Министерство образования Республики Беларусь

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (БГУ)

УДК 519.245:577.345 № госрегистрации 20061008

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе, начальник НИЧ

_____ В.В. Понарядов

«___»____2006 г.

ОТЧЕТ О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ГЛОБАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ В СЛОЖНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ

(заключительный)

№ темы 630/18

Декан факультета радиофизики и электроники, д-р техн. наук, профессор	С.Г. Мулярчик
Зав. кафедрой системного анализа, д-р физмат. наук, профессор	В.В. Апанасович
Куратор, ст. преп.	В.М. Лутковский
Научный руководитель, аспирант	О.А. Коваленко

Минск 2006

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель работы,	О.А. Коваленко
аспирант	(введение, заключение, разд. 1,2)
Ответственный исполнитель,	А.А. Головатый
студент 5 курса	(реферат, разд. 1,2)
Acturbut	П.В. Назаров
Аспирант	(разд. 1,2)
A anupoutro	М.В. Репич
Аспирантка	(разд. 1,2)
	В.В. Савицкий
Студент 4 курса	(разд. 1)
	В.В. Баранов
Студент 5 курса	(разд. 2)
Нормоконтролер	Т.Н. Долгая

РЕФЕРАТ

Отчет о научно исследовательской работе: 47 страниц, 29 рисунка, 33 источника.

АНАЛИЗ ДАННЫХ, СЛОЖНЫЕ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ СИСТЕМЫ, ОПТИМИЗАЦИЯ, ЭВОЛЮЦИОННАЯ АЛГОРИТМЫ ОПТИМИЗАЦИИ, ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ, ИМИТАЦИОННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ, ТОНКИЕ ПЛЕНКИ ПОРФИРИНОВ, МЕМБРАННЫЕ БЕЛКИ

Объектом теоретического исследования являются методы анализа многомерных экспериментальных данных, процессы переноса энергии в биомолекулярных системах, а также структурные и динамические характеристики мембранных белков.

Целью проекта является разработка методов глобального анализа экспериментальных данных, получаемых при исследовании сложных молекулярных систем.

Для исследования возможностей глобального анализа многомерных данных используются экспериментальные данные флуоресцентной и ЭПР спектроскопии в биомолекурных системах пленок порфиринов и мембранного белка М13.

В результате исследования рассмотрены возможные подходы для анализа многомерных экспериментальных данных. Предложена универсальная схема анализа данных. Разработаны имитационные модели переноса энергии по индуктивно-резонансному и обменно-резонансному механизмам в донорно-акцепторных системах. Разработан и тестирован эволюционный алгоритм оптимизации для поиска оценок параметров моделей биомолекулярных систем. Разработанные модели и алгоритмы глобального анализа применены для исследования структурных и динамических характеристик мембранных протеинов, построения их трехмерных молекулярных моделей, а также для изучения фотофизических свойств систем тонких пленок порфиринов.

Разработанные методы глобального анализа данных могут быть использованы в исследованиях различных сложных систем, для которых доступны многомерные наборы экспериментальных данных. Кроме того, полученные результаты анализа данных для мембранного белка М13 имеют важное теоретическое значение для описания структуры мембранных белков и выявления их функций.

СОДЕРЖАНИЕ

ОБОЗНА	АЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
введен	НИЕ	6
1 CXI	ЕМА АНАЛИЗА ПРОЦЕССОВ В СЛОЖНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ	
1.1	Общая схема анализа экспериментальных данных	
1.2	Глобальный анализ	
1.2.1	l Схема второго уровня глобального анализа. Анализ многомерных данных с использ	ованием
мето	ода имитационного моделирования	11
1.3	Оптимизация	
1.3.1	I Метод поисковой оптимизации	
1.3.2	2 Методы эволюционной оптимизации	14
1.3.3	3 Гибридные методы оптимизации	14
1.4	Сложные молекулярные системы	16
1.4.1	I Биологическая мембрана	16
1.4.2	2 Мембранные белки	17
1.4.3	3 Тонкие пленки порфиринов	17
1.5	Экспериментальные методы исследования	
1.5.1	Флуоресцентная спектроскопия	19
1.5.2	2 ЭПР спектроскопия биологических мембран	24
1.5.3	В Направленное мечение и ЭПР спектроскопия мембранных протеинов	
1.5.4	4 Комплексность ЭПР спектра	
1.5.5	5 Моделирование ЭПР спектров	
1.5.6	5 Анализ и интерпретация данных ЭПР спектроскопии	
1.5.7	7 Принцип проекции и GHOST презентация решений	
2 ГЛС	ОБАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ	
2.1	Исследование систем пленок порфиринов	
2.2	Исследование структуры мембранного протеина М13	
2.2.1	Обсуждение результатов анализа ЭПР спектров для системы протеина М13	
2.3	Выводы	
ЗАКЛЮ	ЧЕНИЕ	
СПИСО	К ИСПОЛЬЗОВАНЫХ ИСТОЧНИКОВ	

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ГА	глобальный анализ
ЭА	эволюционный алгоритм
ЭС	эволюционные стратегии
ЭП	эволюционное программирование
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
ВАП	время-амплитудный преобразователь
АЦП	амлитудно-цифровой преобразователь
SDSL	Site-directed spin labeling
ГЭО	гибридная эволюционная оптимизация
МСР	major coat protein

введение

Задача описания и определения характеристик различных экспериментальных систем 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 зачастую приходится прибегать к упрощенной трактовке эмпирической информации и фокусировке на отдельных интегральных значениях [1]. 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.

Наиболее интересными объектами изучения для современной науки являются наноструктуры и сложные молекулярные комплексы. Пример таких систем – это мембранные протеины, которые участвуют практически во всех клеточных реакциях и являются наиболее распространенными биологическими «наномашинами». Другой пример сложных молекулярных систем: самоорганизующиеся тонкие пленки порфиринов [2,3,4] и фотонные антенны на кристаллах цеолитов с внедренными флуорофорами [5,6], которые исследуются с целью создания высокоэффективных преобразователей солнечной энергии.

Для изучения упомянутых систем используются высокочувствительные экспериментальные методы флуоресцентной спектроскопии [7] и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В получаемых экспериментальных данных содержится информация о структурных, динамических и фотофизических свойствах исследуемых молекулярных объектов.

Несмотря на широкое распространение методов спектроскопии, актуальной остается проблема интерпретации экспериментальных данных и определения характеристик молекулярных систем, ввиду сложности реальных биологических и молекулярных объектов. При этом можно выделить две проблемы. Во-первых, в связи с высокой сложностью систем и нелинейным характером зависимостей, присущим реальным системам, построение аналитических моделей, связывающих физические параметры с экспериментальными данными, зачастую не представляется возможным. Вовторых, при определении параметров возникает проблема устойчивости и единственности найденного набора параметров.

Первая проблема может быть решена за счет использования методов имитационного (статистического моделирования), который позволяют изучать весьма сложные системы [8]. Вторая – за счет разработки оптимальных методов анализа данных, включая глобальный анализ всех доступных экспериментальных данных. Такой подход, особенно в случае одновременного анализа

данных, полученных различными методами, позволяет решить проблему устойчивости и единственности решения, наиболее полно и точно характеризовать исследуемые системы.

Для реализации данной цели в рамках работы решены следующие задачи:

1. Используя разработанные ранее имитационные модели Целью проекта является разработка методов глобального анализа экспериментальных данных, получаемых при исследовании сложных молекулярных систем.

, построена схема анализа процессов переноса и релаксации энергии в молекулярных системах, ориентированная на одновременный анализ флуоресцентных спектров возбуждения и эмиссии.

2. Рассмотрены методы глобального анализа данных флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии ЭПР для определения структурных и динамических характеристик мембранных протеинов.

3. Разработан и протестирован эволюционный алгоритм оптимизации для поиска оценок параметров моделей биомолекуляных систем при использовании глобального анализа экспериментальных данных.

4. Разработанные модели и алгоритмы глобального анализа применены для исследования структурных и динамических характеристик мембранных протеинов с целью построения трехмерных молекулярных моделей мембранных протеинов, а также для определения фотофизических свойств систем самоорганизующихся пленок порфиринов с целью проектирования эффективных преобразователей солнечного излучения.

В первом разделе работы рассмотрены схемы анализа процессов в сложных молекулярных системах, рассмотрены экспериментальные методы исследования, рассмотрены разработанные модели переноса энергии электронного возбуждения в молекулярных системах, описаны алгоритмы оптимизации.

Во втором разделе работы представлены результаты глобального анализа экспериментальных данных для системы самоорганизующихся пленок порфиринов, а также результаты исследования структуры мембранных протеинов.

1 СХЕМА АНАЛИЗА ПРОЦЕССОВ В СЛОЖНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМАХ

1.1 Общая схема анализа экспериментальных данных

Целью моделирования является замена реального объекта проектирования некоторой системой, сохраняющей основные свойства исследуемого объекта. Как правило, исследование более простой системы (модели) дает возможность получить приближенные оценки параметров реальной системы. В случае, когда это возможно, определение характеристик системы осуществляется путем проведения экспериментальных измерений. Однако, если система очень сложна, интерпретация экспериментальных значительно усложняется. Для исследования таких систем используются методы математического моделирования [8,9].

Методы математического моделирования подразделяются на два класса:

<u>Аналитические методы.</u> Использование математического аппарата позволяет выделить наиболее общие закономерности функционирования системы, получить характеристики целых классов систем. Для детального исследования конкретных сложных систем аналитические методы становятся неприменимы из-за чувствительности к степени сложности. Оценки, получаемые с помощью аналитических методов, часто являются слишком грубыми.

Имитационные методы. В процессе имитационного моделирования разрабатывается моделирующий алгоритм, имитирующий поведение системы с учетом внешних воздействий и взаимодействия отдельных элементов системы, с последующей реализацией этого алгоритма на моделирующих устройствах или универсальных специальных ЭBМ. Оценка параметров проектируемой системы сводится к проведению статистических экспериментов с моделью, включающих накопление И обработку статистических данных, отражающих процесс функционирования системы. В результате таких экспериментов выбираются оптимальные, в параметры функционирования системы. Такой подход не некотором смысле, является универсальным, однако дает возможность исследовать реальные системы практически любой сложности.

Разработка модели проводится в три этапа [9]:

- 1) создается содержательное описание системы;
- 2) создается формализованная схема;
- 3) разрабатывается математическая модель.

Содержательное описание включает формулировку цели моделирования, перечень параметров системы, численные значения известных параметров, допустимые области их изменения.

Включаются сведения об организации системы, физической природе взаимодействия подсистем, их связях и взаимодействии с окружающей средой.

В формализованной схеме элементарные подсистемы рассматриваются в виде абстрактных математических структур, для которых задается формализованное описание. Функционирование задается с учетом тех факторов, которые принимаются во внимание при формализации.

Математическая модель представляет собой совокупность соотношений, связывающих характеристики состояния системы и выходные сигналы с параметрами системы, входными сигналами, характеристиками состояний в предыдущие моменты времени. Для реализации цифровой модели сложной системы необходимо преобразовать математическую модель в соответствующий моделирующий алгоритм.

Имитационные модели используются для анализа экспериментальных данных и оценки параметров исследуемой системы. Процесс анализа данных представляется в виде следующей схемы (рисунок 1). Начальные параметры системы формируются, используя известную изначально информацию, и должны быть максимально приближены к параметрам реальной системы. Для одной и той же системы может быть построено несколько моделей, отличающихся друг от друга выбором значимых факторов, степенью детализации соответствующим модели процессам. Экспериментальные данные для исследования системы могут быть получены с помощью различных экспериментальных методов.

Блок анализа данных включает оценку соответствия смоделированных и экспериментальных данных, а также метод оптимизации, с помощью которого уточняются оценки параметров модели либо структурные особенности моделей. Различные методы анализа отличаются друг от друга скоростью, точностью определения характеристик системы, устойчивостью по отношению к исходным параметрам. Выход из оптимизационной процедуры может осуществляться как при достижении статистической характеристикой некоторого значения, близкого к оптимальному, так и при уменьшении значений приращения параметров системы ниже некоторого порогового значения. В общем случае, есть возможность выбора, как статистического критерия, так и оптимизирующего алгоритма, которые лучше подходят для решения конкретной задачи.

Есть возможность проводить одновременный анализ нескольких наборов данных, в этом случае необходимо построение общей интегральной статистической характеристики.



Рисунок 1 – Обобщенная схема анализа экспериментальных данных с использованием имитационной модели.

1.2 Глобальный анализ

Глобальный анализ – методология, заслужившая широкую популярность при анализе многомерных экспериментальных данных [10]. Особое преимущество этот подход дает в том случае, когда для анализа доступно несколько наборов однотипных или разнотипных данных. Можно определить несколько уровней глобальности анализа многомерных экспериментальных данных:

1. Простейший уровень глобального анализа заключается в совместном анализе нескольких наборов однотипных данных. Преимущество совместного анализа перед анализом данных по отдельности проявляется в том случае, когда имеются общие для нескольких наборов данных параметры (глобальные или фиксированные параметры).

2. Второй уровень связан с совместным анализом разнотипных данных и чаще всего встречается в комбинации с методом имитационного моделирования. При имитационном моделировании моделируются как сами процессы (физические, фотофизические, физико-химические) в изучаемой системе, так и соответствующие этим процессам характеристики, получаемые экспериментально. Преимущество глобального анализа разнотипных экспериментальных данных заметно в том случае, когда данные моделируются и анализируются с помощью единой имитационной модели. Примером может служить глобальный анализ спектров испускания и кривых затухания биомолекулярных систем (тонкие пленки порфиринов, фотонные антенны на кристаллах цеолитов), в которых наблюдается испускание флуоресценции и резонансный перенос энергии между отдельными элементами систем.

3. Третий уровень заключается в глобальном анализе экспериментальных данных разных методов. Например, при изучении структуры мембранных протеинов есть возможность совместно использовать данные флуоресцентной и ЭПР спектроскопий. Для того чтобы такой анализ был эффективен, необходимо, чтобы разные измерения разными методами проводились в одинаковых условиях (по возможности одинаковый состав системы, концентрации, температура и др.). Другим необходимым условием применения глобального анализа этого уровня является наличие связи параметрами, получаемыми разными методами.

В литературе также встречается такой термин глобального анализа экспериментальных данных, при котором благодаря исчерпывающему анализу доступных данных достигается разносторонне описание исследуемой системы.

1.2.1 Анализ многомерных данных с использованием метода имитационного моделирования

Анализ многомерных наборов экспериментальных данных с использованием имитационной модели заключается в аппроксимации рассматриваемых данных теоретической функцией, получаемой с использованием единой имитационной модели (рисунок 2). В этом случае имитационная модель представляет собой запрограммированный алгоритм функционирования физической системы, характеризующийся ограниченным набором параметров. Задача аппроксимации

многомерных данных заключается в оценке неизвестных параметров имитационной модели. Схема предложенного подхода приведена на рисунке 2.



Рисунок 2 – Схема анализа N-наборов экспериментальных данных с помощью имитационного моделирования и оптимизации параметров модели.

Используя доступную информацию о системе и ее характеристиках, выбираются исходные значения параметров модели. Имитационной моделью генерируются теоретические данные, которые сравниваются с соответствующими экспериментальными данными. Результаты сравнения отдельных наборов данных формируют общий критерий, который направляет процедуру оптимизации на поиск оптимальных значений параметров имитационной модели.

1.3 Оптимизация

При решении задач оптимизации необходимо определить следующие ее составные части:

- 1. Целевую функцию (objective function), которую необходимо оптимизировать;
- 2. Ключевые параметры, определяющие целевую функцию;
- 3. Условия, которые накладываются на эти параметры.

Совокупность всевозможных комбинаций значений параметров целевой функции определяют т.н. параметрическое пространство или пространство поиска, в котором идет процесс оптимизации. Форма поверхности целевой функции определяет сложность поиска оптимальных решений в параметрическом пространстве. В простейшем случае целевая функция имеет один ярко выраженный минимумов. В большинстве же возникающих задач оптимизации, помимо одного глобального минимума, существует множество локальных минимумов. Область, в которой находится локальный минимум, может иметь разную сложность для поиска (рисунок 3).



Рисунок 3 – Области поиска оптимума в задаче оптимизации.

Прикладные задачи оптимизации чаще всего являются многомерными. Размерность определяется числом параметров, от которых зависит значение целевой функции. Задачи, в которых на параметры накладываются некоторые условия, называются задачами условной оптимизации, в противном случае – безусловной. Если целевая функция и имеющиеся ограничения линейны, то говорят о линейной задаче оптимизации.

Алгоритмы оптимизации в общем можно разделить на несколько классов:

- Методы нулевого порядка (поисковые методы)
- Градиентные методы
- Стохастические методы

Градиентные методы во время поиска оптимальных решений использует вычисления производных целевой функции. Примером этих методов служат метод наискорейшего спуска, метод сопряженных градиентов, метод Гаусса-Ньютона, метод Левенберга-Маркварда и др. Эти методы являются весьма быстрыми и эффективными для решения многих задач оптимизации. Не считая необходимость расчета производных целевой функции, основной недостаток этих методов – это чувствительность к ошибкам, возникающим в процессе счета. Поэтому когда целевая функция зашумлена, эффективность градиентных методов сильно падает.

1.3.1 Метод поисковой оптимизации

В этих методах для определения направления поиска не требуется вычислять производные целевой функции. Направление минимизации в данном случае полностью определяется последовательными вычислениями значений функции. Наиболее известные методы этой группы:

1. Методы прямого поиска (метод Хука-Дживса, метод Розенброка, метод Пауэлла и др.);

2. Многоточечные методы (метод Нелдера-Мида, метод Бокса);

3. Стохастические методы.

Прямой поиск заключаются в поочередном изменении переменных, пока не будет достигнут минимум. Минимизация целевой функций п-переменных методом *локальной вариации* заключается в

следующем: выбирается базисная точка, затем последовательно по очереди изменяется каждая из координат на некоторый шаг h (сначала + h, а потом – h) и исследуется значение целевой функции. Если в результате шага целевая функция уменьшилась, то данное изменение координаты принимается и полученная точка становится базисной, далее идет изменение следующей координаты. *Метод Хука-Дживса* использует априорные сведения, отбрасывая устаревшую информацию относительно характера топологии целевой функции. Этот алгоритм включает два основных этапа: «исследующий поиск» вокруг базисной точки (аналогичен методу локальной вариации) и «поиск по образцу», т.е. в направлении, выбранном для минимизации. Суть *метода вращающихся координаты* (метод Розенброка) состоит во вращении системы координат в соответствии с изменением скорости убывания целевой функции. *Метод Нелдера-Мида* состоит в том, что для минимизации функции п переменных f(x) в п-мерном пространстве строится многогранник, содержащий (n +1) вершину. Далее происходит движение многогранника к минимуму и его трансформация для адаптации к форме целевой функции [11].В стохастических методах используется генератор случайных чисел для определения параметров, соответствующих пробным точкам.

1.3.2 Методы эволюционной оптимизации

В основе эволюционных методов оптимизации лежат идеи эволюции и генетики, принципы наследования и естественного отбора в природе. Исторически исследование методов оптимизации, имитирующих жизнь в природе, началось с изучения эволюционных алгоритмов (ЭА). К ЭА относятся генетические алгоритмы (ГА), эволюционное программирование (ЭП) и эволюционные стратегии (ЭС). Развитие первых ГА началась с выхода книги Холланда [12] и диссертационной работы Де Джонга [13]. Стандартная структура классического ГА была описана в книге по генетическим алгоритмам Голдбергом [14].

Преимущество использования ЭА для оптимизации очевидно в сложных многомерных, многоэкстремальных задачах, особенно когда целевая функция не может быть представлена аналитически, зашумлена или не является непрерывной. Эффективность ЭА вытекает из присущих эволюционным алгоритмам адаптационных свойств. Поиск решений осуществляется сразу во многих участках параметрического пространства.

1.3.3 Гибридные методы оптимизации

Прикладные задачи оптимизации, как правило, являются многомерными, нелинейными, многоэкстремальными. В данном случае для эффективного поиска оптимальных параметров имеет смысл разработка, таких методов, которые бы сочетали преимущества разных классов алгоритмов

оптимизации. Например, в решении сложных прикладных задач оптимизации часто стоит проблема установления баланса между глобальным поиском в пространстве параметров (exploration) и нахождением точных значения локальных экстремумов (exploitation) [15].

В данной работе для глобального анализа кривых затухания флуоресценции использовался метод нулевого порядка Нелдера-Мида. Для анализа ЭПР спектров методом имитационного моделирования использовался гибридный эволюционный алгоритм оптимизации. Схема последнего алгоритма представлена на рисунке 4.



Рисунок 4 - Схема эволюционного алгоритма оптимизации.

1.4 Сложные молекулярные системы

Комплексность биологических систем является одним из самых сложных препятствий в применении экспериментальных методов исследования. Сложный биохимический состав и всевозможные биофизические взаимодействия, управляющие эволюцией состояний биологической системы, приводят к тому, что измеряемый экспериментально сигнал от системы представляет собой суперпозицию нескольких независимых сигналов [16, 17].

Тем не менее, комплексность – это одно из базовых свойств естественных биологических систем. Качественно комплексность описывает число (биологических или биофизических) состояний или решений, которые существуют для данной системы. В чистых идеализированных системах достаточно одного решения для описания системы, в то время как для полного описания сложных системах могут быть использованы целые наборы равнозначных решений, образующих вместе определенные распределения в пространстве параметров системы [18, 19].

1.4.1 Биологическая мембрана

Все живые клетки защищены от окружающей среды оболочкой, называемой мембраной.



Рисунок 5 - Система биологической мембраны.

Комплексность мембранных систем вытекает из того, что биологические мембраны включают в свой состав до нескольких сотен различных типов липидов, равно как множество протеинов (каналы, бионасосы, энзимы и рецепторы). Также в таких системах присутствует весьма широкий спектр всевозможных взаимодействий – от локальных стерических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий до дистанционных Кулоновских и дипольных взаимодействий. Интенсивность и направленность этих взаимодействий сильно зависит от типа взаимодействующих молекул, их структуры, а также от энергетических состояний соседствующих молекул. Все перечисленные характеристики определяют сложность биологических мембран и объясняют корни комплексности получаемых решений при экспериментальном исследовании и анализе этих систем [18].

1.4.2 Мембранные белки

Биологическая мембрана состоит не только из липидов, но и различных типов белков и пептидов, которые контролируют жизнедеятельность клетки. Некоторые белки выполняют транспортную функцию, доставляя необходимые для жизни клетки вещества или выводя ненужные отходы. Другие белки обеспечивают ионный баланс клетки и продуцируют клеточную энергию. Имеется также класс белков, которые выступает в качестве рецепторов или триггеров для биологически активных молекул, таких как, например гормоны.



Рисунок 6 – Мембранные белки: а) Белок из семьи сахарных поринов;

б) белок из семьи родопсин-подобных протеинов.

Мембранные белки плохо изучены, как с точки зрения их структуры, так и их функций. Основным препятствием для применения привычных дифракционных методов высокого разрешения является трудность в подготовке кристаллов образца.

1.4.3 Тонкие пленки порфиринов

Модельные фотосинтетические системы на основе пленок самоорганизующихся порфириновых комплексов обладают особенными оптоэлектронными свойствами и являются предметом интенсивных исследований в рамках актуальной проблемы искусственной трансформации и последующей утилизации солнечной энергии [2,3,4].

Молекула порфирина представляет собой симметричную плоскую структуру, схематично изображенную на рисунке 7. При этом атомы цинка Zn в некоторых молекулах могут быть замещены атомами меди Cu или водородом H₂. В системе с миграцией энергии такие молекулы будут выступать в качестве ловушек энергии, т. е. при возбуждении такой молекулы дальнейшая миграция в системе не происходит, а молекула переходит в основное состояние либо в результате флуоресценции, либо в результате безызлучательной аннигиляции (в общем случае есть некоторая малая вероятность переноса возбуждения с ловушки на основные молекулы).



Рисунок 7 – Структура молекул порфиринов.

Экспериментальные образцы пленок Zn-порфиринов получают на кварцевой подложке путем центрифугирования из различных растворов. Полученные пленки имеют толщину 5-25 нм и содержат несколько десятков молекулярных слоев. Установлено, что для каждого отдельно взятого слоя характерна доменная структура (рисунок 8). Каждый домен состоит из параллельно расположенных стеков. Внутри стека молекулы расположены параллельно друг ругу на фиксированном расстоянии.

В такой структуре все возможности переноса энергии можно подразделить на несколько групп. Самым быстрым является перенос энергии внутри стека с константой времени порядка 10⁻¹² с. Переносу энергии между молекулами соседних стеков соответствует константа скорости 10⁻¹⁰-10⁻⁹ с. Не исключается также возможность переноса энергии между доменами одного слоя и между различными слоями.

Следует отметить, что наряду с доменной структурой возможны и другие варианты организации молекул в комплексы, которые будут отличаться своими фотофизическими свойствами.



Рисунок 8 – Доменная организация молекул в пленках порфиринов.

Экспериментальные данные – кривые затухания флуоресценции пленок измеряются методом одноквантовой регистрации. Для возбуждения и регистрации кинетики затухания флуоресценции выбраны длины волн 440 и 665 нм. Число каналов регистрации 4096.

1.5 Экспериментальные методы исследования

1.5.1 Флуоресцентная спектроскопия

Данный раздел посвящен рассмотрению базовых положений флуоресцентной спектроскопии. Дана характеристика явления флуоресценции, большое внимание уделено процессам переноса энергии. Представлены наиболее часто используемее экспериментальные методы.

1.5.1.1 Флуоресценция

Рассмотрим процессы, которые могут иметь место в молекулярной системе. На рисунке 9 представлена диаграмма Яблонского, отражающая энергетические уровни двух молекул и возможные переходы между уровнями в такой системе[7].



Рисунок 9 – Диаграмма Яблонского для донорно-акцепторной молекулярной системы. Охарактеризуем каждый из представленных процессов:

1. Возбуждение молекулы из основного состояния S_0 до одного из возбужденных состояний $S_1...S_n$. Происходит в результате поглощения фотона, так как различие энергий уровней S_0 и S_1 слишком велико, чтобы уровень S_1 мог быть заселен термическим путем. Поглощение фотона происходит за предельно короткое время (~10⁻¹⁵с), поэтому данный процесс считается практически мгновенным.

2. Внутренняя конверсия – быстрая релаксация на самый нижний колебательный подуровень состояния S_1 . Характерное время ~ 10^{-12} секунды, что на несколько порядков меньше характерного времени флуоресценции, вследствие чего длительностью процесса также пренебрегают.

3. Флуоресценция – переход из термически равновесного возбужденного состояния на нижний электронный уровень в колебательно возбужденное состояние с испусканием фотона.

4. Безизлучательная дезактивация – возвращение в состояние S₀ без испускания фотона.

5. Интеркомбинационная конверсия – переход из состояний S₁ в первое триплетное состояние T₁.

6. Фосфоресценция – переход из состояния T₁ в основное состояние. Спектр фосфоресценции смещен по сравнению со спектром флуоресценции в сторону больших длин (меньших частот). Поскольку переход является запрещенным, константа скорости такого испускания на несколько порядков меньше соответствующей константы для флуоресценции. 7. Перенос энергии электронного возбуждения с одной молекулы (донор) на другую молекулу (акцептор). Такие переходы могут происходить по различным механизмам, которые будут рассмотрены в следующем пункте. Молекула, которая в одном акте переноса выступала в качестве акцептора, может в следующем акте переноса выступать в качестве донора. Процесс флуоресценции характеризуется константой скорости:

$$k_{\phi,nyop} = \frac{1}{\tau_{\phi,nyop}},\tag{1}$$

где $\tau_{\phi nyop}$ – среднее время флуоресценции невозбужденной молекулы. Процесс переноса энергии характеризуется константой скорости k_n . В случае, когда в системе возможны несколько процессов переноса энергии, их вероятности будут пропорциональны соответствующим константам скоростей.

В случае учета процесса безизлучательной дезактивации (константа скорости $k_{\vec{0}\vec{0}}$) среднее время жизни возбужденного состояния будет определяться формулой (2):

$$\tau = \frac{1}{k_{\phi \pi y o \rho} + k_{\delta \partial}} \tag{2}$$

1.5.1.2 Перенос энергии электронного возбуждения

Перенос энергии электронного возбуждения от невозбужденной молекулы (донор) на другую химически отличную молекулу (акцептор), происходящий в соответствии со схемой $D^* + A \rightarrow D + A^*$ называется гетерогенным переносом энергии. Если донор и акцептор являются идентичными молекулами, то такой перенос называется гомогенным: $D^* + D \rightarrow D + D^*$. В случае повторения этого процесса, когда возбуждение мигрирует по нескольким молекулам, говорят о миграции энергии. Процесс переноса возможен при условии частичного перекрытия эмиссионного спектра донора и абсорбционного спектра акцептора так, что некоторые колебательные переходы в доноре имеют практически такую же энергию как соответствующие переходы в акцепторе.

Перенос энергии может быть результатом различным механизмов взаимодействия молекул. Так, взаимодействие может быть кулоновским и происходящим из-за межмолекулярного орбитального перекрытия. Кулоновское взаимодействие включает в себя дальнодействующее дипольдипольное взаимодействие (механизм Ферстера [20]) и близкодействующее мультипольное взаимодействие. Взаимодействие, обусловленное перекрытием орбитальных спектров, включает электронный обмен (механизм Декстера [21]) и резонансное взаимодействие зарядов, являющиеся близкодействующими (рисунок 10). Следует отметить, что для синглет-синглетного переноса энергии $({}^{1}D^{*} + {}^{1}A \rightarrow {}^{1}D + {}^{1}A^{*})$ возможны оба типа взаимодействия, тогда как триплет-триплетный перенос энергии $({}^{3}D^{*} + {}^{1}A \rightarrow {}^{1}D + {}^{3}A^{*})$ присутствует только при орбитальном перекрытии[22].





Общая энергия взаимодействия может быть представлена как сумма двух членов: U_{κ} и $U_{o\delta}$. Кулоновское слагаемое соответствует процессу переноса энергии, в котором электрон из верхнего энергетического уровня донора переходит на основной энергетический уровень, возвращая тем самым молекулу донора в основное состояние, одновременно электрон в акцепторе переходит на верхний энергетический уровень, переводя тем самым молекулу акцептора в возбужденное состояние (рисунок 11а). Обменное слагаемое, которое имеет квантово механическую природу, соответствует процессу переноса энергии в котором происходит обмен двумя электронами между донором и акцептором (рисунок 11б).



Рисунок 11 – Схематическое представление кулоновского (а) и обменного (б) механизмов переноса энергии.

1.5.1.3 Флуоресцентные методы экспериментального исследования.

Существуют два широко используемых метода измерений времен затухания флуоресценции[7]:

1. <u>Импульсный метод.</u> Образец освещается короткими импульсами и измеряется интенсивность флуоресценции в зависимости от времени.

2. <u>Фазово-модуляционный (гармонический) метод.</u> Образец возбуждается синусоидальномодулированным светом. Для расчета затухания используется фазовый сдвиг и степень демодуляции испускания по отношению к падающему свету.

Существует несколько модификаций импульсного метода:

- метод счета фотонов (метод одноквантовой регистрации);
- стробоскопический метод;
- применение электронно-оптической камеры;
- методы повышения частоты;

В стробоскопическом методе фотоумножитель периодически включается на короткий период времени в течение затухания флуоресценции. Коэффициент усиления увеличивается пульсирующим напряжением. Время подачи анализирующего сигнала постепенно смещается, и после каждого последовательного импульса регистрируются разлучные участки кривой затухания. В случае большого числа стробирующих импульсов (при условии постоянства их длительности и формы) можно получить полную кривую затухания флуоресценции во времени.

В электронно-оптических камерах фотоэлектроны распределяются по поверхности экрана посредством отклоняющих пластин, расположенных внутри детектора. Методы повышения частоты применяются с целью повышения временного разрешения систем. Сигнальный импульс пропускается через нелинейный кристалл, прозрачность которых изменяется под действием очень коротких лазерных импульсов. Временное разрешение системы ограничивается в данном случае шириной импульса лазера.

В методе счета фотонов импульсная система измеряет время между возбуждающим импульсом и приходом первого фотона [23]. Интенсивность света подбирается настолько низкой, чтобы на каждые двадцать импульсов наблюдался лишь один фотон. Это необходимо для того, чтобы на каждый импульс, для которого фотон подсчитывают, приходился лишь один фотон. В противном случае информация о приходе первых фотонов не отражает действительный закон затухания, т. к. первый фотон всегда приходит раньше других. Опыт проводится до тех пор, пока число зарегистрированных фотонов не достигнет определенного значения.

Обобщенная схема, описывающая работу данного метода представлена на рисунке 12. Интервал времени между вспышкой лампы и моментом регистрации фотона детектором осуществляется при помощи время-амплитудного преобразователя (ВАП), который запускается импульсом лампы и останавливается после импульса детектора. ВАП генерирует линейно-растущее напряжение, поэтому в момент запирания оно пропорционально времени между двумя событиями. Многоканальный временной анализатор определяет номер ячейки, в которой должен быть зафиксирован приход соответствующего импульса.



Рисунок 12 – Схема проведения эксперимента методом однофотонного счета.

Большая часть исследований биохимических систем с использованием флуоресцентной спектроскопии проводится методом счета фотонов. Поэтому в данной работе моделируются эксперименты, проводимые именно этим способом.

1.5.2 ЭПР спектроскопия биологических мембран

Спектроскопия ЭПР в сочетании с техникой внедрения спиновых меток являются мощным инструментом для изучения структурных и динамических свойств липидов и мембранных протеинов. Экспериментально могут быть получены такие параметры как пространственные ограничения вращательного движения, частота вращательного движения, локальная полярность.

ЭПР спектроскопия мембран базируется на внедрении липофильных молекул спиновых меток в мембраны. Анализ спектральных линий ЭПР спиновых меток дает информацию о числе различных локальных вращательных состояний и полярности, а также об их численных характеристиках, начиная от температур жидкой фазы идиалезированнной модели мембраны (простейший случай биохимически чистой системы, которому соответствует одно вращательных состояние) и заканчивая

реальными биологическими мембранами, имеющими сложный состав, когда вращательное движение и полярность сильно варьируется в поперечном направлении (относительно нормали мембраны), а соответствующие характеристики непрерывно распределены в фазовом пространстве параметров. Анализ ЭПР спектров спиновых меток позволяет выявить число спектральных компонент, их характеристики и процентный вклад в совокупный спектр.

1.5.3 Направленное мечение и ЭПР спектроскопия мембранных протеинов

Направленное мечение (Site-directed spin labeling SDSL) является мощным инструментом для изучения структурных и динамических характеристик как растворимых, так и мембранных белков. При SDSL исследуемый участок белка мутируется, так что соответствующая аминокислота заменяется цистеином. В реакции мечения спиновыми метками к цистеину присоединяется нитроксидный остаток, модифицируя уникальную сульфгидрил группу на специальный нитроксидный реагент (рис).



Рисунок 13 – Реакция присоединения спиновой метки к молекуле протеина через цестеин.

Измерение ЭПР спектра нитроксидного зонда и основательный анализ спектральных линий предоставляют большой объем потенциальной информации о локальной структуре белка вблизи спиновой метки.

1.5.4 Комплексность ЭПР спектра

Поскольку система может иметь несколько устойчивых состояний локальной структуры, наблюдаемый ЭПР спектр, является суммой отдельных спектральных компонент, соответствующих различным конфирмационным и динамическим состояниям спиновой метки и ее белкового окружения.



Рисунок 14 – Сложный ЭПР спектр, представляющий собой сумму четырех компонент.

Вклад разных спектральных компонент различен и зависит от вероятностей или процентного соотношения нахождения системы в том или ином состоянии. При большом числе спектральных компонент, получаемых в результате моделирования и анализа спектра, компоненты с низким весом (менее 5%) могут быть исключены из дальнейшей интерпретации экспериментальных данных.

1.5.5 Моделирование ЭПР спектров

В общем случае для моделирования ЭПР спектра спиновых меток используются стохастические уравнения Лиувилля [24, 25]. Изначально стоит задача определения характера движения спиновых меток и их динамических характеристик относительно временной шкалы ЭПР измерений. Так, например, как в мембранных, меченых жирно-кислотными спиновыми зондами, так и в меченых белках и пептидах, измеряемых при физиологических температурах, относительное движение спиновых меток является быстрым. Аппроксимация быстрого движения сокращает расчеты спектра в 100 раз, поэтому для анализа спектров ЭПР систем, измерения в которых проводятся в условиях физиологических температур, движение спиновых меток является быстрыем.

Методика моделирования ЭПР спектра подробно описана в [26, 27]. Для моделирования сложных спектров каждая спектральная компонента моделируется отдельно в три этапа:

Усреднение тензоров магнитных взаимодействий.

Дифференцирование Лоренцевой формы линии.

Свертка функции распределения резонансного поля с первой производной формы линии для всех спектральных полос, составляющих сигнал.

В общем случае для каждого отдельного случая необходимо разрабатывать собственную модель. Например, одна спектральная компонента, моделирующая сигнал в мембранной системе описывается набором из 7 переменных, несущих информацию о таких характеристиках, как пространственная ограниченность (упорядоченность) движении спиновой метки и скорость этого движения, локальная полярность, протисити и др [18].

1.5.6 Анализ и интерпретация данных ЭПР спектроскопии

Схема анализа ЭПР спектра представлена на рисунке. Для наиболее полного описания комплексности исследуемой системы проводится поиск множества наборов параметров моделей спектральных компонент, состоящий из 300-400 решений (популяция решений), соответствующие спектры для которых хорошо согласуются с экспериментальными данными. Для каждого отдельного решения моделируется ЭПР спектр, который затем сравнивается с экспериментальным спектром. Согласованность моделируемых данных с экспериментальными определяется с помощью статистического критерия χ^2 , который представляет собой взвешенную сумму квадратов разностей двух сравниваемых спектральных линий.



Рисунок 15 – Схема анализа спектров ЭПР.

Для оптимизации параметров используется метод гибридной эволюционной оптимизации (ГЭО). ГЭО в данной задаче – это комбинация генетического алгоритма (ГА) и симплексного метода локального поиска (метод Нелдера-Мида). ГА исследует параметрическое пространство в поисках новых областей перспективных решений, в то время как локальный поиск осуществляет уточнение того или иного решения, тем самым, определяя локальный минимум в данной области пространства решений.

1.5.7 Принцип проекции и GHOST презентация решений

Алгоритм построен таким образом, что исследователю нет необходимости указывать предполагаемую сложность экспериментальных данных, подготовленных для анализа. Для анализа данных всегда используется 4 спектральные компоненты (это максимально возможное число компонент, ввиду большого количества оптимизируемых параметров и ограничений на их число, определяющихся качеством экспериментальных данных).

Процедура оптимизации повторяется 20 раз, по окончании из всех решений (20х400=8000 наборов параметров, каждый из которых состоит из 4 компонент) формируется конечная популяция, состоящая из 200 однокомпонентных решений.

Большой объем данных, получаемый в результате оптимизации популяции решений, далее проходит этапы фильтрации и группирования с целью определения числа спектральных компонент и соответствующих им усредненных характеристик. Важным этапом анализа является презентация конечного решения, для этого используются графики проекций параметрического пространства в декартову систему некоторых двух параметров, а также кодирование других наиболее важных параметров цветом.



Рисунок 16 – Схема фильтрации и конденсации решений анализа ЭПР спектров.

Если сложность анализируемой системы не превосходит 4, алгоритм корректно определяет количество спектральных компонент и их число. Излишние компоненты модели, как правило, беспорядочно распределены в пространстве параметров, они имеют высокие значения критерия χ^2 (что показывает неудовлетворительное согласование с экспериментальными данными) и низкие весовые коэффициенты.

Если сложность анализируемой системы высока и превосходит 4, алгоритм по-прежнему способен определить области пространства параметров, соответствующие отдельным компонентам. Это свойство алгоритм имеет, благодаря одновременному использованию большого числа решений. Четырехкомпонентные решения качественно могут определить позиции групп решений. Пересчет весовых коэффициентов (при фиксированных значениях параметров) позволяет уточнить конечное решение, получая более точные соотношения отдельных спектральных компонент.

Независимо от сложности анализируемой системы, важным этапом интерпретации и представления решений является этап фильтрации решений по значению χ^2 , на котором из дальнейшего рассмотрения отбрасываются решения, плохо согласованные с экспериментальными данными.

Аналогичным образом решения фильтруются по плотности. Устраняются решения, локальная плотность которых в пространстве параметров ниже установленного порога (эти решения имеют место либо из-за избыточного числа компонент модели, либо в случае, когда вес однокомпонентного решения очень мал и значения соответствующих параметров не влияет на результирующий спектр).

Этап группирования решений происходит по принципу кластеризации. На нескольких уровнях пороговой плотности, решения образуют группы. Многоуровневый процесс группирования решений позволяет установить характер образование различных групп решений.

2 ГЛОБАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

2.1 Аналитическое выражение для вероятности миграции энергии между молекулам в идеализированной молекулярной системе

Постановка задачи: пусть дана система из n неподвижных молекул (доноров), между которыми может происходить миграция энергии; заданы величины a_{ij} , $i,j=\overline{1,n}$, образующие матрицу A, равные вероятностям миграции энергии за один акт взаимодействия с *i*-ого донора на *j*-ый. Заданы также величины b_i , $i=\overline{1,n}$, равные вероятности того, что энергия покинет систему (например, излучится в

виде фотона или перейдет на акцептор-тушитель энергии) на *i*-ом доноре. Требуется найти вероятность того, что энергия перейдет какими угодно путями с *i*-ого донора на *j*-ый и покинет систему на *j*-ом доноре.

Обозначим искомую вероятность через ${}^{1}P(i,j)$. Введем также функцию ${}^{0}P(i,j,k)$, равную вероятности перехода энергии с *i*-ого донора на *j*-ый за *k* актов взаимодействия.

Вероятность того, что энергия перейдет с *i*-ого донора на *j*-ый ровно за k шагов и покинет систему на *j*-ом доноре, равна ${}^{0}P(i, j, k)b_{i}$.

По теореме о сложении вероятностей

$${}^{1}P(i,j) = \sum_{k=1}^{\infty} {}^{0}P(i,j,k)b_{j}.$$
(3)

Кроме того, надо учесть тот факт, что при i=j энергия может покинуть систему сразу, притом с вероятностью b_i . Окончательно получаем (δ_{ij} -символ Кронекера):

$${}^{1}P(i,j) = \delta_{ij}b_{j} + \sum_{k=1}^{\infty} {}^{0}P(i,j,k)b_{j} = \delta_{ij}b_{j} + b_{j}\sum_{k=1}^{\infty} {}^{0}P(i,j,k).$$
(4)

Теперь выведем выражение для ${}^{0}P(i,j,k)$. Во-первых, очевидно, что ${}^{0}P(i,j,1) = a_{ij}$.

Во-вторых, пользуясь формулой полной вероятности, для $k>1 \sum_{m_1=1}^n a_{im_1}$ получаем

$${}^{0}P(i,j,k) = \sum_{m=1}^{n} a_{im} {}^{0}P(m,j,k-1), \qquad (5)$$

поскольку с с *i*-ого донора энергия с вероятностью a_{im} может перейти на *m*-ый донор, а оттуда с вероятностью ${}^{0}P(m,j,k-1)$ перейти на *j*-ый донор ровно за *k*-1 шагов. Остается расписать формулу для ${}^{0}P(i,j,k)$ подробно:

$${}^{0}P(i,j,k) = \sum_{m_{2}=1}^{n} a_{m_{1}m_{2}} \cdots \sum_{m_{k-2}=1}^{n} a_{m_{k-3}m_{k-2}} \sum_{m_{k-1}=1}^{n} a_{m_{k-2}m_{k-1}} a_{m_{k-1}j}.$$
(6)

Введем матрицу ${}^{0}P(k) = ({}^{0}p_{ij}(k))$, где ${}^{0}p_{ij}(k) = {}^{0}P(i,j,k)$. С таким обозначением формулу (6) можно переписать в матричном виде сразу для всех $i,j = \overline{1,n} : {}^{0}P(k) = A^{k}(k \ge 1)$.

Найдем теперь сумму операторного ряда $\sum_{k=0}^{\infty} A^k$. Методом математической индукции легко

показать, что если $\det(A - E) \neq 0$, то $\sum_{k=0}^{n} A^k = (E - A^{n+1}) \cdot (E - A)^{-1}$, где *E*-единичная матрица

размерности n, а $A^0 = E$.

$$\sum_{k=0}^{\infty} A^k = (E - A)^{-1}, \text{ a } \sum_{k=1}^{\infty} A^k = (E - A)^{-1} - E.$$
(7)

Из формулы (4) следует, что

$${}^{1}P(i,j) = \delta_{ij}b_{j} + b_{j}\sum_{k=1}^{\infty} {}^{0}P(i,j,k) = \delta_{ij}b_{j} + b_{j}\sum_{k=1}^{\infty} (A^{k})_{ij} = \delta_{ij}b_{j} + b_{j}((E-A)^{-1}-E)_{ij} = \delta_{ij}b_{j} + b_{j}(((E-A)^{-1})_{ij} - \delta_{ij}) =$$

$$= \delta_{ij}b_{j} + b_{j}((E-A)^{-1})_{ij} - \delta_{ij}b_{j} = b_{j}((E-A)^{-1})_{ij}.$$
(8)

Итак,

$${}^{1}P(i,j) = b_{j}((E-A)^{-1})_{ij}.$$
(9)

Если теперь ввести матрицы
$${}^{1}P = ({}^{1}p_{ij})$$
, где ${}^{1}p_{ij} = {}^{1}P(i,j)$, и $B = (b_{ij})$, где $b_{ij} = \delta_{ij}b_{j}$, то
 ${}^{1}P = (E - A)^{-1}B$. (10)

Однако достаточное условие ||A|| < 1 не всегда может выполняться, тем не менее, из физических соображений (согласно которым полная вероятность миграции возбуждения с одного донора на другой всегда конечна) ряд $\sum_{k=0}^{\infty} ||A^k||$ всегда сходится, притом выполняются формулы (8) и (10).

Далее приведены сравнительные результаты работы двух программ, моделирующих миграцию энергии по Ферстеру, одна из которых моделирует поведение системы с помощью метода Монте-Карло, вторая – с помощью полученной формулы [20]. Моделировалась система, состоящая из 19 доноров, расположенных в цепочке длиной $10 R_0$, где R_0 – ферстеровский радиус молекул; параметры доноров были следующими: $R_0 = 60 \text{ Å}$, константа излучательной дезактивации донора $kD=0.25*10^9 (\text{ c}^{-1})$ [7]. Необходимо было определить количество испущенных фотонов с каждого из доноров при возбуждении какой-либо либо заданной молекулы, например(что наиболее естественно), крайней; в методе Монте-Карло 10^5 раз разыгрывалось поведение системы, при полуаналитическом расчете строка из матрицы 1P , соответствующая возбуждаемому сначала донору, помножалась на 10^5 .

Элементы матрицы A вычисляются по формуле $a_{ij} = kET(i, j)/(\sum_{j=1}^{n} kET(i, j) + kD)$, где $kET(i, j) = kD \cdot (R_0 / |\vec{r_i} - \vec{r_j}|)^6$ – константы переноса энергии от *i*-ого донора к *j*-ому, $\vec{r_i}, \vec{r_j}$ – радиус-векторы соответствующих доноров [28]. Величины b_i вычисляются по формуле

$$b_i = kD/(\sum_{j=1}^n kET(i,j) + kD).$$
 (11)

Вообще говоря, поскольку в задаче нас не интересует зависимость интенсивности излучения от времени, а в формулах для a_{ij} и b_i (согласно ранее введенным обозначениям) kD сокращается, то можно было принять kD=1. Аналогично, можно задать лишь отношение длины цепочки доноров к ферстеровскому радиусу.

На рисунках 17–19 приведены результат моделирования методом Монте-Карло, результат расчета по формуле (8) и график взвешенных остатков соответственно.



Рисунок 17 – Результат моделирования методом Монте- Карло.



Рисунок 18 – Результат расчета по формуле (8).



Рисунок 19 – График взвешенных остатков.

Результаты, полученные с помощью двух различных методов, находятся в очень хорошем соответствии, однако при такой конфигурации системы предпочтительнее пользоваться расчетом по формуле (8), поскольку он на несколько порядков быстрее метода Монте-Карло.

Полученные теоретические результаты (формуле (8) и (10)) можно применять для проверки работоспособности других методов моделирования, для увеличения эффективности моделирования в рамках более общих задач, а также для анализа сложных систем, например, для оценки влияния тушителей энергии на работу фотонных антенн.

2.2 Исследование систем пленок порфиринов

В данном разделе рассматриваются результаты статистического моделирования фотосинтетических систем на основе пленок самоорганизующихся порфириновых комплексов. В первом пункте описаны формализованные модели, соответствующие реальным экспериментальным системам. Далее представлены результаты моделирования кривых затуханий флуоресценции для различных типов молекул. Также рассматриваются результаты моделирования экспериментов, в которых воздействие на образец производится поляризованным излучением.

2.2.1 Моделируемые структуры

Модель 1 представляет собой систему однотипных молекул, расположенных в узлах решётки. Так как вероятность переноса энергии с увеличением расстояния между молекулами быстро уменьшается, положим, что перенос энергии возможен лишь на ближайшую соседнюю молекулу по каждому из рассматриваемых направлений. Такая модель, во-первых, является легко формализуемой, а во-вторых, будет соответствовать доменной структуре плёнок порфиринов. Параметры данной модели:

 k_{dnvop} - константа скорости флуоресценции отдельно взятой молекулы;

 $k_{y}, k_{y}...$ - постоянные скорости переноса энергии по каждому из направлений;

Для бесконечной структуры может быть получена аналитическая зависимость для кривой затухания флуоресценции:

$$I = I_0 e^{-t/\tau_{\phi_{J} N o p}} \tag{12}$$

То есть кривая затухания флуоресценции для системы с возможным процессом переноса энергии будет совпадать с кривой затухания, соответствующей системе невзаимодействующих молекул. Данный факт был проверен при помощи численного эксперимента. Следует отметить, что вид этой зависимости не отражает особенностей процессов переноса энергии, происходящих в системе. Поэтому часто вместе с анализом кривых затухания проводится анализ спектральных зависимостей.



Рисунок 20 – Модель системы с молекулами в узлах прямоугольной решетки:

а) система однотипных молекул; б) модель системы с ловушками энергии.

Модель 2. Больший интерес с точки зрения практического применения имеют системы, в которых часть молекул заменена ловушками энергии (рисунок 20б). В нашей модели такие ловушки (акцепторы) замещают молекулы донора случайным образом. Предполагается, что молекулы акцептора не могут быть возбуждены фотоном. Также считаем, что в случае переноса энергии возбуждения с донора на акцептор дальнейшая миграция энергии возбуждения с акцептора невозможна, т.е. в дальнейшем имеет место только процесс испускания флуоресценции с молекулы акцептора. В реальности, однако, всегда существует небольшая вероятность обратного переноса энергии с акцептора на донор.

Параметры данной системы:

 $k^{\scriptscriptstyle \partial}_{_{\phi, nyop}}, k^{\scriptscriptstyle a}_{_{\phi, nyop}}$ - константы скорости затухания флуоресценции доноров и акцепторов;

 $k_x^{\ \partial \partial}, k_v^{\ \partial \partial}$ - константы переноса с донора на донор по различным направлениям;

 C_{a} - относительное число молекул акцептора в образце;

2.2.2 Результаты численных экспериментов и анализа данных

На рисунках 21а и 21б представлены графики кривых затухания флуоресценции для модели однотипных молекул, полученные при использовании двух модификаций метода моделирования. Сплошная линия иллюстрирует соответствующую аналитическую зависимость. Для удобства анализа построены дополнительные графики, отражающие зависимость между числом актов переноса и числом фотонов возбуждения (рисунки 21в и 21г).

Данные зависимости показывают полную идентичность двух модификаций метода моделирования. Кроме того, кривая затухания, полученная при помощи имитационной модели в

точности соответствует соответствующей аналитической зависимости. Среднее значение критерия χ^2 равнялось 1,04 (число сгенерированных фотонов 10⁶).





На следующем рисунке представлен график взвешенных остатков для данной модели и график, отражающий зависимость числа актов переноса от числа сгенерированных фотонов для трёх различных соотношений $k_{nep} / k_{d,nvop}$.



Рисунок 22 – Модель однотипных молекул: а) график взвешенных остатков; б) миграция энергии (зависимость числа актов переноса от числа фотонов возбуждения).

Из графика взвешенных остатков видно, что отсчёты случайным образом разбросаны около нуля, что свидетельствует о хорошем соответствии теоретической и имитационной зависимостей. Зависимость на графике б) подтверждает тот факт, что при увеличении константы скорости переноса увеличивается число фотонов, которым соответствует большее число актов переноса.

При изучении затухания флуоресценции в системе с примесями исследуются как кривые затухания доноров, так и кривые затухания акцепторов:



Рисунок 23 – Модель системы с ловушками энергии: а) кривая затухания доноров; б) кривая затухания акцепторов ((a) C_a=0,1; (b) – C_a=0,3; (c) C_a=0,5).

Экспериментально данные зависимости являются разделимыми, поскольку обычно молекулы доноров и акцепторов излучают на различных длинах волн. На рисунке представлены зависимости, полученные для различного относительного числа молекул примеси.

При увеличении концентрации акцепторов кривая для доноров начинает затухать быстрее, а максимум кривой для акцепторов смещается вверх и в сторону меньших времён.

2.3 Исследование структуры мембранного протеина M13

Метод глобального анализа применен для интерпретации экспериментальных данных ЭПР спектроскопии с целью определения структурных и динамических характеристик мембранного протеина М13.

Бактериофаг М13 является небольшим нитеобразным вирусом, поражающим бактерию *Escherichia coli*. Одна вирусная частица, диаметром порядка 6.5 нм, содержит 2800 копий протеина (рисунок 24а), предохраняющего от повреждения одинарную цепь ДНК [29]. Длина вирусной частицы варьируется в зависимости от длины ДНК. Большая часть (98%) вирусной оболочки, представляющей собой гибкий полый цилиндр с толщиной стенок 1.5 – 2 нм, состоит из однотипного

протеина, названного основным оболочечным протеином бактериофага M13 (M13 major coat protein, M13MCP). Находясь в мембране *E. coli* вирусный протеин M13MCP ведет себя как трансмембранный протеин. Этот небольшой протеин состоит 50 аминокислотных остатков (рисунок 24б) и имеет ярко выраженный гидрофобный участок (позиции 21-39).



Рисунок 24 – Мембранный оболочечный протеин бактериофага М13. а) Четвертичная структура белка в оболочке вируса, проникающего через клеточную мембрану

б) Структурная модель а-спирали протеина М13.

Подготовленные образцы модифицированных в разных участках протеинов были помещены в липидный бислой, заменяющий мембрану. Экспериментальные данные ЭПР спектроскопии для протеина, меченого в разных позициях спиновой меткой, представлены на рисунке 25.



Рисунок 25 – Экспериментальные ЭПР спектры меченого белка М13, мутанты 3, 16, 19, 23, 25, 29, 34, 42, 46, 49 (черный цвет). Рассчитанные теоретически ЭПР спектры для соответствующих позиций, оптимизированы с помощью гибридного эволюционного алгоритма (красный цвет).

ЭПР спектры были анализированы с помощью алгоритма, описанного в подразделе 1.5.6. Результаты анализа мутированного в разных участках протеина для двух мембранных систем, например, для позиций 13, 25, 35, 46 представлены на рисунках 26 и 27.



Рисунок 26 – Экспериментальные ЭПР спектры меченого белка М13 в мембране 14:1 PC, мутанты 13, 25, 35, 46, а также соответствующие проекции в плоскость *θ-φ* разбитого на группы пространства решений, с указание групповых весовых коэффициентов.



Рисунок 27 – Экспериментальные ЭПР спектры меченого белка М13 в мембране 22:1 PC, мутанты 13, 25, 35, 46, а также соответствующие проекции в плоскость *θ-φ* разбитого на группы пространства решений, с указание групповых весовых коэффициентов.

Анализ результатов показал, что большая часть образцов характеризуются тремя спектральными компонентами, которым соответствуют три группы спектральных параметров (рисунки 26 и 27). Одна группа решений (правый верхний участок графиков на рисунках 26 и 27) остается постоянной для всех образцов и не зависит от позиции метки в молекуле белка. Усредненные параметры этой группы указывают на свободное вращательное движение спиновой метки в пределах открытого симметричного пространства. Вторая часто-повторяющаяся спектральная компонента характеризуется большим ограничением движения. Две эти группы решений объясняются неспецифичным мечением (известно, что спиновые метки могут присоединяться к аминокислотам в конечном участке протеина).

Третья наибольшая спектральная компонента имеет в среднем 70%-й вклад в результирующее решение. По обоим показателям: структурному ограничению динамики метки, а также по параметру асимметрии конформационного пространства метки, данные анализа соответствуют топологии белка, находящегося в мембране. Совместный анализ экспериментальных данных (рисунки 26-27) сделал возможным установить тенденцию изменения локальных структурных ограничений по всех длине молекулы белка, определить распределение параметра мобильности и вычислить градиент полярности.

Для характеристики величины структурных ограничений вводится параметр эффективного пространства свободного вращения Ω [30], определяемый параметром открытости конуса вращения спиновой метки θ и параметром деформации (асимметрии) пространства вращения φ :

$$\Omega = 4\theta \varphi / \pi^2 \tag{13}$$

Из экспериментальных измерений установлено, что параметр Ω связан с локальной динамикой молекулы протеина. Зависимость нормализованного эффективного пространства свободного вращения от позиции спиновой метки в молекуле протеина представлена на рисунке 28.



Рисунок 28 – Зависимость нормализованного эффективного пространства свободного вращения Ω от позиции спиновой метки в молекуле протеина для мембранных систем 14:1 PC (темные кружки) и 22:1 PC (светлые треугольники).

Параметры структурного ограничения движения метки также могут быть объединены с динамическим параметром корреляционного времени вращательного движения в т.н. коэффициент вращательной диффузии *D* [30]:

$$D = \theta \varphi / 4\tau_c \tag{14}$$

Зависимость коэффициента диффузии от позиции спиновой метки в молекуле протеина представлена на рисунке 29.



Рисунок 29 – Зависимость коэффициента вращательной диффузии от позиции спиновой метки в молекуле протеина для мембранных систем 14:1 PC (темные кружки) и 22:1 PC (светлые треугольники).

Как видно из рисунка 29, для обеих мембранных систем 14:1 PC и 22:1 PC за исключением позиций 12 и 13, различия в значения коэффициента диффузии незначительны. Коэффициент диффузии спиновой метки в 3-4 раза меньше в трансмембранном участке протеина в сравнении с концевыми участками.

2.3.1 Обсуждение результатов анализа ЭПР спектров для системы протеина М13

Данные по нормализованному эффективному пространству свободного вращения спиновой метки Ω для обеих мембранных систем 14:1 PC и 22:1 PC находятся в согласии с общепринятой моделью протеина М13 [31, 32, 33].

Сравнивая две мембранные системы 14:1 PC и 22:1 PC, можно отметить, что, в общем, различия в локальной структуре протеина не значительны. Это говорит о том, что локальное свободно-вращательное пространство спиновой метки, прикрепленной к молекуле белка, определяется, главным образом, структурой самого белка и лишь незначительно изменяется под действием липидного окружения.

Исследуя результаты анализа на рисунке 28, отметим сильное ограничение пространства свободного вращения для позиций 23-29. Максимальный эффект ограничения наблюдается для позиции 25, что можно объяснить окружением этой позиции аминокислотами с большими остатками (Ile-22, Tyr-21, Tyr-24 и Trp-26). Основываясь на этих данных, локальное движение спиновой метки в молекуле протеина изменяется под действием следующих структурных факторов:

1. Влияние первичной структуры белка (последовательность аминокислот). Различные аминокислоты имеют разные остатки, вариации их структуры и размеров определяют различную степень влияния разных аминокислот на относительно быстрое вращательное движение спиновой метки.

2. Влияние вторичной структуры белка и более высоких структурных уровней (свертывание белка, например а α-спираль, взаимная структура различных участков молекулы, организация нескольких молекул в ансамбли для выполнения определенных функций.

3. Влияние липидных молекул мембраны, окружающих белок.

В заключение отметим, что, очевидно, нормализованное эффективное пространство свободного вращения Ω является более чувствительным параметром для описания локального окружения спиновой метки в молекуле белка.

2.4 Выводы

В разделе представлены результаты глобального анализа экспериментальных данных для системы самоорганизующихся пленок порфиринов, а также результаты исследования структуры мембранных протеинов.

Результаты показали, что использование совместного анализа многомерных экспериментальных данных повышает точность определяемых характеристик, а также ведет к более полному описанию исследуемой системы. Как следствие, появляется возможность, проводя локальные измерения в молекулярной системе, после глобального анализа данных получать макрохарактеристики и судить о поведении всей системы в целом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью проекта является разработка методов глобального анализа экспериментальных данных, получаемых при исследовании сложных молекулярных систем методами флуоресцентной и ЭПР спектроскопии.

В ходе реализации данной цели решены следующие задачи:

1. На базе ранее разработанных имитационных моделей построена схема анализа процессов переноса и релаксации энергии в молекулярных системах. Предложена универсальная схема глобального анализа экспериментальных данных.

2. Рассмотрены методы глобального анализа данных флуоресцентной спектроскопии и спектроскопии ЭПР для определения структурных и динамических характеристик мембранных протеинов и фотофизических параметров донорно-акцепторных систем.

3. Разработан и протестирован гибридный эволюционный алгоритм оптимизации, осуществляющий поиск оценок параметров моделей биомолекуляных систем при использовании глобального анализа экспериментальных данных.

4. Разработанные модели сложных систем, методы оптимизации и алгоритмы глобального анализа применены для исследования структурных и динамических характеристик мембранных протеинов, а также для определения фотофизических свойств систем самоорганизующихся пленок порфиринов.

Рассмотренные в рамках НИР алгоритмы глобального анализа могут использоваться и в других исследованиях. Совместный анализ многомерных экспериментальных данных повышает точность определяемых характеристик, а также ведет к более полному описанию исследуемой системы.

Кроме того, полученные при выполнении НИР результаты имеют важное теоретическое значение для развития метода имитационного моделирования фотофизических процессов в случае наличия различных механизмов переноса энергии.

В заключение отметим, что с участием исполнителей проекта обновлен лабораторный практикум по специальному курсу «Моделирование процессов и систем», читаемому на факультете радиофизики и электроники.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1 Loura L.M.S., et al. Fluid-fluid membrane microheterogenety: a fluorescence resonance energy transfer study. // Biophysical Journal, 2001. Vol. 80. P. 776-788.

2 Donker H., Koehorst R.B.M., Schaafsma T.J. et al. Spectroscopy and Photophysics of Self-Organized Zinc Porphyrin Nanolayers. 1. Optical Spectroscopy of Excitonic Interactions Involving the Soret Band. // J. Phys. Chem. B, 2005. Vol. 109(36). P. 17031-17037.

3 Donker H., van Hoek A., van Schaik W., Koehorst R.B.M., Yatskou M. M., Schaafsma T.J. et al. Spectroscopy and Photophysics of Self-Organized Zinc Porphyrin Nanolayers. 2. Transport Properties of Singlet Excitation. // Phys. Chem. B, 2005. Vol. 109(36). P. 17038-17046.

4 Schaafsma T.J., Dag I., Sitters R., Glasbeek M., Lifshitz E. et al. Spectroscopy and Photophysics of Self-Organized Zinc Porphyrin Nanolayers. 3.Fluorescence Detected Magnetic Resonance of Triplet States // Phys. Chem. B, 2005. Vol. 109(36). P. 17047 -17054.

5 Minkowski C., Calzaferri G. et al. Transport of Electronic Excitation Energy in Dye-Loaded Zeolite L // Chimia. 2005. Vol. 59. P. 88-93.

6 Calzaferri G.M., Yatskou M. et al. Electronic Excitation Energy Migration in a Photonic Dye-Zeolite Antenna // ChemPhysChem. 2003. Vol. 4. P. 567-587.

7 Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York. 1999. 725 p.

8 Апанасович В.В., Коляда А. А., Чернявский А.Ф. Статистический анализ случайных потоков в физическом эксперименте. Мн.: Университетское, 1988. 256 с.

9 Апанасович В.В., Тихоненко О.М., Цифровое моделирование стохастических систем. Мн.: Университетское. 1986. 126 с.

10 Yatskou M.M., Digris A.V., Novikov E.G., Skakun V.V., Apanasovich V.V. Integrated Data Analysis in Time-Resolved Fluorescence and Fluorescence Correlation Spectroscopy. Recent Research Developments in Physical Chemistry, Vol. 7, Part I, 2004, P. 165-183.

11 Химмельблау Д. Прикладное нелинейное программирование. М.: Мир. 1975. 534 с.

12 Holland J.H. Adaptation in Natural and Artificial Systems: An Introductory Analysis with Applications to Biology, Control and Artificial Intelligence. MIT Press, Cambridge MA., 2nd ed., 1992.

13 De Jong, K. An analysis of the behavior of a class of genetic adaptive systems, Ph.D. thesis, University of Michigan, Ann Arbor MI, 1975.

14 Goldberg D.E. Genetic Algorithms in Search, Optimization and Machine Learning Addison-Wesley, Reading MA, 1989.

15 Liu S.H., Mernik M., Bryant B.R. Entropy-Drivenexplorationand Exploitationinevolutionary Algorithms. Bio Inspired Optimization Methods and their Application BIOMA 2006, Ljubljana, Slovenia, October 9-10, 2006, P. 15-24.

16 Bloom, M., Thewalt, J. L. Time and distance scales of membrane domain organization. Mol. Membr. Biol. 1995, 12, P. 9–13.

17 Edidin, M. Lipid et al. microdomains in cell surface membranes // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. Vol. 7. P. 528–532.

18 Štrancar, J.; Koklič, T.; Arsov, Z.; Filipič, B.; Stopar, D.; Hemminga, M. A. Spin Label EPR-based Characterization of Biosystem Complexity. J. Chem. Inf. Model. 2005, 45, P. 394–406.

19 Leidy, C., Wolkers, W.F., Jørgensen, K., Mouritsen, O.G., Crowe, J.H. Lateral Organization and Domain Formation in a Two-Component Lipid Membrane System. Biophys. J. 2001, 80, P. 1819–1828.

20 Förster T. // Ann. Phys. (Germany). Vol. 2. 1948. P. 55-75.

21 A Dexter D.L. et al. A Theory of Sensitized Luminescence in Solids // J. Ghem. Phis. Vol. 21. 1953. P. 836-850.

22 Molecular Fluorescence: Principles and Applications. B. Valeur. Wiley-VCH, 2001.

23 O'Connor, D. V.; Phillips, D. Time-Correlated Single Photon Counting; Academic Press: London, 1984.

24 Budil, D. E.; Lee, S.; Saxena, S.; Freed, J. H. Nonlinear-Least-Squares Analysis of Slow-Motion EPR Spectra in One and Two Dimensions Using a Modified Levenberg-Marquardt Algorithm. J. Magn. Reson. A. 1996, 120, P. 155–189.

25 Schneider, D. J.; Freed, J. H. Calculating Slow Motional Magnetic Resonance Spectra: A User's Guide. In Biological Magnetic Resonance: Spin Labeling, Theory and Applications; Berliner, L. J., Reuben, J., Eds.; Plenum Press: New York, 1989, P. 1–76.

26 Štrancar, J.; Šentjurc, M.; Schara, M. Fast and accurate characterization of biological membranes by EPR spectral simulations of nitroxides. J. Magn. Reson. 2000, 142, P. 254–265.

27 Schindler, H.; Seelig, J. EPR spectra of spin labels in lipid bilayers. J. Chem. Phys. 1973, 59, 1841-1850.

28 Valeur B. Molecular fluorescence: principles and applications. Wiley-VCH: Verlag, 2001.

29 Stopar, D., Spruijt, R.B., Wolfs, C.J.A.M. and Hemminga, M.A., Structural characterization of bacteriophage M13 solubilization by amphiphiles, Biochim. Biophys. Acta (2002) 1594, P. 54-63.

30 Stopar, D., Strancar, J., Spruijt, R.B. and Hemminga, M.A., Motional restrictions of membrane proteins: A site-directed spin labeling study, Biophys. J. (2006) 91, P. 3341-3348.

31 Stopar, D., R. B. Spruijt, and M. A. Hemminga. 2006. Anchoring mechanisms of membrane-associated M13 major coat protein. Chem. Phys. Lipids 141, P. 83-93.

32 Papavoine, C. H. M., B. E. C. Christiaans, R. H. A. Folmer, R. N. H. Konings, and C. W. Hilbers. 1998. Solution Structure of the M13 Major Coat Protein in Detergent Micelles; A Basis for a Model of Phage Assembly Involving Specific Residues. J. Mol. Biol. 282, P. 401-419.

33 McDonnell, P. A., K. Shon, Y. Kim, and S. J. Opella. 1993. fd Coat Protein Structure in Membrane Environments. J. Mol. Biol. 233, P. 447-463.