

ТЕОРИЯ ЭФФЕКТА МЁССБАУЭРА В БЕЛКАХ

К. В. ШАЙТАН, А. Б. РУБИН

*Биологический факультет Московского государственного университета
им. М. В. Ломоносова*

Обсуждаются особенности эффекта Мёссбауэра в белках. Показано, что резкое падение фактора f' в ограниченной области температур (при $T > 200$ К) связано с особенностями, характерными для конформационной подвижности белков и временем корреляции ограниченной диффузии мёссбауэровской метки ниже критического значения $\tau_c \sim 10^{-7}$ с (времени жизни ядра ^{57}Fe в возбужденном состоянии).

Для конформационной подвижности предлагается модель броуновского осциллятора с очень сильным затуханием. В рамках этой модели получена новая формула для вероятности эффекта Мёссбауэра, находящаяся в хорошем согласии с экспериментальными данными. С помощью этой формулы восстановлена температурная зависимость микровязкости среды (энергия активации $\epsilon = 5$ ккал/моль) и получены численные оценки ряда других величин.

В последнее время большое внимание уделяется изучению динамики биологических систем с помощью эффекта Мёссбауэра (ЭМ) для атомов ^{57}Fe , введенных в состав белка [1—3]. Резкое уменьшение вероятности резонансного поглощения f' в ограниченной области температур (рис. 1) без заметного уширения мёссбауэровской линии (м. л.) не поддается интерпретации в рамках теоретических моделей, принятых для описания ЭМ как в твердых [4—6], так и в жидких [7—9] средах.

Как известно, спектр поглощения (излучения) γ -квантов мёссбауэровским ядром (м. я.) для классического стационарного гауссовского случайного процесса может быть представлен в виде [5, 10]

$$g(\omega) = \frac{Re}{\pi} \int_0^\infty \exp \{ -i(\omega - \omega_e - i\Gamma/2)t - \langle [\Delta x(t)]^2 \rangle / 2\chi^2 \} dt, \quad (1)$$

где ω_e — частота излучения без отдачи, Γ — естественная ширина линии ($\Gamma \approx 0,7 \times 10^7$ с $^{-1}$), λ — длина волны, деленная на 2π ($\lambda \approx 0,13$ А), $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ — среднее квадратичное смещение м. я. за время t , $g(\omega)$ нормирована на 1.

В жидкостях вследствие неограниченной диффузии $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \sim Dt$ (D — коэффициент диффузии) и резкое падение интенсивности резонансного поглощения $g(\omega_e)$, наблюдавшееся ранее при плавлении твердых тел, всегда было связано с резким уширением спектра и исчезновением м. л. [2, 7—9].

В случае твердых тел движение м. я. обычно моделируется гармоническим осциллятором с малым затуханием [10]:

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle x_a^2 \rangle (1 - e^{-\frac{\gamma}{m}t} \cos \omega_0 t), \quad (2)$$

где x_a — амплитуда, ω_0 — частота, γ — эффективный коэффициент трения, m — масса осциллятора. Условие малости затухания состоит в

$\frac{\gamma}{m} \ll \omega_0$. Подставляя (2) в (1), разлагая $\exp\left\{\frac{\langle x_a^2 \rangle}{2\chi^2} e^{-\frac{\gamma}{m}t} \times \cos \omega_0 t\right\}$ в ряд по функциям Бесселя и учитывая определение фактора f' :

$$f' = \int_{|\omega - \omega_0| \sim \Gamma} g(\omega) d\omega, \quad (3)$$

получим f' в двух предельных случаях:

$$f' = e^{-a^2} I_0(a^2) \text{ при } \frac{\gamma}{m} \ll \Gamma \ll \omega_0, \quad (4)$$

$$f' = e^{-a^2} \text{ при } \omega_0 \gg \frac{\gamma}{m} \gg \Gamma, \quad (5)$$

где мы ввели $a^2 = \langle x_a^2 \rangle / 2\lambda^2$. Для классического осциллятора, находящегося в тепловом равновесии $a^2 = kT / m\omega_0^2 \cdot \lambda^2$, $I_0(a^2)$ — модифицированная

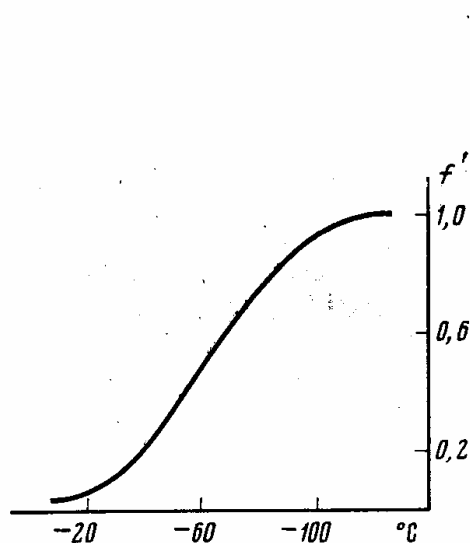


Рис. 1

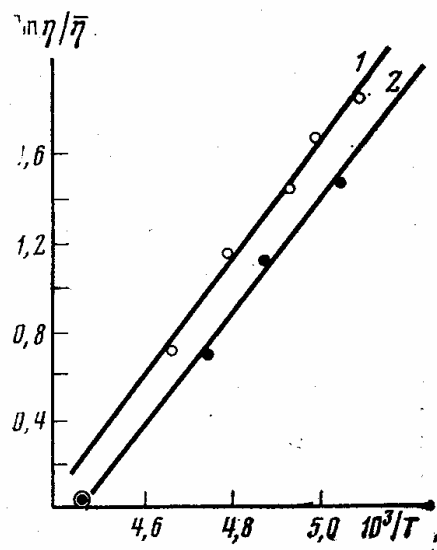


Рис. 2

Рис. 1. Типичная зависимость $f'(T)$ для белковых структур [1, 2]

Рис. 2. Температурная зависимость микровязкости (коэффициента трения) для препаратов реакционных центров фотосинтетических мембран из *R. rubrum*, восстановленная по соответствующей функции $f'(T)$ [1]. 1, 2 — значения, полученные без учета и с учетом зависимости a^2 от T соответственно

функция Бесселя. Аналогичные формулы могут быть получены и для квантового осциллятора [6]. Условие $\frac{\gamma}{m} \ll \Gamma$ (т. е. $\frac{\gamma}{m} \ll 10^{12} \text{ с}^{-1}$) в конденсированной фазе обычно невыполнимо [11], и вероятность $f'(T)$ для твердых тел определяется фактором Дебая — Валлера (5). В этой модели уменьшение вероятности ЭМ с увеличением температуры связано с увеличением амплитуды колебания x_a . При реальных значениях массы m и частоты движения фрагментов молекул ω_0 зависимость $f'(T)$, определяемая фактором Дебая — Валлера, не может быть согласована с зависимостью, наблюдаемой для белков (рис. 1). По этой же причине валентные колебания ^{57}Fe , по-видимому, не вносят заметного вклада в изменение $f'(T)$.

С другой стороны, м. я. связанное с полипептидными цепочками участвует также в конформационных движениях белка. Известно, что фрагменты белковой цепи обладают определенной упругостью [12]. Сопротивление движению участков макромолекулы со стороны окружающей

среды можно описывать в терминах микровязкости η и оценивать коэффициент трения по формуле Стокса

$$\gamma \approx 6\pi b\eta, \quad (6)$$

где $b \sim 1-10$ Å — характерный линейный размер движущегося участка цепи. Из этих соображений приходим к уравнению движения для м. я. вместе с фрагментом белковой цепи

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} + \gamma \frac{dx}{dt} + m\omega_0^2 x = F(t), \quad (7)$$

где $m\omega_0^2$ — константа упругости участка цепи, $F(t)$ — случайная сила, обусловленная тепловыми флуктуациями в системе, m — эффективная масса фрагмента. Оценка скорости затухания осциллятора, соответствующего конформационной моде при минимально возможном значении

$\eta \sim 10^{-2}$ пз (вязкость воды), дает значение $\frac{\gamma}{m} > 10^{15} \text{ с}^{-1}$. Это много больше реально возможной частоты $\omega_0 \sim 10^{12} \text{ с}^{-1}$ для этой моды. Следовательно, интересуясь ЭМ в белках, мы должны в отличие от твердого тела исследовать случай $\gamma/m \gg \omega_0$. Физически это соответствует ограниченной диффузии частицы в параболическом «ящике».

Среднее квадратичное смещение для броуновского осциллятора (4) может быть представлено в виде [10] $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = 2[\varphi(0) - \varphi(t)]$, где корреляционная функция $\varphi(t)$ определяется формулой

$$\varphi(t) = 2kT\gamma \int_{-\infty}^{\infty} d\omega e^{-i\omega t} / [m^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \gamma^2 \omega^2]. \quad (8)$$

Формула (8) обычно используется в случае $\gamma/m \ll \omega_0$, что приводит к ранее рассмотренной формуле (2). В противоположном случае ограниченной диффузии $\gamma/m \gg \omega_0$ и

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \approx \langle x_a^2 \rangle (1 - e^{-t/\tau_c}), \quad (9)$$

где $\langle x_a^2 \rangle = 2kT/m\omega_0^2$ — квадрат амплитуды, $\tau_c = \gamma/m\omega_0^2$ — время корреляции ограниченной диффузии. Физический смысл времени τ_c ясно виден из формулы (9).

Подставляя (9) в (1), можно показать, что вероятность ЭМ критическим образом зависит от отношения τ_c к времени жизни м. я. $\tau_i = 1/\Gamma \sim 10^{-7} \text{ с}$. В конечном счете эта зависимость связана с величиной смещения (относительно λ) м. я. за время жизни τ_i : $\langle [\Delta x(\tau_i)]^2 \rangle$. В случае $\tau_c \gg \tau_i$ вязкость среды столь велика, что ядро вместе с фрагментом цепи не успевает заметно сместиться за время τ_i и фактор $f' \approx 1$. В противоположном случае $\tau_c \ll \tau_i$ среднее квадратичное смещение (9) за время τ_i определяется полной амплитудой x_a и $f' = e^{-a^2}$. При $\tau_c \sim \tau_i$ происходит резкий переход от значений $f' \sim 1$ до $f' \sim e^{-a^2}$. Рассмотрим это подробнее.

Спектр $g(\omega)$ в интересующем нас случае состоит из двух компонент: резкой м. л. и широкой линии (см. приложение). Используя (9) и выделяя в (1) резонансный множитель путем интегрирования по частям, получим

$$g(\omega) = \pi^{-1} \text{Re} \left[\frac{\Gamma}{2} + i(\omega - \omega_e) \right]^{-2} \times \\ \times \left\{ 1 - \tau_c^{-1} a^2 e^{-a^2} \int_0^{\infty} \exp[-i(\omega - \omega_e - i\Gamma/2 - i\tau_c^{-1})t + a^2 e^{-t/\tau_c}] dt \right\}. \quad (10)$$

Учитывая в (10) только вклад м. л., делая подстановку $y = e^{-t/\tau_c}$ и интегрируя по ω , получим формулу для вероятности ЭМ в случае, свя-

занном с конформационной подвижностью макромолекул:

$$f' = 1 - a^2 e^{-a^2} \int_0^1 y^{n(T)} e^{a^2 y} dy, \quad (11)$$

где

$$n(T) = \gamma(T) \Gamma / 2m\omega_0^2 = \tau_c / 2\tau_i^*.$$

Формула (11) хорошо описывает наблюдаемые зависимости $f'(T)$ для белков [1, 2] (рис. 1). На участке резкого падения значений f' основную роль играет не медленное увеличение параметра $a^2(T)$, а экспоненциальное уменьшение $\gamma(T)$. Температурная зависимость $\gamma(T)$ характеризуется микровязкостью $\eta(T) = \eta e^{\epsilon/kT}$, где ϵ — энергия активации микровязкого течения (см. (6)). На рис. 2 представлена зависимость $\eta(T)$ (или $\gamma(T)$), восстановленная по формуле (10) из температурной зависимости фактора f' для препаратов реакционных центров фотосинтетических мембран из *Rhodospirillum rubrum* [1]. График $\eta(T)$ хорошо линеаризуется в аррениусовских координатах. Найденная энергия активации $\epsilon = 5$ ккал/моль. Амплитуда конформационных движений при $T = 250$ К $x_a \approx 0,32$ А. Принимая размер движущегося сегмента $b \sim 5$ А, получим для микровязкости $\eta \approx 10^4$ пз (при $T = 224$ К). Экстраполируя вязкость к комнатным температурам, получим $\eta \approx 10^2$ пз, что на порядок выше вязкости глицерина.

Необходимо отметить, что резкое возрастание вероятности ЭМ при дегидратации белков [1, 2] очевидным образом может быть интерпретировано в рамках предложенной модели. Уменьшение содержания воды в водно-белковом комплексе приводит к уменьшению свободного (от белка) объема и в соответствии с теорией [13] экспоненциальному росту вязкости η . Следствием этого и является резкое возрастание фактора f' .

В заключение следует отметить, что рассмотренное выше влияние вязкости среды на вероятность ЭМ специфично для макромолекулярных структур. Динамика конформационной подвижности этих систем хорошо моделируется броуновским осциллятором с большим затуханием. Роль вязкости в этом случае состоит в изменении времени корреляции ограниченной диффузии звеньев макромолекулы. Этот случай принципиально отличается от свободного броуновского движения, которое приводит лишь к уширению (и исчезновению) мёссбауэровской линии.

Приложение 1. О температурной зависимости формы мёссбауэровского спектра в случае ограниченной диффузии.

Как отмечалось выше спектр $g(\omega)$ состоит из двух компонент: широкой линии и узкой м. л. Детальный анализ вида спектральной функции $g(\omega)$ может быть проведен в рамках следующего приближения для формулы (9):

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle \approx \begin{cases} \langle x_a^2 \rangle t / \tau_c; & t \leq \tau_c \\ \langle x_a^2 \rangle; & t > \tau_c. \end{cases} \quad (11)$$

Приближение (1.1) фактически эквивалентно задаче об ограниченной диффузии частицы в прямоугольном потенциальном «ящике». В последнем случае под временем корреляции понимается время диффузии частицы между стенками: $\tau_c \sim \langle x_a^2 \rangle \gamma / 2kT$.

Подставляя (1.1) в (1) получим $g(\omega)$ в явном виде

$$g(\omega) = \frac{\Gamma/2\pi}{(\omega - \omega_0)^2 + \Gamma^2/4} P_0 + \frac{(\Gamma + 2a^2\tau_c^{-1})/2\pi}{(\omega - \omega_0)^2 + (\Gamma + 2a^2\tau_c^{-1})^2/4} (1 - P_1) \quad 1.2.$$

* Область применимости формул (10), (11) существенно шире модели осциллятора с сильным затуханием и определяется только видом корреляционной функции $\langle x(0)x(t) \rangle \sim e^{-t/\tau_c}$ (см. приложение 2).

где

$$P_0 = \left[\cos(\omega - \omega_e) \tau_c - \frac{2(\omega - \omega_e)}{\Gamma} \sin(\omega - \omega_e) \tau_c \right] \exp(-a^2 - \Gamma \tau_c / 2)$$

$$P_1 = \left[\cos(\omega - \omega_e) \tau_c - \frac{2(\omega - \omega_e)}{\Gamma + 2a^2 \tau_c^{-1}} \sin(\omega - \omega_e) \tau_c \right] \exp(-a^2 - \Gamma \tau_c / 2). \quad (1.3)$$

Напомним, что $a^2 = \langle x_a^2 \rangle / 2\chi^2$.

Температурная зависимость формы линии $g(\omega)$ связана с экспоненциальной зависимостью $\tau_c \sim e^{\varepsilon/\hbar T}$. При низких температурах ($\tau_c \gg \tau_l$) смещение м. я. за время излучения γ -кванта много меньше размеров «ям», и ситуация ничем не отличается от обычной диффузии. При этом с увеличением температуры наблюдается уширение м. л. до значений ширины порядка $(1+a^2)\Gamma$ (рис. 3, 1) (для случая, рассмотренного выше $a^2 \approx 3$).

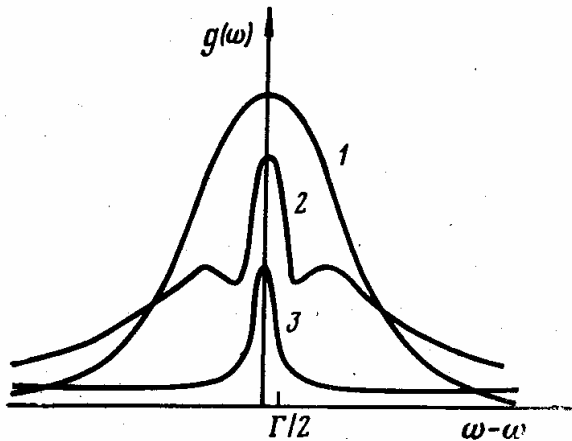


Рис. 3

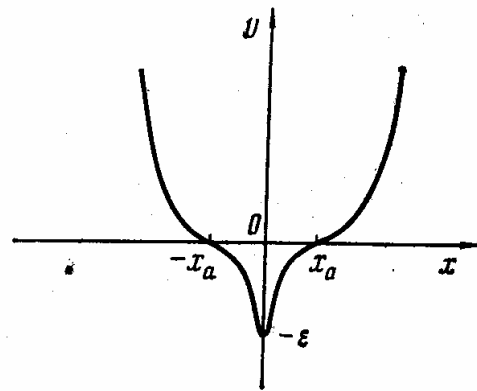


Рис. 4

Рис. 3. Изменение формы спектра при увеличении температуры. 1 — $\tau_c \gg \tau_l$, $a^2 \gg 1$; 2 — $\tau_c \sim \tau_l$; 3 — $\tau_c \ll \tau_l$

Рис. 4. Анггармонический потенциал, необходимый для формального соответствия фактора Дебая — Валлера и зависимости $f'(T)$ в белках

В промежуточной области температур ($\tau_c \sim \tau_l$) становится заметным вклад неуширенной компоненты: $P_0 \sim e^{-a^2}$. При этом в игру вступает тригонометрический множитель, который приводит к уменьшению эффективной ширины до значений порядка Γ и появлению слабо выраженной структуры (рис. 3, 2).

При $\tau_c \ll \tau_l$ уширенная часть спектра воспринимается как гладкий фон, на котором резко выделяется узкая м. л. (рис. 3, 3).

Неоднородное уширение спектра приводит к маскировке этих эффектов.

Приложение 2. Об альтернативных интерпретациях резкой зависимости $f'(T)$ без уширения мессбауэровской линии.

Формально наблюдаемые зависимости $f'(T)$ [1, 2] могут быть интерпретированы в рамках теории ЭМ для сильно ангармонического осциллятора (рис. 4): $f' \simeq \exp(-\langle x^2 \rangle / 2\lambda^2)$. Однако такая форма потенциала требует дополнительных обоснований и представляется в настоящее время маловероятной.

С другой стороны, интерес вызывает модель двух конформационных состояний, описываемых узкими потенциальными «ямами», разделенными относительно широким ($\sim 0,5$ Å) барьером [3, 14] (рис. 5). При низких температурах частица локализована в одной из «ям» и фактор $f' \approx 1$. При повышении температуры за время излучения τ_l частица совершает перескоки из одной «ям» в другую, что приводит к уменьшению вероят-

ности f' и деформации спектра $g(\omega)$. Эта модель допускает точное решение.

Очевидно, что рассматриваемые прыжки между локализованными состояниями являются независимыми случайными событиями и вероятность совершить n прыжков за время t дается распределением Пуассона

$$p(n, t) = e^{-Kt} (Kt)^n / n!, \quad (2.1)$$

где $K = \frac{kT}{h} e^{-\varepsilon/kT}$ — средняя частота прыжков в единицу времени.

В случае малого числа состояний (в данном случае двух) рассматриваемый случайный процесс не является гауссовским и для спектраль-

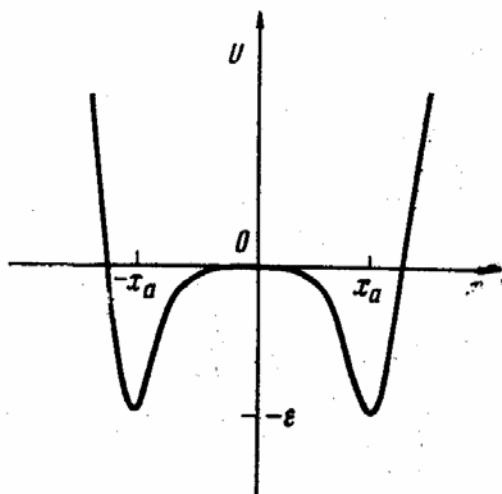


Рис. 5. Модель двух конформационных состояний

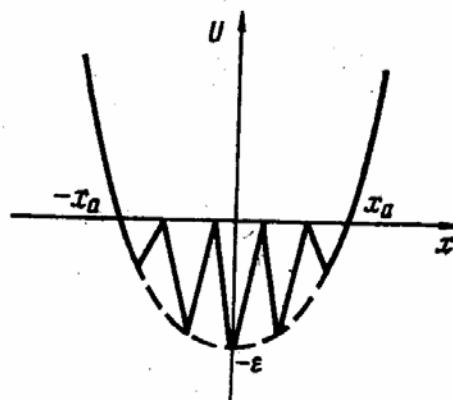


Рис. 6. Имитация вязкости потенциальной «гребенкой»

ной функции $g(\omega)$ вместо формулы (1) нужно использовать более общее соотношение [10]:

$$g(\omega) = \pi^{-1} \operatorname{Re} \int_0^\infty \langle e^{\frac{i}{\hbar} [x(t) - x(0)]} \rangle e^{-i(\omega - \omega_e)t - \frac{\Gamma}{2}t} dt. \quad (2.2)$$

В нашем случае, используя (2.1), легко показать, что

$$\langle \exp \{i [x(t) - x(0)] / \hbar\} \rangle = \cos^2 x_a / \hbar + e^{-2Kt} \sin^2 x_a / \hbar. \quad (2.3)$$

Подставляя (2.3) в (2.2) и интегрируя, получим

$$g(\omega) = \frac{\Gamma/2\pi}{(\omega - \omega_e)^2 + \Gamma^2/4} \cos^2 x_a / \hbar + \frac{(\Gamma + 4K)/2\pi}{(\omega - \omega_e)^2 + (\Gamma + 4K)^2/4} \sin^2 x_a / \hbar. \quad (2.5)$$

Таким образом, в этом случае, так же как и в рассмотренном выше, спектр состоит из широкой линии и узкой м. л. Однако вид весовых множителей резко отличается от предыдущего случая. Это связано с тем, что в рассматриваемой задаче мы фактически имеем дело с интерференцией излучения от двух «ям».

Так как $x_a \gg \lambda$ и в реальной системе расположение молекул хаотическое, то $\sin^2 x_a / \hbar$ и $\cos^2 x_a / \hbar$ должны быть заменены на их среднее значение: $1/2$. Отсюда следует, что резкое падение фактора f' более чем в два раза не может быть объяснено в рамках модели двух состояний. Наблюдаемое резкое уменьшение f' может быть интерпретировано при учете большого числа промежуточных состояний (рис. 6). При этом потенциальная «гребенка» практически имитирует вязкость и фактор f' определяется формулой (11). Оценки показывают, что время корреляции в этой модели $\tau_c \approx \frac{h}{kT}$ и согласие с экспериментом [1] достигается при $\varepsilon = 5$ ккал/моль.

1. Берг А. И., Нокс П. П., Кононенко А. А., Фролов Е. Н., Хрымова Н. Н., Рубин А. Б., Лихтенштейн Г. И., Гольданский В. И., Парак Ф., Букл М., Мессбауэр Р., Мол. биол., 13, 81, 1979.
2. Фролов Е. Н., Белоногова О. В., Лихтенштейн Г. И., в сб.: Равновесная динамика нативной структуры белка, под ред. Э. А. Бурштейна, стр. 99—142, Пущино, 1977.
3. Chernavskii D. S., Frolov E. N., Goldanskii V. I., Kononenko A. A., Rubin A. B., Proc. Nat. Ac. Sci. USA, in press, 1980.
4. Mössbauer R., Z. Naturforsch., 14a, 211, 1959.
5. Шапиро Ф. Л., Успехи физ. наук, 72, 685, 1960.
6. Липкин Г., Квантовая механика, «Мир», М., 1977.
7. Boyle A. J. F., Bunbury D. St. P., Edwards S., Hall H. E., Proc. Phys. Soc., 77, 129, 1961.
8. Craig P. P., Sutin N., Phys. Rev. Lett., 11, 460, 1963.
9. Bunbury D. St., Elliott J. A., Hall H. E., Williams J. M., Phys. Lett., 6, 34, 1963.
10. Хир К., Статистическая механика, «Мир», М., 1976.
11. Джиджоев М. С., Осипов А. И., Панченко В. Я., Платоненко В. Т., Хохлов Р. В., Шайтан К. В., ЖЭТФ, 74, 1307, 1978.
12. Блюменфельд Л. А., Проблемы биологической физики, «Наука», М., 1978.
13. Френкель Я. И., Кинетическая теория жидкостей, «Наука», Л., 1975.
14. Fraenfelder H., Nature, 280, 565, 1979.

Поступила в редакцию 3.I.1980

THEORY OF MÖSSBAUER EFFECT IN PROTEINS

K. V. SHAITAN, A. B. RUBIN

Biological Department, M. V. Lomonosov Moscow State University

Specific features of the Mössbauer effect on proteins are discussed. A sharp decrease in $f'(T)$ at temperature above 200° K that was found is due to the specificity of conformational mobility of proteins and due to a smaller correlation time for spatially—confined diffusion of a Mössbauer label tracer below a critical value of $\tau \sim 10^{-7}$ s (the lifetime of ^{57}Fe excitation). Protein conformational mobility is described by a Brownian strongly damped oscillator. For this model, a new formula for the Mössbauer effect probability is derived. Calculations by the formula and corresponding experimental data are in good accord. By the formula for $f'(T)$, a theoretical temperature dependence of medium microviscosity (with an activation energy of 5 kcal/mol) and estimates for some parameters are obtained.