

Функция плотности колебательных состояний лизоцима

С. Г. Лушников, А. В. Сванидзе, И. Л. Сашин⁺

Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе РАН, 194021 Санкт-Петербург, Россия

⁺Лаборатория нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ, 141980 Дубна, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 4 апреля 2005 г.

После переработки 12 мая 2005 г.

Исследовалось неупругое некогерентное рассеяние нейтронов (ННРН) лизоцима при температурах 200, 280 и 311 К. По результатам экспериментов по ННРН была построена функция плотности колебательных состояний $G(\omega)$ лизоцима, выделенного из куриного яичного белка. Показано, что при всех температурах в низкочастотной области функции плотности состояний лизоцима наблюдаются как дебаевский режим, так и участок $G(\omega)$ со спектральной размерностью $\bar{d} = 1.58$, соответствующий фрактонному режиму.

PACS: 61.12.Ex, 63.50.+x, 87.14.Ec, 87.15.He

В настоящее время колебательные спектры макромолекул и в первую очередь белков стали объектом интенсивных исследований как с помощью оптической и нейтронной спектроскопии [1–6], так и методами численного моделирования [7–12]. Это объясняется тем, что для понимания механизмов функционирования белков необходимо иметь представление не только о структуре, но и о динамике белковой молекулы. При этом важно исследовать низкочастотную область колебательного спектра белковой молекулы, которая отображает коррелированное движение как целой макромолекулы, так и ансамблей макромолекул.

Вместе с тем не существует устоявшейся точки зрения на вклады различных процессов в низкочастотную область колебательного спектра белков. Исследователи сходятся в том, что при энергиях $E < < 2$ мэВ существенным являются релаксационные процессы, проявляющиеся как релаксационная мода в неупругом рассеянии света и нейтронов [2, 3, 6]. В спектрах рассеяния света и нейтронов ряда белков обнаружено акустоподобное возбуждение, характерное для неупорядоченных систем (стекол, переохлажденных жидкостей и т.д.) и называемое “бозонный пик” [2, 4–6]. Для лизоцима частота “бозонного пика” соответствует 4 мэВ в окрестности 200 К. Считается, что появление “бозонного пика” связано с топологическим беспорядком в системе и обусловлено рассеянием на делокализованных низкочастотных колебаниях [6].

Одной из характерных особенностей белковой макромолекулы является то, что она может рассматриваться как фрактальный объект. Такой подход был предложен в работе [13] и развит при численном мо-

делировании колебательного спектра различных белков [8, 9, 11]. Но если правомочен фрактальный подход к описанию свойств белков, то в колебательном спектре должно существовать возбуждение, реализующееся на фракталах, – фрактон (свойства этого возбуждения детально описаны в обзоре [14]). В работе [8] автор численно определяет фрактальную и фрактонную размерности g -актина и объясняет особенности низкочастотной динамики белков на основе фрактальности их структуры. Нужно отметить, что к настоящему моменту не проводились целенаправленные эксперименты по выявлению фрактонных в колебательном спектре белков.

Целью настоящей работы было изучение особенностей низкочастотной динамики белков и ее эволюции при изменении температуры, на примере лизоцима, с помощью неупругого некогерентного рассеяния нейтронов (ННРН).

В работе использовался порошкообразный образец лизоцима (Fluka), выделенного из куриного яичного белка, в количестве 3 мл, который перед проведением экспериментов по рассеянию нейтронов подвергся лиофилизации.

Спектры ННРН были получены на времяпролетном спектрометре обратной геометрии КДСОГ-М, установленном на 10-м канале импульсного реактора ИБР-2 (ОИЯИ, Дубна). Измерения проводились одновременно для восьми углов рассеяния (30°, 50°, 70°, 90° и 80°, 100°, 120°, 140°) в режиме сброса энергии нейтронами при температурах 280, 311 и 200 К последовательно. Разрешение на нулевой переданной энергии составляло 0.6 мэВ. После вычитания фона от держателя образца и криостата экспериментальные данные обрабатывались в рамках однофотонного

некогерентного приближения. При этом обобщенная плотность колебательных состояний вычислялась согласно соотношению

$$G(\omega) = \frac{\omega}{n(\omega) + 1} \frac{\mathbf{k}_0}{\mathbf{k}_1} \frac{1}{Q^2} \left(\frac{d^2 \sigma}{d\Omega d\omega'} \right)_{\text{incoh}}, \quad (1)$$

где \mathbf{k}_0 и \mathbf{k}_1 – волновые векторы падающего и рассеянного нейтронов, $\mathbf{Q} = \mathbf{k}_0 - \mathbf{k}_1$, $\hbar\omega'$ – энергия рассеянного нейтрона, $(d^2 \sigma / d\Omega d\omega')_{\text{incoh}}$ – дважды дифференциальное сечение некогерентного рассеяния, $n(\omega)$ – фактор Бозе–Эйнштейна.

Анализ полученных спектров ННРН был ограничен диапазоном переданных энергий 1.5–20 мэВ. В указанном диапазоне энергий по оценкам работы [7] вклад многофононного рассеяния незначителен.

Для анализа низкочастотной области функции плотности состояний лизоцима мы использовали “степенной” подход, позволяющий разделить вклады различных процессов. При этом мы учитываем то обстоятельство, что в колебательном спектре лизоцима может существовать фрактон, закон дисперсии которого отличен от закона дисперсии фононов. С динамической точки зрения, различия структурных свойств на разных масштабах выражаются в существовании некоторой частоты кроссовера ω_{co} ; при частотах $\omega \ll \omega_{\text{co}}$ выполняется хорошо известный закон Дебая, характеризующий плотность состояний акустических мод:

$$G(\omega) \propto \omega^{d-1}. \quad (2)$$

Если же $\omega \gg \omega_{\text{co}}$, то плотность колебательных состояний фрактонов характеризуется спектральной размерностью \tilde{d} [14, 15]:

$$G(\omega) \propto \omega^{\tilde{d}-1}. \quad (3)$$

Таким образом, анализ показателя степени низкочастотной области плотности колебательных состояний позволяет разделить вклады различных процессов.

Рассмотрим результаты, полученные при исследовании колебательного спектра лизоцима с помощью неупругого некогерентного рассеяния нейтронов. На рис.1 показана обобщенная плотность колебательных состояний лизоцима при $T = 280$ К в диапазоне энергий 1.5–250.0 мэВ, а на вставке к рис.1 в двойном логарифмическом масштабе выделена низкочастотная область от 1.5 до 25 мэВ. Обсуждение обобщенной функции плотности состояний в широком частотном диапазоне будет сделано в отдельной работе, здесь мы сконцентрируем наше внимание на

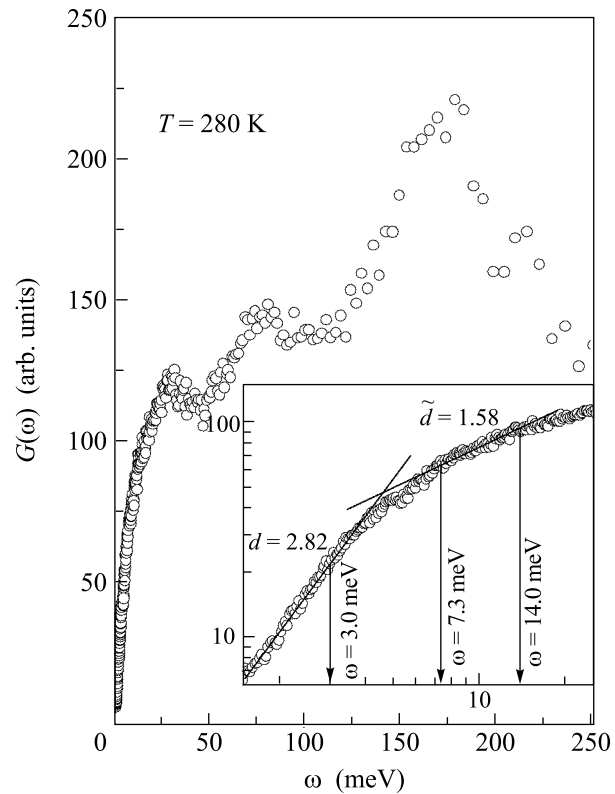


Рис.1. Функция обобщенной плотности колебательных состояний лизоцима при температуре 280 К. Вставка к графику сделана в двойном логарифмическом масштабе

низкочастотной области $G(\omega)$. Двойной логарифмический масштаб позволяет выделить участки с различными степенными зависимостями в рассматриваемой функции обобщенной плотности колебательных состояний. Линейная аппроксимация проводилась по экспериментальным точкам с помощью метода наименьших квадратов. В $G(\omega)$ при данной температуре удалось выделить два участка с разной степенной зависимостью, которым на вставке рис.1 соответствуют две прямые с разными углами наклона. Нижняя граница первого участка $G(\omega)$ обусловлена особенностями эксперимента, а верхняя – отклонением от линейности. Таким образом, на низкочастотном участке в диапазоне переданных энергий 1.5–3.5 мэВ показатель степени равен 2.82. Подобный показатель степени был найден в исследованиях низкочастотной области $G(\omega)$ с помощью ННРН в релаксорном сегнетоэлектрике магнониобате свинца [16]. Этот результат согласуется с моделью Дебая для плотности состояний акустических мод твердого тела, то есть на указанном интервале энергий $G(\omega) \propto \omega^2$.

Следующий линейный участок (как хорошо видно из вставки к рис.1) находится в диапазоне переданных энергий от 7 до 14 мэВ. Выбранный учас-

ток характеризуется показателем степени $\bar{d} = 1.58$. Это значение спектральной размерности соответствует значениям показателя степени функции $G(\omega)$ в классических фрактальных системах при реализации фрактонного режима [14]. Изменение границ обсуждаемого участка на величину ± 1 мэВ приводило к изменению показателя степени от 1.44 до 1.65, то есть ошибка составляла около 10% от начального значения спектральной размерности. Учет погрешности в определении границ не приводит к изменению фрактонного характера показателя степени, поскольку значение фрактонной размерности \bar{d} по оценкам различных работ находится в диапазоне $1 < \bar{d} < 2$ [8, 9, 11]. В данном диапазоне находятся также величины спектральной размерности \bar{d} классических фрактальных объектов [15].

Необходимо отметить, что литературные данные по исследованию низкочастотной динамики глобулярных белков в кристаллическом состоянии на примере лизоцима с помощью комбинационного рассеяния света (КРС) указывают на появление в спектрах КРС двух широких пиков, один из которых имеет максимум при частоте ~ 4 мэВ ($1 \text{ мэВ} = 8.06 \text{ см}^{-1}$), а другой – при ~ 10 мэВ [1]. Данные возбуждения наблюдаются также и в низкочастотных спектрах КРС водных растворов лизоцима, β -лактоглобулина и др. белков [3]. В ряде работ моду с частотой 4 мэВ соотносят с “бозонным пиком”, наблюдаемым в экспериментах по неупругому рассеянию нейтронов [3, 6] при низких температурах. В то время как природа второго возбуждения с частотой 10 мэВ вообще не обсуждалась.

Мы обнаружили, сопоставляя результаты настоящих исследований колебательного спектра лизоцима с литературными данными, что второй моде в спектрах КРС с частотой 10 мэВ соответствует участок функции обобщенной плотности состояний в диапазоне энергий от 7 до 14 мэВ со спектральной размерностью $\bar{d} = 1.58$ (рис.1). Это дает нам основание предположить, что мода с частотой 10 мэВ является фрактоном. На качественном уровне оценим масштаб, на котором реализуется данное возбуждение с помощью соотношения $L \sim v\hbar/E$, где скорость звука $v \approx 2.3 \text{ км/с}$ [17], \hbar – постоянная Планка, E – энергия, на которой наблюдается фрактон. Тогда $L \approx 10 \text{ \AA}$, в то время как размер молекулы лизоцима, выделенного из куриного яичного белка, оценивается как $28.0 \times 28.0 \times 39.9 \text{ \AA}^3$ [18]. Таким образом, можно говорить, что наблюдаемое нами возбуждение действительно реализуется на масштабе длин, по порядку величины соответствующих размерам макромолекулы лизоцима.

Нужно отметить существование кроссовера между двумя участками функции плотности колебательных состояний $G(\omega)$, соответствующими вкладу фононов и фрактонов. Частота, которую можно принять как ω_{co} , определяется из точки пересечения двух прямых от линейной аппроксимации обсуждавшихся выше участков функции плотности состояний лизоцима (при $T = 280 \text{ К}$, $\omega_{co} \approx 4.5 \text{ мэВ}$). Вопрос о кроссовере является предметом отдельного исследования и не будет обсуждаться в настоящей статье.

Проследим за эволюцией фрактонного и фононного режимов при изменении температуры. Для этого была проанализирована низкочастотная часть функции плотности колебательных состояний $G(\omega)$ лизоцима при температурах 311, 280 и 200 К (рис.1, 2, 3). Отметим, что во всех трех случаях удалось иденти-

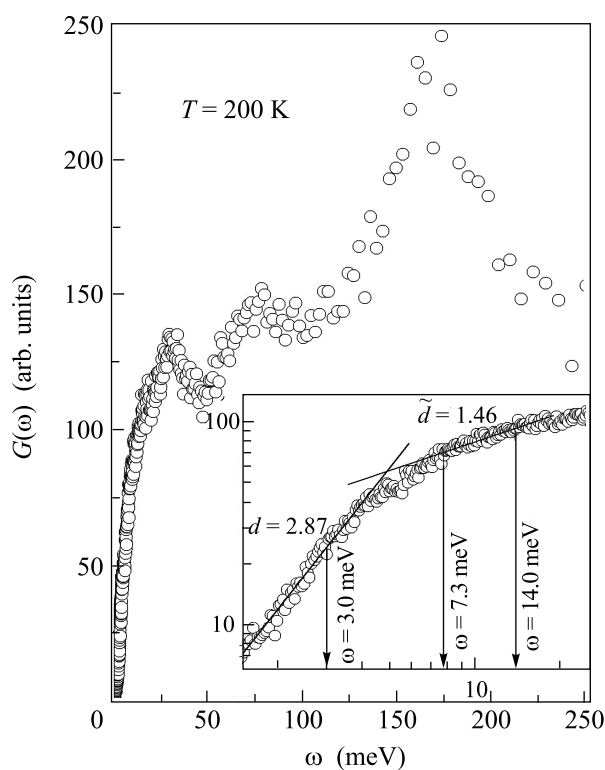


Рис.2. Функция обобщенной плотности колебательных состояний лизоцима при температуре 200 К. Вставка к графику сделана в двойном логарифмическом масштабе

фицировать как фононный, так и фрактонный режимы. При температурах 280 и 311 К соответствующие спектральные показатели d и \bar{d} остаются практически неизменными (см. таблицу). В случае $T = 200 \text{ К}$ можно заметить некоторые изменения в $G(\omega)$, которые соответствуют весьма малому возрастанию значения степенного показателя d и уменьшению фрактонной размерности \bar{d} (рис.3). Возможно, это связано

Спектральные размерности фоновый и фракционный режимов при различных температурах

| T , К | Фоновый режим, мэВ | $D = d - 1$ | Фракционный режим, мэВ | \tilde{d} |
|---------|--------------------|-------------|------------------------|-------------|
| 200 | 1.5–3.0 | 2.9 | 7.8–14.0 | 1.46 |
| 280 | 1.5–3.0 | 2.8 | 7.3–14.0 | 1.58 |
| 311 | 1.5–3.0 | 2.8 | 7.3–14.0 | 1.59 |

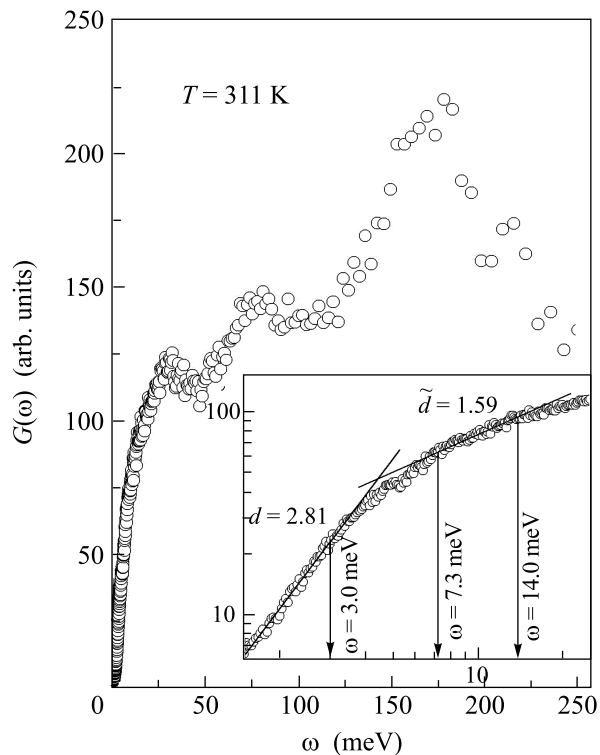


Рис.3. Функция обобщенной плотности колебательных состояний лизоцима при температуре 311 К. Вставка к графику сделана в двойном логарифмическом масштабе

с тем, что белки испытывают превращение в стеклоподобную фазу при понижении температуры [19].

Сравнивая вид функций плотности колебательных состояний лизоцима, полученных в экспериментах при различных температурах (рис.1–3), отметим еще одну особенность функции $G(\omega)$. При понижении температуры наблюдается рост функции $G(\omega)$, что, по-видимому, связано с температурной эволюцией фактора Дебая–Валлера.

В данной работе получена экспериментально и проанализирована функция плотности колебательных состояний лизоцима. Показано, что в функции плотности колебательных состояний удается выделить два участка степенной зависимости, один из которых соответствует фоновому режиму, а другой – фракционному режиму. Для каждого из этих режимов были вычислены соответствующие спектральные по-

казатели. Нужно отметить, что полученные значения не согласуются с результатами численного моделирования [8]. Выявлены температурные изменения плотности колебательных состояний лизоцима: небольшое снижение величины фракционной размерности при 200 К, а также рост плотности колебательных состояний при понижении температуры последовательно от 311, 280, 200 К.

Авторы выражают признательность С. Н. Гвасалия за полезные обсуждения. Работа выполнялась при поддержке грантов Президента РФ НШ-# 2168.2003.2 и Российского фонда фундаментальных исследований # 05-02-17822, Программы Отделения физических наук РАН.

1. L. Genzel, F. Keilmann, T. P. Martin et al., *Biopolymers* **15**, 219 (1976); S. E. May Colaianni and O. Faurskov Nielsen, *J. Mol. Struct.* **347**, 267 (1995).
2. H. Leyser, W. Doster, and M. Diehl, *Phys. Rev. Lett.* **82**, 2987 (1999).
3. Hisako Urabe, Yoko Sugawara, Mitsuo Ataka, and Allan Rupprecht, *Biophys. J.* **74**, 1533 (1998); G. Galaskin, A. Kisiuk, A. M. Tsai et al., *J. Chem. Phys.* **118**, 4230 (2003).
4. E. Balog, T. Becker, M. Oettl et al., *Phys. Rev. Lett.* **93**, 028103 (2004).
5. Gerard Giraud, Jan Karolin, and Klaas Wynne, *Biophys. J.* **85**, 1903 (2003).
6. J. Perez, J.-M. Zanotti, and D. Durand, *Biophys. J.* **77**, 454 (1999); A. R. Bizzarri, A. Paciaroni, C. Arcangeli, and S. Cannistraro, *Eur. Biophys. J.* **30**, 443 (2001).
7. J. Smith, S. Cusack, B. Tidor, and M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **93**, 2974 (1990).
8. Daniel ben-Avraham, *Phys. Rev. B* **47**, 14559 (1993).
9. M. Nollmann and P. Etchegoin, *Phys. Rev. E* **60**, 4593 (1999).
10. M. Tarek and D. J. Tobias, *J. Chem. Phys.* **115**, 1607 (2001).
11. Turkan Haliloglu, Ivet Bahar, and Burak Erman, *Phys. Rev. Lett.* **79**, 3090 (1997).
12. N. Rathore, T. A. Knotts IV, and J. J. de Pablo, *J. Chem. Phys.* **118**, 4285 (2003).
13. J. S. Helman, Antonio Coniglio, and Constantino Tsallis, *Phys. Rev. Lett.* **53**, 1195 (1984).

14. Tsuneyoshi Nakayama, Kousuke Yakubo, and Raymond L. Orbach, *Rev. Mod. Phys.* **66**, 381 (1994).
15. R. Vacher, E. Courtens, and J. Pelous, *La Recherche* **21**, 426 (1990).
16. С. Н. Гвасалия, С. Г. Лушников, И. Л. Сашин, И. Г. Синий, *Кристаллография* **44**, 284 (1999).
17. S. Speziale, F. Jiang, C. L. Caylor et al., *Biophys. J.* **88**, 3202 (2003).
18. Arunan Nadarajah and Marc L. Pusey, *Acta Cryst. D* **52**, 983 (1996).
19. I. E. Iben, D. Braunstein, W. Doster et al., *Phys. Rev. Lett.* **62**, 1916 (1989).