

На правах рукописи

ГОЛЫШЕВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

МАЛОУГЛОВЫЕ ДВИЖЕНИЯ МОЛЕКУЛ ПО ДАННЫМ
ИМПУЛЬСНОГО ЭПР И ОСОБЕННОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
УПАКОВКИ В БИОЛОГИЧЕСКИХ И НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ
СРЕДАХ

1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Новосибирск – 2022

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук

**Научный
руководитель**

Дзюба Сергей Андреевич

доктор физико-математических наук, зав. лаб. ХФСР
ИХКГ СО РАН

**Официальные
оппоненты**

Семенов Алексей Юрьевич

доктор биологических наук, профессор, заведующий
отделом фотобиофизики в научно-исследовательском
институте физико-химической биологии имени
А.Н.Белозерского, г. Москва

Комаровских Андрей Юрьевич

кандидат физико-математических наук, с.н.с.
лаборатории физико-химических методов исследования
газовых сред Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт неорганической химии им. А.В. Николаева
Сибирского отделения Российской академии наук

**Ведущая
организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт «Международный томографический
центр» Сибирского отделения Российской академии
наук

Защита диссертации состоится “12” октября 2022 года в 16-45 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.150.01 при ФГБУН Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН) по адресу: 630090, Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещён на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ИХКГ СО РАН, учёному секретарю диссертационного совета 24.1.150.01; e-mail: ref_dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан “ ” _____ 2022 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



И. П. Поздняков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Органические и биологические твердые тела, не обладающие кристаллической структурой, представляют интерес не только для практического использования, но и ввиду их необычных фундаментальных свойств. С точки зрения практического применения, такие материалы технологичны, прозрачны, обладают равномерными физическими свойствами. Исследование биологических объектов при низких температурах представляет интерес в связи с изучением процессов криоконсервации, а также в связи с исследованием таких структурно-динамических свойств, изучение которых облегчено в условиях заторможенности движений и которые при этом неизбежно проявляют себя и при более высоких температурах.

Исследование наноструктуры таких тел является важной фундаментальной задачей, так как структура, а именно надмолекулярная упаковка или упаковка больших молекул, определяет многие макросвойства объектов, такие как твердость, теплопроводность материала, функциональность биосистем и другие. Знание наноструктуры твердых тел важно для развития нанотехнологий, наномедицины, разработки лекарств и методов их доставки. Так, например, белки и пептиды могут связываться с металлами, ионами, полупроводниками, меняя свою структуру и позволяя различное свое применение в биотехнологии.

Наноструктуру твердых тел исследуют методами криоэлектронной микроскопии, рентгеновского рассеяния, рассеяния нейтронов, атомно-силовой микроскопии, молекулярного моделирования, ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и другими. Данные методы имеют свои ограничения: некоторые из них являются труднодоступными и дорогими, другие требуют особой пробоподготовки, что вносит свои ограничения на исследуемые объекты, метод молекулярного моделирования требует экспериментального подтверждения. При этом эти методы дополняют друг друга, позволяют собрать более полную информацию о системе.

Метод импульсного электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) в варианте электронного спинового эха (ЭСЭ) спиновых зондов и меток чувствителен к стохастическим малоугловым

ориентационным движениям, – так называемым стохастическим либрациям, происходящим в твердых телах в наносекундном диапазоне времен корреляции. Данный метод позволяет изучать такие движения парамагнитной молекулы как целого (в случае жесткой структуры), или большого фрагмента молекулы.

Изначально данный метод импульсного ЭПР активно применялся только для исследования молекулярной подвижности. Однако недавно было обнаружено, что наблюдение стохастических либраций методом ЭСЭ позволяет исследование структуры матрицы. Так, например, путем сравнения температурных зависимостей скоростей анизотропной релаксации можно делать вывод о более или менее плотной надмолекулярной упаковке исследуемого объекта. В ряде работ по ионным жидкостям методом импульсного ЭПР была показана перестройка матрицы с температурой. Таким образом, метод импульсного ЭПР полезен не только для исследования стохастических движений, но также для исследования надмолекулярной упаковки и структурных перестроек.

Степень разработанности темы исследования

Ранее было показано, что метод импульсного ЭПР спиновых зондов в двухимпульсном варианте чувствителен к наносекундным ориентационным стохастическим либрациям. Установлено, что модель стохастических либраций хорошо соответствует экспериментальным данным. Этот тип движений обнаружен в ряде систем – молекулярных стеклах, белках и модельных мембранах, обнаружено влияние на него криопротекторов и холестерина.

При этом ряд важных особенностей этих движений остался невыясненным – не определена с достаточной точностью температура их появления, не изучена подробно их температурная зависимость, не установлена связь движений с молекулярной упаковкой в исследуемых системах, не обсуждалась роль эффектов кооперативности.

Цели и задачи работы

Цель работы - получение температурной зависимости наблюдаемых в ЭСЭ стохастических либраций для различных молекулярных стекол и биологических объектов, определение параметров движения, выяснение возможностей получения информации о надмолекулярной упаковке исследуемых объектов.

Задачи

1. Анализ стохастических либраций молекул на поверхности с целью исключения кооперативного вклада в эти движения.
2. Исследование стохастических либраций методом ЭСЭ в различных модельных мембранах с использованием спиновых зондов различных размеров и различной локализации в мембране.
3. Получение температурной зависимости для низкотемпературных стохастических движений и установление ее взаимосвязи с особенностями надмолекулярной упаковки методом ЭСЭ.
4. Получение температурной зависимости для динамических и стохастических либраций внутренне разупорядоченного белка казеина и глобулярного белка лизоцима.
5. Выяснение возможности выявления микроструктуры глубоко-эвтектических растворителей с помощью детектирования в них методами стационарного и импульсного ЭПР малоугловых движений.

Научная новизна результатов

В данной работе впервые методом импульсного ЭПР спиновых зондов и меток исследована подробная температурная зависимость стохастических либраций молекул в молекулярных разупорядоченных средах разных типов – липидных бислоях разного состава, глобулярных и внутренне разупорядоченных белках, стеклюющихся глубоко-эвтектических растворителях. Для биологических систем установлено, что рост движения возникает при двух температурах: либо при 100 К, либо при 130 К. Исследования некооперативных движений молекул, адсорбированных на твердых поверхностях позволило связать эти две температуры с появлением торсионных и изгибных движений, соответственно. Впервые обнаружена переупаковка модельной мембраны DOPC и внутренне разупорядоченного белка казеина при низких температурах. Методом стационарного ЭПР обнаружено разделение фаз на микроуровне при низких температурах в глубоко-эвтектических растворителях.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты позволяют лучше понять механизмы малоугловых ориентационных движений – типа движений, внутренне присущим неупорядоченным средам. Выясненные закономерности проявления этих движений и их температурных

зависимостей показывают их связь с особенностями наноструктурной молекулярной упаковки этих веществ. Результаты работы также показывают возможность использования разработанных подходов к изучению разупорядоченных сред самых разных типов – липидные бислои, глобулярные и внутренне разупорядоченные белки, глубоко-эвтектические растворители.

Методология и методы исследования

Основным методом исследования в данной работе был выбран метод импульсного ЭПР спиновых зондов и меток в X-диапазоне частот. Исследование ориентационных стохастических наносекундных и микросекундных движений проводилось по методике, представленной в литературе. В качестве основного варианта метода ЭСЭ использовалась двухимпульсная последовательность для изучения стохастических наносекундных движений. Также использовался трехимпульсный метод в двух различных вариантах для исследования микросекундных движений биологических объектов и ориентационных движений молекул воды в гидратной оболочке. Для определения локализации спиновой метки или зонда использовался стационарный вариант ЭПР. Также стационарный метод ЭПР был использован для получения температурной зависимости среднеквадратичного углового отклонения. Объяснение насыщения температурной зависимости скорости анизотропной релаксации для некооперативных движений на поверхностях было получено путем моделирования в рамках ранее предложенной модели либраций путем случайных прыжков между двумя ориентациями.

Положения, выносимые на защиту

1. Наблюдаемое в ЭСЭ возникновение стохастических либраций молекул происходит при температурах либо вблизи 100 К, либо вблизи 130 К, что может быть связано с торсионными и изгибными колебаниями, соответственно.
2. Стохастические либрации, наблюдаемые в ЭСЭ выше 160 К в биологических системах имеют кооперативный характер, то есть происходят с участием нанокластера молекул окружения.
3. Метод ЭСЭ позволяет делать выводы о жесткости молекулярной упаковки в биологических и неупорядоченных средах.

4. С помощью метода ЭСЭ возможно наблюдение в биологических и неупорядоченных средах молекулярных переупаковок в наноструктуре вещества.

5. Внутренне разупорядоченный белок может совершать переходы порядок-беспорядок в ходе процессов замораживания-размораживания.

Достоверность работы

Достоверность выводов и результатов работы обеспечена комплексным подходом к экспериментальным исследованиям и их интерпретации с использованием современного экспериментального оборудования, воспроизводимостью экспериментальных результатов, достигнутым соответствием эксперимента и теории. Полученные результаты не противоречат уже имеющимся в литературе данным.

Личный вклад соискателя

Представленные в диссертации результаты получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автор принимал активное участие в разработке плана исследований, обсуждении результатов и написании публикаций по теме диссертационной работы.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на следующих международных и российских научных конференциях: Modern Development of Magnetic Resonance 2015, (Kazan, Russia); Asia-Pacific EPR/ESR Symposium APES-2016, (Listvyanka, Irkutsk, Russia); IX International Voevodsky Conference 2017, (Akademgorodok, Novosibirsk, Russia); The 8th Conference on Nitroxide Radicals, Spin-2017, (Padova, Italy); III International Conference SPIN PHYSICS, SPIN CHEMISTRY AND SPIN TECHNOLOGY, SPCT-2018, (Novosibirsk, Russia); Asia-Pacific EPR/ESR Symposium APES-2018, (Brisbane, Australia); XIth EFEP 2019 Conference, (Bratislava, Slovakia); VI Съезд биофизиков России, (Сочи, Россия).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК и индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, списка сокращений и списка литературы, состоящего из 187 наименований. Работа изложена на 133 страницах и содержит 42 рисунка.

Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, физика горения и взрыва, физика экстремальных состояний вещества

Диссертационная работа соответствует п. 1 «Атомно-молекулярная структура химических частиц и веществ», п. 2 «структура и свойства кристаллов, аморфных тел, жидкостей; поведение веществ и структурно-фазовые переходы в экстремальных условиях – в электрических и магнитных полях, в условиях статического и динамического сжатия, в полях лазерного излучения, в плазме и в гравитационных полях, при сверхнизких температурах и в других условиях.», п. 3 «Молекулярная динамика, межмолекулярные потенциалы и молекулярная организация веществ» паспорта специальностей 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность и разработанность темы, сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, методы исследования, формулируются положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов исследования, личный вклад автора и сведения об апробации результатов.

Первая глава посвящена обзору литературы. В *первой части* обзора описаны некоторые типы молекулярных неупорядоченных сред: биологические и модельные мембраны, глобулярные и внутренне разупорядоченные белки, глубоко-эвтектические растворители (ГЭР).

Вторая часть обзора литературы посвящена методам исследования молекулярной подвижности: методам рассеяния нейтронов и мессбауэровского поглощения, твердотельного ЯМР, молекулярно-динамического моделирования и рамановского рассеяния. Приводятся примеры из литературных данных о связи подвижности со структурой исследуемых объектов. Также описано

явление динамического перехода, наблюдаемое методами рассеяния нейтронов и мессбауэровского поглощения, его возникновение в биологических средах и молекулярных стеклах, связь со степенью гидратации, структурой и физиологической активностью биологических систем. Данное явление состоит в резком росте температурной зависимости среднего квадрата отклонения атомов от положения равновесия выше некоторой температуры, то есть наблюдается отклонение от линейной температурной зависимости.

В *третьей части* литературного обзора рассматривается применение метода ЭПР спиновых зондов для исследования подвижности и молекулярной упаковки. Приведен вывод для формы линий стационарного спектра нитроксильного радикала в X-диапазоне частот. Рассмотрены понятия динамических и стохастических либраций – малоугловых качаний, их различие. Динамические либрации – это обычные для твердых тел колебания, они происходят с частотой в терагерцовой области. Эти либрации проявляют себя в стационарном ЭПР. Стохастические либрации являются специфическим типом движения для молекулярных сред – ввиду слабости межмолекулярных взаимодействий здесь потенциальная яма, которой ограничена молекула, получает возможность сама флуктуировать [1]. Стохастические либрации могут наблюдаться в импульсном ЭПР – в его варианте электронного спинового эха (ЭСЭ). Описан способ исследования динамических либраций методом стационарного ЭПР, а также рассмотрены работы, выполненные данным методом.

Приведен вывод для скорости анизотропной релаксации, вызванной стохастическими либрациями, наблюдаемыми в электронном спиновом эхе, приведена ее связь с временем корреляции (τ_c) и углом отклонения (α). Описан экспериментальный способ получения скорости анизотропной релаксации с использованием двухимпульсной последовательности: спады ЭСЭ записываются в центральной наиболее изотропной (I) и центре высокопольной наиболее анизотропной (II) компонентах (рис. 1). Схема двухимпульсной последовательности, примеры спектра нитроксильного радикала и спадов ЭСЭ в положениях I и II приведены на рис. 1. Результат деления этих двух спадов дает вклад стохастических либраций. В полулогарифмической шкале он может быть аппроксимирован прямой линией, наклон которой позволяет

найти скорость анизотропной релаксации. Описаны работы по исследованию стохастических либраций, а также по выяснению особенностей надмолекулярной упаковки путем их наблюдения методом ЭСЭ. Также описан общий принцип формирования стимулированного эха, рассмотрены работы по исследованию микросекундных молекулярных движений.

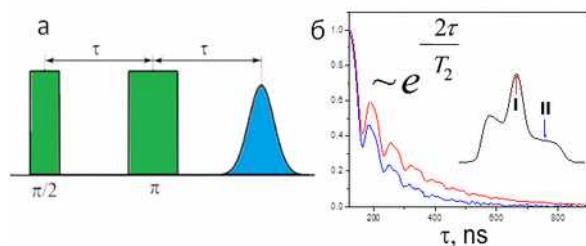


Рисунок 1. а) двухимпульсная последовательность для регистрации ЭСЭ, б) спады ЭСЭ в центральной (I) и высокопольной (II) компонентах.

Вторая глава посвящена описанию используемых материалов и методов. Приведены структуры нитроксильных радикалов (рис. 2), спин-меченых стеариновых кислот (рис. 3) и липидов (рис. 4), используемых в данной работе.

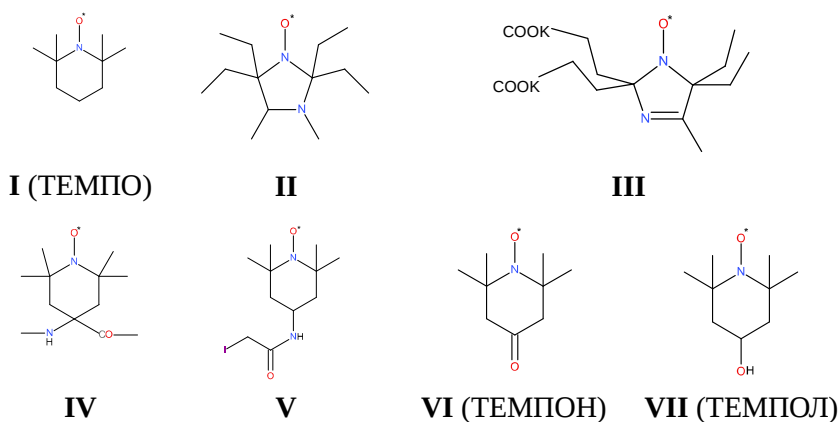


Рисунок 2. Структуры используемых в данной работе нитроксильных радикалов.

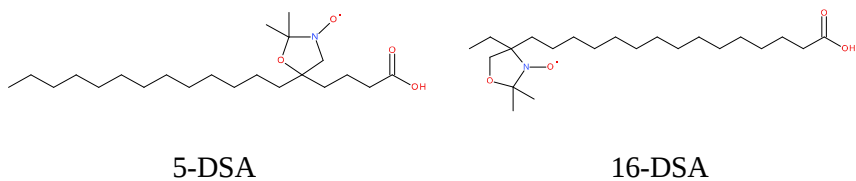


Рисунок 3. Структуры используемых в работе спин-меченых стеариновых кислот.

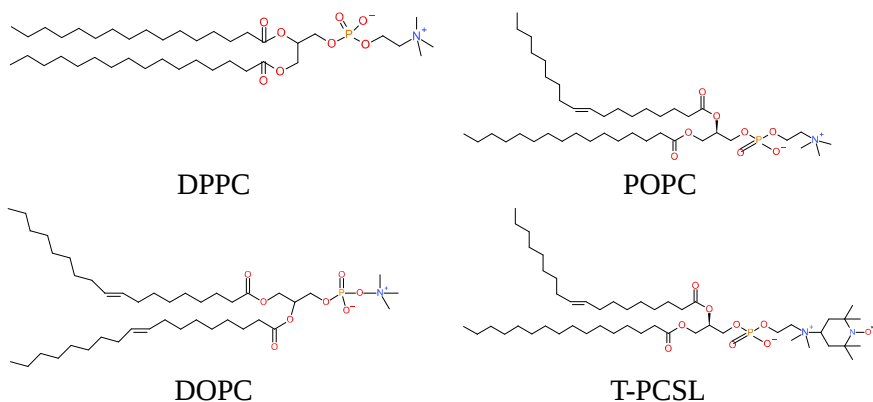


Рисунок 4. Структуры используемых в работе фосфолипидов.

Третья глава посвящена исследованию молекулярной подвижности на твердой поверхности оксида кремния (SiO_2), то есть в отсутствие эффекта кооперативности вследствие взаимной изоляции молекул. Описана процедура приготовления образцов. В качестве исследованных молекул были использованы нитроксильные радикалы **I-III** (структуры приведены на рис. 2), спин-меченые пептиды: аламетицин (alaTOAC16), тилопептин (tyloTOAC13), трихогин (TriTOAC4), спин-меченые стеариновые кислоты: 5-DSA и 16-DSA (рис. 3).

Приведены температурные зависимости для скорости анизотропной релаксации (рис. 5 и 6). Наблюдается насыщение температурных зависимостей выше 230 К с незначительным падением выше 250 К. Такое поведение удалось промоделировать в рамках модели случайных прыжков между близкими ориентациями по теории Жидомирова-Салихова [2]. Данная модель позволила

обойти ограничение Редфилда ($\langle \Delta\omega^2 \rangle \tau_c^2 \ll 1$) и объяснить насыщение температурных зависимостей. Оказалось, что для определенного времени корреляции достигается определенное максимальное значение скорости анизотропной релаксации (рис. 7).

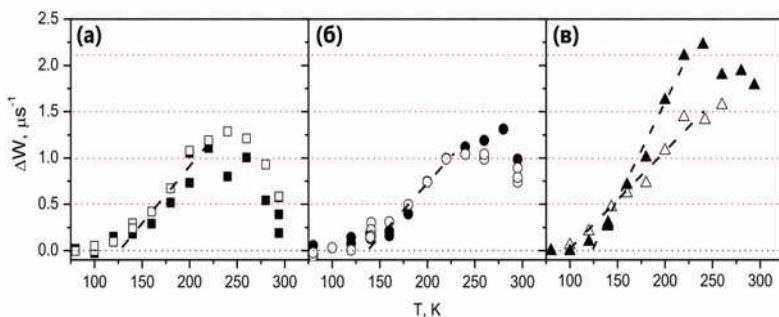


Рисунок 5. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации ΔW для образцов: а) I/SiO₂ (светлые квадраты), II/SiO₂ (черные квадраты); б) alaTOAC16/SiO₂ (черные круги) и tyloTOAC13/SiO₂ (светлые круги); в) для 16-DSA/SiO₂ (черные треугольники) и 5-DSA/SiO₂ (светлые треугольники).

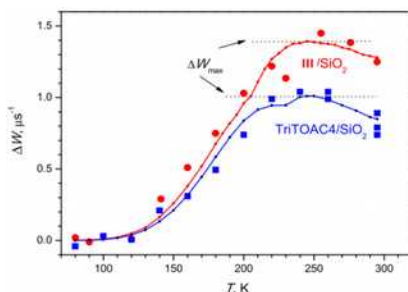


Рисунок 6. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации (ΔW) для образцов TriTOAC4/SiO₂ (квадраты) и III/SiO₂ (круги). Сплошные кривые: моделирование.

Для моделирования температурных зависимостей (рис. 6) предполагалось постоянное время корреляции и аррениусовская зависимость для угла отклонения, рассматривалось движение относительно одной оси. Результаты моделирования (рис. 7) показали, что предельное значение $\Delta W_{\max} \approx 1 \text{ мкс}^{-1}$ воспроизводится

моделью одноосных либраций вокруг оси, лежащей в плоскости xy системы координат, связанной с молекулой нитроксильного радикала. Если предположить, что либрации могут происходить независимо относительно двух разных осей, то скорости релаксации, вызванные этими двумя типами движения, следует сложить, что означает, что $\Delta W_{\max} \approx 2 \text{ мкс}^{-1}$.

На рис. 6 и 7 все системы можно разделить на два типа: системы, в которых движения начинаются при $\sim 100 \text{ К}$ и при $\sim 130 \text{ К}$. Интересно отметить, что литературные данные также свидетельствуют о том, что в зависимости от системы стохастические либрации, обнаруженные ЭСЭ, проявляются либо около 100 К , либо около 130 К .

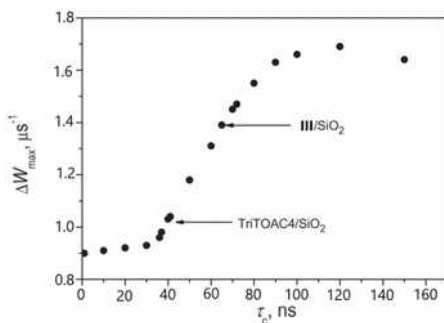


Рисунок 7. Расчетная зависимость максимальной скорости анизотропной релаксации от времени корреляции в рамках модели прыжков между двумя близкими ориентациями

На рисунке 8 показано схематическое представление типов движения, которые могут появиться для изучаемых здесь систем. Либрационные движения связанных с поверхностью молекул могут быть двух типов: изгибные и крутильные (торсионные) [3]; оба типа могут быть одноосными или двухосными. Для нитроксильных радикалов I и II ожидается только одноосное изгибное движение относительно их связей с поверхностью из-за ограничений, налагаемых анизотропией связывающего потенциала. Для спин-меченных пептидов может появиться одноосное изгибающее движение относительно пептидных связей. В случаях нитроксильного радикала III, 5-DSA и 16-DSA метка может выполнять двухосное изгибное движение из-за гибкости длинного

алифатического хвоста (с некоторыми ограничениями в случае **III** и 5-DSA). А 5-DSA отличается от всех остальных исследуемых молекул наличием свободного алифатического хвоста, который может совершать крутильные движения (в случае радикала **III** хвоста два, что, вероятно, мешает вращению). Влияние крутильного движения на движение спиновой метки может объяснить, почему для системы 5-DSA/SiO₂ T₀~100 К, в то время как во всех остальных системах T₀~130 К: для этих систем преобладают изгибные движения, так как торсионные закрутывают.

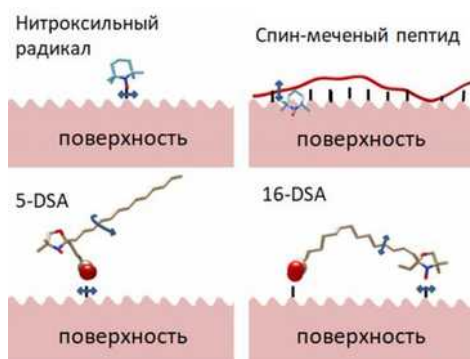


Рисунок 8. Схематическое изображение различных типов движений, испытываемых спиновыми метками.

Четвертая глава посвящена исследованию липидных бислоев DPPC и POPC в гелевой фазе. Описана процедура приготовления многослойных везикул из молекул DPPC и POPC со спиновыми зондами: спин-меченым пептидом трихогином (TriTOAC1), 5-DSA, липидом, спин-меченым в полярной головке (T-PCSL).

Приведены полученные с использованием двухимпульсной последовательности температурные зависимости скорости анизотропной релаксации. Температурные зависимости для всех модельных слоев DPPC (рис. 9) близки вне зависимости от выбора спинового зонда, что говорит о кооперативности наблюдаемых в ЭСЭ стохастических либраций. Для бислоев DPPC рост скорости анизотропной релаксации начинается вблизи 130 К.

Поведение температурной зависимости для РОРС значительно отличается, скорость анизотропной релаксации начинает расти уже при 100 К. Данный факт, в соответствии с результатами предыдущей главы можно интерпретировать как результат проявления изгибных колебаний в бислоях DPPC. В мембране же из ненасыщенных липидов РОРС ускорение температурной зависимости ΔW наблюдается начиная с температуры 100 К, что в свою очередь можно связать с появлением крутильных колебаний в связи с большей рыхлостью данной мембраны. Свободный объем в бислое РОРС возникает из-за изгиба хвоста относительно ненасыщенной C=C связи (рис. 4).

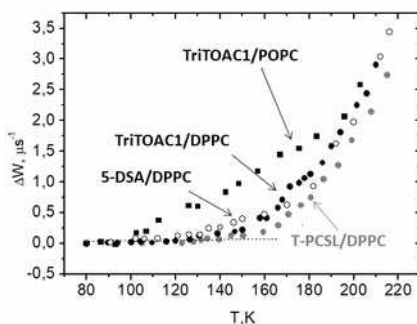


Рисунок 9. Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации ΔW для бислоев РОРС со спиновым зондом трихогином (квадраты), DPPC (круги).

Данные $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c$, пересчитанные из значений ΔW , для бислоя 5-DSA/DPPC (не приведены) подчиняются температурной зависимости аррениусовского типа. Результаты, полученные в данной работе и в [4], свидетельствуют о том, что эти барьеры возникают для молекулярных переориентаций, и что эти барьеры приблизительно составляют 10–20 кДж/моль.

Пятая глава посвящена исследованию липидных бислоев DOPC в гелевой фазе. Описана процедура приготовления образцов: DPPC/5-DSA, POPC/5-DSA, DOPC/5-DSA и DOPC/16-DSA. Полученные данные ΔW для DOPC/5-DSA и POPC/5-DSA представлены на рис. 10. Аналогичные данные для бислоя 5-

DSA/DPPC, представленные в предыдущей главе, также показаны на рис. 11 для сравнения.

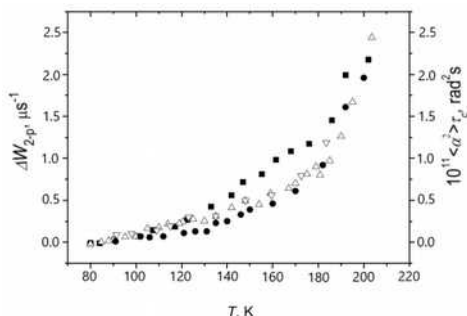


Рисунок 10. Температурная зависимость скорости релаксации для бислоев POPC/5-DSA (квадраты), бислоев DOPC/5-DSA (треугольники вверх: температура увеличивается, треугольники вниз: температура уменьшается), бислоев DPPC/5-DSA (круги).

Температурные зависимости данных ΔW , полученные для 16-DSA, встроенной в те же модельные мембраны, представлены на рис. 11. Данные для бислоев DPPC/16-DSA и POPC/16-DSA были взяты из работы [5]. Можно заметить, что температурные зависимости на рис. 11 демонстрируют схожее поведение с данными на рис. 10. Однако на рис. 11 для бислоя DOPC/16-DSA наблюдается излом, имеющий место при ~ 140 К. Так как липид DOPC имеет в своей структуре два излома двойных связей C=C (рис. 3), то можно ожидать, что для бислоев DOPC беспорядок будет еще более заметным, чем для POPC. Однако из рис. 10 и 11 видно, что данные для бислоя DOPC находятся между данными для бислоев POPC и DPPC. Таким образом, межмолекулярная упаковка в бислое DOPC более упорядочена, чем в бислое POPC. Для объяснения этого на первый взгляд парадоксального факта можно отметить, что дефектность бислоя DOPC может снизиться, если два концевых сегмента липидных хвостов DOPC (за пределами связей C=C) будут складываться кооперативно, параллельно друг другу (схематическое изображение на рис. 12). Данные на рис. 10 и 11, однако, показывают, что при понижении температуры беспорядок увеличивается, и ниже 130 К экспериментальные точки для бислоя DOPC совпадают с таковыми для бислоя POPC. И этот процесс

обратим с температурой. На первый взгляд, это предположение противоречит интуиции, поскольку понижение температуры обычно приводит к более упорядоченным межмолекулярным структурам (как при переходе жидкость-гель). Однако в этом отношении следует отметить, что аналогичный эффект уменьшения порядка с понижением температуры четко наблюдался для упаковки биомолекул в фотосинтетических реакционных центрах [6; 7]. Таким образом, здесь имеет место экспериментально зафиксированный эффект низкотемпературного разупорядочения, интерпретацию которого однако пока предположить трудно.

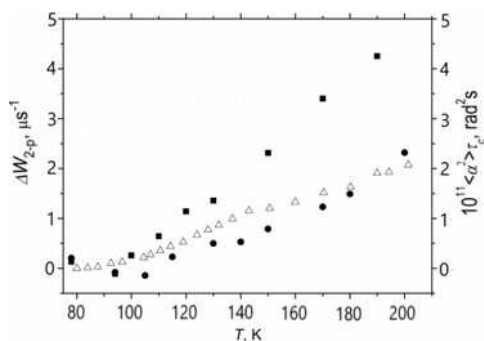


Рисунок 11. То же, что на рис. 10, с тем же значением символов, для 16-DSA вместо 5-DSA. Для бислоев DPPC/16-DSA и POPC/16-DSA данные взяты из [4].

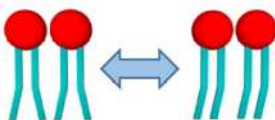


Рисунок 12. Схематическое изображение менее упорядоченной (слева) и более упорядоченной (справа) упаковки в бислое DOPC при криогенных температурах.

Было обнаружено, что процесс переупаковки между 130 К и 170 К обратим при повышении или понижении температуры. Данные на рис. 10 и 11 позволяют также предположить, что межмолекулярная структура бислоя DOPC со складывающимися вместе липидными хвостами сохраняется выше

170 К. Можно предположить, что эта специфическая упаковка имеет место до перехода DOPC гель-жидкость (256 К). Однако выше этой точки эти хвосты определенно неупорядочены, что хорошо известно из МД моделирования [8], широкоугольного рентгеновского рассеяния [9] и ЯМР [10]; это разупорядочение является естественным следствием того, что кинетическая энергия молекул в жидкостях становится сравнимой с межмолекулярным взаимодействием.

Шестая глава посвящена исследованию глобулярного белка лизоцима и внутренне разупорядоченного белка казеина. Описана процедура спин-мечения белков. Приведены температурные зависимости скорости анизотропной релаксации для всех сухих и полностью гидратированных образцов (часть данных приведена на рис. 13). Большая часть данных была получена в условиях увеличения температуры, однако при ее понижении наблюдалась хорошая воспроизводимость.

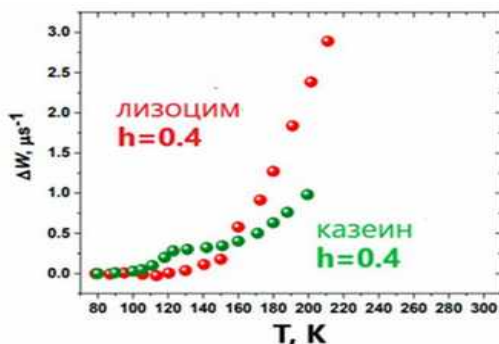


Рисунок 13. Температурные зависимости скорости анизотропной релаксации для гидратированных ($h=0,4$) спин-меченных белков лизоцима и казеина.

Подвижность в гидратированном спин-меченом казеине-V возникает при меньшей температуре (100 К), чем в гидратированном спин-меченом лизоциме-V (130 К). Данный факт говорит о большей свободе для молекулярных ориентационных движений в матрице казеина при таких низких температурах.

Однако вблизи 120 К для образца спин-меченого гидратированного казеина-V возникает явный изгиб температурной зависимости скорости анизотропной релаксации. Поскольку стохастические либрации обусловлены окружением молекулы, данный изгиб может означать структурный переход в ближайшем окружении молекулы. Такой переход с замедлением температурной зависимости может возникать, когда доступные степени свободы в структуре внутренне разупорядоченного белка позволяют переупаковку, при которой эта структура становится более плотной и/или более жесткой даже в сравнении с глобулярным белком (лизоцима).

Обращает на себя внимание сходство температурной зависимости для гидратированного казеина-V на рис. 13 с аналогичными данными для бислая DOPC на рис. 10 и 11 – там и там возникают перегибы вблизи 120-130 К с замедлением зависимости при более высоких температурах. Это означает сходство процессов молекулярной переупаковки – там и там при повышении температуры происходит упорядочение упаковки.

Седьмая глава посвящена исследованию переохлажденных глубоко-эвтектических растворителей (ГЭР). Описана процедура приготовления образцов: холин хлорид – мочеви́на (релайн) и холин хлорид – тиомочеви́на с ТЕМПОНам. Полученные стационарные спектры ЭПР приведены на рис. 14. Спектры нормированы на второй интеграл, таким образом, спектральная интенсивность пропорциональна полной абсорбции. Можно заметить, что форма спектра значительно меняется с ростом температуры. Ниже 254 К спектры соответствуют спектрам иммобилизованных нитроксильных радикалов, наблюдается только незначительное сужение спектральных линий, которое может быть объяснено вращением метильных групп в холине. Выше 254 К появляется примесь вращательных движений самой молекулы ТЕМПОНа, что говорит о существовании твердой и жидкой фаз, т. е. о гетерогенности микроструктуры.

Можно заметить, что для смеси холин хлорид – тиомочеви́на возникают две изобестические точки (рис. 14, внизу справа) – спектральные точки, в которых интенсивность не меняется с температурой. Появление таких точек в абсорбционных спектрах

означает суперпозицию двух типов спектра с определенной формой линий. Однако для релайна изобестические точки довольно размыты.

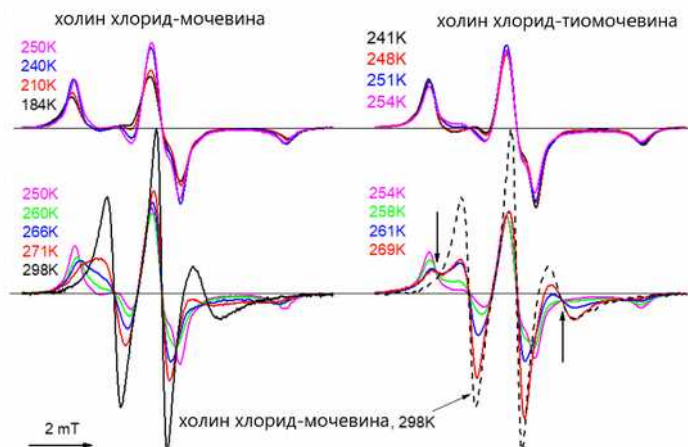


Рисунок 14. Спектры стационарного ЭПР при различных температурах для ТЕМПОна в релайне (слева) и холин хлорид – тиомочевина (справа).

Для релайна при 298 К неподвижный вклад на рис. 14 исчезает. Данная форма линии может быть промоделирована в предположении, что молекула ТЕМПОна изотропно меняет свою ориентацию со временем корреляции вращения примерно 1 нс. В предположении правомерности выражения Стокса-Эйнштейна-Дебая оценена микровязкость, которая оказалась 10 Пуаз.

На рис. 15 приведены температурные зависимости скоростей анизотропной релаксации для ТЕМПОна в релайне и растворе холин хлорид – тиомочевина, а также литературные данные для спин-меченого бислюа DPPC. Из рис. 15 можно заметить значительное различие в поведении температурных зависимостей скоростей анизотропной релаксации для двух глубоко-эвтектических растворителей (ГЭР): для смеси холин хлорид – тиомочевина резкий рост скорости анизотропной релаксации наблюдается выше 160 К, в то время как рост температурной зависимости для релайна более растянут по температуре, начинаясь однако уже при 130 К. Такая разница предполагает, что

надмолекулярная упаковка раствора холин хлорид – тиомочевина более жесткая. Данный вывод согласуется с данными стационарного ЭПР, рассмотренными выше.

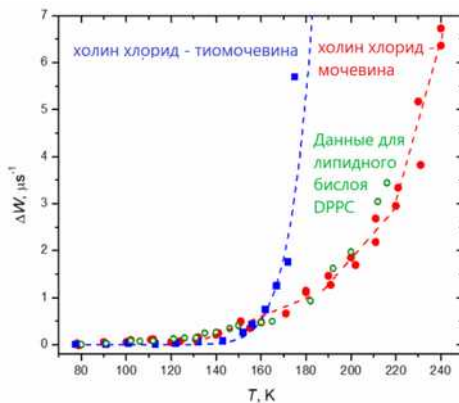


Рисунок 15. Температурные зависимости скорости анизотропной релаксации.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

Сопоставление данных для спин-меченых молекул разного размера в модельных мембранах разного типа показало, что наблюдаемые в импульсном ЭПР малоамплитудные движения слабо зависят от типа молекулы и определяются в основном типом мембраны, то есть движения являются кооперативными и определяются молекулярной упаковкой. Таким образом, для известного ранее из данных по рассеянию нейтронов так называемого динамического перехода в биологических и молекулярных системах выяснено, что за этот переход отвечают кооперативные движения молекул.

Для адсорбированных на поверхности спин-меченых молекул отсутствие в этом случае эффектов кооперативности позволило сделать выводы о преобладании для разных типов молекул либо крутильных (торсионных), либо изгибных типов движений. Причем крутильные движения наблюдаются начиная с 100 К, изгибные — начиная с 130 К.

Данные две температуры начала движений – 100 К и 130 К – наблюдались также и для исследованных в настоящей работе биологических систем: липидных мембран DPPC (130 К), POPC и DOPC (100 К), глобулярного белка лизоцима (130 К) и внутренне разупорядоченного белка казеина (100 К). Можно предполагать, что эти совпадения свидетельствуют об универсальном характере лежащих в основе этих движений закономерностей наноструктуры вещества.

Для модельных мембран двукратно ненасыщенного липида DOPC температурная зависимость движений свидетельствуют об обратимой с температурой переупаковке двух концевых сегментов ацильных «хвостов» липидов в диапазоне температур 130 – 170 К.

Для внутренне разупорядоченного белка казеина температурная зависимость движений оказалась очень близкой к таковой для модельных мембран DOPC, что позволяет утверждать, что в казеине также имеет место коррелированная переупаковка сегментов белковой молекулы.

Для застеклованных глубоко-эвтектических растворителей холин хлорид – тиомочевина и холин хлорид – мочевина показано, что в первом случае жесткость молекулярной упаковки заметно выше, чем во втором. Обнаружено сосуществование двух фаз с четкими границами для первого случая и диффузными для второго, оценена микровязкость жидкой фазы, которая оказалась близкой к 10 пуазам.

Публикации автора по теме диссертации

1. Golysheva E. A. Dynamical transition in molecular glasses and proteins observed by spin relaxation of nitroxide spin probes and labels / E. A. Golysheva, G. Y. Shevelev, S. A. Dzuba // *The Journal of Chemical Physics*. – 2017. – Vol. 147. – № 6. – P. 064501. DOI: 10.1063/1.4997035.
2. Low-Temperature dynamical transition in lipid bilayers detected by spin-label ESE Spectroscopy / E. A. Golysheva, M. De Zotti, C. Toniolo [et al.] // *Applied Magnetic Resonance*. – 2018. – Vol. 49. – № 12. – P. 1369-1383. DOI: 10.1007/s00723-018-1066-2.
3. Electron spin echo detection of stochastic molecular librations: Non-cooperative motions on solid surface / E. A. Golysheva, R. I. Samoilova, M. De Zotti [et al.] // *Journal of Magnetic Resonance*. –

2019. – Vol. 309. – P. 106621. DOI: 10.1016/j.jmr.2019.106621.

4. ESE-detected molecular motions of spin-labeled molecules on a solid inorganic surface: motional models and onset temperatures / E. A. Golysheva, R. I. Samoilova, M. De Zotti [et al.] // *Applied Magnetic Resonance*. – 2020. – Vol. 51. – № 9-10. – P. 1019-1029. DOI: 10.1007/s00723-020-01212-2.

5. Golysheva E. A. Lipid chain mobility and packing in DOPC bilayers at cryogenic temperatures / E. A. Golysheva, S. A. Dzuba // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2020. – Vol. 226. – P. 104817. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104817.

6. Maslennikova N. A. Evidence for an ordering transition near 120 K in an intrinsically disordered protein, casein / N. A. Maslennikova, E. A. Golysheva, S. A. Dzuba // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – № 19. – P. 5971. DOI: 10.3390/molecules26195971.

7. Гольшева Е. А. Низкотемпературные молекулярные движения в глубоко-эвтектическом растворителе холин-хлорид/мочевина по данным ЭПР спиновых зондов / Гольшева Е. А., Дзуба С. А. // *Известия Академии наук. Серия химическая*, 2021, № 12, 2366-2369. DOI: 10.1007/s11172-021-3354-5.

8. Structural properties of supercooled deep eutectic solvents: choline chloride–thiourea compared to reline / E. A. Golysheva, N. A. Maslennikova, D. S. Baranov, S. A. Dzuba // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2022. – Vol. 24. – № 10. – P. 5974-5981. DOI: 10.1039/D1CP05162H.

.Список цитированной литературы

1. Dzuba S. A. Probing Small-angle molecular motions with EPR spectroscopy: Dynamical transition and molecular packing in disordered solids / S. A. Dzuba // *Magnetochemistry*. – 2022. – Vol. 8. – № 2. – P. 19.

2. Salikhov K. M. The theory of electron spin-echo signal decay resulting from dipole-dipole interactions between paramagnetic centers in solids / K. M. Salikhov, S. A. Dzuba, A. M. Raitsimring // *Journal of Magnetic Resonance* (1969). – 1981. – Vol. 42. – № 2. – P. 255-276.

3. Hansen F. Y. Molecular dynamics studies of the melting of butane and hexane monolayers adsorbed on the basal-plane surface of graphite / F. Y. Hansen, J. C. Newton, H. Taub // *The Journal of Chemical Physics*. – 1993. – Vol. 98. – № 5. – P. 4128-4141.

4. Low-temperature dynamics of chain-labeled lipids in ester- And ether-linked phosphatidylcholine membranes / E. Aloï, M. Oranges, R. Guzzi, R. Bartucci // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2017. – Vol. 121. – № 39. – P. 9239-9246.
5. Konov K. B. Low-temperature molecular motions in lipid bilayers in the presence of sugars: Insights into cryoprotective mechanisms / K. B. Konov, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 118. – № 43. – P. 12478-12485.
6. Dzuba S. A. Probing the energy landscape of bacterial photosynthetic reaction centers at cryogenic temperatures by ESEEM of spin-polarised D+Q-A radical pairs / S. A. Dzuba, P. Gast, A. J. Hoff // *Chemical Physics Letters*. – 1997. – Vol. 268. – № 3-4. – P. 273-279.
7. Borovykh I. Y. “Glass transition” near 200 K in the bacterial photosynthetic reaction center protein detected by studying the distances in the transient P+Qa- radical pair / I. Y. Borovykh, P. Gast, S. A. Dzuba // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2005. – Vol. 109. – № 15. – P. 7535-7539.
8. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types / J. B. Klauda, R. M. Venable, J. A. Freites [et al.] // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2010. – Vol. 114. – № 23. – P. 7830-7843.
9. Order parameters and areas in fluid-phase oriented lipid membranes using wide angle x-ray scattering / T. T. Mills, G. E. S. Toombes, S. Tristram-Nagle [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2008. – Vol. 95. – № 2. – P. 669-681.
10. Warschawski D. E. Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: A 1H-13C solid-state NMR study at natural abundance / D. E. Warschawski, P. F. Devaux // *European Biophysics Journal*. – 2005. – Vol. 34. – № 8. – P. 987-996.

Работа поддержана грантами РФФИ № 18-43-540004, РНФ № 15-15-00021.