАД в окисленной форме и обычно (за исключением aCRY) не связывают антенный хромофор. Как показывают структуры криптохромов, это обусловлено замещением ключевых аминокислотных остатков в белковых карманах, связывающих антенный хромофор, что препятствует его узнаванию и встраиванию.

В исследованиях с применением инфракрасной (ИК) фурье-спектроскопии временного разрешения в сочетании со спектроскопией временного разрешения в УФ и видимой области установлено, что при поглощении синего света ФАД в синглетном возбужденном состоянии восстанавливается в анион-радикал ФАД^{•-} посредством переноса электрона от соседнего остатка триптофана — компонента консервативной триады триптофанов. Сверхбыстрые реакции переноса электрона от триптофана (Три₁Н) к ФАД и между концевым триптофаном

(Три₃Н) и Три₁Н происходят за 0,4 пс и 31 пс соответственно (рис. 2). Они сопровождаются формированием катион-радикала концевой триптофана (Три₃Н⁺), который после депротонирования переходит в радикал Три₃[•]. Последующее взаимодействие нейтрального радикала триптофана с остатком тирозина (ТирОН) вызывает его восстановление до Три₃Н и образование радикала тирозина (ТирО[•]) в течение нескольких миллисекунд [Thoing et al., 2015]. Образующийся при фотовосстановлении ФАД анион-радикал (ФАД^{•-}) протонируется у CRY1 и CPN1 в течение нескольких микросекунд и переходит в нейтральный радикал (ФАДН[•]). Согласно полученным данным, донором протона в этой реакции может служить близко расположенный к изоаллоксазиновому кольцу флавина остаток аспарагиновой кислоты (Асп396). Очевидно, что исчезновение радикала ФАД^{•-} отделено от процессов внутри триады триптофанов, поскольку его протонирование и переход в форму ФАДН[•] задержано во времени на 6–7 порядков по отношению изначальному переносу электрона. Однако такое отчетливое разделение двух процессов представляется удивительным, если учесть, что донор протона Асп396 находится в непосредственной близости к флавину. Объяснение этого противоречия может состоять в том, что для переноса

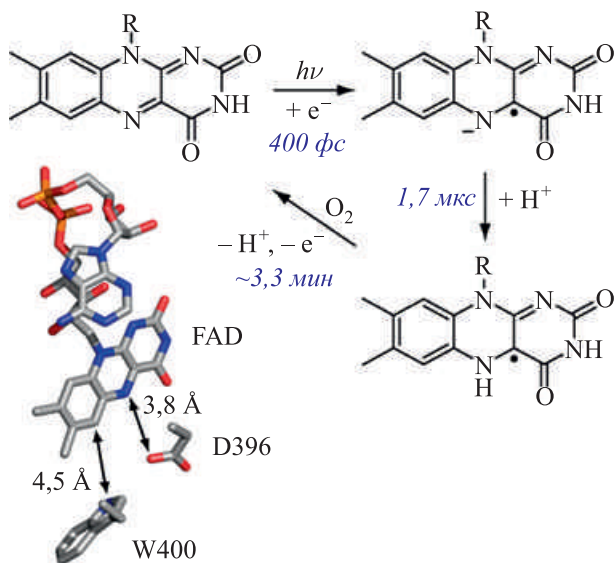
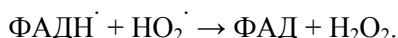
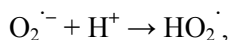
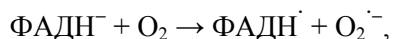


Рис. 2. Фотохимия ФАД криптохрома CPN1. После поглощения фотона окисленным ФАД формируется ФАДН[•] посредством переноса электрона и протона от триптофана W400 и аспарагиновой кислоты D396, которые расположены вблизи хромофора ФАД и рассматриваются как доноры электрона и протона соответственно. После поглощения второго фотона нейтральным радикалом и переноса на него электрона формируется восстановленный анион ФАДН⁻ (на схеме не приведен), который реокисляется кислородом в исходную форму ФАД аналогично окислению ФАДН[•] [Thoing et al., 2015]

протона аспарагиновой кислоте требуется предварительная структурная реорганизация, так как Asp396 формирует водородную связь с атомом кислорода белковой структуры [Thoing et al., 2015].

Интересно, что Asp396 сохранен только у криптохромов растений, тогда как у криптохромов животных типа 1, например, у dCRY, он замещен остатком цистеина. Вероятно, этим объясняется отсутствие сопряженного с переносом электрона протонирования при фотовосстановлении ФАД у dCRY и образование только анион-радикала. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, согласно которым замена Asp396 на цистеин в PNR-домене CRH1 полностью блокирует перенос протона. Важное следствие реакции протонирования — стабилизация радикала флавина в состоянии ФАДН[•] и продление его времени жизни до нескольких миллисекунд *in vitro* и нескольких минут *in vivo* [Hense et al., 2015; Herbel et al., 2013].

Как отмечено выше, в отличие от всех других редокс-форм флавина, имеющих поглощение только в синей/УФА области, ФАДН[•] поглощает в зеленой и красной областях (500–650 нм). Это свойство ФАДН[•] способствовало установлению его роли как сигнальной формы флавинового хромофора у криптохромов растений. Было показано, что добавление зеленого света подавляет ряд контролируемых криптохромом ответов на синий свет. Антагонистическое действие зеленого света по отношению к синему свету коррелировало с уменьшением концентрации ФАДН[•] в результате его фотовосстановления в неактивную форму ФАДН[–] [Ahmad, 2016]. Последующая реакция ФАДН[•] с кислородом приводит к регенерации исходного окисленного состояния ФАД по следующей возможной схеме [Muller, Ahmad, 2011]:



Как уже отмечалось, сигнальная активность криптохромов обеспечивается их ССЕ-доменом, тогда как PNR-домен осуществляет регулируемый светом контроль над функцией ССЕ. После фотоактивации ССЕ высвобождается и может взаимодействовать с компонентами сигнальных путей криптохрома. Однако до недавнего времени вопрос о том, как высвобождение ССЕ связано с фотохимией криптохрома, оставался невыясненным.

В исследовании с применением ИК-спектроскопии временного разрешения обнаружено, что после формирования сигнальной формы ФАДН[•] в N-концевом α/β -домене PNR фоторецептора CRH1 в течение 500 мкс происходит заметное изменение структуры β -листа. Этот факт рассматривается как свидетельство ключевой роли β -листа во взаимодействии PNR и ССЕ, а также роли его дест-

руктуризации в сигнальном процессе [Thoining et al., 2015]. Интересно, что у CRY1 переход ССЕ в неупорядоченное состояние происходит за время 400 мс после формирования ФАДН', т. е. намного позже. В предложенной на основе этих данных модели показано, как структурные изменения согласуются во времени с фотохимией флавинового хромофора у криптохромов растений [Thoining et al., 2015].

Структурные аспекты трансдукции сигнала криптохромами: фотоолигомеризация и взаимодействие с сигнальными белками. Как следует из рассмотренных выше данных, криптохромы с фотовосстановленным ФАД подвергаются конформационным изменениям, приводящим к разобщению РНР-и ССЕ-доменов. В последнее время показано, что этот процесс может вызывать изменения во взаимодействии между молекулами криптохромов, сопровождаемые их гомоолигомеризацией. Фотоолигомеризация требуется для физиологической активности криптохромов растений, так как обеспечивает повышение их сродства к другим белкам. К известным в настоящее время 30 белкам, взаимодействующим с криптохромами, относятся, например, транскрипционные факторы CRY-interacting basic helix-loop-helix — bHLHs (CIBs), комплекс репрессоров фотоморфогенеза constitutive photomorphogenic1 (COP1)/suppressors of phytochrome A (SPAs) и ингибиторы криптохромов (blue-light inhibitors of CRYs, BICs). В результате взаимодействия в комплексе гомоолигомера криптохрома с белками изменяется их сигнальная активность, что приводит к изменению экспрессии генов и регуляции программ развития растений [Wang, Lin, 2020]. Следует отметить, что ключевые детали этой модели не были точно определены. Особенно это касается структурных изменений в гомодимере криптохрома, на основании которых можно было бы его отличить от структуры мономера. Для решения этого вопроса проведено генетическое изучение связи структуры и функции у криптохромов растений [Gao et al., 2015; Liu et al., 2019]. Показано, что мутации остатков триптофана Три-триады у CRY1 или CRY2 блокируют каскад переноса электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, но не влияют на их физиологическую активность *in vivo*. Некоторые мутанты, а именно, Три374Ала у CRY2 или его эквивалент Три377Ала у CRY1, проявляют конститутивную, т. е. не зависимую от света, физиологическую активность. Используя преимущество таких мутантов, недавно определены структуры активных гомоолигомеров криптохромов. В отличие от дикого типа CRY2, который подвергается фотоолигомеризации, мутант Три374Ала CRY2 проявляет гомоолигомеризацию *in vitro*. Этот результат согласуется с данными о том, что фотоолигомеризация требуется для функциональной активности CRY2 и что мутант Три374Ала CRY2 конститутивно активен *in vivo* [Wang, Lin, 2020].

Методом низкотемпературной электронной микроскопии с визуализацией выявлены конфигурации гомодимера и гомотетрамера мутанта Три374Ала

CRY2, в которых эти олигомеры формируются посредством взаимодействий поверхностей PHR-доменов. Мутации в интерфейсе CRY2 приводили к уменьшению сродства гомодимера к сигнальному белку CIB1. На основании этого факта предположено, что CIB1 взаимодействует с CRY2 в интерфейсе гомодимера, и, вероятно, поэтому именно олигомеры, а не мономеры являются активными формами криптохромов [Shao et al., 2020]. Отметим, что большинство остатков, находящихся в одном из двух интерфейсов CRY-тетрамера, являются консервативными у криптохромов растений, но не у криптохромов животных. В этой связи было бы интересно определить, требуется ли гомоолигомеризация для функционирования данной группы криптохромов, которые могли развить иные структуры интерфейсов, или зависимый от димеризации механизм фотоактивации криптохромов растений уникален.

Инактивация криптохромов и комплексы CRY–BIC. Фотоактивированные криптохромы растений могут подвергаться инактивации по трем механизмам, включая спонтанную темновую реверсию гомоолигомеров в мономеры, взаимодействие с ингибиторами (BICs) и убиквитин-зависимый протеолиз. Среди этих механизмов только ингибирование криптохромов, вызываемое BICs, является светочувствительным процессом. Это предполагает, что взаимодействие CRY–BIC может играть более динамичную роль в регуляции активности криптохромов у растений, растущих на свету. Недавно проведенный анализ кристаллической структуры комплекса PHR–CRY2 с BIC2 выявил два возможных механизма, проясняющих вопрос о том, как белки BIC могут инактивировать криптохромы растений [Wang, Lin, 2020]. Во-первых, BIC может ингибировать фотовосстановление ФАД. Порядка десяти остатков CRY2 находятся в непосредственной близости от ФАД. Связывание BIC2 с PHR–CRY2 увеличивает расстояние между донором электрона (Три397) и акцептором (изоаллоксазиновое кольцо ФАД) на 1 ангстрем, что может затруднить перенос электрона. Кроме того, такое связывание может привести к вращению карбоксильной боковой цепи предполагаемого донора протона (Асп393) на 50°, что увеличит расстояние между донором протона и акцептором протона в хромофоре на 5 ангстрем. Такое изменение делает протонирование практически невозможным. Соответственно, BIC2 может блокировать фотовосстановление ФАД в ФАД^{•+} и его протонирование в ФАДН^{•+}. Во-вторых, BICs могут действовать как конкурентные ингибиторы гомоолигомеризации CRY2. В комплексе PHR–CRY2 с BIC2 фрагмент BIC2 проявляет структуру, определяющую его способность опоясывать паз между двумя субдоменами PHR-домена CRY2. PHR–CRY2 и BIC2 имеют по 16 остатков, которые вовлекаются в формирование комплекса между ними. Индивидуальные мутации нескольких остатков в интерфейсе комплекса снижали выраженное сродство между PHR–CRY2 и BIC2 *in vitro*. Интерфейсы

гетеродимера CRY–BIC и гомодимера CRY–CRY содержат два остатка CRY2 — Три349 и аргинин (Арг208). В гетеродимере остаток Три349 гидрофобно взаимодействует с изолейцином (Иле57) BIC2, тогда как Арг208 формирует солевой мостик и водородную связь с глутамином (Глу50) BIC2. В гомодимере CRY2–CRY2 Три349 и Арг208 находятся в интерфейсе. Эти данные убеждают, что связывание BICs с CRYs конкурентно ингибирует фотоолигомеризацию CRY, блокируя тем самым его фотоактивацию.

LOV-доменные сенсоры синего света

Фотоцикл ФМН в LOV-домене. Как следует из кристаллографического анализа [Zoltowski, Gardner, 2011], структура LOV-домена состоит из пятицепочечного β -листа ($\alpha\beta\beta\beta\beta\beta$) и четырех α -спиральных элементов (CaDaEaFa), тесно связывающих флавиновый хромофор (ФМН) внутри доменного кармана. Спирали закреплены в центральном складчатом β -листе, также участвующем в связывании ФМН внутри окружающей структуры, формируя своими полярными остатками сеть водородных связей с $C(2)=O$, $N3$, $C(4)=O$ изоаллоксазинового кольца. На расстоянии ~ 4 ангстрем от кольца в консервативном мотиве Ea-спирали находится цистеиновый остаток, который определяет специфику фотореакции ФМН и светочувствительную функцию LOV-домена. В темноте LOV-домен со связанным хромофором, максимально поглощающим при 450 нм, образует спектральную форму LOV_{450} . Для этой формы характерна интенсивная зеленая флуоресценция с максимумом при 520–530 нм. Воздействие синего света инициирует в LOV-домене фотоцикл, сопровождаемый формированием ФМН-цистеинильного аддукта, который отличается максимумом абсорбции при 390 нм (LOV_{390}) и полным отсутствием флуоресценции (рис. 3). Эти существенные спектральные изменения обусловлены двухэлектронным восстановлением изоаллоксазинового кольца с потерей конъюгированных двойных связей и искажением флавинового хромофора [Losi, Gartner, 2017].

Образованию аддукта предшествуют фотофизические и фотохимические процессы, исследованные с помощью спектроскопии временного разрешения. При возбуждении синим светом квантовый выход аддукта составляет 0,3–0,6, и он возникает после быстрого (~ 4 мкс) распада триплетного состояния ФМН (LOV_{660}), электронная структура которого обеспечивает протонирование атома N5, а также нуклеофильную атаку тиоловым анионом атома C(4a) изоаллоксазинового кольца (рис. 3). Согласно общепринятой модели, эти реакции сопряжены с формированием радикальной пары ФМН $\dot{H}$ – $H_2CS^{\cdot}$ и последующей рекомбинацией радикалов [Losi, Gartner, 2017].

Процесс образования аддукта включает разрыв SH-связи в цистеине, возникновение новых связей $C(4a)$ –S и $N5$ –H и обращение спина при переходе ФМН из триплетного состояния в основное синглетное. Триплетное состояние

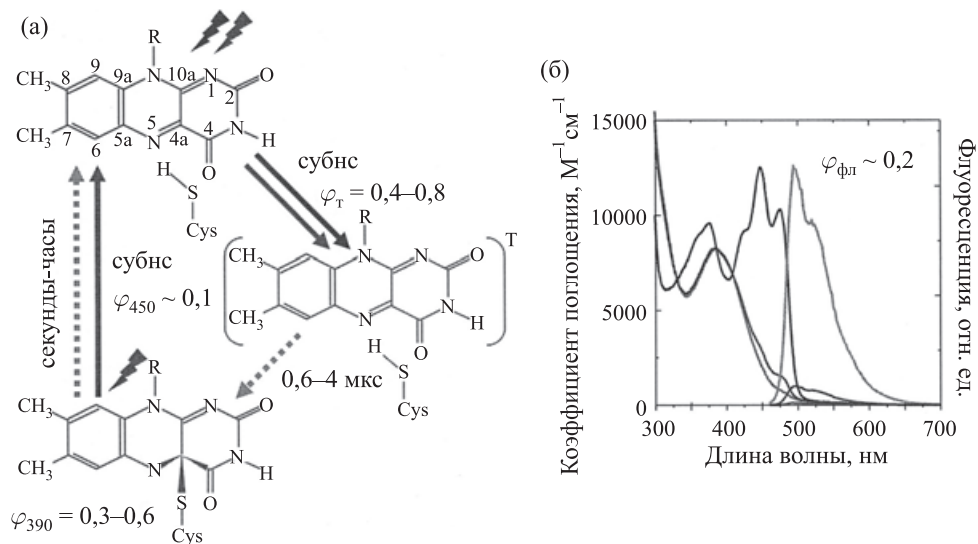


Рис. 3. Фотоцикл LOV-доменов (а) и спектральные свойства LOV-белка (б): спектры поглощения LOV_{450} , LOV_{390} и белка в режиме фоторавновесия при воздействии фиолетового света 390 нм; спектры флуоресценции тех же состояний [Losi, Gartner, 2017]

флавинового хромофора возникает за ~ 3 нс из его синглетного возбужденного состояния, причем скорость синглет-триплетного перехода у ФМН в LOV-доме не превышает таковую у ФМН в растворе. Таким образом, белковая структура способствует образованию ФМН-цистеинильного аддукта. Форма LOV_{390} , представляющая собой сигнальное состояние фоторецептора, полностью обратима в темноте и превращается в исходную форму LOV_{450} за время от нескольких секунд до часов при комнатной температуре (рис. 3). Однако при действии УФА/фиолетового света (390–400 нм), максимально поглощаемого LOV_{390} , переход в LOV_{450} происходит за время < 10 нс, хотя с очень малым квантовым выходом — около 0,1. Кроме того, поскольку УФА/фиолетовый свет поглощается также LOV_{450} , между состояниями LOV_{390} и LOV_{450} возникает фоторавновесие в обход термального восстановления LOV_{450} . В связи с этим LOV-домены рассматриваются как фотохромные системы, в которых LOV_{390} может подвергаться светоиндуцированному расщеплению ковалентной связи (аддукт), вызывающему формирование LOV_{450} [Losi, 2020].

Как отмечено выше, квантовый выход фотоаддукта при возбуждении синим светом достаточно высокий. При возбуждении же УФА-светом он значительно меньше. Это явление недостаточно исследовано, но оно, возможно, связано с разными направлениями дипольных моментов перехода для двух спектральных областей и поляризуемыми слабыми взаимодействиями между ФМН и окружающими его аминокислотными остатками [Losi, Gartner, 2017].

Трансмиссия сигнала в LOV-белках: световая активация фототропина и бактериальных LOV-белковых сенсоров. Фотохимические процессы в LOV-доменах, а также структурные аспекты передачи сигнала были впервые охарактеризованы у фоторецептора растений фототропина, который содержит два LOV-домена и эффекторный домен с киназной активностью, присоединенный к LOV2-домену *Ja*-спиралью. По современным представлениям, световая активация фототропина связана с повышением киназной активности эффекторного домена и его аутофосфорилированием вследствие образования аддукта в LOV2, который в темноте действует как репрессор киназного домена. Светоиндуцированное аутофосфорилирование фототропиновой киназы инициируется реорганизацией водородных связей в активном сайте в результате добавления протона к N5 ФМН в LOV₃₉₀ и последующим поворотом на 180° боковой цепи остатка глутамина. Это первая и ключевая стадия трансдукции светового сигнала в LOV2 (и в других LOV-белках) [Losi, Gartner, 2017]. Последующие изменения, выявленные с помощью низкотемпературной дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии, происходят в структуре центрального β -листа и затем в α -спиралях, фланкирующих LOV-ядро. Эти структурные изменения приводят к модификации взаимодействия LOV2 с *Ja*-спиралью, вызывая ее деструктуризацию, сопровождаемую активацией киназного домена. Механизм активации киназного домена может заключаться в том, что LOV2, действующий в темноте как ингибитор киназной активности, в результате фотоиндуцированного деструктурирования *Ja*-спирали диссоциирует от каталитического центра киназы и тем самым открывает его для связывания АТФ и аутофосфорилирования [Fraikin et al., 2013].

Наиболее привлекательным свойством LOV-фоторецепторов является присутствующая им модульная структура: фотосенсорный домен контактирует с разнообразными эффекторными и регуляторными модулями, которые, в конечном счете, определяют функциональность самого белка. Типичные функции представлены киназами, фосфатазами, вторичными регуляторными мессенджерами и ДНК-связывающими модулями [Fraikin et al., 2015]. Большое количество бактериальных LOV-доменов не содержат эффекторных модулей. У них LOV-ядро фланкируется спиральными участками различной длины. Эти короткие LOV-белки функционируют посредством формирования временных комплексов с эффекторными доменами или белками. Недавно проведенный обширный биоинформационный анализ позволил идентифицировать около 7000 LOV-белков у бактерий, грибов и растений.

Один из важных вопросов, связанных с модульной структурой LOV-белков, состоит в следующем: до какой степени светоиндуцированное распространение сигнала и трансмиссия сигнала от фотосенсорного домена к эффек-

торным модулям сохранена у разных LOV-белков. Результаты недавних исследований свидетельствуют, что β -структура в сочетании со спиральными участками, фланкирующими LOV-ядро на N-конце ($A'\alpha$) и C-конце (Ja), действуют в LOV-белках как фотопереклюватели. Распространение сигнала происходит в основном по четырем главным механизмам, каждый из которых вовлекает β -структуру и в разной степени Ja и/или $A'\alpha$. Первый механизм, основанный на отделении в течение 1 мс Ja от LOV-домена фототропина и повышении активности связанной с ним киназы, описан выше. Второй механизм основан на светоиндуцированном отсоединении $A'\alpha$ и димеризации LOV, вовлекающей β -структуру. Такой процесс происходит в LOV-белке VVD гриба *Neurospora crassa* и является основой биологической активности фоторецептора [Dasgupta et al., 2016]. Третий механизм постулирован для LOV-фоторецептора YtvA бактерии *Bacillus subtilis* на основе изучения структуры химерного белка, у которого LOV–YtvA соединен с киназой. В димере Ja принимает «coiled-coil»-конформацию, и две спирали поворачиваются наружу в течение 70 мкс после световой активации LOV-домена [Choi et al., 2016]. Четвертый механизм связан с отсоединением домена НТН и димеризацией LOV-НТН-фоторецептора EL222 бактерии *Erythrobacter litoralis*. Этот механизм имеет сходство со структурными механизмами, установленными для фототропина и VVD. В темноте белок EL222 находится в мономерном состоянии, и НТН присоединен к β -листу LOV-домена Ja -спиралью. Световая активация LOV инициирует разрушение контакта связывания между LOV и НТН. Это структурное изменение приводит к формированию димера фоторецептора на ДНК, посредством связывания НТН с ДНК, которое происходит только в данном олигомерном состоянии. Таким образом, активация LOV-домена светом может вызвать отсоединение НТН от β -листа и модуляцию олигомерного состояния EL222 в присутствии ДНК [Zoltowski et al., 2013].

Следует отметить, что большое разнообразие эффекторных доменов в LOV-фоторецепторах усложняет более общее понимание индуцированных ими сигнальных процессов. С другой стороны, с учетом множества различных комбинаций доменов, найденных в природе, вряд ли можно выработать обобщенную концепцию относительно того, как LOV-доменные белки осуществляют свою сигнальную функцию. Предметом оживленных дискуссий является олигомерное состояние LOV-белков, его динамика и функциональная роль. В целом, недавние результаты по олигомеризации и равновесию между мономером/димером вновь подчеркивают сложность сигнальной активности LOV-белков и мотивируют дальнейшее исследование аминокислотных остатков, которые не строго консервативны у разных LOV-белков и, возможно, определяют особенности трансдукции светового сигнала.

BLUF-доменные сенсоры синего света

Большинство известных в настоящее время BLUF-доменов (~ 900) присутствуют у бактерий (исключение составляют несколько эвглен). Некоторые BLUF-доменные фоторецепторы состоят только из BLUF-домена, хотя ряд других содержат ковалентно присоединенные эффекторы с ферментативной либо ДНК-связывающей активностью. Структура BLUF-доменов включает две α -спирали, расположенные по одну сторону центрального β -листа; они нековалентно связывают изоаллоксазиновое кольцо хромофора ФАД в окисленной форме (рис. 4, б). В отличие от LOV-доменов и криптохромов, фотовозбуждение ФАД в BLUF-домене не изменяет его редокс-состояние, а только индуцирует относительно тонкое электронное изменение, проявляемое в сдвиге на 10 нм в абсорбционном спектре (рис. 4, а). Кроме того, фотоактивация BLUF-доменов, в отличие от LOV-доменов, не требует больших структурных изменений в хромофоре. Поэтому механизм передачи флавином светового сигнала к апо-белку и другим белкам вызывает значительный интерес у исследователей.

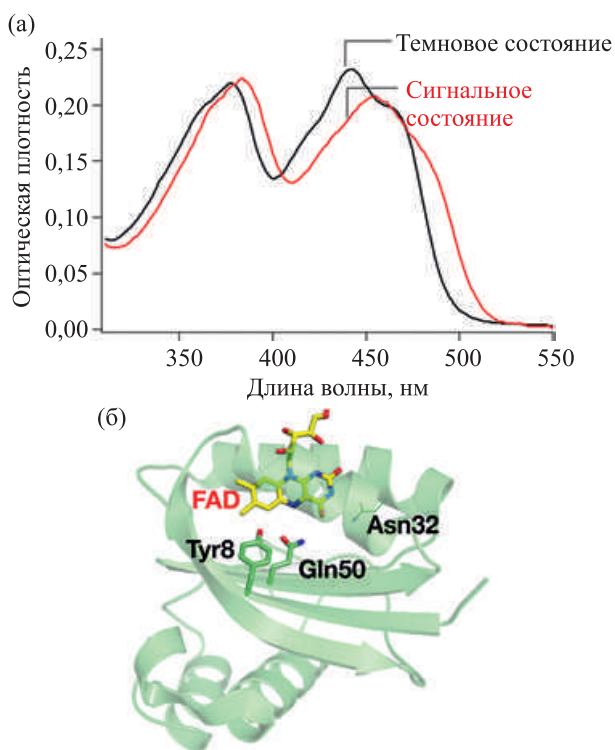


Рис. 4. Спектры поглощения BLUF-белка в темновом и световом состояниях (а). Структура BLUF-белка с хромофором ФАД и консервативными остатками тирозина, глутамин и аспарагин в активном сайте (б) [Fujisawa, Masuda, 2018]

Структура активного сайта и механизм реорганизации сети водородных связей в триаде ФАД–глутамин–тирозин, лежащий в основе фотоактивации BLUF-домена. На рис. 4, *а* показаны спектры поглощения BLUF-белка в темновом и сигнальном состояниях, т. е. до и после воздействия света. Видно, что в обоих состояниях содержится один и тот же хромофор ФАД, только в сигнальном состоянии его спектр сдвинут на ~ 10 нм. Поскольку сдвиг происходит в «красную» область, сигнальное состояние ФАД обозначают как ФАД_{red}. Такой сдвиг свидетельствует о связи фотоактивации BLUF с изменением взаимодействий между хромофором и апобелком. Изучение механизма этого уникального формирования сигнального состояния стало предметом многочисленных экспериментальных и теоретических исследований BLUF-белков. К настоящему времени общепринято, что сигнальное состояние BLUF-белков возникает вследствие реструктуризации сети водородных связей между ФАД, глутамином и тирозином в активном сайте BLUF-домена, где ключевой является боковая цепь глутамина, подвергающаяся химическим или механическим изменениям между ФАД и глутамином [Park, Tame, 2017].

Хромофор FAD связан с белком в активном сайте BLUF-домена (рис. 4, *б*). Кристаллографический анализ и данные по мутагенезу аминокислотных остатков вблизи хромофора свидетельствуют, что консервативный остаток глутамин, образующий водородную связь с карбонильной группой C4=O флавина, играет главную роль в фотоактивации BLUF-белка. Остаток глутамин образует также водородную связь с фенольным гидроксилом консервативного тирозина, вследствие чего формируется сеть водородных связей в триаде ФАД–Глу–Тир (рис. 5, *б*). Реорганизация этой сети водородных связей признана основным механизмом перехода BLUF-белков в сигнальное состояние. Однако вопрос о природе фотоиндуцированных изменений в боковой цепи глутамин ранее не был окончательно решен и длительное время оживленно дискутировался в литературе. В соответствии с результатами ряда экспериментальных и теоретических исследований были предложены две модели, описывающие возможную реорганизацию сети водородных связей в триаде ФАД–Глу–Тир (рис. 5, *б*). Первая модель предполагала, что переключение водородных связей обусловлено вращением амидной группы глутамин на 180° . Согласно второй модели, предсказанной на основании теоретических расчетов, реорганизация водородных связей индуцируется кето-енольной таутомеризацией карбонильной боковой цепи остатка глутамин с последующим вращением глутамин. Эта модель не сразу была принята безоговорочно из-за отсутствия твердого экспериментального подтверждения. Только недавно в комплексном исследовании с применением ИК-Фурье-спектроскопии получено экспериментальное доказательство таутомеризации глутамин [Domratcheva et al., 2016].

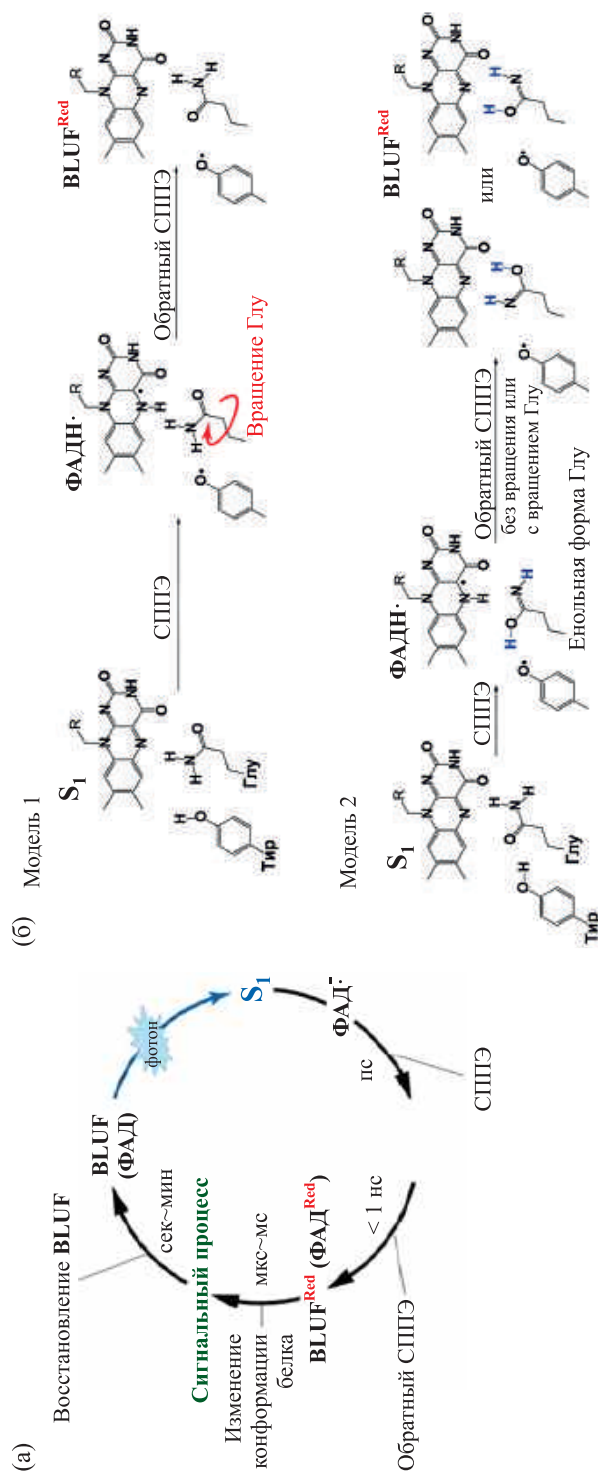


Рис. 5. Фотохимия BLUF-домена [Fujisawa, Masuda, 2018]: (а) схема фотоцикла; (б) предложенный процесс реорганизации водородных связей: вращение keto-формы глутамина (модель 1) или keto-енольная таутомеризация глутамина (модель 2)

В работе использовали BLUF-белки с ^{15}N -глутамином для выделения его структурного изменения из светоиндуцированного дифференциального спектра. Расшифровка сигналов, проведенная путем обширных квантово-химических расчетов, показала, что структурное изменение глутамин при переходе из темнового состояния в сигнальное не объясняется вращением кето-формы глутамин, а воспроизводится кето-енольной таутомеризацией. На основании совпадения данных эксперимента и теории идентифицирована частота при 1667 см^{-1} как относящаяся к $\text{C}=\text{O}$ глутамин в темновом состоянии BLUF. Это рассматривается как прямое доказательство конфигурации, соответствующее модели, в которой группа $\text{C}=\text{O}$ глутамин направлена к тирозину и акцептирует водородную связь. Определение ориентации глутамин в темновом состоянии BLUF исключает его вращение, и, следовательно, фотоактивация BLUF может происходить только посредством таутомеризации глутамин. Также в этом исследовании впервые удалось идентифицировать спектр глутамин в световом состоянии с частотой при 1691 см^{-1} , отнесенной к $\text{C}=\text{N}$ глутамин в его таутомерной форме. Согласно теоретическим расчетам, глутамин в сигнальном состоянии BLUF после таутомеризации из-за низкой энергии активации подвергается еще вращению, сопровождаемому формированием водородной связи между ОН енола и $\text{C4}=\text{O}$ флавина. Хотя это требует экспериментального подтверждения, модель кето-енольной таутомеризации становится в настоящее время общепринятой (рис. 5, б).

Фотоцикл FAD в BLUF-домене. Реорганизация водородных связей инициируется серией сверхбыстрых реакций, включающих фотоиндуцированный перенос электрона и сопряженный с ним перенос протона от тирозина к флави-ну. Эти реакции протекают в пикосекундной временной шкале, и поэтому определение молекулярных деталей переключения водородных связей возможно только с использованием сверхбыстрой абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Применение соответствующей спектроскопии с фемтосекундным временным разрешением оказалось решающим для получения полной информации о фотоцикле ФАД и фотоактивации BLUF-доменов (рис. 5, а) [Kennis, Mathes, 2013].

После воздействия синего света возбужденное состояние флавина тушится в результате переноса электрона от тирозина за $\sim 17\text{ пс}$. Образующийся анион-радикал флавина ($\text{ФАД}^{\cdot-}$) протонируется за $\sim 10\text{ пс}$ (наиболее вероятно, тем же тирозином), и формируется радикальная пара $\text{ФАДН}^{\cdot}/\text{ТирО}^{\cdot}$. Последовательность сверхбыстрых реакций, в которой перенос электрона предшествует переносу протона, известна как «сопряженный с протоном перенос электрона» — СППЭ (proton-coupled electron transfer, PCET). Протонирование $\text{ФАД}^{\cdot-}$ играет важную роль в последующей реорганизации водородных связей, поскольку при

образовании ФАДН[•] водородная связь между глутамином и N5 флавина разрушается, и это инициирует изменение ориентации амида глутамина. Радикальная пара ФАДН[•]/ТирО[•] рекомбинирует в течение 60 пс вследствие обратной реакции переноса электрона и протона (обратная реакция СППЭ). Во время рекомбинации этих радикалов происходит реорганизация сети водородных связей в триаде ФАД–Глу–Тир (рис. 5, б), приводящая к «красному» сдвигу на ~ 10 нм в спектре поглощения ФАД (рис. 4, а). Возникающая вследствие этого в пределах 1 нс форма флавина с переключенными водородными связями (ФАДred) остается стабильной в течение нескольких секунд/минут, и поэтому BLUF-домен с ФАДred рассматривается как адаптированное к свету или сигнальное состояние (BLUFred). До его термального перехода в исходное темновое состояние (BLUFdark) происходят более медленные процессы структурной релаксации вне флавин-связывающего кармана (в микросекундной и миллисекундной временной шкале). Эти конформационные изменения распространяются в периферические области BLUF-доменов и приводят к активации соответствующих эффекторных доменов/белков [Kennis, Mathes, 2013].

Интересные данные получены при исследовании фотохимии BLUFred (рис. 6). В работе использовали мутант одного из BLUF-доменных фоторецепторов, который отличался от дикого типа только значительно более продолжительной темновой реверсией BLUFred в BLUFdark (223 и 4 секунды соответственно). Это позволило сохранять сигнальное состояние BLUFred более длительное время. Формирование BLUFred индуцировали фоновым освещением, после чего ФАДred возбуждали фемтосекундным импульсом света. Показано, что в адаптированном к свету состоянии образуется такая же радикальная пара ФАДН[•]/ТирО[•], как и в реакции состояния, адаптированного к темноте. Особенно важно, однако, что способ ее формирования посредством СППЭ изменился. При фотовозбуждении флавина в темновом состоянии СППЭ происходит последовательно, а именно, перенос протона отстает от переноса электрона на ~ 10 пс. При фотовозбуждении же флавина в адаптированном к свету состоянии ФАДН[•] образуется согласованным переносом электрона и протона за ~ 1 пс без формирования интермедиата ФАД^{•-} (рис. 6). Измененная природа процесса СППЭ, весьма вероятно, связана с реорганизованной сетью водородных связей в триаде ФАД–Глу–Тир в адаптированном к свету состоянии. Такая точка зрения основана на данных о том, что формирование ФАДН[•] вовлекает перенос протона через сеть водородных связей в этой триаде. Поэтому более быстрое и согласованное формирование ФАДН[•] в сигнальном состоянии объясняется более сильной сетью водородных связей, что способствует переносу через нее протона [Kennis, Mathes, 2013].

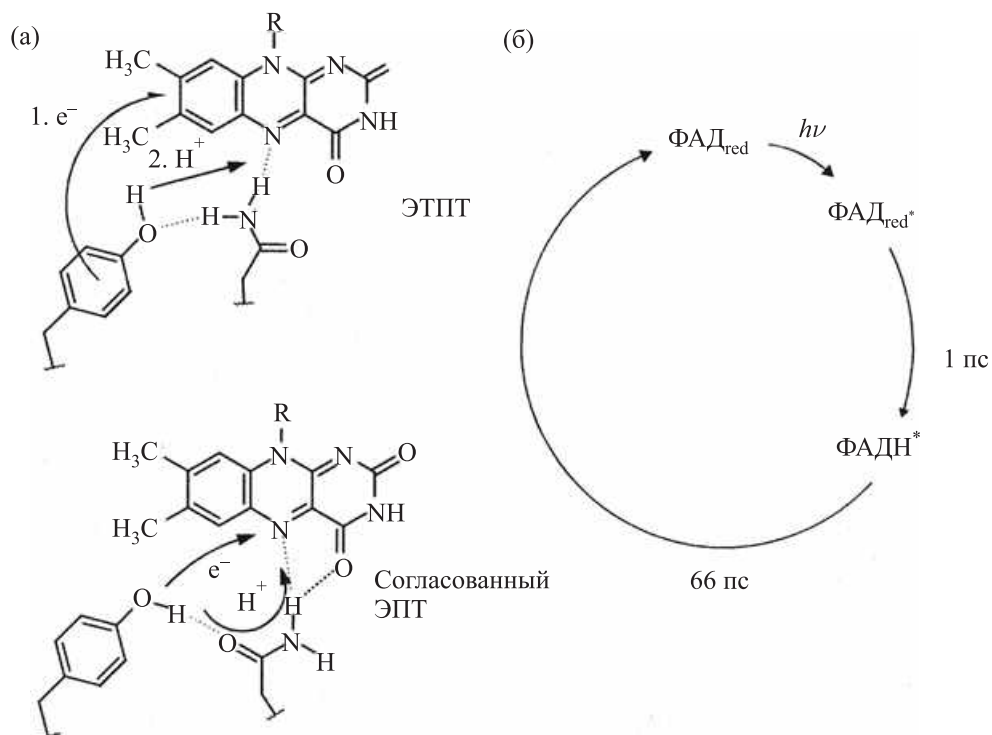


Рис 6. В фотоцикле BLUF, который адаптирован к темноте (а), перенос электрона от тирозина к флавину (1) предшествует переносу протона (2) в последовательности электронный транспорт → протонный транспорт (ЭТПТ). При возбуждении светом флавина в BLUF, который адаптирован к свету (б), т. е. находится в сигнальном состоянии (FAD_{red}), нейтральный радикал (FADH*) формируется посредством согласованного электронного и протонного транспорта (ЭПТ) за ~ 1 пс [Kennis, Mathes, 2013]

Фотоактивацию BLUF-доменных фоторецепторов можно рассматривать как конверсию энергии фотона в увеличение числа водородных связей в связывающем флавин кармане [Domratcheva et al., 2016]. Остается прояснить, как метастабильный таутомер глутамина с его специфическими водородными связями триггирует конформационное переключение в белке и становится достаточно стабилизированным, чтобы поддерживать относительно долгоживущее сигнальное состояние, которое способно инициировать различные физиологические ответы.

Рассмотренные выше флавопротеиновые сенсорные фоторецепторы вызывают большой научный интерес в связи с их фотохимическими свойствами, вариабельностью сигнальных доменов/белков и все расширяющимся применением в оптогенетических системах. Так, на основе фотобиофизических свойств LOV-домены успешно используются как флуоресцентные репортеры в клеточной мик-

роскопии [Wingen et al., 2017], как генераторы синглетного кислорода в miniSOGs (mini singlet oxygen generators) [Souslova et al., 2017] и в ряде других систем. Все три типа сенсорных фоторецепторов находят все большее применение в оптогенетике для манипуляции светом различных молекулярных и клеточных процессов, включая трансдукцию сигнала, экспрессию генов и транспорт белков [Losi et al., 2018]. Генетически закодированные, светочувствительные активаторы могут быстро и обратимо контролировать динамику таких процессов с высокой пространственно-временной точностью. В основанных на фотосенсорных белках оптогенетических системах используются в основном те же механизмы трансмиссии сигнала, что и в этих нативных белках [Fraikin et al., 2016].

Познание первичных механизмов восприятия света флавопротеиновыми сенсорными фоторецепторами и принципов их функционирования у разных организмов значительно возросло за последние несколько лет. Накопленная ранее информация о структуре и фотохимии этих фоторецепторных белков пополнилась новыми данными о взаимном влиянии флавинового хромофора и окружающих аминокислотных остатков в активном сайте. Эти остатки во многом определяют специфику фотохимических реакций флавинов у каждого из трех фоторецепторов. Особого внимания заслуживают результаты исследования криптохромных фоторецепторов, выявленных недавно у зеленой водоросли *C. reinhardtii* (CPH1, aCRY) и у позвоночных животных (CRY4). Эти фоторецепторы охарактеризованы в отношении структуры и разнообразных функций; у них детально изучены фотоциклы флавиновых хромофоров, которые отличаются из-за природы и числа ароматических остатков и других аминокислот, участвующих в каскаде переноса электрона/протона при фотовосстановлении флавина [Kottke et al., 2017]. У криптохромов растений поглощение света хромофором инициирует перенос электрона к флавину через триаду триптофанов. У криптохромов животных типа I и подобных криптохромам животных (aCRY) этот электронно-транспортный путь включает четвертый ароматический остаток, который может быть либо триптофаном (dCRY), либо тирозином (CraCRY). У криптохрома голубя (*CiCRY4*) цепь из Три-триады удлиняется за счет четвертого триптофана и остатка тирозина, что определяет необычно высокий квантовый выход фотовосстановления флавина [Zoltowski et al., 2019].

Несмотря на то, что механизм фотовосстановления ФАД детально изучен *in vitro*, вопрос о том, как конкретно перенос электрона к ФАД вовлекается в фотоактивацию криптохромов, остается нерешенным. Показано, что мутации остатков Три-триады у CRY1/CRY2, которые блокируют перенос электрона и фотовосстановление ФАД *in vitro*, не влияют на их биохимическую и физиологическую активность *in vivo* [Gao et al., 2015; Liu et al., 2019]. Иными словами, зависимое от Три-триады фотовосстановление ФАД не требуется для функционирования криптохромов. Очевидно, для раскрытия механизма фотоактивации

криптохромных белков необходимо дальнейшее исследование альтернативного пути переноса электрона с применением новых и инновационных подходов.

Другой вопрос, связанный с фотоциклом ФАД, относится к магниточувствительной функции криптохромов. Принято считать, что в основе магниточувствительности криптохромных белков лежит формирование радикальных пар, на которые могут влиять слабые магнитные поля [Hore, Mouritsen, 2016]. Следствием этого может быть изменение химических констант скоростей редокс-реакций ФАД, создающее отличие в концентрации активированного состояния фоторецептора и, соответственно, измененную биологическую активность. Однако природа магниточувствительных радикальных пар и стадии, на которых они действуют в течение редокс-цикла криптохромов, пока точно не определены и являются предметом дискуссий. На основании большого числа экспериментальных и теоретических работ предложены две альтернативные модели формирования разных радикальных пар, определяющих магниточувствительность криптохромов.

Согласно модели 1, радикальная пара (ФАД^{•-} Три^{•+}) образуется путем иницирующей реакции переноса электрона к фотовозбужденному ФАД от остатка триптофана, включенного в триаду (тетраду) триптофанов. Эта радикальная пара подвергается магниточувствительной интерконверсии между синглетным состоянием и триплетным: $^1[\text{ФАД}^{\bullet-} \text{Три}^{\bullet+}] \leftrightarrow ^3[\text{ФАД}^{\bullet-} \text{Три}^{\bullet+}]$. При протонировании они могут переходить в форму ФАДН[•] и после фотовосстановления — в неактивную форму ФАДН⁻. Реокисление ФАДН[•] в реакции с кислородом принято за основу в модели 2, предполагающей, что интермедиатом в этом процессе может быть радикальная пара [ФАДН[•] О₂^{•-}]. Она также может подвергаться магниточувствительному взаимопревращению между синглетным состоянием и триплетным; при этом синглетное состояние переходит в исходную форму ФАД после высвобождения перекиси водорода. В недавнем исследовании получено частичное подтверждение такого механизма [Roos et al., 2019]. Показано, что ответы CRY1 на свет *in vivo* усиливаются в магнитном поле, причем даже в случае его воздействия во время темновых интервалов между освещением. Поэтому считается, что магниточувствительная реакция в фотоцикле криптохрома происходит на стадии реокисления ФАДН[•] и может вовлекать активные формы кислорода (АФК). Однако конкретная природа АФК пока не определена. Кроме того, в соответствии с данными теоретического анализа радикальная пара флавин/супероксид кислорода не может быть магниточувствительным интермедиатом у криптохромов из-за очень быстрой релаксации спина супероксида. Очевидно, для идентификации магниточувствительных интермедиатов требуются дальнейшие теоретические и экспериментальные исследования.

Главный проблемный вопрос, касающийся рассмотренной выше модели 1, состоит в том, что она включает некоторые результаты, являющиеся спорными

из-за существования противоречий между фотохимическими и биологическими данными. Кроме того, в ряде работ по ориентации птиц в магнитном поле получены данные, которые не согласуются с обсуждаемой моделью. В одной из них продемонстрировано, что птицы могут ориентироваться в магнитном поле при действии зеленого света, где ФАД не поглощает, а поглощает только ФАДН[•]. Вследствие этого он может восстанавливаться в ФАДН[•], что исключает возможность формирования радикальной пары флавин/триптофан и ее модификации магнитным полем. В другой работе установлено, что зависимость от магнитного поля направленная ориентация птиц может происходить только в том случае, если птицы подвергаются действию магнитного поля в темноте. Поскольку радикальная пара флавин/триптофан имеет очень короткое время жизни (несколько миллисекунд), эти радикалы не могут служить мишенями для магнитного поля. Итак, магниточувствительная стадия в ориентации птиц происходит в темновой период, что совпадает с реакцией реокисления ФАДН[•] у криптохромов.

Для прояснения вопроса о несоответствии фотохимических и биологических данных в недавней работе проведен детальный фотохимический и структурный анализ криптохрома из голубя *Columba livia* (C1CRY4). В полученных кристаллических структурах выявлены модификации в эволюционно консервативной триаде триптофанов: у C1CRY4 цепь триптофанов удлиняется за счет четвертого триптофана и остатка тирозина [Zoltowski et al., 2019]. Это обеспечивает высокий квантовый выход реакции фотовосстановления ФАД ($\phi \sim 0,4$), превышающий соответствующие квантовые выходы у других криптохромов ($\phi \sim 0,2$). Высокий квантовый выход повышает чувствительность C1CRY4 к низким интенсивностям света, что согласуется с наблюдением поведенческих реакций у птиц при их ориентации в магнитном поле. В целом результаты работы совместимы с ночным поведением мигрирующих позвоночных животных в условиях слабой освещенности и предсказывают фотохимические пути, которые могут обеспечивать магниточувствительность организмов. Однако некоторые вопросы в этом направлении остаются нерешенными. Для их прояснения необходимы новые подходы к изучению поведенческих реакций организмов, а также дальнейшие фотохимические исследования криптохромов у мигрирующих птиц, которые помогут глубже понять механизмы биологической адаптации разных организмов.

Литература

- Ahmad M. Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes // Curr. Opin. Plant Biol. — 2016. — Vol. 33. — P. 108–115.
- Chaves I., Pokorny R., Byrdin M., Hoang N., Ritz T., Brettel K., Essen L.O., van der Horst G. T., Batschauer A., Ahmad M. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals // Annu. Rev. Plant Biol. — 2011. — Vol. 62. — P. 335–364.

- Choi S., Nakasone Y., Hellingwerf K. J., Terazima M. Photochemical reactions of the LOV and LOV-linker domains of the blue light sensor protein YtvA // *Biochemistry*. — 2016. — Vol. 55. — P. 3107–3115.
- Dasgupta A., Fuller K. K., Dunlap J. C., Loros J. J. Seeing the world differently: variability in the photosensory mechanisms of the model fungi // *Environ. Microbiol.* — 2016. — Vol. 18. — P. 15–20.
- Domratcheva T., Hartmann E., Schlichting I., Kottke T. Evidence for tautomerization of glutamine in BLUF blue light receptors by vibrational spectroscopy and computational chemistry // *Sci. Rep.* — 2016. — Vol. 6. — P. 22669.
- Fraikin G. Ya., Strakhovskaya M. G., Belenikina N. S., Rubin A. B. Bacterial photosensory proteins: regulatory functions and optogenetic applications // *Microbiology*. — 2015. — Vol. 84, No. 4. — P. 461–472.
- Fraikin G. Ya., Strakhovskaya M. G., Belenikina N. S., Rubin A. B. LOV and BLUF flavoproteins, regulatory photoreceptors of microorganisms and photosensory actuators in optogenetic systems // *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* — 2016. — Vol. 71, No. 1. — P. 50–57.
- Fraikin G. Ya., Strakhovskaya M. G., Rubin A. B. Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes // *Biochemistry (Mosc.)*. — 2013. — Vol. 78, No. 11. — P. 1238–1253.
- Franz S., Ignatz E., Wenzel S., Zielosko H., Putu E., Maestre-Reyna M., Tsai M.-D., Yamamoto J., Mittag M., Essen L.-O. Structure of the bifunctional cryptochrome aCRY from *Chlamydomonas reinhardtii* // *Nucleic Acids Res.* — 2018. — Vol. 46, No. 15. — P. 8010–8022.
- Fujisawa T., Masuda S. Light-induced chromophore and protein responses and mechanical signal transduction of BLUF proteins // *Biophys. Rev.* — 2018. — Vol. 10. — P. 327–337.
- Gao J., Wang X., Zhang M., Bian M., Deng W., Zuo Z., Yang Z., Zhong D., Lin C. Trp triad-dependent rapid photoreduction is not required for the function of Arabidopsis CRY1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2015. — Vol. 112, No. 29. — P. 9135–9140.
- Hense A., Herman E., Oldemeyer S., Kottke T. Proton transfer to flavin stabilizes the signaling state of the blue light receptor plant cryptochrome // *J. Biol. Chem.* — 2015. — Vol. 290, No. 3. — P. 1743–1751.
- Herbel V., Orth C., Wenzel R., Ahmad M., Bittl R., Batschauer A. Lifetimes of Arabidopsis cryptochrome signaling states in vivo // *Plant J.* — 2013. — Vol. 74. — P. 583–592.
- Hore P. J., Mouritsen H. The radical-pair mechanisms of magnetoreception // *Annu. Rev. Biophys.* — 2016. — Vol. 4. — P. 299–344.
- Kennis J. T. M., Mathes T. Molecular eyes: proteins that transform light into biological information // *Interface Focus*. — 2013. — Vol. 3. — P. 20130005.
- König S., Juhas M., Jäger S., Kottke T., Buchel C. The cryptochrome-photolyase protein family in diatoms // *J. Plant Physiol.* — 2017. — Vol. 217. — P. 15–19.
- Kottke T., Oldemeyer S., Wenzel S., Zou Y., Mittag M. Cryptochrome photoreceptors in green algae: unexpected versatility of mechanisms and functions // *J. Plant Physiol.* — 2017. — Vol. 217. — P. 4–14.

- Lacombat F., Espagne A., Dozova N., Plaza P., Muller P., Brettel K., Franz-Badur S., Essen L.-O. Ultrafast oxidation of a tyrosine by proton-coupled electron transfer promotes light activation of an animal-like cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* — 2019. — Vol. 141, No. 34. — P. 13394–13409.
- Liu B., Liu H., Zhong D., Lin C. Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2010. — Vol. 13. — P. 578–586.
- Liu H., Su T., He W., Wang G., Lin C. The universally conserved residues are not universally required for stable protein expression or functions of cryptochromes // *Mol. Biol. Evol.* — 2019. — Vol. 37, No. 2. — 327–340.
- Losi A. LOV proteins photobiophysics // *Encyclopedia of Biophysics.* — 2020. — DOI: 10.1007/978-3-642-16712-6_800.
- Losi A., Gardner K. H., Moglich A. Blue-light receptors for optogenetics // *Chem. Rev.* — 2018. — Vol. 118, No. 21. — P. 10659–19709.
- Losi A., Gartner W. Solving blue light riddles: new lesions from flavin-binding LOV photoreceptors // *Photochem. Photobiol.* — 2017. — Vol. 93, No. 1. — P. 141–158.
- Losi A., Gartner W. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors // *Annu. Rev. Plant Biol.* — 2012. — Vol. 63. — P. 49–72.
- Michael A. K., Fribourgh J. L., Van Gelder R. N., Partch C. L. Animal cryptochromes: divergent roles in light perception, circadian timekeeping and beyond // *Photochem. Photobiol.* — 2017. — Vol. 93. — P. 128–140.
- Muller P., Ahmad M. Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin-superoxide radical pair consistent with magnetoreception // *J. Biol. Chem.* — 2011. — Vol. 286, No. 24. — P. 21033–21040.
- Oldemeyer S., Franz S., Wenzel S., Essen L.-O., Mittag M., Kottke T. Essential role of an unusual long-lived tyrosyl radical in the response to red light of the animal-like cryptochrome aCRY // *J. Biol. Chem.* — 2016. — Vol. 291. — P. 14062–14071.
- Oldemeyer S., Haddad A. Z., Fleming G. R. Interconnection of the antenna pigment 8-HDF and flavin facilitates red-light reception in bifunctional animal-like cryptochrome // *Biochemistry.* — 2020. — Vol. 59, No. 4. — P. 594–604.
- Ozturk N. Phylogenetic and functional classification of the photolyase/cryptochrome family // *Photochem. Photobiol.* — 2017. — Vol. 93, No. 1. — P. 1–22.
- Park S.-Y., Tame J. R. H. Seeing the light with BLUF proteins // *Biophys. Rev.* — 2017. — Vol. 9. — P. 169–176.
- Paulus B., Bajzath C., Melin F., Heidinger L., Kromm V., Herkersdorf C., Benz U., Mann L., Stehle P., Hellwig P., Weber S., Schleicher E. Spectroscopic characterization of radicals and radical pairs in fruit fly cryptochrome – protonated and nonprotonated flavin radical-states // *FEBS J.* — 2015. — Vol. 282. — P. 3175–3189.
- Pooam M., Arthaut L.-D., Burdick D., Link J., Martino C. F., Ahmad M. Magnetic sensitivity mediated by the Arabidopsis blue-light receptor cryptochrome occurs during flavin reoxidation in the dark // *Planta.* — 2019. — Vol. 249, No. 2. — P. 319–332.
- Schwinn K., Ferre N., Huix-Rotllant M. UV-visible absorption spectrum of FAD and its reduced forms embedded in a cryptochrome protein // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2020. — Vol. 22. — P. 12447–12455.

- Shao K., Zhang X., Li X., Hao Y., Huang X., Ma M., Zhang M., Yu F., Liu H., Zhang P. The oligomeric structures of plant cryptochromes // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2020. — Vol. 27, No. 5. — P. 480–488.
- Souslova E. A., Mironova K. E., Deyev S. M. Applications of genetically encoded photosensitizer miniSOGs: from correlative light electron microscopy to immunophotosensitizing // *J. Biophotonics.* — 2017. — Vol. 10. — P. 338–352.
- Thoing C., Oldemeyer S., Kottke T. Microsecond deprotonation of aspartic acid and response of the α/β subdomain precede C-terminal signaling in the blue light sensor plant cryptochrome // *J. Am. Chem. Soc.* — 2015. — Vol. 137. — P. 5990–5999.
- Vechtomova Y. L., Telegina T. A., Kritsky M. S. Evolution of proteins of the DNA photolyase/cryptochrome family // *Biochemistry (Mosc.)*. — 2020. — Vol. 85. — P. 131–153.
- Wang Q., Lin C. A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2020. — Vol. 27, No. 5. — P. 401–403.
- Wang Q., Zuo Z., Wang X., Liu Q., Gu L., Oka Y., Lin C. Beyond the photocycle — how cryptochromes regulate photoresponses in plants // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2018. — Vol. 45. — P. 120–126.
- Wingen M., Jaeger K.-E., Gensch T., Drepper T. Novel thermostable flavin-binding fluorescent proteins from thermophilic organisms // *Photochem. Photobiol.* — 2017. — Vol. 93 — P. 849–856.
- Zoltowski B. D., Chelliah Y., Wickramaratne A., Jarecha L., Karki N., Xu W., Mouritsen H., Hore P. J., Hibbs R. E., Green C. B., Takahashi J. S. Chemical and structural analysis of a photoactive vertebrate cryptochrome from pigeon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2019. — Vol. 116, No. 39. — P. 19449–19457.
- Zoltowski B. D. Resolving cryptic aspects of cryptochrome signaling // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2015. — Vol. 112, No. 29. — P. 8811–8812.
- Zoltowski B. D., Vaidya A. T., Top D., Widom J., Young M. W., Crane B. R. Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome // *Nature.* — 2011. — Vol. 480. — P. 396–399.
- Zoltowski B., Motta-Mena L., Gardner K. Blue-light-induced dimerization of bacterial LOV-HTH DNA-binding protein // *Biochemistry.* — 2013. — Vol. 52. — P. 6653–6661.

Flavin-binding sensory photoreceptors in living systems: biophysical aspects

G. Ya. Fraikin, A. B. Rubin

Department of Biophysics, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory, 1-12, 119234 Moscow, Russia
E-mail: GFraikin@yandex.ru, rubin@biophys.msu.ru

This review deals with the biophysical aspects of flavin-based photosensors, comprising cryptochromes, light, oxygen, voltage (LOV) and blue light sensing using flavins (BLUF) proteins. The molecular mechanisms of blue light sensing via these photoreceptors have become a major topic in photobiology during the last two decades. Flavin-based photoreceptors

have gained ever-growing scientific interest due to their specific photochemical properties, their variety in signaling domains or interacting proteins and their widening applications in optogenetic systems. Fundamental to photoreception of the sensory proteins are flavin chromophores (FAD or FMN) that undergo physico-chemical changes and photochemical transformations of different kinds upon blue light absorption. The photochemical reactions initiate photosensory processes and lead to a variety of changes in chromophore-protein interaction. These conformational transitions in protein structure immediately surrounding the chromophores are subsequently amplified by allosteric networks within the photoreceptors. The resulting changes in protein dynamics and structure provide the foundation of the photoreceptor signaling activity in living systems. The knowledge on the primary mechanisms of the above-mentioned photosensory processes has grown remarkably during the last few years. In this review the biophysical aspects of cryptochromes, LOV and BLUF proteins are mainly discussed. Special emphasis is given to peculiarities of their flavin chromophore photochemical reactions, photoactivation mechanisms and early stages of signal transduction. We also notice to several unresolved issues that still remain as well as to further investigations in this attractive field of molecular photobiology and biophysics.

Key words: flavin-based photosensors, cryptochromes, LOV and BLUF proteins, photochemical reactions, signaling activity.

Научное издание

Горизонты биофизики

Том 1

Под редакцией академика А. Б. Рубина

Дизайнер А. А. Гурьянова
Технический редактор А. В. Бакиев
Корректор А. В. Бекмачева

Подписано в печать 13.09.2022. Формат 60×84¹/₁₆.
Усл. печ. л. 30,69. Уч.-изд. л. 32,12. Гарнитура «Таймс».
Бумага офсетная № 1. Печать офсетная. Тираж 300 экз. Заказ № 22-30.

АНО «Ижевский институт компьютерных исследований»,
426053, г. Ижевск, ул. Ворошилова, д. 123.
<http://shop.rcd.ru> E-mail: mail@rcd.ru Тел./факс: +7 (3412) 50-02-95

Отпечатано в цифровой типографии
АНО «Ижевский институт компьютерных исследований».
