

Министерство образования Республики Беларусь
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (БГУ)

УДК 621.317
№ госрегистрации 01830005238

УТВЕРЖДАЮ

Первый проректор, д-р хим. наук,
профессор

_____ .П. Рахманов

« ___ » _____ 2004 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

НЕЙРОСЕТЕВОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ДАННЫХ
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ И
СПЕКТРОСКОПИИ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА
(заключительный)

г.б. НИР №445/11

Декан факультета радиофизики и электроники,
д-р физ.-мат. наук, профессор

С.Г. Мулярчик

Зав. кафедрой системного анализа,
д-р физ.-мат. наук, профессор

В.В. Апанасович

Научный руководитель,
мл. науч. сотр., аспирант

П.В. Назаров

Куратор проекта
ст. науч. сотр.

В.М. Лутковский

Минск 2004

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель работы,
мл. науч. сотр, аспирант

П.В. Назаров
(реферат, введение, разд. 1,
подразд. 2.7, 4.1-4.2, 4.4, заключение)

Ответственный исполнитель,
мл. науч. сотр, аспирант

О.А. Коваленко
(подразд. 2.1-2.4, 2.6)

Исполнитель,
аспирант

Е. В. Макарова
(подразд. 3.1-3.7)

Исполнитель,
магистрант

М. В. Репич
(подразд. 2.5, 4.3)

Нормоконтролер

Т.Н. Долгая

РЕФЕРАТ

Отчет 64 с, 31 рис., 7 табл., 39 источников.

НЕЙРОННАЯ СЕТЬ, МОДЕЛИРОВАНИЕ, АНАЛИЗ, ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ, ЭПР

Объектом исследования являются искусственные нейронные сети, методы нейросетевого моделирования процессов, происходящих в сложных биомолекулярных системах при их исследовании экспериментальными методами флуоресцентной и ЭПР спектроскопии.

Целью исследования является разработка и обоснование моделей процессов поглощения, передачи и релаксации энергии электронного возбуждения в биомолекулярных системах, а также разработка методов нейросетевого анализа данных, получаемых в флуоресцентных и ЭПР экспериментах.

Основные методы базируются на применении теории нейронных сетей, математической статистики, методов оптимизации, имитационного моделирования и вычислительной математики.

В процессе исследований разработаны нейросетевые модели резонансного переноса энергии в системах мембранных протеинов, а также построены алгоритмы нейросетевого анализа данных флуоресцентной и ЭПР спектроскопии.

Усовершенствована методика анализа и идентификации параметров процессов. Предложенный подход включает в себя использование имитационного и нейросетевого моделирования. Причем имитационная модель используется только единожды. Непосредственный анализ проводится с помощью нейронной сети. Полученное на экспериментальной задаче ускорение составило порядка 10^4 раз.

В результате исследования были разработаны алгоритмы предварительного анализа кривых затухания флуоресценции для получения информации о модели и параметрах экспериментальных систем. Предложен также подход на основе РБФ сетей для быстрого разделения многокомпонентных ЭПР спектров.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ.....	2
РЕФЕРАТ	3
СОДЕРЖАНИЕ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1 НЕЙРОСЕТЕВОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ДАННЫХ.....	9
1.1 Общий подход к анализу сложных систем	9
1.2 Нейросетевое моделирование	9
1.2.1 Непараметрическое моделирование	9
1.3 Искусственные нейронные сети.....	11
1.3.1 Основы теории нейронных сетей.....	11
1.3.2 Многослойные персептроны	13
1.3.3 РБФ-сети.....	17
2 ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ	20
2.1 Физические основы явления флуоресценции и флуоресцентная спектроскопия с разрешением по времени	20
2.1.1 Введение в флуоресценцию.....	20
2.1.2 Времена затухания, квантовый выход и анизотропия флуоресценции	22
2.2 Индуктивно-резонансный перенос энергии электронного возбуждения	23
2.3 Стационарные спектры и спектры с временным разрешением	25
2.3.1 Флуоресцентные измерения с временным разрешением	26
2.4 Экспериментальные данные и проблемы их анализа	27
2.5 Формализованное описание модели исследуемой системы.....	28
2.6 Имитационная модель.....	29
2.6.1 Математическое моделирование методом Монте-Карло	29
2.7 Исследование мембранных протеинов с помощью флуоресцентной спектроскопии	30
3 СПЕКТРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОНОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА.....	32
3.1 Введение в электронный парамагнитный резонанс	32
3.2 Теория ЭПР для нитроксильной группы.....	34
3.2.1 Гамильтониан.....	34
3.2.2 Система координат	34
3.2.3 Быстрое изотропное движение.....	36
3.2.4 Медленное или анизотропное движение.....	37
3.2.5 Два типа формы линий.....	38
3.3 Модель ЭПР в случае быстрого изотропного движения	39
3.4 Уширение и расщепление спектра.....	40
3.4.1 Сверхтонкое расщепление	41
3.4.2 Сверхтонкое расщепление на ^1H	41
3.4.3 Сверхтонкое расщепление на ^{13}C	41
3.4.4 Другие источники неоднородного уширения.....	42
3.5 Математическая модель ЭПР	43
3.6 Экспериментальные данные и проблема их анализа	44
3.6.1 Материалы.....	44
3.6.2 Схема экспериментов.....	46
3.7 Многокомпонентные спектры.....	46
3.7.1 Однокомпонентная система	46

3.7.2	Двухкомпонентная система.....	47
3.7.3	Разделение двух компонент.....	47
4	ПРИМЕНЕНИЕ ИНС	48
4.1	Предварительный анализ кривых затухания	48
4.1.1	Предварительная обработка кривых затухания.....	48
4.1.2	Классификация кривых затухания флуоресценции	49
4.1.3	Определения параметров	50
4.2	Нейросетевое моделирование процесса переноса энергии в мембранных протеинах ...	52
4.2.1	Экспериментальные объекты и методы	52
4.2.2	Результаты нейросетевого моделирования	55
4.3	Нейросетевой анализ ЭПР спектров.....	59
4.4	Основные результаты и выводы	60
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	62
	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	63

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AEDANS	N-(йодоацетиламиноэтил)-5-нафтиламин-1-сульфоная кислота
Cys	цистеин
TEMPO	2,2,6,6-тетраметилпиперидинооксид
Trp	триптофан
Tyr	тирозин
ИНС	искусственная нейронная сети
МСП	многослойный персептрон
РБФ	радиальная базисная функция
СВЧ	сверхвысокая частота
ФСРПЭ	флуоресцентная спектроскопия резонансного переноса энергии
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	ядерный магнитный резонанс

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) является важнейшим инструментом при изучении сложных молекулярных объектов и систем, включая биологические мембраны, протеины, ДНК и др. Эти экспериментальные методы позволяют получать детальную информацию о структуре и динамических свойствах молекулярных систем. Ключевым моментом успешного применения флуоресцентной и ЭПР спектроскопии является адекватный анализ получаемых экспериментальных данных. Однако существует ряд факторов, которые превращают анализ этих данных в достаточно сложную задачу: из набора экспериментальных данных требуется определить не один, а несколько неизвестных параметров системы; практически все зависимости между параметрами и получаемыми данными носят сложный нелинейный характер; экспериментальные данные подвержены искажениям, обусловленным неидеальностью регистрирующей системы. Поэтому стандартные подходы к анализу (регрессионные методы, фитинг аналитическими моделями) зачастую не дают приемлемого результата. Одним из наиболее перспективных методов интерпретации экспериментальных данных спектроскопии является метод фитинга экспериментальных данных результатами имитационного моделирования (simulation-based fitting) [1, 2]. Однако применение этого подхода затруднено на практике из-за значительных вычислительных затрат. Как правило, идентификация системы осуществляется стандартными методами многопараметрической оптимизации, в которых имитационная модель выступает в качестве стохастической функции, аппроксимирующей результаты эксперимента. Очевидно, что в этом случае число пусков моделирования совпадает или превосходит число вычислений функции невязок. Зачастую высокие временные затраты не позволяют применять такой подход для идентификации систем. Поэтому актуальной является разработка методов и алгоритмов, позволяющих снизить вычислительные и временные затраты этого подхода. Также открытым остается вопрос о поиске хороших начальных приближений искомых параметров, так чтобы обеспечить сходимость метода оптимизации.

В настоящее время для анализа экспериментальных данных всё чаще используются искусственные нейронные сети (ИНС), характеризующиеся высокой устойчивостью к шумам, способностью к обучению и обобщению [3, 4]. В этой работе были предложены три нейросетевых метода анализа данных флуоресцентной и ЭПР спектроскопии. Первый метод является расширением подхода к идентификации систем через имитационное моделирование, значительно снижающим его вычислительные и временные затраты. Второй – предназначен для получения приближенных оценок параметров экспериментальной системы по кривым затухания

флуоресценции. И, наконец, третий метод предназначен для разделения многокомпонентных ЭПР спектров. Предложенные методы нейросетевого моделирования и анализа имеют большое значение для решения задачи идентификации параметров сложных стохастических систем. Разработанные методы применялись для анализа процессов переноса энергии и исследования биомолекулярных системах.

В первом разделе отчета описываются типы ИНС, применяемые для моделирования процессов и анализа экспериментальных данных. Среди них классический вариант ИНС – многослойный персептрон (МСП) и нейронные сети на радиальных базисных функциях (РБФ). В этом разделе даются преимущества каждого типа, очерчивается круг задач.

Второй раздел посвящен методу флуоресцентной спектроскопии. В разделе представлены математические модели процесса переноса и релаксации энергии.

В третьем разделе рассмотрен метод ЭПР спектроскопии. Рассмотрены физические основы и методика применения для изучения систем протеин-мембрана.

В четвертом разделе представлены результаты применения нейронных сетей для моделирования процессов трансформации энергии электронного возбуждения; а также и для анализа экспериментальных данных.

1 НЕЙРОСЕТЕВОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ДАННЫХ

1.1 Общий подход к анализу сложных систем

Задача определения параметров системы по экспериментальным данным является обратной задачей вычислительного эксперимента и, как следствие, может приводить к неоднозначным решениям. Анализ данных в этом случае требует построения адекватной модели процессов в системе и детального исследования всего пространства параметров. На рис. 1 представлен общий подход к анализу экспериментальных данных, в том числе, полученных методами флуоресцентной спектроскопии для сложных молекулярных систем. Пусть над некоторой системой (блок 1) был поставлен ряд экспериментов, результатом которых явился набор экспериментальных данных (кривых затухания флуоресценции) (блок 2). Исходя из априорной информации о системе и используя результаты предварительного анализа данных (блок 3), выбирается модель физических процессов приводящих к их получению. Кроме того, в блоке 3 могут быть получены оценки искомых параметров системы. С учетом сделанных оценок и выбранной модели производится точная идентификация параметров. Для сложных систем, у которых отсутствует аналитическое описание, наилучшие результаты при определении параметров дает метод фитинга экспериментальных данных моделью (simulation-based fitting).

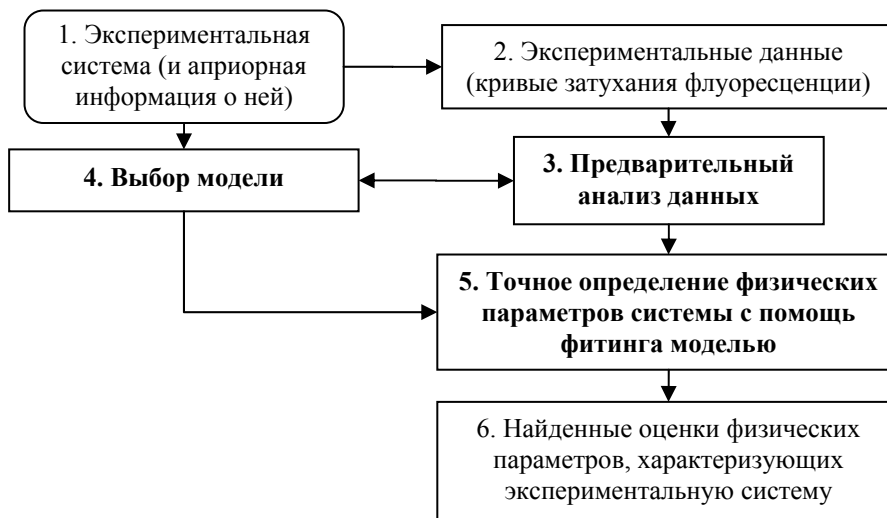


Рисунок 1 – Общий подход к анализу данных для определения параметров сложных систем

1.2 Нейросетевое моделирование

1.2.1 Непараметрическое моделирование

Особенность нейросетевого подхода к моделированию заключается в использовании универсальных программных или аппаратных средств, настраиваемых под конкретную задачу

путем их обучения по специально подготовленному множеству. В рамках данного раздела предполагается, что ИНС моделируются на стандартном персональном компьютере, однако в равной степени они могут быть реализованы на специальных микросхемах, нейроплатах или нейрокомпьютерах [5].

Целесообразность перехода к нейросетевым алгоритмам моделирования может быть обусловлена следующими причинами:

- необходимо существенно ускорить процесс проведения вычислительного эксперимента;
- необходимо снизить затраты на этапе создания программной реализации моделей;
- не удастся привести исходную задачу к описанию последовательности операций над входными данными или другому формализованному виду, позволяющему построить алгоритм ее решения на ЭВМ.

Другими словами, искусственные нейронные сети позволяют решать многие трудно формализуемые задачи и отличаются достаточно низкими временными затратами на полный цикл их решения. В процессе построения модели ИНС приводит исходную задачу к специальному нейросетевому базису с последующей классификацией входных данных по указанному базисному разложению. Следует заметить, что многие уравнения математической физики могут быть представлены в таком базисе [6]. Именно это может быть использовано в качестве отправного момента при разработке алгоритмов моделирования полупроводниковых приборов.

Рассмотрим применения непараметрического моделирования при идентификации неизвестных параметров сложных экспериментальных систем. Такая задача является одной из основополагающих во многих областях науки. Важнейший этап при этом – адекватный анализ экспериментальных данных, носящих, как правило, статистический характер. Однако, из-за сложности проведения анализа всех доступных данных, на практике приходится прибегать к упрощенной трактовке эмпирической информации и фокусировке на отдельных интегральных значениях [7]. Особенно остро данная проблематика характерна для изучения биомолекулярных образований, обладающих высокой степенью сложности, стохастической природой, а также зависимостью от различных физических и химических факторов среды. Одним из наиболее перспективных методов интерпретации экспериментальных данных является метод имитационного моделирования (другими словами – путем построения модели типа "белого ящика") [8]. Для построения имитационной модели сложной системы достаточно обладать информацией об элементарных процессах, происходящих в ней, и иметь представление о

структуре системы. Тогда как стандартное математическое моделирование предполагает наличие полного аналитического описания поведения системы и знание законов распределения всех стохастических параметров, используемых при моделировании, что редко осуществимо на практике.

В то же время, определение параметров стохастических систем с помощью имитационного моделирования затруднено, поскольку сопряжено со значительными вычислительными затратами. Как правило, идентификация системы осуществляется стандартными методами многопараметрической оптимизации [9], в которых имитационная модель выступает в качестве стохастической функции, аппроксимирующей результаты эксперимента. Очевидно, что в этом случае число пусков моделирования совпадает или даже превосходит число вычислений функции невязок. Во многих случаях высокие временные затраты не позволяют применять такой подход для идентификации систем. Этим проблем можно избежать, заменив имитационную модель моделью "черного ящика" значительно упростив при этом внутренние вычисления. Применение ИНС для замены имитационной модели позволяет значительно снизить временные затраты при поиске неизвестных параметров системы и заменить стохастический результат работы имитационной модели его гладкой аппроксимацией.

1.3 Искусственные нейронные сети

1.3.1 Основы теории нейронных сетей

Искусственная нейронная сеть представляет собой совокупность процессорных элементов (нейронов). Искусственный нейрон состоит из набора межсоединений, сумматора и нелинейного оператора. Значение каждого входа X_i умножается на свой вес W_i , затем суммируется и из суммы вычитается порог θ . После этого на результат действует некоторая активационная функция F и преобразованная таким образом информация подаётся на выход нейрона Y , как показано на рисунке 2 [3].

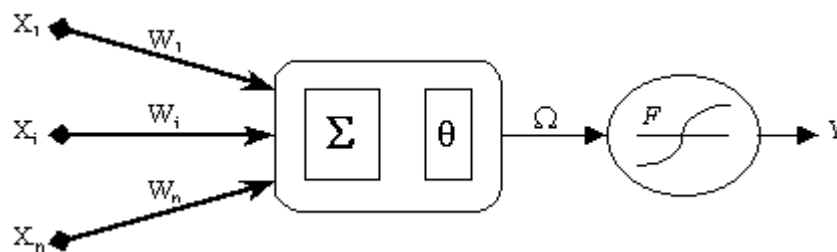


Рисунок 2 – Модель искусственного нейрона

Таким образом, выход каждого нейрона вычисляется по формуле:

$$Y = F \left\{ \sum_{i=1}^n (X_i W_i) - \theta \right\} \quad (1)$$

В дальнейшем условимся обозначать сумму произведений $X_i W_i$ через переменную Ω .

В качестве выходных (активационных) функций нейронов принято использовать ограниченные на множестве значений нелинейные функции, такие как: пороговая (случай сигнума) представленная на рисунке 3а, комбинации пороговой и линейной функций, сигмоидальная функция – на рисунке 3б, однотипная с ней функция гиперболического тангенса, а также радиальные базисные функции, показанные на 3в и 3г соответственно.

При пороговой функции (2) нейрон остаётся неактивным до тех пор, пока суммарный сигнал с его входов не достигает порогового значения. Когда этот порог достигнут, нейрон возбуждается и даёт на выходе 1.

$$Y = \begin{cases} 0, & \Omega \leq \theta \\ 1, & \Omega > \theta \end{cases} \quad (2)$$

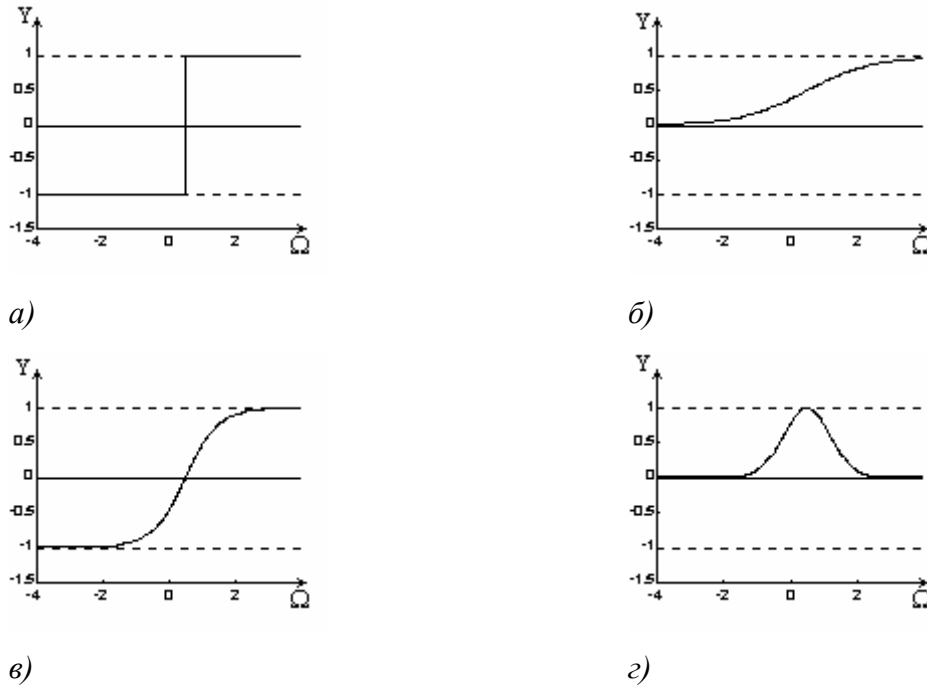
Пороговая функция наиболее точно моделирует нелинейную передаточную характеристику биологического нейрона и благодаря своей простоте представляет нейронным сетям большие возможности. При классификации образов, ИНС с такой активационной функцией разбивает пространство на многогранники [10, 11].

При использовании сигмоидальной (иначе логистической) функции (3) диапазон изменений величины X сужается таким образом, что при любых значениях X значения Y принадлежат некоторому конечному интервалу. К тому же эта функция удобно дифференцируема, что немаловажно в алгоритмах обучения [7, 10].

$$Y = \frac{1}{1 + e^{-(\Omega - \theta)}} \quad (3)$$

Функция гиперболического тангенса является расширением логистической функции на интервал $(-1, 1)$ и имеет вид

$$Y = 1 - \frac{2}{1 + e^{2(\Omega - \theta)}} \quad (4)$$



а) пороговая; б) сигмоидальная; в) гиперболический тангенс; г) радиальная базисная.

Рисунок 3 – Наиболее распространённые виды активационных функций (порог равен 0.5)

Наиболее интересным и перспективным на сегодняшний день (особенно в вопросах интерполяции и аппроксимации) является класс т.н. *радиальных базисных функций* (РБФ), к которым принято относить функции, имеющие глобальный экстремум и ведущие себя монотонно по мере удаления от него. Например, к радиальным базисным функциям относится функция вида:

$$Y = e^{-\frac{1}{2}(\Omega - \theta)^2} \quad (5)$$

В данной работе использован класс ИНС называемый многослойным персептроном (МСП). Рассмотрим структуру этих сетей и способы их применения.

1.3.2 Многослойные персептроны

Многослойным персептроном называют нейронную сеть, изображённую на рисунке 4, нейроны в которой расположены слоями, причём нейроны каждого слоя связаны только с нейронами предыдущего слоя.

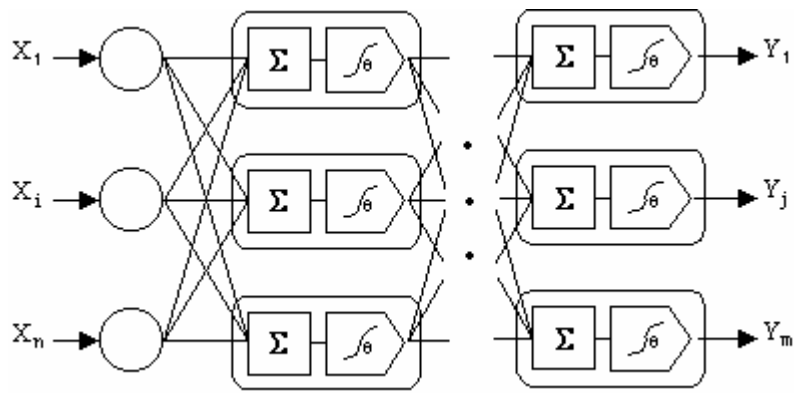


Рисунок 4 – Многослойный персептрон

Для сетей этого класса существует довольно хороший "классический" метод обучения – так называемый метод обратного распространения ошибки (*Back Propagation Error*), который относится к разряду методов градиентного спуска. Он сыграл очень важную роль в пробуждении интереса к нейронным сетям в начале 80-х, а его модификации и по сей день остаются лучшими для рассматриваемого класса сетей.

С использованием процедуры обратного распространения решаются задачи, в которых для некоторого входного вектора $X(x_1, \dots, x_n)$ сеть на выходе формирует требуемый вектор $Y(y_1, \dots, y_m)$. На этапе обучения используется ряд пар векторов (X, Y^*) , называемых обучающей парой, где Y^* – целевой вектор.

Используя обучающие пары, сеть подстраивает свои веса таким образом, чтобы адекватно реагировать на входной вектор X . Рассмотрим работу алгоритма обратного распространения ошибки в случае, когда в качестве активационной функции выступает сигмоидальная функция.

При инициализации сети случайным образом задаются начальные веса и сдвиги сети. Алгоритм обучения сети обратного распространения включает в себя следующие шаги:

1. Выбрать очередную обучающую пару (X, Y^*) из обучающего множества и подать входной вектор X на вход сети.
2. Вычислить выход сети Y .
3. Вычислить разность между реальным (вычисленным) выходом сети и требуемым выходом (целевым вектором обучающей пары).
4. Подкорректировать веса сети так, чтобы минимизировать ошибку.
5. Повторить шаги с 1 по 4 для каждого вектора обучающего множества до тех пор, пока ошибка на всем множестве не достигнет приемлемой величины.

Шаги 1 и 2 используются как на этапе обучения сети, так и при функционировании уже обученной сети.

Вычисления в сети выполняются послойно. На шаге 3 каждый из выходов сети Y вычитается из соответствующей компоненты целевого вектора с целью получения ошибки. Эта ошибка используется на шаге 4 для коррекции весов сети, причем величина изменений определяются алгоритмом обучения.

Шаги 1 и 2 можно рассматривать как "проход вперед", а 3 и 4 – как проход назад, так как сигнал ошибки распространяется обратно по сети и используется для подстройки весов. Эти два прохода можно выразить математически.

На входе имеем вектор X , на основе которого вычисляется выходной вектор Y . Вектор Y вычитается из целевого вектора Y^* с целью получения ошибки ε :

$$\varepsilon = Y^* - Y \quad (6)$$

Величина Ω каждого нейрона первого слоя вычисляется как взвешенная сумма входов нейрона. Затем активационная функция F сжимает Ω и дает величину OUT для каждого нейрона в этом слое.

Полученное выходное множество OUT является входом для следующего слоя. Процесс повторяется слой за слоем, пока не будет получено заключительное множество сети.

На этапе обратного прохода происходит подстройка весов выходного слоя. Так как для каждого нейрона выходного слоя задано целевое значение, то подстройка весов легко осуществляется с помощью дельта-правила. Внутренние слои не имеют целевых значений и называются скрытыми слоями.

Процесс подстройки одного веса от нейрона p в скрытом слое j к нейрону q в выходном слое строится следующим образом. Выход OUT слоя k , вычитаясь из целевого значения Y^* , дает ошибку, которая умножается на производную сжимающей функции (в нашем случае $OUT(1-OUT)$), вычисленную для этого нейрона слоя k , давая, таким образом, величину

$$\delta = OUT(1 - OUT)(Y^* - OUT) \quad (7)$$

Затем δ умножается на величину OUT нейрона j , из которого выходит рассматриваемый вес. Это произведение в свою очередь умножается на коэффициент обучения η ($0,01 \leq \eta \leq 1$) и результат прибавляется к весу.

$$\Delta w_{pq,k} = \eta \delta_{q,k} \cdot OUT_{p,q}, \quad (8)$$

где $\delta_{q,k}$ - величина δ для нейрона q в выходном слое k ; $OUT_{p,q}$ - величина выхода для нейрона в скрытом слое j .

$$w_{pq,k}^{(n+1)} = w_{pq,k}^n + \Delta w_{pq,k}, \quad (9)$$

где $w_{pq,k}^n$ - величина веса от нейрона в скрытом слое k к нейрону q в выходном слое на шаге n , $w_{pq,k}^{(n+1)}$ - величина веса на шаге $n+1$ после коррекции. Такая же процедура выполняется для каждого веса от нейрона скрытого слоя к нейрону в выходном слое.

Рассмотрим один нейрон в скрытом слое, предшествующем выходному слою. При проходе вперед этот нейрон передает свой выходной сигнал нейронам в выходном слое через соединяющие их веса.

Во время обучения эти веса функционируют в обратном порядке, пропуская величину δ от выходного слоя назад к скрытому слою. Каждый из этих весов умножается на величину δ нейрона, к которому он присоединен в выходном слое. Величина δ , необходимая для нейрона скрытого слоя, получается суммированием всех таких произведений и умножением на производную сжимающей функции:

$$\delta_{p,j} = OUT_{p,j} (1 - OUT_{p,j}) \sum_q \delta_{q,k} w_{pq,k} \quad (10)$$

Когда значение δ получено, веса между входным слоем и скрытым слоем j могут быть скорректированы с помощью формул (9) и (10), в которых индексы необходимо модифицировать в соответствии со слоем. То есть процесс обучения представляет собой вычисление δ для каждого нейрона в данном слое и коррекцию всех весов данного слоя.

Для ускорения обучения сети алгоритм обучения модифицируют путем введения нейронного смещения и стабилизирующего множителя, условно называемого "импульсом".

Введение нейронного смещения позволяет сдвигать начало отсчета передаточной функции и по сути является процедурой аналогичной подстройке порога персептронного нейрона. Смещение вводится посредством добавления к каждому слою нейронов дополнительного нейрона, на который подается сигнал, равный +1, а не выходу нейрона

предыдущего слоя. В процессе обучения вес данного нейрона корректируется так же, как и остальные веса нейронов.

Введение импульса позволяет ускорить обучение сети при использовании алгоритма обратного распространения. Этот метод заключается в добавлении к коррекции веса члена, пропорционального величине предыдущего изменения веса. Как только происходит коррекция, она запоминается и служит для модификации всех последующих коррекций. Уравнение коррекции принимает следующий вид:

$$w_{pq,k}^{(n+1)} = \alpha \Delta w_{pq,k}^n + \eta (\delta_{q,k} OUT_{pj}) \quad (11)$$

Затем вычисляется изменение веса:

$$w_{pq,k}^{n+1} = w_{pq,k}^n + \Delta w_{pq,k}^{(n+1)}, \quad (12)$$

где α - коэффициент импульса, обычно ≈ 0.9 .

Описанный метод обучения МСП применяется в данной работе для построения модели "чёрного ящика". На входы МСП подавался сигнал с входа системы (или имитационной модели системы), а с выхода снимался сигнал, соответствующий выходному сигналу системы.

1.3.3 РБФ-сети

Аппроксимация РБФ-сетью. Многослойные перцептроны не являются единственными представителями ИНС, успешно применяемыми для решения задач аппроксимации. Наиболее часто для этого используют разработанные в 1988 году сети с радиальными базисными функциями, или РБФ-сети [4,6]. Эти ИНС в значительной степени отличаются от МСП как по принципу обработки информации, так и по методам обучения.

Рассмотрим структуру и функциональные особенности РБФ-сетей, начиная с простейшего примера и постепенно усложняя задачу. Пусть требуется аппроксимировать функцию $y = f(x)$, причём x и y – скаляры. Набор экспериментальных точек будем обозначать $\{x_i, y_i\}$.

РБФ-сеть, решающая задачу аппроксимации такой функции, представлена ниже на рис. 5.

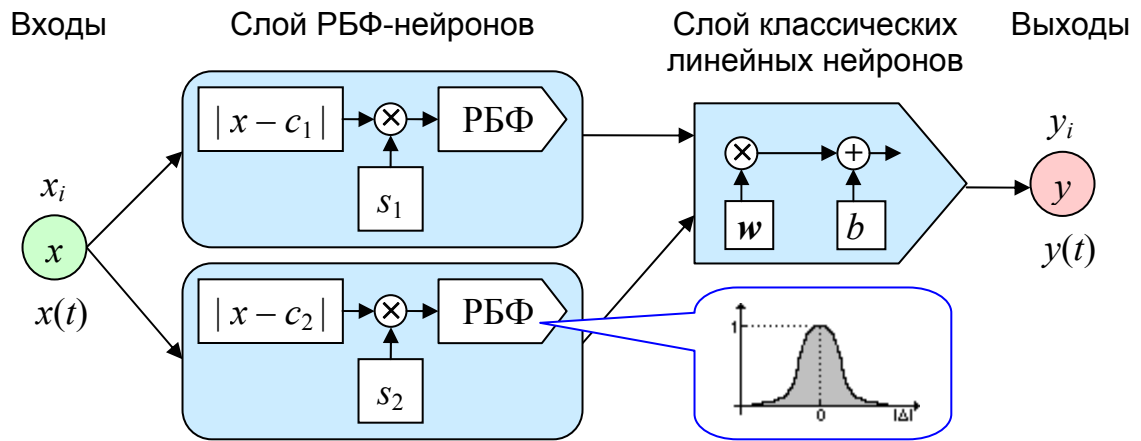


Рисунок 5 – РБФ-сеть, аппроксимирующая скалярную функцию одной переменной

Для простоты ограничимся двумя нейронами в скрытом слое. В качестве базисной возьмём РБФ-функцию вида:

$$\text{RBF}(\xi) = e^{-\xi^2} \quad (13)$$

Сеть применяется следующим образом. На вход подаётся аргумента функции. В нашем случае это x_i при обучении и $x(t)$ при тестировании. Этот аргумент поступает в каждый нейрон, где из него вычитается значение центра базисной функции c_j (своего рода весовой коэффициент РБФ-нейрона) и производится умножение модуля полученной разности на коэффициент ширины РБФ s_j (аналог смещения в классическом нейроне). От результата вычисляется РБФ и значение поступает на вход классического нейрона, который вычисляет взвешенную сумму выходов РБФ-нейронов и добавляет к ней некоторую постоянную составляющую b .

Рассмотрим более подробно, каким же образом производится аппроксимация. Для этого запишем в явном виде преобразование аргумента функции x в её значение y .

$$y = b + \sum_{j=1}^N \left(w_j \cdot \exp \left[- \left(s_j |x - c_j| \right)^2 \right] \right), \quad (14)$$

где N – число РБФ-нейронов. Это выражение – не что иное, как взвешенная сумма РБФ, смещённая вдоль оси ординат на b . Таким образом, РБФ-сеть аппроксимирует исходные данные смещённой взвешенной суммой базисных функций, число которых совпадает с числом нейронов в скрытом слое сети.

Мы рассмотрели простейший вариант: аппроксимацию скалярной функции одной переменной. В том случае, если исходная функция содержит n переменных, следует ввести дополнительные входы (число входов должно равняться числу переменных). В этом случае каждый нейрон будет содержать вектор центров $c_j = (c_j^1, \dots, c_j^n)$, а вместо модуля разности следует записать

$$\sqrt{\sum_{k=1}^n (x_k - c_j^k)^2} \quad (15)$$

Если аппроксимируемая функция не является скалярной, следует увеличить число выходных нейронов (оно равно числу компонент вектора, возвращаемого функцией).

Процесс обучения такой сети включает две стадии: настройку центров базисных функций и обучение нейронов в скрытых (выходных) слоях. Благодаря независимому выполнению этих процессов РБФ-сети обучаются быстрее. Отдельно настраивают центры базисных функций, затем с фиксированными параметрами РБФ-нейронов обучают выходной слой. Как правило, обучение начинается с одного нейрона в РБФ-слое. Затем нейроны последовательно добавляются вплоть до достижения максимально-допустимой ошибки либо заданного максимального числа нейронов (равного обычно числу обучающих пар).

2 ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ

2.1 Физические основы явления флуоресценции и флуоресцентная спектроскопия с разрешением по времени

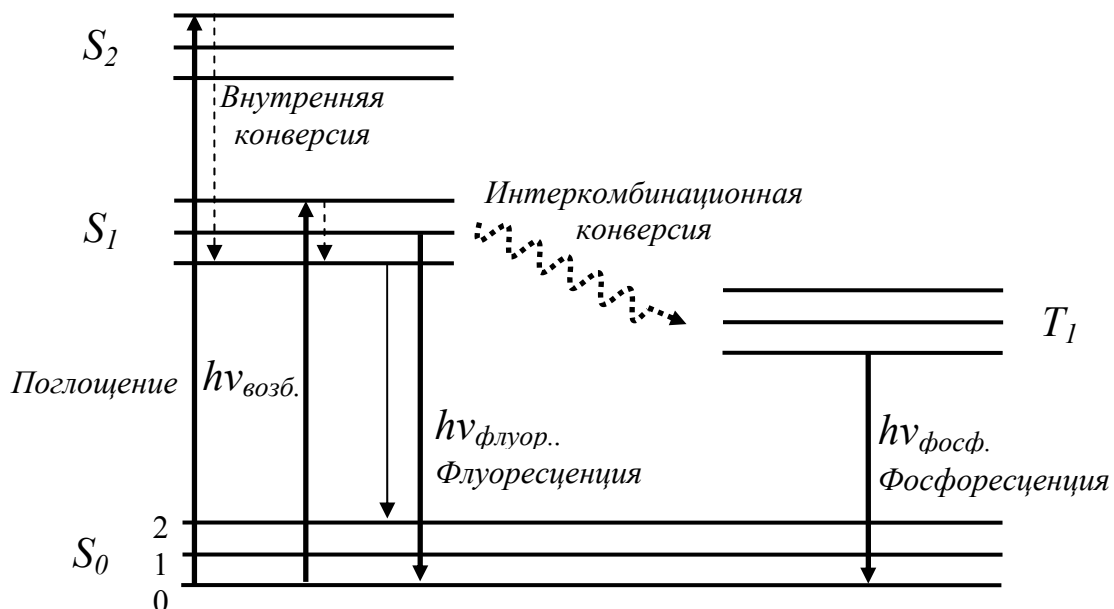
Методы флуоресцентной спектроскопии широко применяются в биохимических, медицинских и химических исследованиях. Причиной этого служат присущая этим методам высокая чувствительность, а также удобный временной диапазон: испускание флуоресценции происходит через 10 нс после поглощения света. За этот промежуток времени может произойти множество различных молекулярных процессов, которые способны повлиять на спектральные характеристики флуоресцирующего соединения. Такое сочетание чувствительности с подходящим временным диапазоном способствует тому, что флуоресцентные методы обычно используют для изучения мембран и протеинов и их взаимодействия с другими макромолекулами [12].

2.1.1 Введение в флуоресценцию

Флуоресценция – спонтанная люминесценция, затухающая в течение короткого времени [13]. Представляет собой испускание фотонов из электронно-возбужденных состояний. Это испускание происходит при возвращении электрона из возбужденного синглетного состояния в основное состояние без изменения ориентации его спина (см. рис 6). Такие переходы разрешены с точки зрения квантовой механики и типичные величины скоростей испускания для них $\sim 10^8 \text{ с}^{-1}$, отсюда время затухания флуоресценции ~ 10 нс. Время жизни – это средний период времени, в течение которого флуорофор находится в возбужденном состоянии.

Поглощение света происходит за 10^{-15} с, время, слишком короткое для заметного смещения ядер (принцип Франка-Кондона). За поглощением (возбуждение флуорофора происходит до некоторого высшего колебательного уровня состояний S_1 либо S_2) следует несколько других процессов. Процесс быстрой релаксации на самый нижний колебательный уровень состояния S_1 называется внутренней конверсией и происходит за 10^{-12} с. Поскольку типичные времена затухания флуоресценции близки к 10^{-8} с, внутренняя конверсия обычно полностью заканчивается до процесса испускания. Следовательно, испускание флуоресценции чаще всего осуществляется из термически равновесного возбужденного состояния. Аналогично поглощению обратный переход электронов на самый нижний электронный уровень также приводит к колебательно возбужденному состоянию (рис. 6). Термическое равновесие достигается за время 10^{-12} с. Следствием из такого рассмотрения является то, что спектр поглощения молекулы отражает колебательную структуру возбужденных электронных

состояний, а спектр испускания – колебательную структуру основного электронного состояния. В большинстве случаев электронное возбуждение не сильно изменяет расположение колебательных уровней энергии. В результате этого колебательные структуры, проявляющиеся в спектрах поглощения и испускания, сходны.



Основное, первое и второе электронные состояния обозначены S_0 , S_1 , S_2 соответственно. Каждый из этих уровней энергии может состоять из множества колебательных подуровней, обозначаемых 0, 1, 2 и т.д. Вертикальные линии обозначают переходы между различными электронными уровнями. T_1 – первое триплетное состояние.

Рисунок 6 – Диаграмма Яблонского

Молекулы в состоянии S_1 могут также подвергаться конверсии в первое триплетное состояние T_1 – интеркомбинационная конверсия (см. рис. 6). Испускание из T_1 , называемое фосфоресценцией, обычно сдвинуто в сторону больших длин волн (меньших энергий) по сравнению с флуоресценцией. Переход из T_1 в основное состояние запрещен, поэтому константа скорости такого испускания на несколько порядков меньше соответствующей константы для флуоресценции.

На испускание флуоресценции могут влиять и другие факторы, не показанные в явном виде на рис. 6: влияние растворителей, релаксация растворителя, тушение, а также реакции, происходящие в возбужденных состояниях [6].

2.1.2 Времена затухания, квантовый выход и анизотропия флуоресценции

Для флуоресцентной спектроскопии время жизни и квантовый выход – основные параметры, характеризующие флуорофор при изучении фотофизических процессов в возбужденных состояниях [14].

Время жизни возбужденного состояния определяется как среднее время, в течение которого молекула находилась в возбужденном состоянии до того, как вернуться в основное состояние и представляется следующим выражением

$$\tau = 1/(\Gamma + k), \quad (16)$$

где Γ и k – константы скорости соответственно излучательной и безизлучательной дезактивации флуорофора в состояние S_0 .

Квантовый выход флуоресценции – это отношение числа испущенных фотонов к числу поглощенных. Обе константы Γ и k соответствуют процессам уменьшения заселенности возбужденного состояния. Доля молекул флуорофора, которые дезактивируются с испусканием, а следовательно, и квантовый выход определяются выражением

$$Q = \Gamma / (\Gamma + k) \quad (17)$$

Для удобства все возможные процессы безизлучательной дезактивации сгруппированы в одну константу скорости k [12]. Сюда могут входить константы скорости межсистемного перехода k_{ISC} (для сложных многоатомных молекул), внутренней конверсии k_{IC} , формирования продукта k_D , переноса энергии (в донорно-акцепторной системе) k_{ET} . В более общих случаях выражения для времени жизни и квантового выхода принимают следующий вид [14, 15]

$$\tau = 1/(\Gamma + k_{ISC} + k_{IC} + k_D + k_{ET}) \quad (18)$$

$$Q = \Gamma / (\Gamma + k_{ISC} + k_{IC} + k_D + k_{ET}) \quad (19)$$

Время жизни флуорофора в отсутствие безизлучательных процессов, называемое излучательным временем жизни τ_0 , равно

$$\tau_0 = 1/\Gamma \quad (20)$$

Отсюда вытекает обычное соотношение между квантовым выходом и временем жизни:

$$Q = \tau / \tau_0 \quad (21)$$

2.2 Индуктивно-резонансный перенос энергии электронного возбуждения

Перенос энергии от возбужденных атомов или молекул к невозбужденным – широко распространенное в природе явление. Наглядное проявление переноса энергии – тушение люминесценции [16].

Большое число работ и исследований было посвящено изучению природы переноса энергии в различных молекулярных системах и средах. Наиболее фундаментальные теории были предложены Ферстером, Декстером и Галаниным [14].

Первая удовлетворительная теория Ферстера [17], основанная на теории возмущений в адиабатическом приближении, полностью сохранила свое значение и дает хорошее согласие с экспериментом в тех случаях, когда условия ее применимости выполнены. Предполагается, что перенос энергии происходит благодаря слабому диполь-дипольному взаимодействию между молекулами, так что оно не изменяет первоначальные оптические спектры молекул [16].

Флуоресцентный перенос энергии – это перенос энергии возбужденного состояния от донора к акцептору. Он происходит без промежуточного испускания фотонов и является, в основном, результатом диполь-дипольных взаимодействий между донором и акцептором.

Скорость переноса энергии зависит от степени перекрытия спектра испускания донора со спектром поглощения акцептора, относительной ориентации дипольных моментов переходов и расстояния между молекулами.

Зависимость флуоресцентного переноса энергии от всех перечисленных факторов обеспечивает значительные возможности использования метода для биохимических исследований [12].

Мы будем рассматривать безизлучательный перенос, который происходит в результате диполь-дипольного взаимодействия между донором и акцептором и не является простым испусканием и перепоглощением фотонов.

Константа скорости переноса энергии от донора к акцептору, при условии фиксированного расстояния между ними, определяется выражением

$$k_{ET} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6, \quad (22)$$

где r – расстояние между донором и акцептором;

τ_D – время жизни возбужденного состояния донора;

R_0 – характеристическое расстояние (радиус Ферстера) – расстояние на котором константа переноса энергии k_{ET} равна константе скорости затухания флуоресценции донора в отсутствие акцептора $k_{ET} = \tau_D^{-1}$:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 q_D}{128\pi^5 n^4 N_A} J, \quad (23)$$

где q_D – квантовый выход донора в отсутствие акцептора;

n – показатель преломления среды;

N_A – число Авогадро;

κ^2 – фактор, описывающий взаимную ориентацию в пространстве дипольных моментов переходов донора и акцептора.

J – интеграл перекрытия, отражающий степень спектрального перекрытия между испусканием донора и поглощением акцептора, имеет следующий вид:

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (24)$$

где $\varepsilon_A(\lambda)$ – коэффициент экстинкции акцептора, соответствующий длине волны λ ;

$F_D(\lambda)$ – нормированная интенсивность флуоресценции донора в шкале длин волн в диапазоне от λ до $\lambda + \Delta\lambda$.

Часто измеряют эффективность переноса энергии, которая определяется как отношение числа поглощенных донором фотонов к числу фотонов, перенесенных на акцептор:

$$E = \frac{k_{ET}}{\tau_D^{-1} + k_{ET}} \quad (25)$$

Эффективность можно непосредственно связать с расстоянием:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad (26)$$

Предположение о фиксированном расстоянии между донором и акцептором приводит к единственной скорости переноса, и, как следствие, кинетика затухания интенсивности флуоресценции должна быть одноэкспоненциальной [12].

2.3 Стационарные спектры и спектры с временным разрешением

В общем случае различают стационарную флуоресцентную спектроскопию и флуоресцентную спектроскопию с разрешением по времени. В стационарной спектроскопии используются непрерывные возбуждение и испускание. Регистрируемый стационарный флуоресцентный спектр испускания и спектр анизотропии усреднены по времени и определяются уравнениями (27) и (28).

$$I_{SS} = \int_0^{\infty} I(t) dt \quad (27)$$

$$r_{SS} = \frac{\int_0^{\infty} r(t) I(t) dt}{\int_0^{\infty} I(t) dt} \quad (28)$$

В спектроскопии с временным разрешением образец возбуждается световым импульсом, длина которого обычно меньше, чем время затухания флуоресценции образца. Испускание регистрируется быстродействующей системой детектирования, которая позволяет измерять интенсивность и анизотропию флуоресценции в наносекундном и даже более коротком временном масштабе.

Для простейшего случая (например, цинко-порфирин в толуоле) выражения для флуоресценции с разрешением по времени и стационарной флуоресценции и анизотропии принимают вид [14]:

$$I(t) = I_0 \exp(-t / \tau) \quad (29)$$

$$r(t) = r_0 \exp(-t / \phi) \quad (30)$$

$$I_{SS} = I_0 \tau \quad (31)$$

$$r_{ss} = r_0 / (1 + \tau / \phi), \quad (32)$$

где τ и ϕ – соответственно время жизни и время вращательной корреляции флуорофора;

I_0 и r_0 – интенсивность и анизотропия флуоресценции в момент времени $t=0$, немедленно следующий за импульсом возбуждения.

Параметр I_0 , как правило, зависит от концентрации флуорофоров и набора инструментальных параметров; величина r_0 характеризует форму флуорофора.

В то время как стационарные флуоресцентные измерения просты в реализации, измерения с разрешением по времени часто содержат больше информации, включая данные о временах жизни, форме молекул, статическом и динамическом тушении, переносе энергии [14].

2.3.1 Флуоресцентные измерения с временным разрешением

Существуют два широко используемых метода измерения времен затухания флуоресценции: импульсный и фазово-модуляционный. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки.

В фазово-модуляционном методе образец возбуждается синусоидально модулированным светом. Фазовый сдвиг и степень демодуляции испускания по отношению к падающему свету используют для расчетов времени затухания.

В импульсном методе образец освещается короткими импульсами света, затем измеряется зависимость интенсивности флуоресценции от времени. Длина импульса должна быть как можно короче, определенно короче времени жизни флуорофора.

Существует несколько импульсных методов для проведения измерений с временным разрешением (стробоскопический метод, метод счета фотонов и др.). Наиболее широко используемый – метод счета фотонов. В этом методе образец возбуждают световым импульсом. Регистрирующая система измеряет время между этим импульсом и приходом первого фотона. Уровень интенсивности необходимо подбирать таким образом, чтобы наблюдать не более одного фотона на каждые 20 импульсов. Если число фотонов на импульс больше, закон затухания искусственно сдвигается в сторону более коротких времен. Время между возбуждающим импульсом и приходом первого фотона измеряют для большого числа фотонов (10^6) [12].

2.4 Экспериментальные данные и проблемы их анализа

Инструментальная погрешность приводит к дополнительным сложностям в анализе данных. Наблюдаемая флуоресценция в действительности представляет собой свертку между теоретической флуоресценцией и импульсной характеристикой (ИХ) детектирующей системы, которая обусловлена конечной шириной импульса возбуждения, неидеальностью ИХ фотодетектора и электроники (см. рис 7)

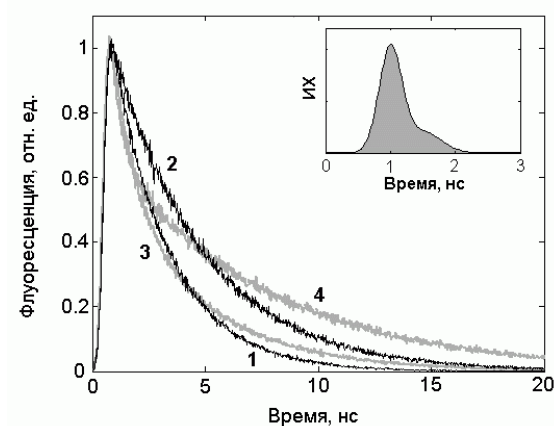


Рисунок 7 – Экспериментальные кривые затухания флуоресценции. Параметры затухания: для кривой 1 $\tau=2.5$ нс; для кривой 2 $\tau=4$ нс; 3 – $\tau_1=4$ нс, $\tau_2=1$ нс; 4 – $\tau_1=7$ нс, $\tau_2=0.5$ нс

К сожалению, длительности возбуждающих световых импульсов часто сравнимы с временем затухания флуоресценции [12]. Обозначим зависимость интенсивности вспышки от времени через $L(t)$ (это т.н. аппаратная функция измерительного оборудования), наблюдаемое затухание флуоресценции через $R(t)$, а импульсную функцию отклика через $F(t)$. Доказана следующая связь [12]:

$$R(t) = \int_0^t L(t')F(t-t')dt' \quad (33)$$

Зависимость интенсивности вспышки от времени обычно определяется в отдельном эксперименте. Наблюдая затухание флуоресценции $R(t)$, зная $L(t)$, необходимо определить функцию отклика $F(t)$. Предложено множество методов расчета истинной функции затухания $F(t)$: метод наименьших квадратов, метод моментов, метод преобразования Лапласа и преобразования Фурье и др.

Так, например, в методе наименьших квадратов ожидаемая величина $R(t)$ сравнивается с рассчитанным значением $R_c(t)$, которое вычисляется на основе подобранных значений параметров функции отклика $F(t)$. Параметры изменяются до получения наилучшего совпадения расчетных и экспериментальных кривых [12]. Нужно отметить, что подбираемые параметры необходимо проверять на соответствие физической модели.

2.5 Формализованное описание модели исследуемой системы

Для описания рассматриваемой системы выбрана следующая модель. Идеализированная система состоит из двух типов молекул, называемых доноры и акцепторы (см. рис. 8).

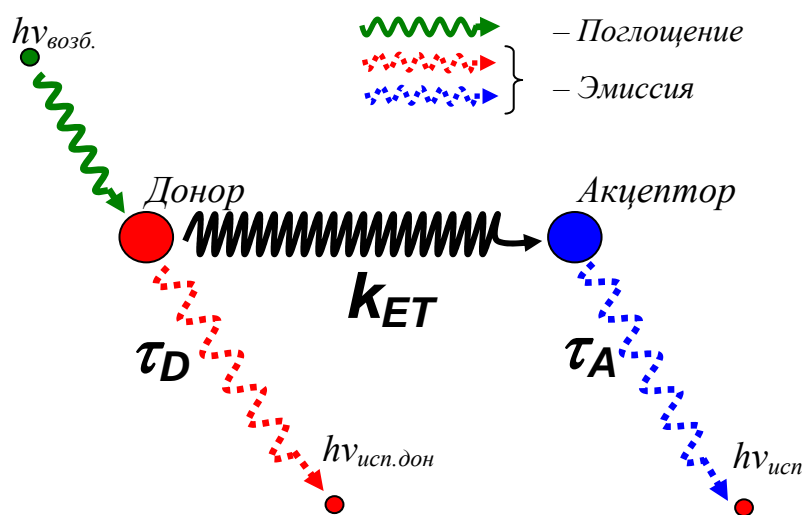


Рисунок 8 – Схема процессов, рассматриваемых в имитационной модели донорно-акцепторной системы

Предполагается, что система находится в условиях слабого межмолекулярного взаимодействия и в системе возможен резонансный перенос энергии от молекул донора к молекулам акцептора.

Полагается, что молекулы акцепторы находятся на фиксированном расстоянии от молекул доноров. Расстояние между молекулами определяет скорость и механизм межмолекулярного переноса энергии. При предложенных допущениях будем считать, что в системе имеет место Фестеровский механизм переноса энергии.

Система молекул донора и акцептора облучается потоком фотонов от источника возбуждения при условии, что возбуждение происходит на длине волны поглощения донора. Возбужденные молекулы доноры могут деактивироваться двумя путями:

Посредством спонтанного испускания с константой времени жизни τ_D на соответствующей длине волны испускания донора.

Вследствие диполь-дипольного резонансного переноса энергии невозбужденному акцептору. Этот процесс характеризуется константой скорости переноса энергии k_{ET} .

Молекулы акцептора в свою очередь излучает с константой времени жизни τ_A на соответствующей длине волны испускания акцептора.

Отметим, что в такой системе кривая затухания интенсивности флуоресценции донора будет определяться константой времени жизни донора τ_D и константой скорости переноса энергии k_{ET} . Кривая затухания интенсивности флуоресценции акцептора также будет зависеть от соотношения этих двух параметров τ_D и k_{ET} , а также от константы времени жизни акцептора τ_A .

2.6 Имитационная модель

2.6.1 Математическое моделирование методом Монте-Карло

Метод моделирования Монте-Карло часто выступает в качестве эффективной альтернативы аналитическому описанию при анализе процессов в сложных молекулярных системах, в которых возможен перенос энергии. В этом разделе описывается подход моделирования процессов в предложенной идеализированной донорно-акцепторной системе в присутствии резонансного переноса энергии.

Аналитическое уравнение затухания флуоресценции донора представлено формулой (34).

$$I_D(t) = I_{D0} e^{-\left(\frac{1}{\tau_D} + k_{ET}\right)t}, \quad (34)$$

где I_{D0} – интенсивность затухания донора в момент времени $t=0$;

Монте-Карло моделирование затухания флуоресценции донора при возможном переносе энергии акцептору проходит следующим образом. Независимо друг от друга случайным образом разыгрывается время затухания донора Δt_D (35) и время переноса энергии Δt_{ET} (36) для каждой из рассматриваемых возбужденных молекул донора:

$$\Delta t_D = -\tau_D \ln[\text{rand}(1)] \quad (35)$$

$$\Delta t_{ET} = -(k_{ET}^{-1}) \ln[\text{rand}(1)], \quad (36)$$

где $\text{rand}(1)$ – генератор базовой случайной величины, равномерно распределенной на отрезке $(0,1)$.

Если значение Δt_D меньше Δt_{ET} , то считается, что рассматриваемая возбужденная молекула донора флуоресцирует через время $t_D = \Delta t_D$, если же Δt_{ET} меньше Δt_D , тогда предполагается, что произошел перенос энергии от донора к акцептору. В этом случае моделируется затухания флуоресценции акцептора. Для этого разыгрывается время Δt_A (37).

$$\Delta t_A = -\tau_A \ln[\text{rand}(1)] \quad (37)$$

Тогда время, через которое флуоресцировал акцептор после возбуждения донора, будет вычисляться по формуле $t_A = \Delta t_A + \Delta t_{ET}$.

Таким образом, что бы получить результирующие кривые затухания флуоресценции для донора и акцептора, необходимо провести аналогичную процедуру моделирование для достаточно большого числа молекул системы [18].

Проверка на адекватность такого метода моделирования, а так же анализ необходимого числа разыгрываемых молекул для достижения хороших результатов подгона рассмотрены в следующей главе.

2.7 Исследование мембранных протеинов с помощью флуоресцентной спектроскопии

Мембранные протеины выполняют целый ряд биологических функций, включая дыхание, передачу сигнала, молекулярный и ионный перенос [19]. Однако, определение структур мембранных протеинов все ещё проблематично: из более чем 15000 известных структур протеинов менее 50 относятся к мембранным [20,21]). Сложность и хрупкость системы мембрана-протеин в значительной степени препятствуют применению стандартных методов изучения протеинов, таких как рентгеновская кристаллография и ЯМР [22,21]. Кроме того, эти методы предназначены для получения информации о малых расстояниях $\sim 5\text{\AA}$ и мало пригодны для изучения таких процессов, как, например кластеризации протеинов. Эти факторы вынуждают искать другой подход для изучения мембранных протеинов.

Успешной альтернативой вышеназванным методами является метод флуоресцентной спектроскопии резонансного переноса энергии (ФСРПЭ) [23,17,24], позволяющий получать информацию о расстояниях в диапазоне 10-100 \AA , что является достаточным для изучения структуры мембранных протеинов и их комплексов. Изучаемые макромолекулы (в нашем случае – мембранные протеины) помечают флуоресцентными метками двух типов: донорами и

акцепторами [24], причем в качестве донора либо акцептора зачастую используют естественные аминокислотные остатки протеинов – триптофан (Trp) и тирозин (Tyr) [25,22]. Для прикрепления искусственных меток к мембранным протеинам обычно производится замена определенной аминокислоты на цистеин (Cys) к которому и прикрепляется флуоресцентная метка. Поскольку биохимическая технология замены аминокислот и производства различных мутантов протеинов отработана, такой способ мечения позволяет заранее выбирать позицию прикрепления меток и, при необходимости, варьировать ее для получения дополнительной информации о конформации протеина.

Чувствительность флуоресцентного метода позволяет работать с чрезвычайно малыми (порядка микромолей) количествами меченых протеинов, и, следовательно, позволяет исследовать биологически валидные пробы.

3 СПЕКТРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОНОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

В основе ЭПР спектроскопии лежит эффект Зеемана – расщепление уровней энергии электрона во внешнем магнитном поле, которые могут быть изучены с помощью абсорбционной спектроскопии. Мембранные протеины маркируются относительно маленькими спиновыми метками содержащими нитроксильную группу. Результирующий абсорбционный спектр ЭПР содержит точные данные о среде в которой находятся спиновые метки, их подвижности, взаимодействии друг с другом и др. Этих данных достаточно для изучения геометрии небольших мембранных протеинов и их комплексов. В отличие от других методов, ЭПР предоставляет данные о структуре и динамике, даже для проводящихся химических или физических процессов без влияния на процесс

Однако сложность систем протеинов и липидов ограничивает возможности аналитической интерпретации спектров ЭПР. Стандартные методы анализа спектров включают в себя: непосредственное извлечение параметров формы линии, измерение высоты пиков, расщепления и общее уширение. Эти параметры не дают точной информации о физических процессах в экспериментальной системе. Кроме того, этот подход не применим для гетерогенных систем, когда экспериментальный спектр ЭПР представляет собой суперпозицию нескольких гомогенных спектров от спиновых меток, находящихся в разных средах [26].

Для анализа многокомпонентного спектра ЭПР используют математическое, имитационное или нейросетевое моделирование. Аппроксимация экспериментальных данных математической моделью предполагает подбор физических параметров модели для минимизации ошибки между экспериментальными и смоделированными данными. В результате становится доступной информация о физических процессах происходящих в системе и их параметрах.

Разработанные методы и алгоритмы были применены для анализа влияния небольшого трансмембранного пептида из вакуольной H^+ АТФазы [27] на распределение спиновых меток в водной и липидной среде, и параметры сред. Изучение этих пептидов играет роль в разработке новых способов лечения остеопороза.

3.1 Введение в электронный парамагнитный резонанс

Спектроскопией называют ряд экспериментальных методик для измерения и интерпретации разницы значений энергий для различных дискретных состояний. Обладая этой

информацией можно говорить о структуре и динамике молекулярной системы внутри опытного образца [28,29].

Взаимодействие неспаренного электрона, расположенного на орбите атома, с внешним магнитным полем называют эффектом Зеемана. Электрон обладает минимальной энергией в состоянии, когда его магнитный момент μ ориентирован вдоль внешнего магнитного поля, и соответственно максимальной энергией он обладает, когда магнитный момент μ будет антипараллелен полю. Эти два состояния описываются проекцией электронного спина M_s на направление магнитного поля: $M_s = \pm 1/2$ [30,31]. Разница между значениями энергий соответствующих двум состояниям пропорциональна величине внешнего магнитного поля (рис. 9).

Под действием переменного магнитного поля, перпендикулярного полю B , между верхними и нижними энергетическими уровнями будут наблюдаться переходы, сопровождающиеся переориентацией электронного спина, в том случае если частота переменного поля ν соответствует энергии перехода.

$$\Delta E = h\nu = g \mu_B B, \tag{38}$$

где ΔE – разница между энергиями для двух состояний;

h – постоянная планка, g – константа Зеемановского расщепления;

μ_B – магнетон Бора.

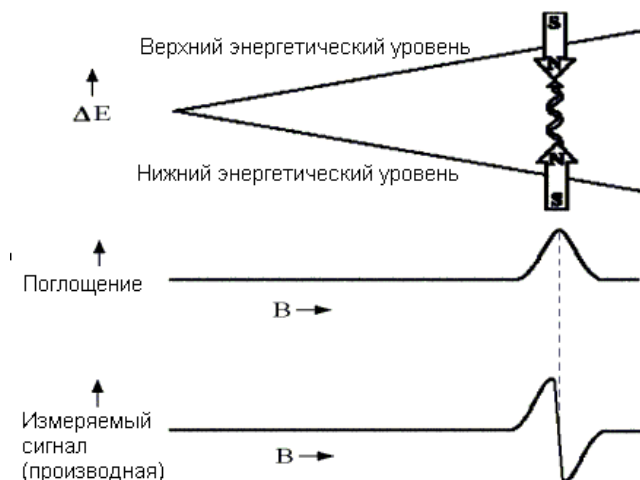


Рисунок 9 – Расщепление уровней энергии электрона в зависимости от внешнего магнитного поля

Существуют два подхода для получения ЭПР спектра. Величина магнитного поля фиксируется, и сканируются частоты СВЧ поля. Второй подход заключается в том, что частота СВЧ поля фиксируется, а сканируется величина постоянного магнитного поля. Пик поглощения возникает при выполнении условия (38). Это значение называют резонансным полем B_r . Из-за ограничений СВЧ генераторов, последний метод предоставляет более высокую производительность и используется в большинстве ЭПР спектрометров [31]. Также обычно используется усиление сигнала и фазочувствительное детектирование. Фазочувствительное детектирование дает сигнал, который является первой производной от спектра поглощения [28,31].

3.2 Теория ЭПР для нитроксильной группы

3.2.1 Гамильтониан

В нитроксильном радикале (-NO) неспаренный электрон находится на 2p-орбитали атома азота. При помещении описанной выше системы во внешнее магнитное поле гамильтониан для нитроксильного радикала для энергии будет описываться уравнением (39)

$$\hat{H} = \mu_B \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \hat{S} + \hat{F} \cdot \mathbf{A} \cdot \hat{I}, \quad (39)$$

где μ_B магнетон Бора, \hat{S} спин электрона, \hat{F} – спин ядра, \mathbf{B} – внешнее магнитное поле, \mathbf{A} – тензор сверхтонкого расщепления, \mathbf{g} – тензор Зеемановского расщепления.

Первая часть уравнения (39) описывает Зеемановское взаимодействие электрона с магнитным полем. Вторая часть - сверхтонкое расщепление неспаренного электрона с ядром ^{14}N (спин ядра $I = 1$) [32].

3.2.2 Система координат

Определим декартову систему координат $\{x, y, z\}$ связанную с молекулой, как показано на рис. 10. Ось x совпадает со связью N-O, ось z направлена вдоль 2p-орбитали, на которой находится неспаренный электрон. Благодаря симметрии 2p-орбитали, оси координат $\{x, y, z\}$ совпадают с главными осями тензоров \mathbf{g} и \mathbf{A} [30, 33].

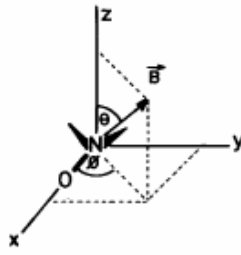


Рисунок 10 – Система координат для нитроксильной группы

Таким образом, g и A диагональны в этой системе координат. Пример этих тензоров для 2,2,6,6- тетраметилпиперидинооксид (ТЕМРО) спиновой метки представлены далее [31].

$$g = \begin{pmatrix} 2.0103 & 0 & 0 \\ 0 & 2.0069 & 0 \\ 0 & 0 & 2.0030 \end{pmatrix} \quad (40)$$

$$A = \begin{pmatrix} 0.76 & 0 & 0 \\ 0 & 0.60 & 0 \\ 0 & 0 & 3.18 \end{pmatrix}, \text{ в мТ} \quad (41)$$

Для нитроксильной спиновой метки в магнитном поле гамильтониан остается таким же, как и в уравнении (39), если пренебречь сверхтонким взаимодействием протонов и ядер ^{13}C и взаимодействием между спиновыми метками. Все эти утверждения верны для разбавленных систем при нормальных условиях [30].

Если магнитное поле приложено вдоль оси z нитроксильной метки, уравнение (39) можно переписать в виде

$$U(M_s, M_I) = \mu_B g_{zz} B M_s + A_{zz} M_s M_I, \quad (42)$$

где $M_s = \pm 1/2$, $M_I = 0, \pm 1$. из уравнения (42) следует, что спектр ЭПР состоит из трех резонансных линий равной высоты. Их положение задается уравнением (43)

$$h\nu_0 = \mu_B g_{zz} B + A_{zz} M_I \quad (43)$$

На рис. 11 представлен пример ЭПР спектра нитроксильной спиновой метки в идеальном случае.

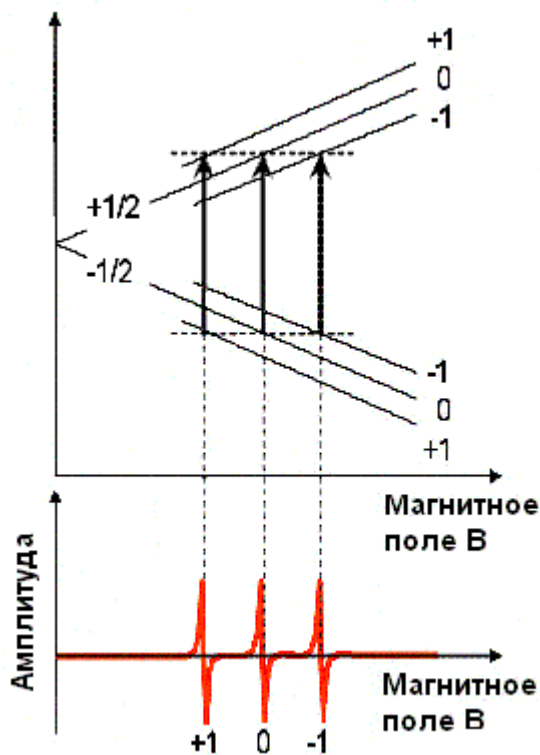


Рисунок 11 – Пример спектра ЭПР

3.2.3 Быстрое изотропное движение

Когда нитроксильные молекулы быстро и изотропно вращаются (например, в жидкости), спиновый гамильтониан из уравнения (39) начинает зависеть от времени. Однако возможно разделение гамильтониана на две части: стационарную часть \hat{H}_0 и нестационарная часть $\hat{H}_1(t)$ [33].

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \hat{H}_1(t), \quad (44)$$

где

$$\hat{H}_0 = \mu_B g_{iso} \mathbf{B} \hat{S} + A_{iso} I \hat{S} \quad (45)$$

и

$$\hat{H}_1(t) = \mu_B [g(t) - g_{iso}] \mathbf{B} \hat{S} + I [A(t) - A_{iso}] \hat{S} \quad (46)$$

Уравнение (46) содержит анизотропные части g and A тензоров: $g(t)$ и $A(t)$. Изотропные части g_{iso} и A_{iso} , задаются соотношениями:

$$g_{iso} = \frac{1}{3}(g_{xx} + g_{yy} + g_{zz}) \quad (47)$$

$$A_{iso} = \frac{1}{3}(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (48)$$

Когда движение молекулы с временем корреляции τ_c достаточно быстрое

$$|\dot{H}_1(t)| \times \tau_c \leq 1 \quad (49)$$

$\dot{H}_1(t)$ может рассматриваться как нестационарное возмущение. Такое возмущение действует как когерентное СВЧ поле, которое вызывает переходы между энергетическими состояниями электрона. Разница в том, что движение нитроксильной молекулы случайно, и $\dot{H}_1(t)$ вызывает переходы, изменяющие не только спин электрона, но и спин ядра вместе с модуляцией энергетических уровней. Следовательно, $\dot{H}_1(t)$ является причиной релаксационных эффектов и уширение линий.

Позиции линий спектра могут быть достаточно просто рассчитаны из уравнения (45), которое является аналогом уравнения (44). Это приводит к ЭПР спектру, состоящему из трех линий с константой расщепления A_{iso} и центром, заданным g_{iso} . Если движение очень быстрое, то есть $\tau_c < 10^{-11}$ s, спектр состоит из трех линий равной высоты (рис. 12а) [30,31,33].

В области быстрого движения ($10^{-11} < \tau_c < 3 \times 10^{-9}$ с), происходит уширение линий, в то время как их положение остаются постоянными. Форма линий очень чувствительна к деталям процесса переориентации. Например, в зависимости от формы, молекула может вращаться с различной скоростью вокруг различных осей. Подвергая детальному анализу такую форму линий, можно определить динамику системы, и какие факторы влияют на нее [28,31,33].

3.2.4 Медленное или анизотропное движение

Медленное движение происходит в диапазоне $\tau_c > 3 \times 10^{-9}$ с. При этом позиции линий спектра и их форма начинают размываться. Это является результатом суперпозиций спектров для всех возможных ориентаций молекулы по отношению к полю. Результирующий спектр представлен на рис. 12б.

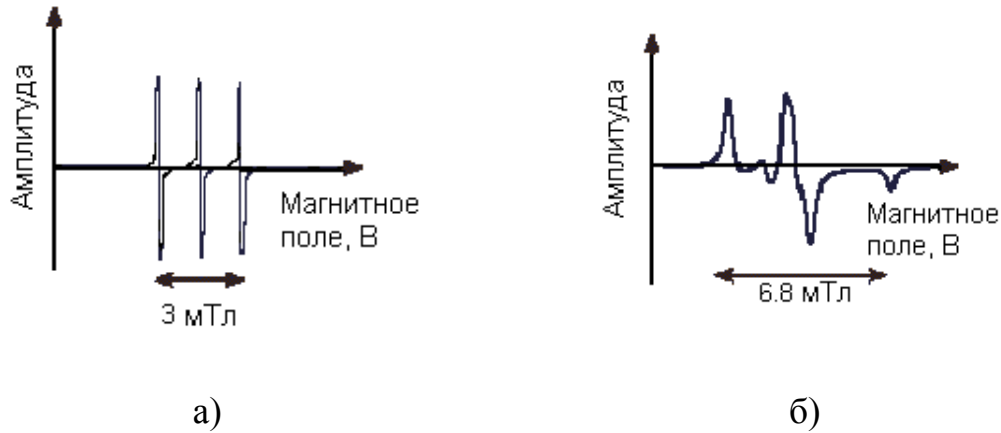


Рисунок 12 – Спектр ЭПР: быстрое движение (а), очень медленное движение (б)

3.2.5 Два типа формы линий

Лоренцевская форма линий спектра соответствует идеальному случаю изотропного вращения в жидкости (50). Следует отметить, что взаимодействие спиновых меток с другими атомами (кислорода и водорода) приводит к расщеплению энергетических уровней и уширению спектра. Результирующий спектр представляет собой суперпозицию нескольких немного смещенных друг относительно друга лоренцевских пиков. Это приводит к гауссовской форме линий (51). Лоренцевская и гауссовская форма (рис. 13) линий задаются уравнениями [26].

$$f_L(B) \propto \frac{1}{1 + \left(\frac{B - B_r(M_I)}{\Delta B_L(M_I)} \right)^2} \quad (50)$$

$$f_G(B) \propto \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{B - B_r(M_I)}{\Delta B_G} \right)^2 \right], \quad (51)$$

где $\Delta B_L(M_I)$ – уширение Лоренца для пика M_I ;

ΔB_G – уширение Гаусса

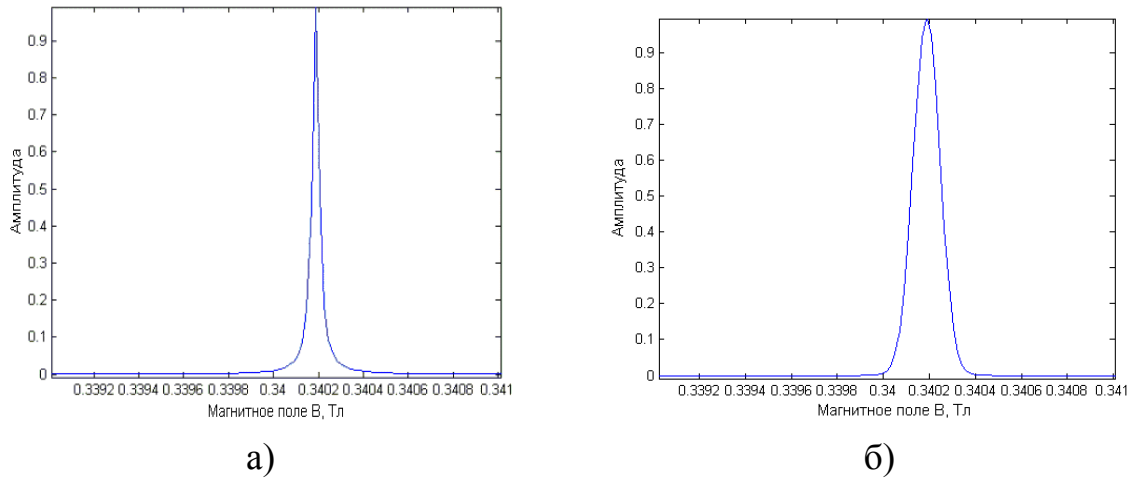


Рисунок 13 – Лоренцевская (а) и гауссовская (б) форма линий

3.3 Модель ЭПР в случае быстрого изотропного движения

Как было отмечено ранее, ЭПР спектр в идеальном случае состоит из трех лоренцевских линий (уравнение 50(50)) [28,31,33]. Ширина линии $\Delta B(M_I)$ выраженная в Тл задается уравнением

$$\Delta B(M_I) = a + bM_I + cM_I^2 \quad (52)$$

Выражение в явном виде для a , b и c задаются следующими уравнениями

$$a = \left(\frac{\gamma^2}{10}\right) [(A^{(0)})^2 + 2(A^{(2)})^2] + \left(\frac{\omega^2}{30}\right) [(g^{(0)})^2 + 2(g^{(2)})^2] \quad (53)$$

$$b = \left(\frac{2\omega\gamma}{15}\right) [g^{(0)}A^{(0)} + 2g^{(2)}A^{(2)}] \quad (54)$$

$$c = \left(\frac{\gamma^2}{12}\right) [(A^{(0)})^2 + (A^{(2)})^2], \quad (55)$$

где

$$g^{(0)} = \left(\frac{3}{2}\right)^{\frac{1}{2}} \left(g_{zz} - \frac{1}{2}(g_{xx} + g_{yy}) \right) \quad (56)$$

$$A^{(0)} = \left(\frac{3}{2}\right)^{\frac{1}{2}} \left(A_{zz} - \frac{1}{2}(A_{xx} + A_{yy}) \right) \quad (57)$$

$$g^{(2)} = \frac{1}{2}(g_{xx} - g_{yy}) \quad (58)$$

$$A^{(2)} = \frac{1}{2}(A_{xx} - A_{yy}) \quad (59)$$

В этих уравнениях ω –частота СВЧ поля, γ – гиромагнитное соотношение для электрона.

Для лоренцевской формы линий параметры b и c из уравнений (54-55) могут быть выражены через соотношение высоты пиков h_M :

$$b = \frac{1}{2} \Delta B(0) \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} - \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} \right) \quad (60)$$

$$c = \frac{1}{2} \Delta B(0) \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{+1}}} + \sqrt{\frac{h_0}{h_{-1}}} - 2 \right) \quad (61)$$

для X-диапазона ЭПР спектроскопии (9.5 GHz) можно определить время корреляции τ_c в диапазоне от $5 \cdot 10^{-11}$ до 10^{-9} s. Из теории релаксаций следует [32,33]

$$\tau_c = -1.22 \cdot 10^{-9} b \quad (62)$$

$$\tau_c = 1.19 \cdot 10^{-9} c \quad (63)$$

3.4 Уширение и расщепление спектра

Форма линий ЭПР для нитроксильных спиновых меток в аксиально-симметричной или изотропной системе является лоренцевской и фойхтовской (свертка Гаусса и Лоренца). Фойхтовская форма возникает благодаря неомогенному уширению из-за неразрешенной сверхтонкой структуры. Спектр неразрешен как из-за природы спиновых меток и эксперимента,

так и искусственно, из-за уширения за счет кислорода или других парамагнитных объектов. Эти эффекты рассматриваются далее [34,35,36].

3.4.1 Сверхтонкое расщепление.

Линии в спектре ЭПР могут расщепляться из-за взаимодействия парамагнитного электрона с магнитным моментом соседних ядер. Для нитроксильной спиновой метки, сверхтонкое расщепление на азоте является доминантным и хорошо разрешенным [31,32].

3.4.2 Сверхтонкое расщепление на ^1H

Для свободных нитроксильных радикалов в растворе сверхтонкое расщепление на протонах играет важную роль, так как природная концентрация ядер водорода $\sim 100\%$ и они обладают большим магнитным моментом [28,36]. Относительные интенсивности сверхтонких линий, которые дает ^1H в случае 12 протонов для метки ТЕМРО представлены на рис. 14. Результирующий спектр может быть получен с помощью свертки

$$L_H(B) = f_L(B) \otimes P_H(B), \quad (64)$$

где f_L – лоренцевская форма линии,

P_H – модель расщепления, обусловленного взаимодействием с ^1H .

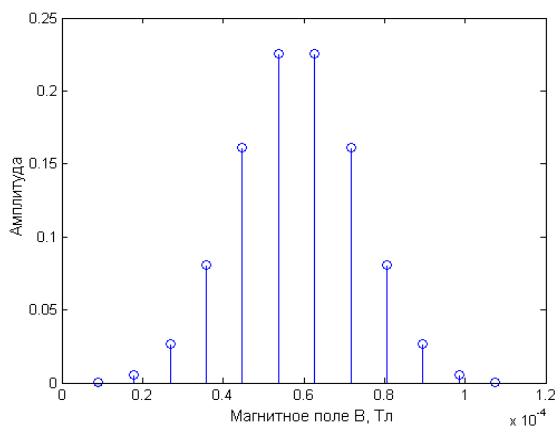


Рисунок 14 – Модель расщепления, обусловленного взаимодействием с ^1H

3.4.3 Сверхтонкое расщепление на ^{13}C .

Хотя природная концентрация изотопа ^{13}C очень мала (1.1%), в данном случае необходимо учитывать влияние ^{13}C для построения более точной модели ЭПР [28]. Из-за низкой природной концентрации ^{13}C рассматривается случай, когда в молекуле может находиться только один такой атом. Модель расщепления P_C (рис. 15) в этом случае состоит из двух одинаковых линий. Вероятность w найти молекулу с ^{13}C зависит от количества атомов углерода,

соединенных с нитроксильной группой не более чем 3 связями. В случае спиновой метки TEMPO есть 8 таких атомов углерода, которые приводят к вероятности $w = 8.8\%$. Спектр рассчитывается по формуле (65).

$$L_C(B) = (1-w) L_H(B) + w L_H(B) \otimes P_C(B) \quad (65)$$

Модель расщепления для ^{13}C показана на рисунке 15.

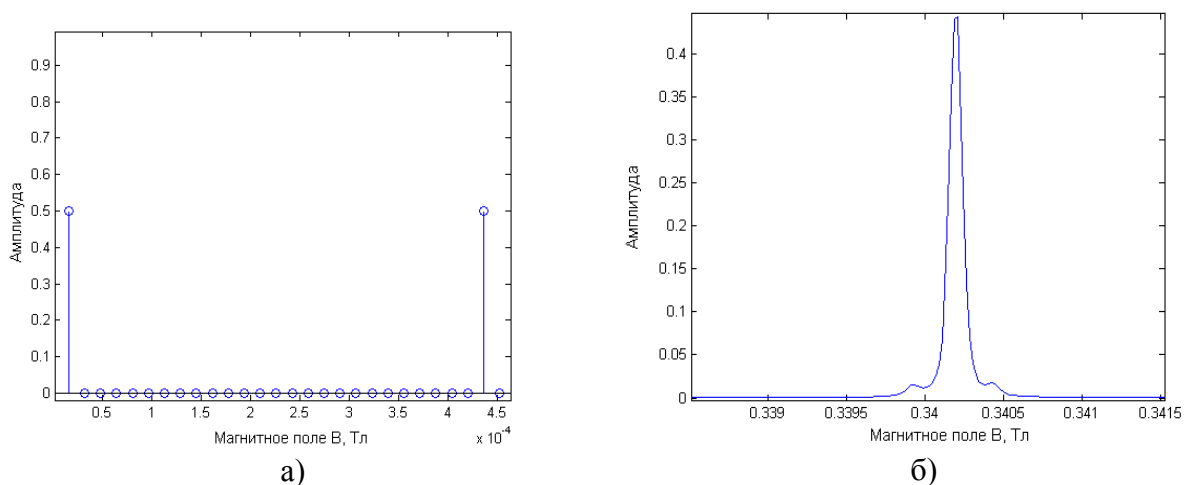


Рисунок 15 – модель расщепления для ^{13}C (а) и результирующий спектр (б)

3.4.4 Другие источники неоднородного уширения.

Уширение линий спектра может происходить из-за таких факторов, как модуляция магнитным полем, спин-спиновое взаимодействие, свободные атомы кислорода [35,36]. Для того, чтобы учесть все эти факторы для описания формы линий используется свертка гауссовской и лоренцевской формы линий. Результирующую форму линии называют фойхтовской [36]

$$f_V(B) = f_L(B) \otimes f_G(B), \quad (66)$$

где f_L и f_G – это лоренцевская и гауссовская форма линий соответственно (50-51).

Результирующий спектр представлен на рис. 16.

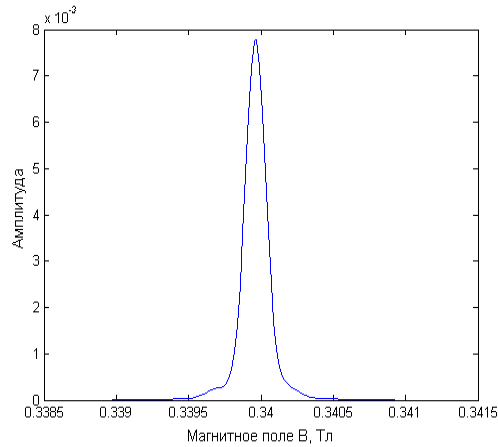


Рисунок 16 – Результирующий спектр

3.5 Математическая модель ЭПР

Для анализа ЭПР спектра гетерогенной системы была построена математическая модель нитроксильных спиновых меток в изотропном случае. Разработанная модель построена на основе теории описанной в разделах 3.2 - 3.4. Блок схема модели представлена на рис. 17.

Неизвестные входные параметры $\mathbf{P}_X = (A, g, \tau_c, W)$ для гомогенной системы представлены в таблице 1.

Таблица 1 – неизвестные входные параметры для однокомпонентной модели спектра ЭПР.

Параметр	Описание	Диапазон
1. Константа сверхтонкого расщепления, A	Экспериментальное значение A_{iso} (содержит информацию о полярности среды)	$1.5 \times 10^{-3} \div 2.1 \times 10^{-3}$ Тл
2. g тензор, g	Экспериментальное значение g_{iso}	$2.00 \div 2.02$
3. Время корреляции, τ_c	Показывает скорость вращения метки	$10^{-11} \div 3 \times 10^{-9}$ с
4. Величина гауссовского уширения, W	Уширение ΔB для функции Гаусса	$10^{-5} \div 10^{-4}$ Тл

В случае многокомпонентной системы число параметров фитинга возрастает. Например, для двухкомпонентной системы будут определены следующие параметры:

$$\mathbf{P}_X = (A^I, g^I, \tau_c^I, W^I, A^{II}, g^{II}, \tau_c^{II}, W^{II}, f), \quad (67)$$

где I и II маркируют параметры, относящиеся к первой и второй, f – соотношение между компонентами.

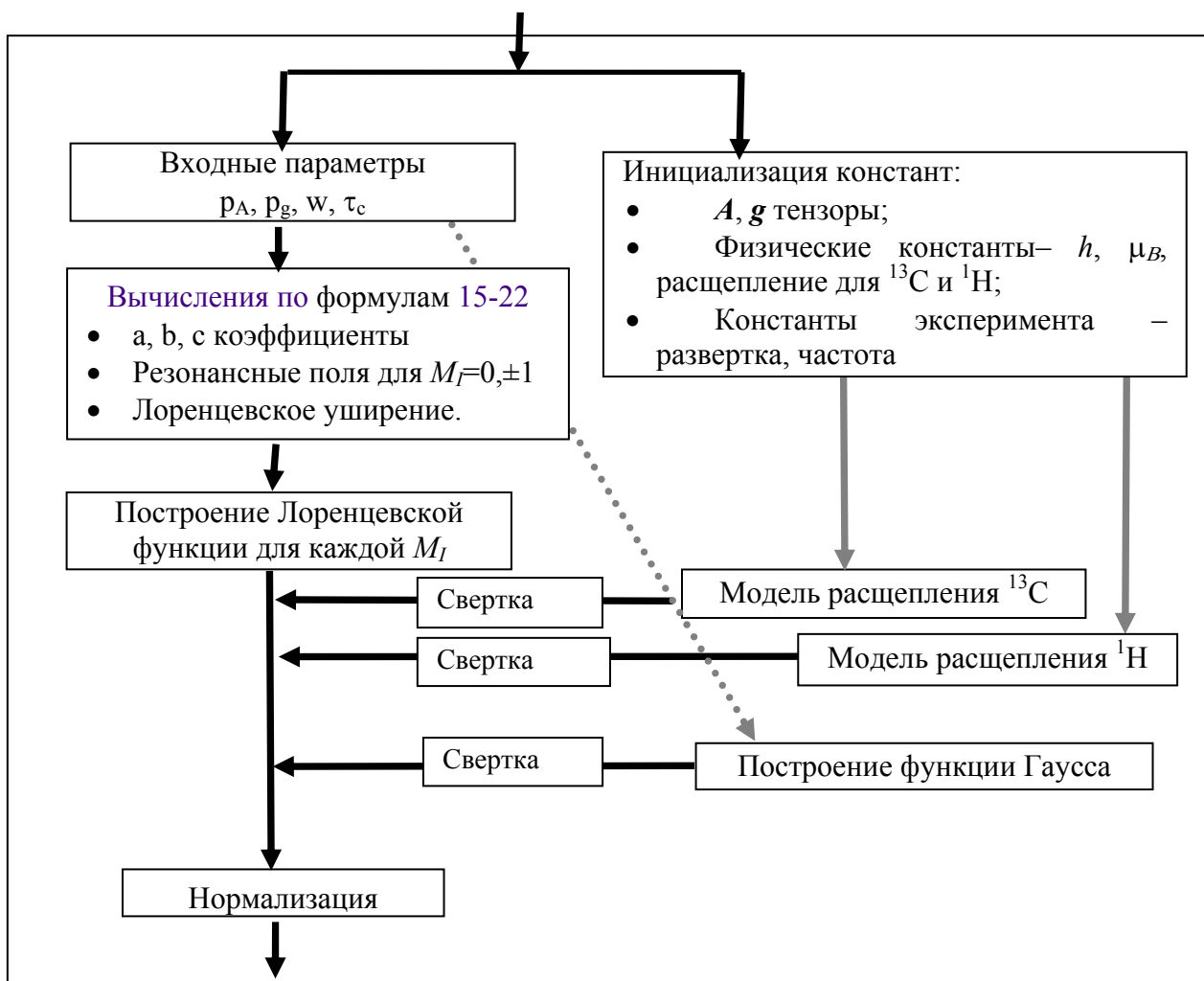


Рисунок 17 – Моделирование формы линии

3.6 Экспериментальные данные и проблема их анализа

3.6.1 Материалы

Липиды и мембраны. Липиды (фосфолипиды), являющиеся представителями сложных эфиров жирных кислот, представляют собой класс частично водорастворимых органических молекул. Липиды состоят из гидрофильной «головы» и двух гидрофобных углеводородных цепей.

При помещении в водный раствор липиды образуют различные структуры. Считается, что основная масса липидов в биомембранах находится в ламеллярной жидкокристаллической фазе. При этом липиды формируют двухслойные плоские структуры ориентированные углеводородными цепями к центру, а гидрофильными головами – к воде (рис. 18).

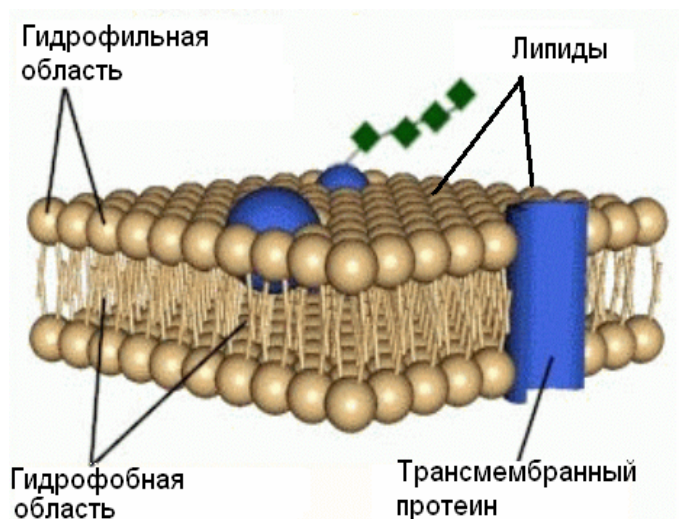


Рисунок 18 – Пример липидного бислоя (мембраны)

В данной работе использовались липиды с отрицательно заряженной «головой» для того, чтобы пептиды могли более свободно проникать внутрь мембраны.

Мембранные протеины и пептиды. Это большие молекулы состоящие из аминокислот соединенных последовательно. Пептидами называют последовательности менее чем из 50 аминокислот и они могут быть синтезированы.

В данной работе были использованы пептиды S1, S2, S3 и S4 из вакуольной H^+ АТФазы. Последовательности пептидов приведены на рис. 19.

Пептид S1 KK-SHTASYL**R**LWALSLANAQLSS-KK

Пептид S2 KK-SHTASYL**A**LWALSLANAQLSS-KK

Пептид S3 KK-SHTASYL**H**LWALSLANAQLSS-KK

Пептид S4 KK-SHTASYL**C**LWALSLANAQLSS-KK

Рисунок 19 – Трансмембранные пептиды использованные в экспериментах

Спиновые метки. Биологические мембраны не обладают внутренними парамагнитными свойствами. Для изучения такой системы методами ЭПР спектроскопии необходимо внедрение спиновых меток в эту систему. В данной работе использовалась спиновая метка 2,2,6,6-тетраметилпиперидинооксид (TEMPO) для изучения влияние мембранных протеинов на липидный бислой. Химическая структура спиновой метки TEMPO приведена на рис. 20.

Для этого типа меток справедливо следующая зависимость, чем больше текучесть мембраны, тем больше меток находится в ней.

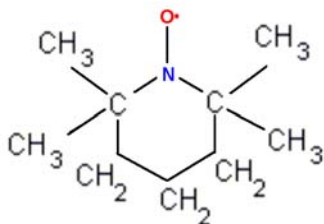


Рисунок 20 – Спиновая метка TEMPO

3.6.2 Схема экспериментов

Эксперименты проводились на спектрометре ELEXSYS E500, Bruker Instruments Inc.

Для тестирования предложенной модели и анализа описанной выше биологической модели были проведены следующие типы экспериментов (таблица 2). Изучалась температурная зависимость распределения спиновых меток и других параметров системы в диапазоне температур от 274°K до 309°K.

Таблица 2 – Проведенные эксперименты

Модель	Компоненты	Эксперименты
1.Однокомпонентная (10 эксперименты)	• TEMPO метки, вода	Измерение температурной зависимости в диапазоне температур 274÷309°K
2.Двухкомпонентная А (10 экспериментов)	• TEMPO метки, вода, липиды	Измерение температурной зависимости в диапазоне температур 274÷309°K
3.Двухкомпонентная В (50 экспериментов)	• TEMPO метки, вода, липиды, пептиды S1, S2, S3, S4	Измерение температурной зависимости для пептидов S1, S2, S3, и S4. серия экспериментов с пептидом S2 была проведена дважды с различной концентрацией пептидов

Для получения физических параметров системы были применены методы и модели, описанные в разделе 3.5. Для анализа температурной зависимости вначале обрабатывался спектр, записанный при более высокой температуре. Рассчитанные параметры использовались как начальные параметры для следующего спектра при более низкой температуре. Это приводило к лучшим результатам, чем когда использовался обратный порядок обработки или начальные параметры задавались для всего набора температур одинаково.

3.7 Многокомпонентные спектры

3.7.1 Однокомпонентная система

Для тестирования предложенной модели были проведены эксперименты с TEMPO метками и водой, рис. 21.

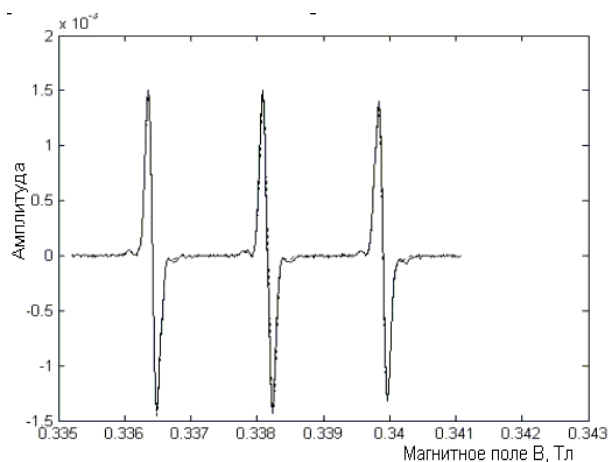


Рисунок 21 – Спектр ЭПР для ТЕМРО в воде и его аппроксимация моделью

3.7.2 Двухкомпонентная система

Если полученный ЭПР спектр для двухкомпонентной системы хорошо разрешен в третьем пике, то отношение количества меток можно рассчитать из отношения высоты пиков [34]. Однако, как было отмечено ранее, существует ряд факторов, уширяющих результирующий спектр, поэтому линии плохо разрешены. Два спектра перекрываются и подход Бэйлса [34] неприменим. Двухкомпонентный спектр и его аппроксимация разработанной моделью представлены на рис. 22.

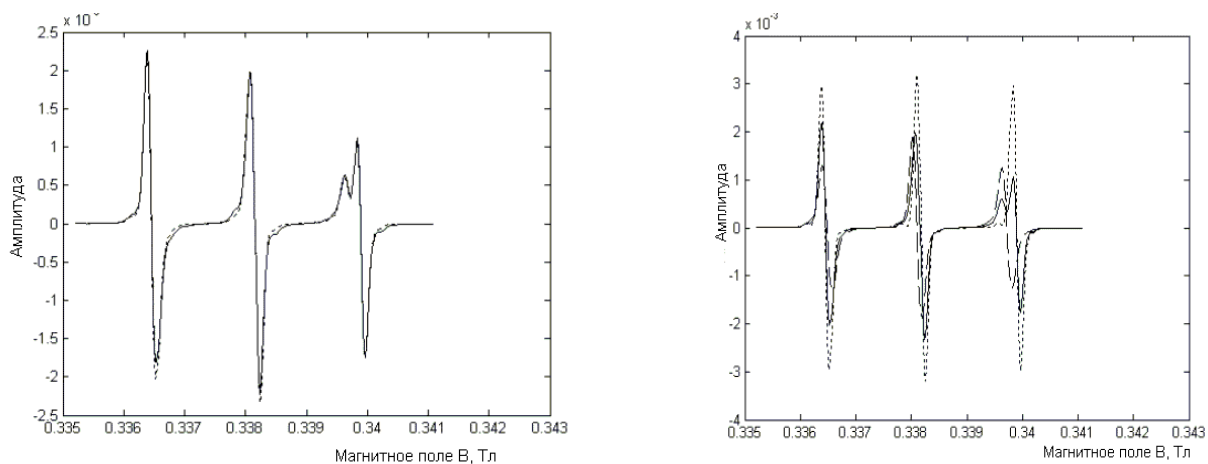


Рисунок 22 – Двухкомпонентный спектр и его аппроксимация моделью

3.7.3 Разделение двух компонент.

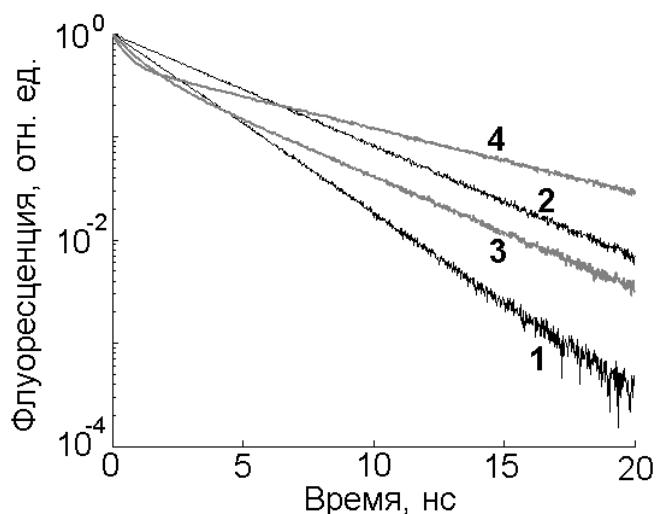
Когда две компоненты разделены, можно получить A и g тензоры, время корреляции и гауссовское уширение слоя обеих компонент. Пример разделения спектров показан на рис. 22. Соотношение компонент говорит об изменениях текучести мембраны.

4 ПРИМЕНЕНИЕ ИНС

4.1 Предварительный анализ кривых затухания

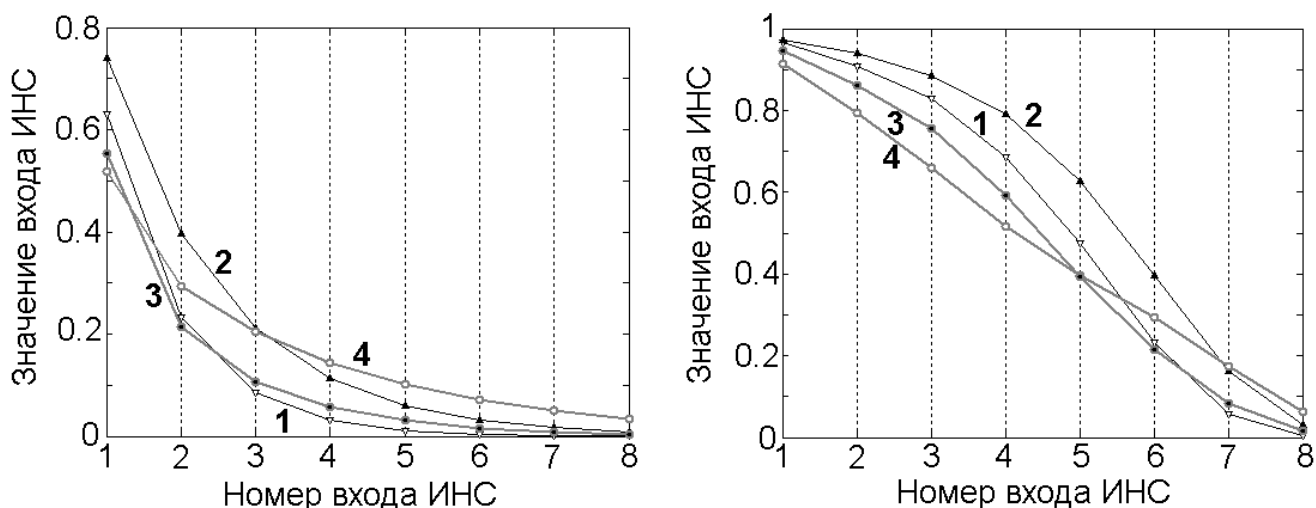
4.1.1 Предварительная обработка кривых затухания

Наиболее очевидный способ применения ИНС – непосредственное решение обратной задачи по определению параметров системы. При этом на вход нейронной сети подаются предварительно обработанные экспериментальные данные, а с выходов снимается оценка параметров экспериментальной системы. Для успешного применения ИНС над данными должны быть произведены некоторые дополнительные операции. Во-первых, следует понизить размерность экспериментальных данных. Во-вторых, значения, подаваемые на вход сети, желательно перевести в интервал (0, 1). Рассмотрим этап предварительной обработки в случае анализа кривых затухания флуоресценции. Исходные данные представлены на рис. 23. Каждая экспериментальная кривая содержит по 1024 отсчета. Для примера пусть число входов ИНС равняется 8. Кривые затухания можно преобразовать в вектор из 8 значений, применив огрубление (усреднение внутри некоторого интервала) по временной шкале. При этом интервалы усреднения могут выбираться либо одного размера (рис. 24а), либо экспоненциально возрастающими. На рис. 24б приведен пример понижения размерности для количества отсчетов в интервале, равного: 8, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512.



Тонкой черной линией показаны одноэкспоненциальные кривые затухания, толстой серой – двухэкспоненциальные.

Рисунок 23 – Примеры одно- (кривые 1 и 2) и двухэкспоненциальных (кривые 3 и 4) кривых затухания флуоресценции



а)

б)

Рисунок 24 – Кривые затухания флуоресценции, обработанные путем усреднения с постоянными (а) и экспоненциально возрастающими (б) интервалами.

4.1.2 Классификация кривых затухания флуоресценции

Важным этапом при анализе кривых затухания является выбор правильной аналитической модели флуоресценции. Такой выбор осуществляется, как правило, либо на основании априорной информации о системе (не всегда достаточной), либо путем эмпирического подбора модели, на основании поведения критерия χ^2 .

Рассмотрим задачу выбора модели кривых затухания. В зависимости от числа флуорофоров и их состояний в измеряемом образце, модели кривых затухания могут быть одноэкспоненциальными, двух-, трехэкспоненциальными и т.д., причем число экспонент в модели кривой затухания равно числу флуорофоров и их состояний в образце. При проведении измерений априорная информация о числе состояний флуорофоров обычно отсутствует.

Проблему выбора адекватной модели можно представить в виде задачи классификации. Действительно, набор экспериментальных данных по затуханию флуоресценции надо отнести к одному из нескольких классов моделей, выбрав, например, одно-, двух- или трехэкспоненциальное затухание. Для решения этой задачи могут быть использованы ИНС, обученные на специально подготовленных примерах.

Указанная задача решалась следующим образом. Были подготовлены обучающее, тестовое и контрольное множества данных, каждое из которых содержало кривые, принадлежащие каждому из определяемых классов. Нормировка всех кривых должна быть одинаковой. Число выходов совпадало с числом классов. На вход сети подаются предварительно обработанные кривые затухания, с выходов снимается вероятность

принадлежности кривой к одному из классов (например: одно-, двух- или трёхэкспоненциальные кривые).

Для классификации применялся МСП с сигмоидальной передаточной функцией в выходном слое, обучаемый методом обратного распространения ошибки. Обучаемые пары генерировались искусственно. Структура ИНС включала 10 нейронов во входном слое, 4 нейрона в скрытом слое, один нейрон – в выходном. Объем обучающей выборки – 100. Результаты классификации подтвердили возможность классификации данных на одно- и многоэкспоненциальные. Этот метод можно развивать и проводить классификацию кривых затухания на 3 (одно-, двух- и трехэкспоненциальные) и более классов, причем для этого необходимо использовать МСП с большим количеством нейронов. Результаты классификации приведены на рисунке 25.

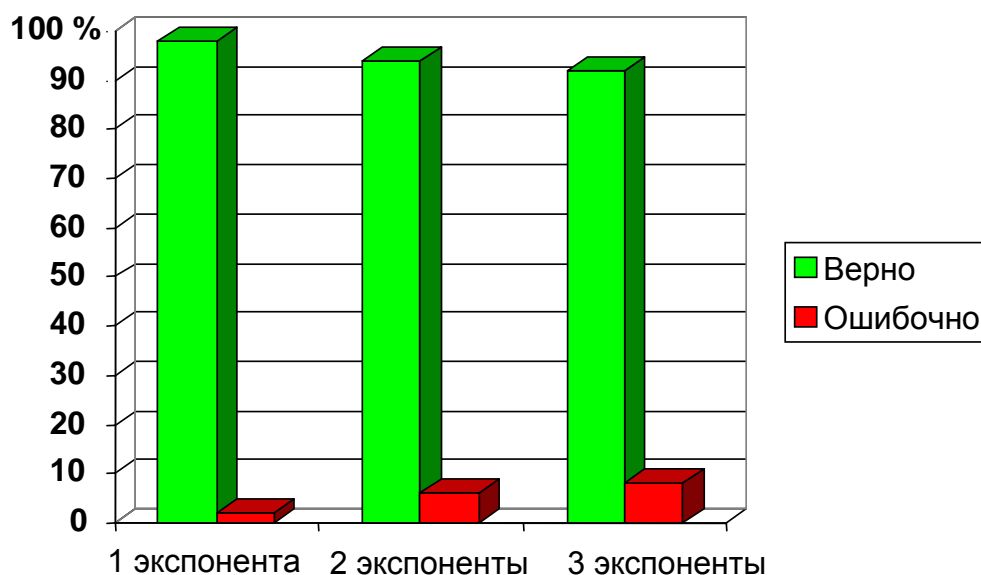


Рисунок 25 – Вероятности верного и ошибочного распознавания моделей кривых затухания флуоресценции

4.1.3 Определения параметров

Вследствие специфики анализа кривых затухания для многоэкспоненциальных моделей особое значение приобретает предварительный поиск начальных приближений. Ошибка на этом этапе чревата попаданием алгоритма поиска параметров в локальный минимум. Как правило, для поиска начальных приближений используют метод случайного подбора параметров, не дающий достаточной точности, или же преобразование Лапласа, работающее только с суммами экспонент и непригодное для более сложных моделей. Применение нейронных сетей имеет ряд

преимуществ перед названными подходами. Для нейросетевого анализа характерна высокая устойчивость к шумам, гибкость (сети с одинаковой структурой могут использоваться для анализа различных моделей), универсальность (анализ не ограничивается моделью с суммой экспонент). Обученная на искусственно смоделированных данных нейронная сеть может успешно применяться для анализа экспериментальных кривых. Рассмотрим задачу поиска начальных приближений на примере трехэкспоненциальной модели:

$$f(t, a_1, \dots, a_n, \tau_1, \dots, \tau_n) = \sum_{i=1}^n a_i e^{-t/\tau_i}, \quad (68)$$

где τ_i – времена жизни флуорофоров в возбужденном состоянии.

Для анализа кривых затухания удобно использовать многослойные перцептроны. При этом, так же как и в случае классификации модели, на вход сети подается предварительно обработанная кривая затухания. С выходов снимаются нормированные значения τ . Таким образом, число выходов будет зависеть от выбранной модели и равняться числу оцениваемых параметров (в случае трехэкспоненциального затухания – 3 выхода). Поскольку в функции (68) порядок суммирования не влияет на результат, приходилось вводить дополнительные ограничения. При обучении сети первый выход сети сравнивался с наибольшим τ , и далее, по порядку, до минимального времени жизни. Аналогично, при работе сети с первого выхода снималась оценка наибольшего времени жизни, с последнего – наименьшего.

В результате проведенных численных экспериментов были установлены вероятности попадания оценки параметров в 10 % и 20 % интервалы отклонений от своих реальных значений. Полученные данные приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Вероятности попадания оценки в область допустимой погрешности

Допустимая погрешность	Вероятность попадания оценки τ_1 в область допустимой погрешности	Вероятность попадания оценки τ_2 в область допустимой погрешности	Вероятность попадания оценки τ_3 в область допустимой погрешности
10 %	99 %	73 %	70 %
20 %	100 %	97 %	96 %

Видно, что сеть с высокой вероятностью оценивает параметры трехэкспоненциального затухания. Следует отметить, что метод применим и в случае более сложных, не экспоненциальных моделей. Дополнительным позитивным фактором является то, что при таком

анализе отпадает необходимость деконволюции данных, что делает процедуру в достаточной степени устойчивой к шумам.

4.2 Нейросетевое моделирование процесса переноса энергии в мембранных протеинах

4.2.1 Экспериментальные объекты и методы

Представленный выше подход к моделированию был протестирован на задаче моделирования резонансного переноса энергии между флуоресцентными метками вирусного протеина M13, внедренного в липидную мембрану. Рассмотрим модель экспериментальной системы.

Пространственная модель протеин-липидной системы. Внедренный в мембрану белок бактериофага M13, инфицирующего *Escherichia Coli* является весьма удобной системой для изучения фундаментальных аспектов протеин-липидных и протеин-протеиновых взаимодействий. Длина этого протеина составляет 50 аминокислот, образующих преимущественно α -спираль. Этот протеин изучался в течение последних 10 лет различными биофизическими методами [37].

При изучения методом резонансного переноса энергии аминокислота Trp в позиции 26 использовалась в качестве донора. А качестве акцептора в белок искусственно внедрялась флуоресцентная метка AEDANS [38]. Поскольку вероятность внедрения была ниже 100 % в системе существовало 2 типа протеинов: не меченные, содержащие лишь один донор, и меченные, содержащие как донор так и акцептор. Для изучения такой сложной системы была введена следующая упрощенная пространственная модель. Биологическая мембрана была аппроксимирована двумерной периодической структурой с гексагональной упаковкой липидов в которой распределены протеины M13. Такая структура представлена на рисунке 26а. Площадь занятая каждым протеином была принята равной площади липида. Было предположено что расстояние между двумя ближайшими молекулами в решетке равно 8 Å, а толщина двойного липидного слоя – 30 Å. Протеины аппроксимировались структурами представленными на рисунке 26б с постоянным положением донора (D) и переменным акцептора (A).

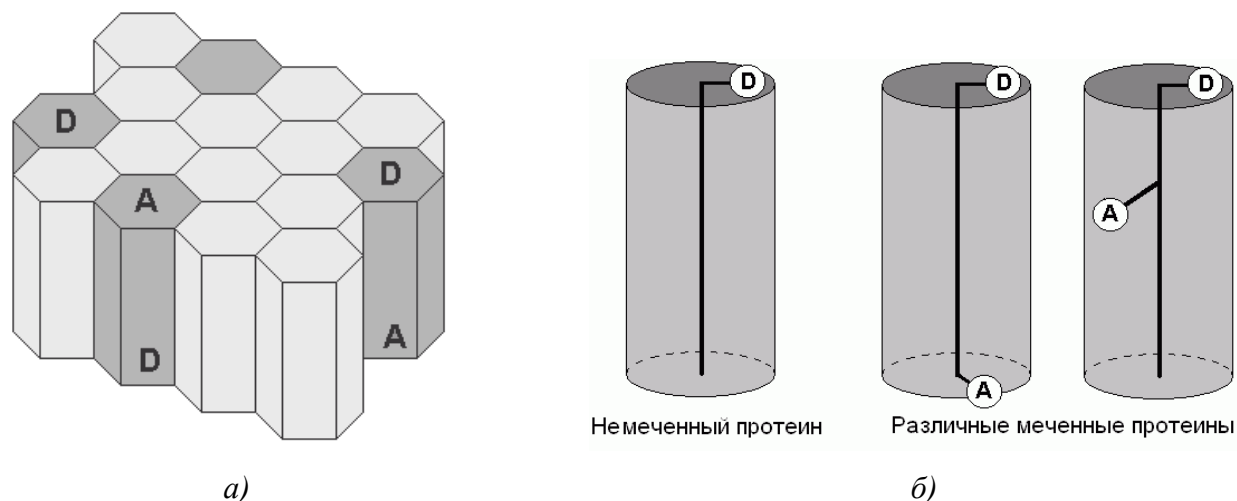


Рисунок 26 – Модель мембраны (а) и мембранного протеина (б) с флуоресцентными метками.

Модель переноса энергии. Входные параметры модели представлены в таблице 4. Их диапазоны выбраны таким образом, чтобы покрыть все физически оправданные значения возможные на практике.

Таблица 4 – Входные параметры модели

Параметр	Описание	Диапазон
1) Поверхностная плотность меченых протеинов	Отношение площади занятой меченными протеинами (содержащими и донор и акцептор) к полной площади мембраны.	0.0001 – 0.1
2) Поверхностная плотность не меченых протеинов	Отношение площади занятой не меченными протеинами (содержащими и донор и акцептор) к полной площади мембраны	0.0001 – 0.1
3) Позиция акцептора	Номер аминокислотной позиции к которой прикрепляется акцептор.	1 – 50
4) Коэффициент ассоциации протеинов	Вероятность того, что выбранный протеин находится рядом с другим.	0 – 1
5) Размер молекул	Минимальное расстояние между центрами 2-х ближайших молекул (липидов или протеинов)	5 – 10 Å
6) Расстояние Ферстера	Расстояние между донором и акцептором, при котором происходит 50 % перенос энергии.	1 – 100 Å

В экспериментальной ситуации параметры 1-3 и 6 известны (хотя и с некоторой погрешностью), следовательно, они могут рассматриваться как P_0 в обозначениях подраздела 2.2. Тем не менее, в общем случае разделение параметров представленных в таблице 4 на P_0 и P_X зависит от конкретной ситуации. Например, для 3-х параметрической модели параметры 1 и 2 могут использоваться как P_X , а параметр 3, известный более точно, как P_0 . Следует отметить, что 3-х параметрическая модель использовалась только для проверки методологии. Для 4-х параметрической модели коэффициент ассоциации протеинов становится объектом интереса (P_X), в то время как параметры 1-3 – известны (P_0).

В качестве выходного значения системы бралась эффективность переноса энергии (F в обозначениях подраздела 2.2). Вследствие того, что моделирование носит полу-имитационный характер (имитационная модель пространственной структуры и математическая модель процесса) выходное значение системы содержало случайную шумовую составляющую. Поэтому моделирование запускалось несколько раз с усреднением результата. Блок-схема моделирования представлена на рисунке 27.



Рисунок 27 – Схема отдельного моделирования переноса энергии в системе мембранных протеинов.

Моделирование осуществлялось следующим образом:

1. Устанавливались параметры системы (блок 1).

2. Пространственная модель мембраны с внедренными протеинами создавалась в соответствии с входными параметрами. Координаты и ориентация протеинов предоставляли информацию о положении доноров и акцепторов в системе (блок 2).

3. Для каждого донора (обозначенного как i_D) вычислялись расстояние до всех акцепторов и вероятность переноса энергии с этого донора на любой из них (формула (26)) (блок 3-5).

4. Средняя вероятность переноса энергии давала эффективность переноса энергии для всей системы.

Шаги 2-4 (и блоки 2-6 в блок-схеме) повторялись несколько раз для уменьшения случайной составляющей эффективности. В наших вычислениях использовалось $10^4/n_D$ пусков моделирования, где n_D – число доноров в системе.

4.2.2 Результаты нейросетевого моделирования

Конфигурация ИНС. Параметры системы линейным преобразованием переводились в диапазон [0,1] перед подачей на входы сети. Оптимальное число нейронов МСП выяснялось с помощью численных экспериментов, результаты которых приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Оптимальное число нейронов в ИНС

Число входных параметров	3	4	5	6
Номера используемых параметров	1-3	1-4	1-5	1-6
Число нейронов в первом слое сети	13	15	18	20
Число нейронов во втором слое сети	10	13	16	20

После определения оптимального числа нейронов сеть обучалась, как это было описано в подразделе 1.3.2. Результирующая ошибка после обучения составляла порядка 2 %.

Временные затраты. Все вычисления проводились с помощью MATLAB[®] 6.1 (Neural Networks Toolbox) на ПК на базе процессора Intel Pentium III-850. Временные затраты представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Временные затраты при нейросетевой аппроксимации модели переноса энергии

Число параметров	3	4	5	6
Время создания обучающей выборки	11 ч	22 ч	56 ч	110 ч
Время обучения	6 мин	10 мин	14 мин	20 мин
Время единичного нейросетевого моделирования	6.0×10^{-4} с	7.0×10^{-4} с	8.0×10^{-4} с	10^{-3} с
Среднее время имитационного моделирования	40 с	40 с	40 с	40 с
Среднее ускорение при моделировании	6.7×10^4	5.7×10^4	5.0×10^4	4.0×10^4

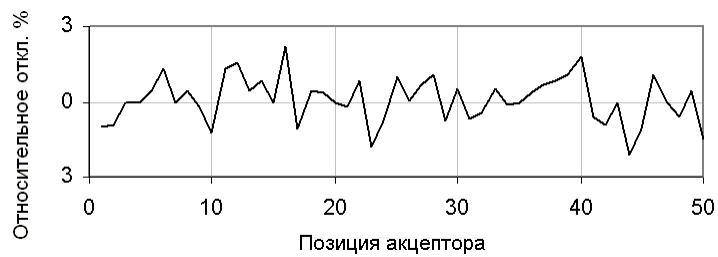
Из таблицы 6 видно, что процесс генерации обучающих пар является наиболее трудоемким. Следует, однако, отметить, что этот процесс выполняется автоматически (без привлечения исследователя) и лишь единожды для каждой модели. Ускорение, получаемое при замене имитационной модели на нейросетевую, составляет порядка 5×10^4 .

Типичный пример нейросетевого моделирования представлен на рисунке 28. Здесь показана зависимость эффективности переноса энергии от позиции акцептора. Причиной колебаний эффективности является спиральная структура протеина. Относительное отклонение ИНС аппроксимации от результатов имитационного моделирования не превышает 3 %. Это указывает на достаточную точность аппроксимации, поскольку статистический разброс результатов моделирования составляет порядка 1-2 %.

Состоятельность аппроксимации. Для доказательства состоятельности аппроксимации был проведен вычислительный эксперимент с 4-х параметрической моделью. При этом модифицировался один из параметров – коэффициент ассоциации протеинов. Затем анализировались отклонения нейросетевого предсказания (аппроксимации) от результатов моделирования. На рисунке 29 представлены: зависимость эффективности переноса энергии от коэффициента ассоциации для аппроксимации и моделирования, относительные отклонения, автокорреляционная функция отклонений и оценка их плотности распределения.



а)



б)

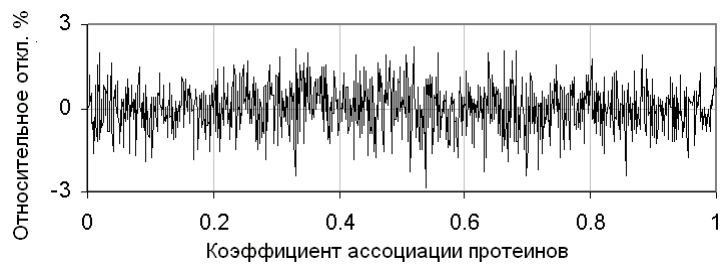
Рисунок 28 – ИНС аппроксимация результатов имитационного моделирования (а) и относительные отклонения при этом (б). На рисунке (а) кружками показаны значения полученные методом имитационного моделирования, линией – ИНС аппроксимации.

Поскольку автокорреляционная функция близка к δ -функции, можно сказать что поведение отклонений стохастично, и, следовательно, эти отклонения являются результатом погрешности имитационного моделирования. Распределение отклонений близко к гауссову с математическим ожиданием равным 0.

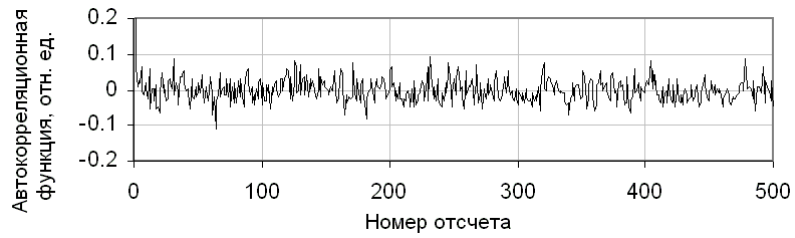
Следует отметить, что МСП с сигмоидальными активационными функциями дает гладкую аппроксимацию зашумленных результатов имитационного моделирования. Поэтому операция подгонки параметров оперирует с менее случайной функцией невязки $\|F - F^{**}\|$ содержащей меньшее число локальных "шумовых" минимумов.



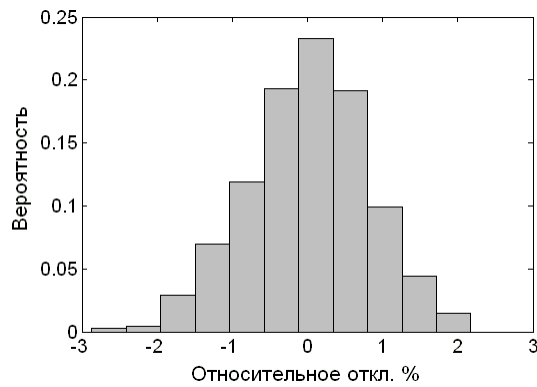
а)



б)



в)



г)

Рисунок 29—Состоятельность ИНС аппроксимации. На рисунке (а) толстой серой линией показан результат имитационного моделирования, тонкой черной — нейросетевое предсказание. Ниже показаны относительные отклонения (б) и их автокорреляционная функция (в). Оценка распределения отклонений представлена на (г).

4.3 Нейросетевой анализ ЭПР спектров

Для упрощения анализа ЭПР спектр и изучения перекрывающихся пиков многокомпонентного спектра было предложено аппроксимировать спектральную область множеством аналитических функций характеризующих физические линии. Для построения такой аппроксимации была использована ИНС на радиальных базисных функциях (РБФ). Перед началом аппроксимации экспериментальный ЭПР спектр приводился к интегральному виду, как показано на рисунке 30. Таким образом, присутствующие в нем компоненты могли быть аппроксимированы гауссовыми или фойхтовскими функциями.

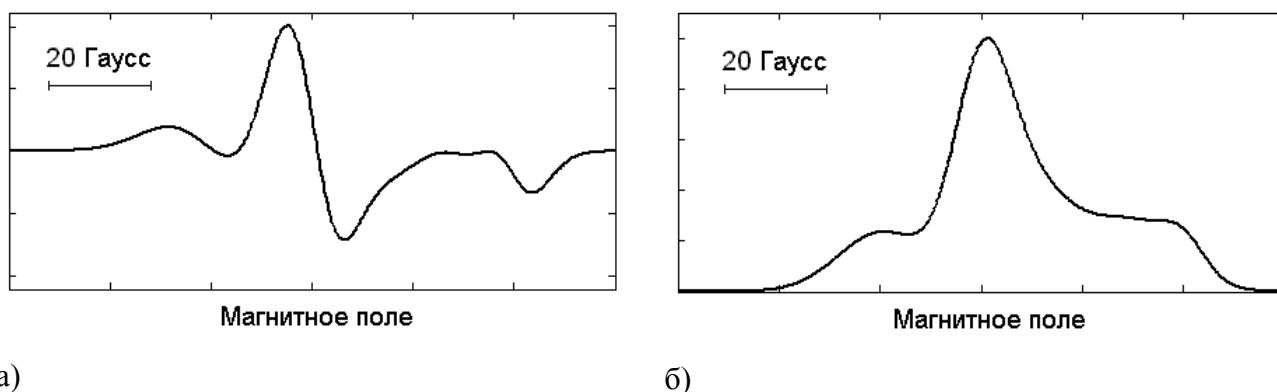
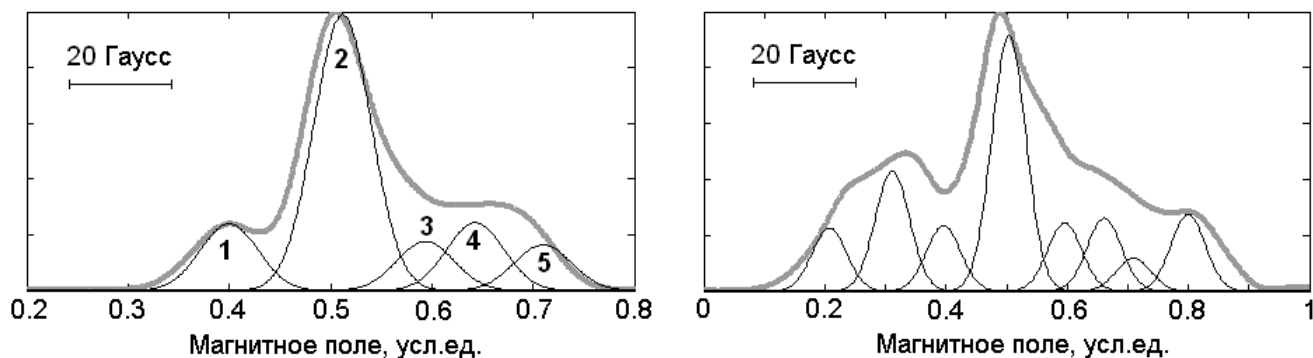


Рисунок 30 – Форма экспериментального ЭПР спектра (а) и его интегральная форма, характеризующая спектр поглощения (б)

Для того чтобы аппроксимация оставалась физически верной, в процесс обучения РБФ-сети были включены некоторые изменения. Так, в начале обучения сеть состояла из 1 РБФ нейрона. Затем, в процессе обучения нейроны в сеть добавлялись нейроны до тех пор, пока не появлялся нейрон, РБФ функция которого имела отрицательную амплитуду. В этом случае обучение прекращалось.

Был проведен ряд численных экспериментов, для того чтобы определить возможности РБФ аппроксимации. Результаты одного из них представлены на рис. 31а и в таблице 7. РБФ-сеть безошибочно определила число гауссианов в смоделированных данных. Их положение было определено с ошибкой в интервале 0 to 7%. Для уменьшения ошибки и точной подгонки пиков на втором этапе могут быть использованы стандартные методы многопараметрической оптимизации. В этом случае можно говорить о том, что РБФ-сеть выдает хорошее начальное приближение положений пиков в спектре и позволяет выбрать модель для дальнейшего уточнения аппроксимации.

Метод был также протестирован на экспериментальном спектре, представленном на рисунке рис. 31б. Спектр был получен из образцов микоплазмы клеток с метками 12NS, прикрепленными к альбумины полученному из сыворотки бычьей крови [539].



a)

б)

Толстая серая линия показывает исходный ЭПР спектр, тонкие черные кривые представляют предполагаемое положение и высоту пиков

Рисунок 31 – Нейросетевая аппроксимация смоделированного ЭПР спектра (а) и экспериментального спектра (б).

Таблица 7 – Предполагаемое положение пиков для смоделированных данных

Номер линии	1	2	3	4	5
Настоящее положение (отн. ед.)	0.40	0.50	0.55	0.65	0.70
Найденное положение	0.40	0.51	0.59	0.64	0.71
Относительная погрешность	0 %	2 %	7 %	2 %	1 %

4.4 Основные результаты и выводы

В результате исследований было показано, что обученная ИНС может быть использована для предварительного анализа кривых затухания флуоресценции. Метод напрямую работает с экспериментальными данными и, в отличие от классических алгоритмов оценки, не требует операции деконволюции. При анализе трёхэкспоненциальных кривых хорошие оценки параметров были получены для более чем 95% кривых. В то же время, в случае неоднозначности, при сопоставлении параметров данным, метод выбирает один из вариантов,

теряя информацию об остальных. Это заставляет использовать фитинг моделью для точного определения параметров системы.

Нейросетевая аппроксимация имитационной модели позволяет значительно ускорить процесс моделирования, хотя и требует значительного по времени накопления обучающей выборки. Результатом работы ИНС является гладкая функция, значительно снижающая стохастические девиации результата имитационного моделирования. Предложенный алгоритм анализа данных был применен на практике для идентификации процессов переноса энергии в системах мембранных протеинов. В результате было получено ускорение процесса на этапе анализа более чем в 10^4 раза.

РБФ сеть была успешно применена для построения физически оправданной аппроксимации многокомпонентного ЭПР спектра. Такая аппроксимация позволяет быстро оценивать положения и вклад пиков ЭПР спектра. Метод показал хорошие результаты при тестировании на смоделированных данных. В качестве РБФ может использоваться любая форма линии, характерная для ЭПР спектров: гауссова, лоренцова или фойтовская. Для уточнения положений и вкладов пиков было предложено использовать стандартные методы оптимизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показывают целесообразность использования нейросетевых моделей процессов на этапе идентификации параметров сложных биомолекулярных систем. Применение ИНС позволяет значительно ускорить анализ процессов, а также сделать его более устойчивым к экспериментальным шумам. В процессе работы были усовершенствованы методы моделирования фотофизических процессов, а также разработаны новые подходы к анализу кривых затухания флуоресценции. Был предложен алгоритм быстрого разделения многокомпонентных ЭПР спектров.

Построенные алгоритмы нейросетевого моделирования и анализа будут применяться для изучения процессов поглощения, переноса и релаксации энергии электронного возбуждения в молекулярных структурах на кафедре системного анализа БГУ. Также – для изучения мембранных протеинов методами флуоресцентной и ЭПР спектроскопии в лаборатории биофизики Вагенингенского университета, Нидерланды (Laboratory of Biophysics, Wageningen University, The Netherlands).

Главный результат проведенных исследований состоит в следующем:

- усовершенствован метод идентификации параметров процессов и систем с помощью нейросетевой аппроксимации, обеспечивающей значительное ускорение вычислений;
- разработан метод оценки параметров кривых затухания флуоресценции с помощью МСП;
- в ходе работы была показана применимость РБФ сетей для разделения многокомпонентных ЭПР спектров.

Полученные результаты докладывались на четырех научных конференциях и были включены в сборники трудов:

- 61-й научной конференции студентов и аспирантов БГУ, Минск;
- International conference on "Modeling and Simulation" (MS'2004), Minsk;
- Международной конференции “Лазерно-оптические технологии в биологии и медицине”, Минск;
- Международной конференции “Информационные системы и технологии” (IST'2004), Минск.

Кроме того, наиболее важные результаты проведенных исследований опубликованы в виде статьи в журнале [1].

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Nazarov, P. V. et al. Artificial neural network modification of simulation-based fitting: application to a protein-lipid system, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 2004, Vol. 44, P. 568-574
- 2 Yatskou, M. M. et al. Non-isotropic excitation energy transport in organized molecular systems: Monte Carlo simulation-based analysis of time-resolved fluorescence. *J. Phys. Chem. A*, 2001, Vol. 105, P. 9498–9508
- 3 Уоссермен Ф. Нейрокомпьютерная техника: Теория и практика / Пер. с англ. Ю. А. Зуева и В. А. Точенова. М.: Мир. 1992. 184 с.
- 4 Tetko I. V., Livingstone D. J., Luik A. I. Neural network studies. 1. Comparison of overfitting and overtraining. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1995, Vol. 35. P. 826–833
- 5 Теория нейронных сетей. Кн.1 Учебное пособие для вузов / Ред. А. И. Галушкин. М.: ИПРЖР. 2000. 416 с.
- 6 Лутковский В. М. Нейронные сети. Конспект лекций. Мн: БГУ. 2003.
- 7 Loura L. M. S., et al. Fluid-fluid membrane microheterogeneity: a fluorescence resonance energy transfer study. *Biophysical Journal*, 2001, Vol. 80, P. 776-788.
- 8 Andrews L., Demidov A., Eds. Resonance Energy Transfer. John Wiley & Sons Ltd Inc: New York. 1999.
- 9 Flecher R. Practical Methods of Optimisation. John Willey & Sons Inc., New York. 1987.
- 10 Van Schaik A. Building blocks for electronic spiking neural networks. *Neural Networks*, 2001, Vol. 14, P. 617–628.
- 11 Hangartner R. D., Cull P. Probabilistic computation by Neuromine Networks. *BioSystems*, 2000, Vol. 58, P. 167–176.
- 12 Лакович Д. Основы флуоресцентной спектроскопии. – М.: Мир, 1986. – 496 с.
- 13 Физический энциклопедический словарь / Гл. ред. А.М. Прохоров – М.: Сов. энциклопедия, 1983. – 928с.
- 14 M.M. Yatskou. Computer Simulation of Energy Relaxation and Transport in Organized Porphyrin Systems, Ponsen & Looijen Printing Establishment, Wageningen, the Netherlands, 2001
- 15 David F. Eaton. *Pure & Appl. Chem.* 1990, Vol. 62, No. 8, P. 1631-1648
- 16 В.М. Агранович, М.Д. Галанин Перенос энергии электронного возбужденного состояния в конденсированных средах. – М.: Наука, 1978. – 485 с.
- 17 Förster, T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 1948, 2, P. 55–75.
- 18 M. Yatskou, A. Kavalenka, V.V. Apanasovich, G. Calzaferrri. Principles of Monte Carlo simulations in physical chemistry: luminescence of organized dye molecules. *Modelling and Simulation: Proc. of Int. Conf. Minsk*, 2004, P. 368-372
- 19 Byrne, B.; Iwata, S. Membrane protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002, 12, P. 239–243.
- 20 Arora A., Tamm L.K. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2001, Vol. 11, P. 540
- 21 Torres, J.; Stevens, T. J.; Samso, M. Membrane proteins: the 'Wild West' of structural biology. *Trends Biochem. Sci.* 2003, Vol. 28, P. 137–144
- 22 dos Remedios C.G., Moens P.D.J. *J. Struct. Biol.* 1995, Vol. 115, P. 175
- 23 Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999
- 24 Stryer, L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu. Rev. Biochem.* 1978, Vol. 47, P. 819–846
- 25 Fleming, P.J.; Koppel, D.E.; Lau, A.L.Y.; Strittmatter, P. Intramembrane position of the fluorescent tryptophanyl residue in membrane-bound cytochrome b5. *Biochemistry*, 1979, 24, P. 5458–5464.
- 26 Filipič, B. and Štrancar, J., Tuning EPR spectral parameters with a genetic algorithm, *Appl. Soft Comp.* 2001, 1, 83-90.

- 27 Beutler JA, McKee TC, Novel marine and microbial natural product inhibitors of vacuolar ATPase. *Current Medicinal Chemistry*, 2003, Vol. 10 (9), 787-796.
- 28 Marsh, D. Membrane spectroscopy. Electron spin resonance: spin labels. *J. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, 1981, Vol. 31, P. 51-142.
- 29 Nordio. T. Theory of ESR. *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 1. Berliner, Lawrence J.; Reuben, Jacques; Editors. USA, 1978, P. 27-176.
- 30 Hemminga, M.A., Syllabus Course Magnetic Resonance, 2002, P. 55-81.
- 31 Jiang J.J. et. al ELEXIS E 500 User's Manual. Basic operations. 2000, P. 25-48.
- 32 Knowles P.F.; Marsh D. Magnetic resonance of biomolecules, 1976, P. 28-80.
- 33 Hemminga, M.A., Interpretation of ESR and saturation transfer ESR spectra of spin labeled lipids and membranes, *Chem. Phys. Lipids* 1983, Vol. 32, P. 323-383.
- 34 Bales, B.L. ; Peric M. EPR line shifts and line shape changes due to spin exchange of nitroxide free radicals in liquids. *J.Phys. Chem.* 1997, Vol. 101, P. 8707-8716.
- 35 Bales, B.L. Inhomogeneous broadened spin labels spectra. *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 8: Spin Labeling: Theory and Applications. Berliner, Lawrence J.; Reuben, Jacques; Editors. USA, 1989, Vol. 5, P. 178
- 36 Sankaram M.B., Marsh D. Analysis of spin label line shapes with novel inhomogeneous broadening from different component widths. Application to spatially disconnected domains in membranes. *Biological Magnetic Resonance*, Vol. 14, Spin labeling: the next millennium, edited by Berliner, 1998, Vol.3, P. 27
- 37 Meijer A. B., Spruijt R. B, Wolfs C. J. A. M, Hemminga M. A. Membrane-anchoring interactions of M13 major coat protein. *Biochemistry* 2001. Vol. 40. P. 8815–8820.
- 38 Spruijt R. B., Meijer A. B., Wolfs C. J. A. M., Hemminga M. A. Localization and rearrangement modulation of the N-terminal arm of the membrane-bound major coat protein of bacteriophage M13. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1509. P. 311–323.
- 39 M. E. Tourtellotte, D. Branton, and A. Keith. "Membrane structure: spin labeling and freeze-etching of *Mycoplasma laidlawii*" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 66, 1970, P. 909-916.