

МНОГОМАСШТАБНОЕ МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАШИН: ПРОБЛЕМЫ И СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ

Аветисов В.А.¹, Бикулов А.Х.¹, Зубарев А.П.², Мешков Д.А.¹

¹ *Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, Москва*

² *Самарский государственный университет, Самара*

avetisov@chph.ras.ru

Поступила 26.01.2012

В обзоре представлен новый подход к математическому моделированию «молекулярных машин» наноразмерного масштаба, естественными прототипами которых являются белки. Подход основан на ультраметрических конструкциях и их описании в рамках p -адического математического анализа. Представлены экспериментальные наблюдения, демонстрирующие нетривиальные свойства флуктуационно-динамической подвижности белковой молекулы и ее связь с функцией белка, описаны основные ультраметрические конструкции, моделирующие многомасштабную динамику белковой молекулы, дано физическое толкование ультраметрических конструкций и показано, как такие конструкции могут быть использованы практически, в частности, для развития методов математического моделирования молекулярных машин.

УДК 501; 577

1. Введение

Уже более четверти века словосочетание "молекулярная машина" или "наномашина" употребляется как синоним термину "белок" (точнее, "фермент", т.е. функционально активный белок), подчеркивая тем самым способность этих биологических макромолекул проводить операции на атомном уровне так же точно, как это делают устройства и машины (см., например, [1-3]). Сейчас термин "молекулярная машина" стал особенно модным и практически везде сопровождает (и даже вытесняет) классический в биологии термин "фермент". Для примера тут часто обращаются к так называемым "молекулярным моторам" – белкам семейств кинезинов, миозинов или АТФаз,

осуществляющих перемещение макромолекулярных фрагментов нано-размерного масштаба за счет энергии, выделяемой ими же при контролируемом превращении, например, молекулы АТФ в молекулу АДФ.

Вместе с впечатляющими иллюстрациями устройства и работы молекулярных моторов, созданными на границе физико-химии и компьютерного моделирования, в другой, несколько экстравагантной области – проблеме возникновения жизни, было осознано, что точное выполнение операций на атомном уровне является необходимым условием создания таких сложных функциональных систем, какими являются даже простейшие биологические объекты. Предъявлены весьма серьезные аргументы, указывающие на то, что путь к живым системам мог лежать только через технологию точного оперирования на атомном уровне, которая и была создана природой прежде, чем возникли первые биологические объекты [4,5]. Даже такие простые с химической точки зрения, процессы как, например, связывание малых лигандов, выполняются в живой клетке белками-ферментами. Белковая молекула является уникальным природным прототипом молекулярной машины, и физические принципы и механизмы, определяющие функциональность белков, всегда были и остаются классической областью теоретической биофизики. Математические модели белков, а в более широком смысле – молекулярных машин, играют тут ключевую роль.

Обсудим вначале те проблемы, которые возникают при описании флуктуационно-динамической подвижности таких сложных многоатомных структур, как белки. Формально, для описания подвижности молекулярной структуры нужно, прежде всего, задать множество состояний структуры (будем называть их конфигурационными состояниями) и потенциальную энергию структуры, как функцию ее состояний. Пусть макромолекулярная структура состоит из N элементов (атомов, молекулярных звеньев или фрагментов полимерной цепи, в зависимости от представления макромолекулы), каждый из которых имеет m степеней свободы. Для описания конфигурационных состояний можно ввести евклидово пространство размерности $M = Nm$ и каждому состоянию сопоставить M – мерный вектор $\mathbf{R} = \{r_1 \dots r_M\}$. Потенциальную энергию $\Phi(\mathbf{R})$ в состоянии \mathbf{R} , вообще говоря, можно определить из межатомных потенциалов. Функция $\Phi(\mathbf{R})$ будет представлять собой гиперповерхность над многомерным пространством конфигурационных состояний. Ее принято называть энергетическим ландшафтом. Задавая подходящие уравнения движения на энергетическом ландшафте можно описать динамику структуры.

В тех случаях, когда рассматриваемая структура имеет не слишком большое число степеней свободы, такая программа может быть реализована если не аналитически, то численно. В литературе имеется труднообозримое число работ по компьютерным методам реконструкции энергетических ландшафтов и моделирования подвижности молекулярных структур относительно небольших размеров (см., например, [6] и цитируемую там литературу). Но в сравнении с этими структурами, белки очень большие молекулы. Типичное число степеней свободы белковой молекулы порядка 10^3 . При этом, для функционирования белка, преобразующего, например, химическую энергию субстрата в движение наноразмерных молекулярных фрагментов, оказываются важными как мелкомасштабная подвижность белковой молекулы, контролирующая химическое превращение в активном центре, так и движение крупных молекулярных фрагментов, определяющее соответствующую биологическую функцию. Иначе говоря, для функции белка важна не только крупномасштабная структура энергетического ландшафта, но и его мелкомасштабная структура. И проблема тут в том, что из-за многочисленных топологических и энергетических ограничений, обусловленных неразрывностью белковой полимерной цепи и ее плотной пространственной укладкой, энергетические ландшафты белков оказываются при детальном рассмотрении "слишком пересеченными".

Число 10^{100} дает вполне подходящее представление о числе локальных минимумов на энергетическом ландшафте белка (см., например, [6]). Понятно, что при моделировании подвижности и функции белка полное описание таких энергетических поверхностей невозможно даже численно. Заметим, что многочисленные примеры компьютерного моделирования динамики многоатомных структур, сопоставимых по сложности с белком, в действительности, дают либо детальную картину поведения молекулярной структуры, но в малой области конфигурационного пространства, либо, при грубом описании структуры, радикально снижающем число ее степеней свободы, эскизную картину поведения в целом. Принципиальные ограничения численных методов в применении к так называемым "сложным системам" особенно ясно проявляются в задачах, где требуется многомасштабное описание, учитывающее одинаково хорошо мелко-масштабные, промежуточные и крупномасштабные движения многоатомных систем. Моделирование в таких случаях нуждается, конечно, в упрощении, которое, вообще говоря, не обязано быть универсальным, но должно быть релевантным структурам рассматриваемого типа. Для белковых молекул, в последние годы такое упрощение построить удалось. В следующих двух разделах мы обсудим его основные идеи и математические конструкции.

2. Метод иерархического приближения

Метод многомасштабного математического моделирования подвижности белковой молекулы, которому в данном обзоре уделено основное внимание, органически вырос из представления многомерных сильно пересеченных ландшафтов древообразными графами [6-9]. Такое представление, широко используемое сейчас при компьютерном моделировании макромолекулярных структур, основано на нескольких положениях.

Первое заключается в том, что вместо всех конфигурационных состояний многоатомной структуры рассматривают только ее квазиравновесные конфигурации, т.е. конфигурации, отвечающие локальным минимумам энергетического ландшафта. Физически это оправдано именно для сильно пересеченных ландшафтов, когда из почти любого состояния система быстро "скатывается" в ближайший локальный минимум и находится в нем существенно дольше времени "скатывания". Соответственно, флуктуационно-динамическая подвижность структуры моделируется не элементарными (малыми) смещениями в конфигурационном пространстве, а скачкообразными переходами между квазиравновесными состояниями (локальными энергетическими минимумами). Заметим, что этот шаг, сам по себе, еще не упрощает моделирование таких структур, как белки, поскольку имеется астрономически большое число квазиравновесных состояний (локальных минимумов), которые нельзя перечислить, используя даже рекордные вычислительные ресурсы.

Второе положение заключается в том, что все множество локальных минимумов ландшафта разбивается иерархическим образом на вложенные друга в друга подмножества (бассейны) минимумов. Технически, такое разбиение осуществляется подобно топографии природных ландшафтов с помощью эквипотенциальных сечений [6,8]. Используя такой прием, множество квазиравновесных состояний разбивают на большие бассейны локальных минимумов, разделенные на ландшафте большими энергетическими барьерами, большие бассейны разбивают на вложенные в них меньшие бассейны, разделенные более низкими энергетическими барьерами, те, в свою очередь, еще на меньшие бассейны и т.д., до собственно локальных минимумов. В результате, многомерному энергетическому ландшафту сопоставляется древообразный граф, "листья" (узлы на границе дерева) которого отвечают локальным минимумам ландшафта, а ветвления – точкам "перевала", через которые осуществляются переходы между локальными

ми минимумами. На рис. 1 из работы [9] схематически показаны типы многомерных энергетических ландшафтов в представлении древообразных графов.

Представление многомерных сильно пересеченных энергетических ландшафтов древообразными графами позволяет перейти к описанию подвижности структуры в терминах переходов через энергетические барьеры, разделяющие *бассейны состояний*, а не сами состояния. Этот замена, по существу, означает, что из всех энергетических барьеров, которые находятся на пути перехода из одного локального минимума в другой, выбирается только *максимальный барьер*, и считается, что он и дает основной вклад в вероятность перехода между данными локальными минимумами. В результате, вероятность перехода между любой парой локальных минимумов определяется только тем барьером, который разделяет два наибольших неперекрывающихся бассейна, в каждом из которых лежит по одному из минимумов. Данное приближение было названо в [8] "межбассейновой кинетикой" (basin-to-basin kinetics).

Нетрудно заметить, что в межбассейновой кинетике времена переходов ($\tau \sim \exp\{E/kT\}$, E – барьер перехода) между любыми тремя состояниями (локальными минимумами) подчиняются сильному неравенству треугольника $\tau_{2,3} \leq \max\{\tau_{1,2}, \tau_{1,3}\}$. Сильное неравенство треугольника, в отличие от неравенства треугольника $\tau_{2,3} \leq \tau_{1,2} + \tau_{1,3}$, разрешает только равносторонние и равнобедренные треугольники с меньшим основанием (рис. 2). Расстояние, которое удовлетворяет сильному неравенству треугольника, называют ультраметрическим расстоянием, и переход к межбассейновой кинетике, по существу, означает введение ультраметрического пространства состояний системы.

Понимая скачкообразные переходы между локальными минимумами ландшафта как марковский случайный процесс, можно записать стандартное кинетическое уравнение вида

$$\frac{d\mathbf{f}(t)}{dt} = \mathbf{W}\mathbf{f}(t), \quad (2.1)$$

где $\mathbf{f}(t)$ вектор (столбец), i -ая компонента которого есть вероятность найти систему в состоянии i (i -ом локальном минимуме) в момент времени t , а элементы кинетической матрицы \mathbf{W} задают вероятности переходов (в единицу времени) между состояниями (локальными минимумами). Матрица \mathbf{W} , таким образом, описывает энергетический ландшафт системы. Отметим, что диагональные элементы матрицы \mathbf{W} равны сумме элементов соответствующего столбца с обратным знаком, т.е., в покомпонентной записи, матричному уравнению (2.1) отвечает система дифференциальных уравнений вида

$$\frac{df_i}{dt} = \sum_{j \neq i} (w(i|j)f_j - w(j|i)f_i), \quad (2.2)$$

правая часть которых описывает переходы в i -тое состояние и обратные переходы. Специфика бассейнового описания заключается лишь в том, что матрица \mathbf{W} имеет теперь блочно-иерархическую структуру, отражающую тот факт, что одна и та же вероятность перехода относится к *подмножествам состояний*, и эти подмножества вложены друг в друга иерархическим образом (см. рис. 3).

В физической литературе, блочно-иерархические матрицы часто называют матрицами Паризи [10]. Основное кинетическое уравнение (2.1) с матрицей переходов вида матрицы Паризи может пониматься как уравнение, описывающее случайное блуждание на древообразном графе, с той лишь оговоркой, что состояниям отвечают только "листья" дерева, и переход между любой парой состояний осуществляется через вершину минимального поддерева, включающего эти состояния.

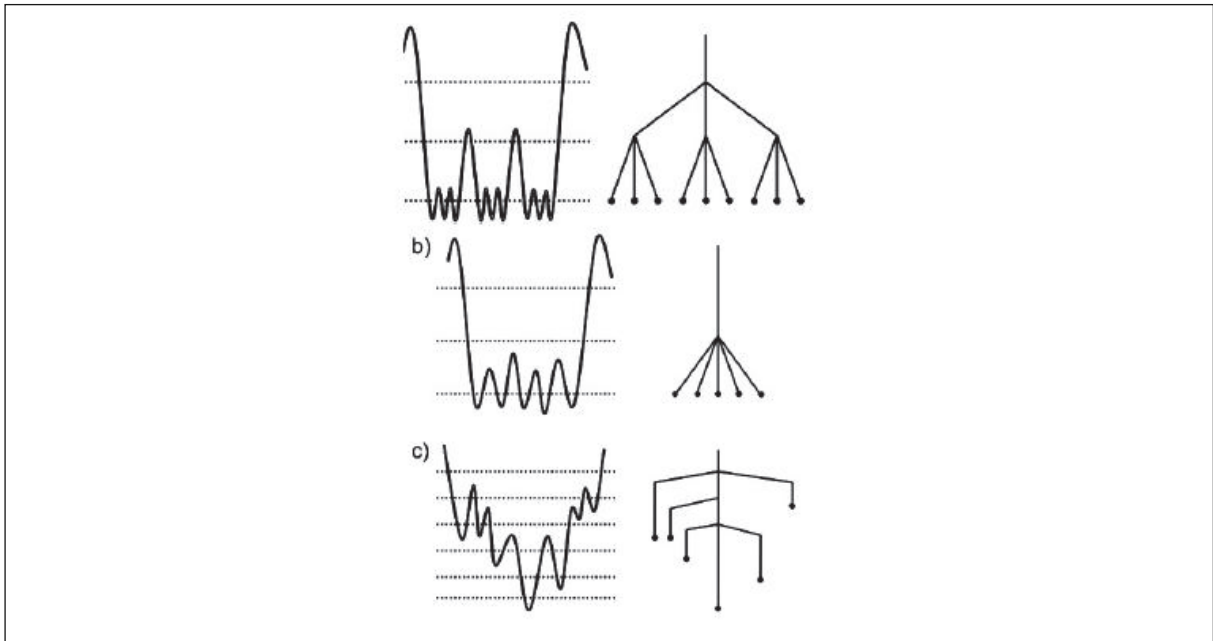


Рис. 1. Схематическое изображение многомерных сильно пересеченных энергетических ландшафтов (слева) и их представление древообразными графами (справа).

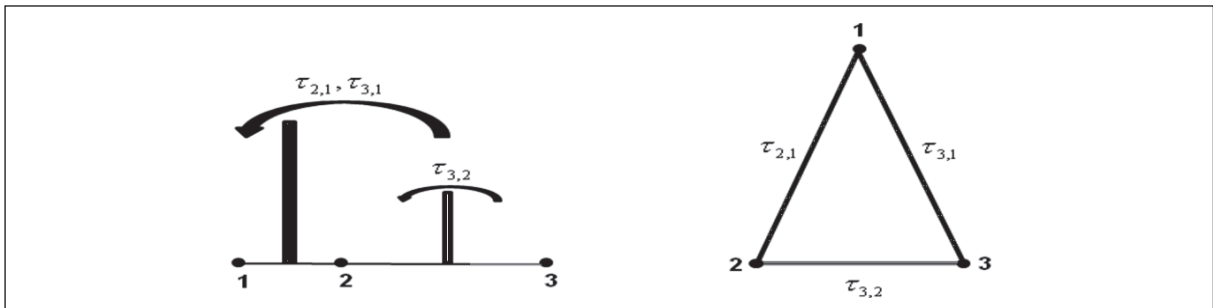


Рис. 2. Правило максимального барьера для переходов между состояниями 1, 2 и 3 (слева) и соотношение сторон метрического треугольника для времен переходов между этими состояниями (справа).

Если вершины древообразного графа энергетического ландшафта ассоциировать с активационными барьерами, то условие перехода через вершину минимального поддерева эквивалентно условию максимального барьера между состояниями и, соответственно, условию сильного неравенства треугольника для времен переходов ($\tau_{ij} \sim w_{ij}^{-1}$) между тройкой состояний. По последней причине, случайное блуждание на границе дерева можно понимать как блуждание на ультраметрической решетке. Марковский случайный процесс этого типа называют в физической литературе ультраметрической диффузией (см. например, [11-13]). Первые теоретические модели и исследования ультраметрической диффузии в середине 80-х годов прошедшего столетия были мотивированы как раз попытками построить многомасштабное математическое описание подвижности белковой молекулы [12]). Однако добиться тут значимых результатов в рамках матричного описания межбассейновой кинетики не удалось. Вплоть до начала 2000-х, так и оставалось неясным, адекватно или нет приближение межбассейновой кинетики, а в математическом отношении, ультраметрическое пространство состояний, реальной белковой подвижности.

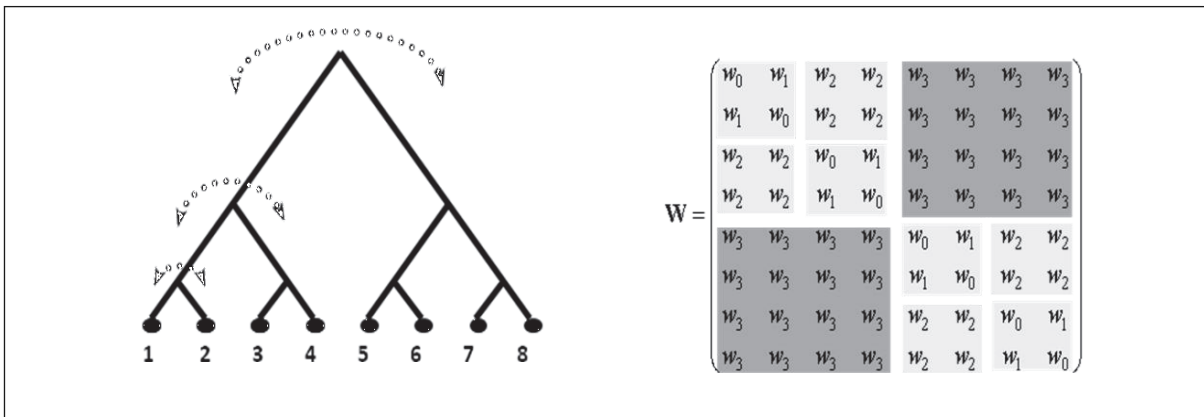


Рис. 3. Переходы между бассейнами, иерархия которых представлена регулярным (2-адическим) деревом. Справа показана блочно-иерархическая кинетическая матрица, отвечающая переходам между состояниями ("листьями" дерева).

Ситуация принципиально изменилась, когда весь этот подход был реализован на основе описания иерархии бассейнов p -адическими числами, а межбассейновой кинетики соответствующими p -адическими кинетическими уравнениями [14-21]. Это было сделано осмысленно, поскольку межбассейновая кинетика, как отмечалось выше, по существу, вводит ультраметрическое пространство состояний, которое описывается полем p -адических, а не вещественных чисел. В результате такого математически естественного шага был открыт путь для построения точно решаемых аналитических моделей, обладающих предсказательной силой, и тем самым, для сравнения теории с экспериментом. Это привело к совершенно новой математической основе многомасштабного моделирования флуктуационно-динамической подвижности белков как молекулярных машин.

В следующих разделах мы остановимся на базовых p -адических конструкциях, уделяя основное внимание их физической интерпретации. Физическое толкование p -адических уравнений нам представляется особенно важным, поскольку и в математической и в физической научной среде достаточно часто высказывается мнение, что все формальные конструкции так называемой " p -адической математической физики" [22] лишены физического содержания уже потому, что ультраметрическое расстояние, в силу неархимедовости, нельзя измерить прибором. Это, конечно, так, однако наш опыт показывает, что p -адическое описание наполнено физическим содержанием не в меньшей степени, чем привычное вещественное описание. При этом, как выясняется, p -адические модели оказываются исключительно эффективными именно там, где традиционные вещественные модели сталкиваются с непреодолимыми трудностями.

3. p -Адическое уравнение ультраметрической диффузии

Прежде всего, построим ультраметрическое случайное блуждание на дискретной решетке. Пусть имеется перенумерованный набор состояний, $i = 1, 2, \dots, p^\Gamma$, где p фиксированное простое число и $\Gamma \gg 1$ целое число. Назовем все это множество состояний бассейном B_Γ уровня Γ . Разобьем множество B_Γ на p непересекающихся подмножеств (бассейнов) $B_{\Gamma-1}(a_1)$ уровня $\Gamma-1$, $a_1 = 1, 2, \dots, p$, каждый из которых содержит $p^{\Gamma-1}$ состояний, $\bigcup_{a_1} B_{\Gamma-1}(a_1) = B_\Gamma$. Энергетический барьер между бассейнами уровня $\Gamma-1$ примем равным E_Γ , и вероятность перехода (в единицу времени) через барьер E_Γ обозначим w_Γ . Разобьем каждый из $B_{\Gamma-1}(a_1)$ бассейнов на p непересекающихся бассейнов $B_{\Gamma-2}(a_1 a_2)$ уровня $\Gamma-2$, $a_2 = 1, 2, \dots, p$, каждый из которых содержит $p^{\Gamma-2}$ состояний, $\bigcup_{a_2} B_{\Gamma-2}(a_1 a_2) = B_{\Gamma-1}(a_1)$. Энергетический барьер между бассейнами уровня $\Gamma-2$, вложенными в один и тот же бассейн уровня $\Gamma-1$, примем равным $E_{\Gamma-1} < E_\Gamma$.

Вероятность перехода (в единицу времени) через барьер $E_{\Gamma-1}$ обозначим $w_{\Gamma-1}$. Энергетический барьер для переходов между бассейнами уровня $\Gamma - 2$, вложенными в *разные* бассейны уровня $\Gamma - 1$, остается равным E_{Γ} . Таким образом, вероятность перехода между двумя состояниями $i \in B_{\Gamma-1}(a_1 a_2)$ и $j \in B_{\Gamma-1}(a'_1 a'_2)$ равна w_{Γ} , если $a_1 \neq a'_1$, и равна $w_{\Gamma-1}$, если $a_1 = a'_1$. Данную процедуру разбиения на бассейны, вложенные друг в друга иерархическим образом, и расстановки между ними более низких барьеров продолжим до уровня 1, на котором каждый "бассейн" содержит одно состояние (локальный минимум). Множество дискретных состояний с так заданными правилами переходов между ними будем называть ультраметрической решеткой [12,14].

Случайное блуждание на ультраметрической решетке B_{Γ} задается основным кинетическим уравнением вида (2.1) с матрицей переходов, элементы которой определены согласно правилам, изложенным выше. Нетрудно понять, что эти правила задают матрицу переходов в виде блочно-иерархической матрицы Паризи.

p -Адическое уравнение ультраметрической диффузии строиться как аналог кинетического уравнения (2.1), в котором состояния, объединенные в бассейны, параметризованы p -адическими числами, а элементы матрицы переходов зависят только от ультраметрического расстояния между состояниями. Покажем, как строится такое описание. Пусть имеется дискретный набор состояний, перенумерованных натуральными числами $i = 1, 2, \dots, p^{\Gamma}$, где p фиксированное простое число. Множество натуральных чисел $\{i\}$ отобразим в множество рациональных чисел $\{x^{(i)}\}$ по правилу

$$l: i = 1 + p^{-1} \sum_{\gamma=1}^{\Gamma} x_{\gamma}^{(i)} p^{\gamma} \rightarrow \sum_{\gamma=1}^{\Gamma} x_{\gamma}^{(i)} p^{-\gamma} = x^{(i)}, \quad x_{\gamma}^{(i)} = 0, \dots, p-1 \quad (3.1)$$

Определим расстояние между состояниями i и j как p -адическую норму разности рациональных чисел $x^{(i)}$ и $x^{(j)}$, $d(i, j) = |x^{(i)} - x^{(j)}|_p$. Напомним, что p -адическая норма рационального числа определяется следующим образом. Представим рациональное число x в виде $x = p^{\gamma} \frac{m}{n}$, где γ целое число и m и n взаимно простые числа. При любом фиксированном простом p такое представление единственное. p -Адическая норма рационального числа x определяется по формуле $|x|_p = p^{-\gamma}$. Например, 2-адическая норма чисел $\{2, 6, 10\}$ (ряд нетрудно продолжить) равна 2^{-1} , а $\{8, 24, 40\}$ – 2^{-3} . p -Адическая норма индуцирует ультраметрическое (неархимедово) расстояние, удовлетворяющее сильному неравенству треугольника. Множество дискретных состояний, наделенное ультраметрическим расстоянием, можно понимать как ультраметрическое пространство состояний.

Нетрудно убедиться [14], что блочно-иерархическая структура матрицы Паризи естественным образом генерируется ультраметрическим расстоянием между состояниями на ультраметрической решетке. Регулярное иерархическое разбиение множества состояний на вложенные бассейны (регулярно ветвящееся дерево бассейнов) соответствует *однородной* ультраметрической решетке. Вероятность перехода между любыми двумя состояниями на однородной решетке зависит только от ультраметрического расстояния между ними, $w(i|j) = \rho(|x^{(i)} - x^{(j)}|_p)$. В этом случае, кинетическое уравнение (2.1) для случайного блуждания можно записать в виде

$$\frac{df(x,t)}{dt} = \sum_{y \neq x} \rho(|x - y|_p) [f(y,t) - f(x,t)] \quad (3.2)$$

Построение p -адического уравнения ультраметрической диффузии (на однородном ультраметрическом пространстве) завершает переход от уравнения (3.2) к его континуальному аналогу на поле p -адических чисел \mathcal{Q}_p . Такое уравнение имеет вид

$$\frac{\partial f(x,t)}{\partial t} = \int_{\mathcal{Q}_p} \rho(|x - y|_p) [f(y,t) - f(x,t)] d_p y \quad (3.3)$$

где $x \in Q_p$, $t \in R$, и интегрирование ведется по мере Хаара $d_p x$ на Q_p . Вещественнозначная (неотрицательная) функция $f(x, t): Q_p \times R \rightarrow R_+$ имеет смысл плотности распределения вероятности и описывает состояние системы в момент времени t . Интеграл $\int_B f(x, t) d_p x$ есть вероятность найти систему в рассматриваемой области B ультраметрического пространства состояний в момент времени t . Функция $\rho(|x - y|_p)$, по существу, описывает энергетический ландшафт в терминах вероятностей переходов (в единицу времени) между локальными минимумами. Отметим, что $\rho(|x - y|_p)$ обладает свойством перестановочной симметрии, ($\rho(|x - y|_p) = \rho(|y - x|_p)$), и трансляционной инвариантности, ($\rho(|x - y|_p) = \rho(|(x - a) - (y - a)|_p)$, $a \in Q_p$). Графическое представление энергетического ландшафта, соответствующего такой функции для переходов, есть регулярно ветвящееся дерево с индексом ветвления $p + 1$ (см. рис. 2а). Характерные масштабы бассейнов и активационных барьеров на таком энергетическом ландшафте зависят только от уровня иерархии, к которому они относятся.

С точки зрения физических приложений, в частности, для сравнения теории с экспериментом, помимо описания движений молекулярной структуры с помощью уравнений (3.2) или (3.3), важно в рамках этого же описания уметь конструировать величины, отвечающие наблюдаемому. Для каждого эксперимента наблюдаемая величина конструируется специально, в зависимости от особенностей эксперимента и способа наблюдения. Ниже мы покажем это на двух примерах – кинетики связывания СО миоглобином и спектральной диффузии в глобулярных белках.

4. Модели и приложения

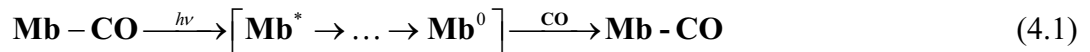
В этом разделе описаны примеры построения p -адических математических моделей многомасштабной подвижности белковых структур. Данные модели разрабатывались для описания реальных свойств белковой подвижности, установленных различными экспериментальными группами в течение нескольких последних десятилетий. Мы обсудим эксперименты, поставленные группой Г. Фрауенфельдера из Центра Нелинейных Исследований Лос-Аламосской Национальной Лаборатории США [23-26] и группой Дж. Фридриха из Мюнхенского технического университета [27-32], поскольку именно в этих экспериментах были установлены отличительные, присущие именно белковой подвижности, свойства, которые оказались к тому же универсальными в исключительно широком диапазоне температур от 300 К до 4 К. Свойства белковой подвижности оказались столь неожиданными и нетривиальными, что более двух десятилетий, практически до появления p -адических математических моделей, подвижность белков оставалась полной загадкой для теории. Помимо этих двух примеров, в данном разделе мы обсудим, как такие p -адические модели можно применять для описания рабочего цикла молекулярной машины [33].

Кинетика связывания СО миоглобином

Идея эксперимента группы Фрауенфельдера (см. [23-25]) была внешне простой – взять белок, осуществляющий достаточно простую ферментативную реакцию, желательной такой, структура которого хорошо изучена, инициировать реакцию, и посмотреть, как меняется скорость реакции при понижении температуры, когда перестройки белковой молекулы замедляются, и их влияние на протекание реакции проявляется все в большей и большей мере. Для этой цели хорошо подходил миоглобин, связывающий в клетке молекулы кислорода и окиси углерода. Структура активного центра миоглобина и химизм образования связи между гемовым железом активного центра и малым лигандом (СО, O₂, NO) в деталях описаны во всех курсах биофизики и биохимии, а сама реакция связывания считается классическим примером ферментативной реакции.

Технически, эксперимент был поставлен следующим образом. Вначале, в подготовленном для исследования образце, молекулы миоглобина находились в связанном состоянии, т.е. молекула лиганда, например, СО, была связана с гемовым железом активного центра. С помощью короткого лазерного импульса, химическая связь СО с гемовым железом быстро разрывалась, и сразу после этого начиналось наблюдение за изменением во времени концентрации тех молекул миоглобина, которые оставались в несвязанном состоянии. Концентрация несвязанных молекул миоглобина уменьшалась за счет обратного связывания СО к миоглобину. Вопрос заключался в том как именно уменьшается концентрация.

Общее представление о характере тех событий, которые следуют за разрывом связи СО с гемовым железом в активном центре белка, было следующим (см. например, [2]). Сразу после разрыва связи наиболее сильные изменения электронной структуры и геометрии активного центра и лиганда происходят за время колебательной релаксации ($\tau \sim 10^{-12} \div 10^{-13}$ с.). Такие практически мгновенно реализующиеся изменения затрагивают только молекулу лиганда и непосредственно контактирующие с ней атомные группы активного центра белка. После окончания релаксации колебательных степеней свободы возникает следующая ситуация. Лиганд и его ближайшее окружение оказываются в новом, локально уравновешенном состоянии, а остальная часть белковой молекулы остается неизменной. Возникает локальное напряжение, инициирующее релаксацию макромолекулы белка к равновесной конфигурации, отвечающей свободному белку. После достижения этой конфигурации, белковая молекула может вновь связаться с лигандом. Ниже представлена схема этого процесса:



Релаксация из локально напряженного, несвязанного состояния Mb^* в функционально активное, но тоже несвязанное состояние Mb^0 должна проходить через множество стадий, имеющих разные характерные времена. Это обусловлено, прежде всего, тем, что локальные смещения отдельных атомов и атомных групп в белке осуществляются в условиях разномасштабных топологических и энергетических ограничений. Для, скажем, смещения определенной группы атомов в активном центре требуется согласованное смещение ее соседей, для чего может потребоваться согласованное смещение уже их соседей, и т.д. Локальное напряжение, вызванное разрывом связи в активном центре, порождает, таким образом, *нелокальный случайный процесс* перестройки молекулы белка, обусловленный взаимозависимыми движениями отдельных атомов, атомных групп и даже целых фрагментов белковой молекулы. Именно этот случайный процесс перестроек белковой молекулы, точнее то, как он влияет на обратное связывание СО миоглобином, и представлял основной интерес в данном эксперименте.

Измеряемой величиной в эксперименте являлась доля $S(t)$ молекул миоглобина, оставшихся несвязанными к моменту времени t после разрыва связи СО с гемовым железом. Понятно, что в число таких молекул входят молекулы несвязанного белка, находящиеся в момент времени t в *любом* из тех конфигурационных состояний, через которые осуществляется перестройка молекулы из состояния Mb^* в состояние Mb^0 .

Вид кинетических кривых в диапазоне температур от 300 К до 200 К приведен на рис. 4 [23].

Сразу обращают на себя внимание следующие особенности кинетики обратного связывания. При температуре 300 К кинетика связывания экспоненциальная. Однако с понижением температуры на кинетических кривых начинает проявляться характерный степенной участок, который при 200 К занимает почти 6 порядков временного окна наблюдения. При этом, что интересно, с понижением температуры скорость связывания

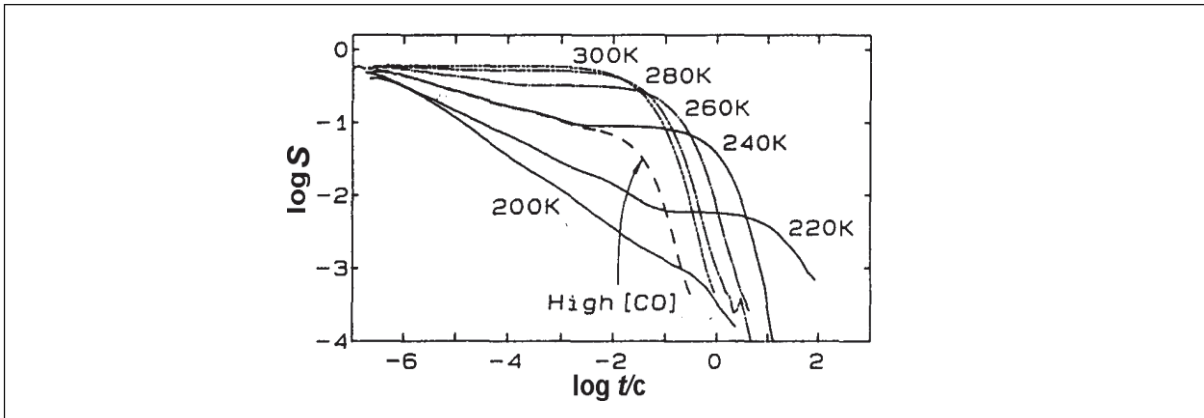


Рис. 4. Кинетика обратного связывания СО миоглобином при температурах от 300 К до 200 К. Обе оси даны в логарифмическом масштабе.

растет, а не падает, как должно было быть, если бы кинетика реакции контролировалась только величиной активационного барьера.

Построим теперь описание кинетики реакции связывания предполагая, что перестройки белковой молекулы, имеющей сложный энергетический ландшафт, можно описать в терминах межбассейновых переходов так, как об этом писалось выше. Поскольку конфигурационные перестройки белковой молекулы сопровождаются реакцией связывания СО с миоглобином, то весь процесс перестроек, начинающийся сразу после разрыва связи, и заканчивающийся присоединением СО, естественно описывать уравнением типа "реакция-диффузия", при том понимании, что "диффузионная" часть уравнения описывает конфигурационные перестройки белка и задается ультраметрической диффузией. Уравнения этого типа имеют вид:

$$\frac{\partial f(x,t)}{\partial t} = \int_{B_R} |x-y|_p^{-(\alpha+1)} [f(y,t) - f(x,t)] d_p y - \lambda \Omega(|x|_p) f(x,t) \quad (4.2)$$

где ультраметрический шар B_R радиуса $R \gg 1$ описывает пространство конфигурационных состояний несвязанного белка, $\alpha \sim \frac{E_0}{k_B T}$ масштабирует иерархию времен переходов между бассейнами конфигурационных состояний (E_0 калибровочный барьер, k_B константа Больцмана, T температура), λ константа реакции связывания СО с гемовым железом, и $\Omega(|x|_p)$ индикатор ультраметрического шара единичного радиуса,

$$\Omega(|x|_p) = \begin{cases} 1, & |x|_p \leq 1 \\ 0, & |x|_p > 1 \end{cases}$$

выделяющий те конфигурационные состояния, в которых миоглобин может связаться с СО. Таким образом, правая часть кинетического уравнения (4.2) содержит два слагаемых, первый из которых описывает ультраметрическую диффузию в пространстве состояний белка, т.е. перестройки несвязанной молекулы миоглобина в представлении "межбассейновой кинетики", а второй – "реакционный сток", т.е. саму реакцию связывания СО с гемовым железом. Напомним, что функция $f(x,t)$ имеет смысл плотности распределения вероятности по конфигурационным состояниям для несвязанных молекул миоглобина и, следовательно, $S(t) = \int_{B_R} f(x,t) d_p x$ есть доля молекул миоглобина,

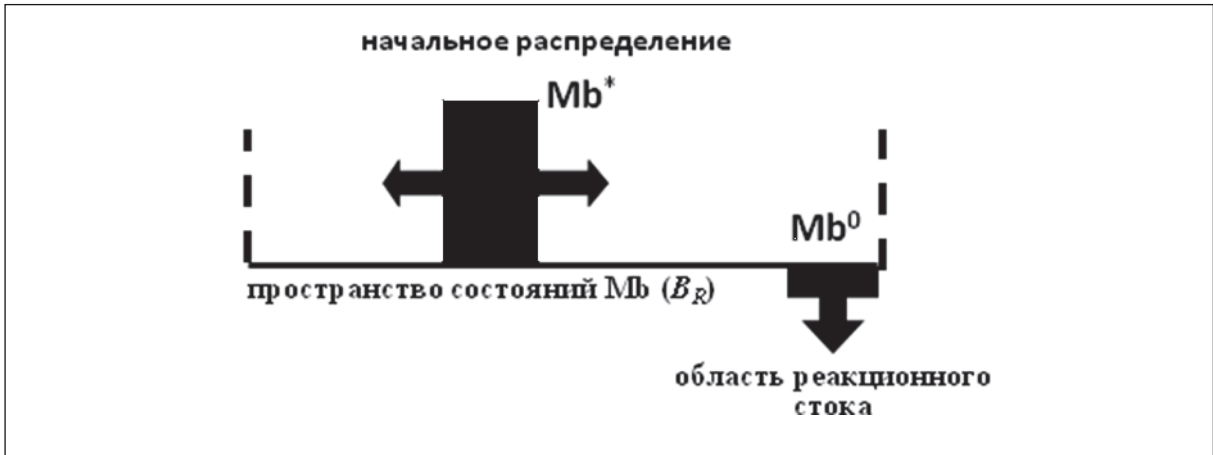


Рис. 5. Схематическое представление математической модели связывания СО миоглобином. На схеме выделена область конфигурационных состояний белковой молекулы, в которых происходит связывание СО (область реакционного стока), и показано расположение начального распределения относительно области связывания.

оставшихся несвязанными к моменту времени t . Это и есть та величина, которая измеряется в эксперименте.

Математическое описание кинетики связывания заключается в решении задачи Каши для уравнения (4.2) с модельным начальным условием $f(x,0)$, описывающим распределение молекул миоглобина Mb^* по конфигурационным состояниям сразу после разрыва связи лазерным импульсом, и вычислении измеряемой величины $S(t)$. Схема математической модели показана на рис. 5.

На рис. 6 показаны теоретические кривые кинетики связывания СО миоглобином, вычисленные в работах [15,17] по модели (4.2), где в качестве модельного начального условия $f(x,0)$ было выбрано однородное распределение на ультраметрическом кольце $O_{\sigma\delta} = \{x : p^\sigma \leq |x|_p \leq p^\delta\}$, $1 < \sigma < \delta < R$.

Сравнивая рис. 4 и рис. 6 нетрудно убедиться в качественном соответствии теории и эксперимента. При высоких температурах кинетика связывания экспоненциальная (кривая 1) – равновесное распределение быстро устанавливается во всем конфигурационном пространстве белка, включающем и область реакционного стока, и кинетика реакции подчиняется уравнению

$$\frac{dS(t)}{dt} = -\lambda a S(t),$$

где a есть отношение конфигурационного объема области реакционного стока (ультраметрический диск единичного радиуса) к объему всего конфигурационного пространства (ультраметрический диск радиуса $R \gg 1$). С понижением температуры (кривые 2 и 3), проявляются участки степенной кинетики. Причина этого явления в том, что с понижением температуры время τ_{eq} установления равновесного распределения на всем пространстве конфигурационных состояний белка B_R становится меньше характерного времени присоединения СО к активному центру, λ^{-1} . На временах $t < \tau_{eq}$ скорость процесса связывания ограничена самим процессом перестроек миоглобина. Эти перестройки задаются в модели иерархией времен переходов $|x - y|_p^{(\alpha+1)}$, поэтому кинетика связывания, в условиях, когда перестройки белковой молекулы становятся лимитирующей стадией, тоже многомасштабная и тоже характеризуется иерархией времен. На временах $t > \tau_{eq}$, (если эти времена попадают в окно наблюдения) кинетика связывания остается экспоненциальной по тем же причинам, что и при высокой температу-

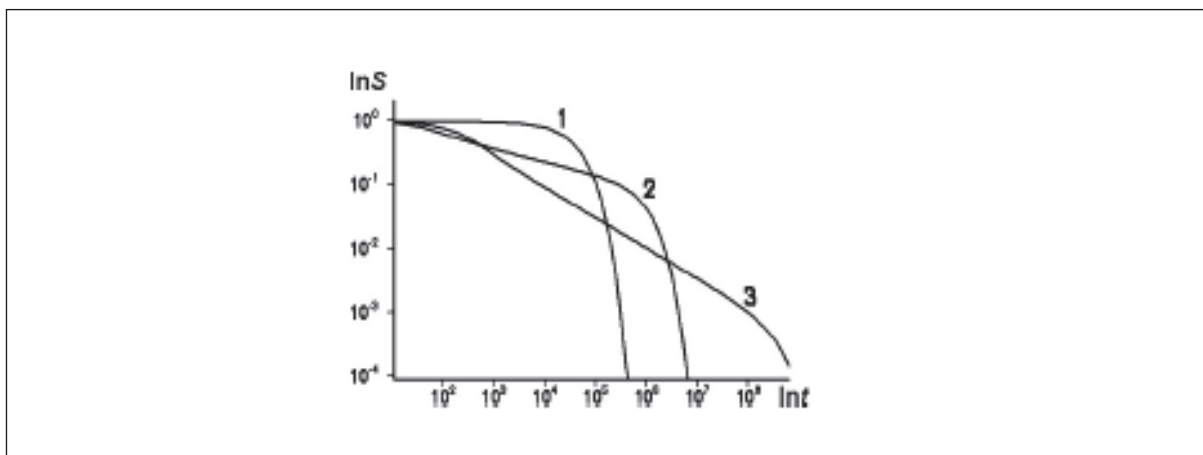


Рис. 6. Теоретические кривые $S(t)$ кинетики обратного связывания СО миоглобином при высоких температурах. Экспериментальные кривые см. для сравнения на рис. 4.

ре. Понятно, что с понижением температуры время τ_{eq} растет и степенная часть кинетики захватывает всё бо'льшие временные масштабы. Степенную кинетику ферментативной реакции порождает многомасштабный, "бассейновый" характер перестроек самой белковой молекулы.

Причина аномальной зависимости скорости связывания от температуры тоже, как выяснилось, кроется в "бассейновом" характере перестроек. Особенность таких перестроек заключается в том, что вначале заполняется бассейн, включающий как начальное распределение, так и область реакционного стока, и только затем распределение по конфигурационным состояниям "расплывается" в другие бассейны. Начальное распределение, расплываясь по бассейнам, сначала "накрывает" область реакционного стока, создавая в этой области повышенную заселенность, и лишь затем распространяется на другие области пространства состояний, и заселенность области реакционного стока снижается. С понижением температуры, повышенная заселенность области реакционного стока сохраняется дольше, что и приводит к увеличению скорости обратного связывания.

Таким образом, моделирование белковой подвижности, основанное на ультраметрической диффузии, объясняет необычные, на первый взгляд, свойства кинетики реакции связывания. При этом, как показывает математическая модель, именно многомасштабные перестройки белковой молекулы и бассейновая структура энергетического ландшафта белка играют тут главную роль.

Здесь следует обратить внимание еще на одно свойство использованной модели. Ядро интегрального оператора ультраметрической диффузии $|x - y|_p^{-(\alpha+1)}$ в уравнении (4.2) задает степенное убывание вероятности переходов с ростом ультраметрического расстояния между состояниями $|x - y|_p = p^{\gamma(x,y)}$ ($\gamma(x,y)$ уровень иерархии, которому бассейны принадлежат). Если использовать формулу Аррениуса для вероятности пере-

хода через барьеры, $w \sim \exp\left\{-\frac{E}{k_B T}\right\}$, где E величина активационного барьера, то та-

кое ядро оператора ультраметрической диффузии будет соответствовать линейному росту активационных барьеров на ландшафте с ростом уровня иерархии $\gamma(x,y)$. Ультраметрическое расстояние определяет и масштаб бассейнов состояний. В этом смысле, энергетический ландшафт белка, принятый в модели (4.2), является иерархически самоподобным. Как показано в [15,16], именно это самоподобие и приводит к степенной кинетике реакции связывания.

Спектральная диффузия в белках

Кинетика связывания СО миоглобином конечно позволяет сделать определенные заключения относительно энергетического ландшафта белка и характера перестроек белковой молекулы, однако эти заключения не столь однозначны, как хотелось бы, главным образом, из-за неоднозначности кинетического моделирования самого процесса связывания. Для получения более определенных ответов относительно характера белковой подвижности необходимы были прямые ее наблюдения, и такие эксперименты были осуществлены методом "спектральной диффузии" [26-31], тоже в последние два десятилетия, в основном, группой Дж. Фридриха (J. Friedrich) (см. обзор [30]).

Спектральная диффузия в белках исследовалась путем измерения спектра поглощения хромофорной метки, расположенной в активном центре белка. Частота поглощения метки в оптическом диапазоне очень чувствительна к пространственному расположению окружающих ее атомов. По оценкам (см., например, [28]), смещения ближайших к метке атомов белковой молекулы на расстояние порядка $\sim 10^{-2}$ Å могут приводить к вполне наблюдаемым смещениям частоты поглощения метки на величину порядка $\sim 0,1$ -1 Гц. При низких температурах, характерные времена таких смещений достаточно велики, и процесс случайных смещений частоты поглощения метки можно было бы наблюдать технически, однако в макроскопическом образце, содержащем ансамбль белковых молекул, ширина спектра поглощения оказывается при этих же температурах на 3-4 порядка больше ширины линии поглощения индивидуальных меток. В экспериментах [26-31], типичная ширина полосы поглощения образца при 4.2 К составляла величину порядка 10^3 Гц против $\sim 0,1$ -1 Гц для индивидуальной линии поглощения метки. Иначе говоря, индивидуальные линии скрыты в общем спектре поглощения образца, и для того, чтобы их увидеть используют метод своеобразной "окраски" индивидуальной линии. Для этого подбирают такие метки, которые при импульсной (монохроматической) лазерной накачке подвержены необратимому (на больших временах) фотохимическому переходу. Используя такие метки, и воздействуя на образец монохроматическим импульсным излучением на некоторой частоте из спектра поглощения образца, часть меток таким образом "выжигают". В результате, при измерении спектра поглощения образца сразу после "выжигания", в нем возникает узкий спектральный провал с характерной шириной порядка ширины линии поглощения индивидуальной метки. Этот прием называют методом выжиганием спектрального провала. В том случае, когда частота фотопоглощающего перехода индивидуальных меток случайно меняется из-за перестроек окружения, спектральный провал уширяться, "расплываясь" вдоль частотной прямой. Это явление и называется *спектральной диффузией*. Понятно, что уширение спектрального провала зависит от случайных изменений конфигурации атомов ближайшего окружения метки, и если эти смещения обусловлены смещениями других фрагментов белковой молекулы, т.е. флуктуационная подвижность белка нелокальная, то спектральная диффузия может нести информацию о том типе случайного процесса, который определяет подвижностью белка как целого. В этом и заключалась идея эксперимента.

В работах [27-30] наблюдение за спектральной диффузией велось стандартным образом – путем контролирования ширины спектрального провала σ_ν , от двух временных переменных – "времени старения" t_{ag} и "времени ожидания" t_w . Временем старения t_{ag} называли интервал между моментом приготовления образца (некоторым назначенным моментом времени после установления температуры образца) и моментом выжигания спектрального провала. Время ожидания t_w отсчитывалось сразу после выжигания спектрального провала, т.е. время ожидания было просто текущим временем для спектральной диффузии.

Спектральная диффузия была исследована для различных белков, различных органических матриц, в которых находились белковые молекулы при низкой температуре, при различных температурах и температурных циклах (см. [27-30]). При этом, для сравнения, были исследованы как нативные белки, сохранявшие после размораживания свою функциональную активность, так и денатурированные, функционально неактивные белки. Основные свойства спектральной диффузии в низкотемпературных *нативных* белках представлены на рис. 7. Они демонстрируют замечательную универсальность для всех исследованных образцов.

1) *Форма спектрального провала*: Во всем временном окне наблюдения, от $t_w \sim 10$ мин до $t_w \sim 10^4$ мин, форма линии спектрального провала хорошо описывается гауссовским распределением. Таким образом, спектральная диффузия в белках может рассматриваться как одномерный гауссовский случайный процесс, и все случайные смещения ближайшего окружения метки, обуславливающие спектральную диффузию, могут считаться некоррелированными.

2) *Уширение спектральной диффузии*: Для нативных (функционально активных) белков, зависимость гауссовской ширины спектрального провала от времени ожидания t_w хорошо описывается степенной функцией $\sigma_v(t_w) \sim t_w^a$. Показатель a варьируется очень слабо и лежит в узком интервале значений $a = 0,27 \pm 0,03$. Таким образом, низкотемпературная спектральная диффузия в нативных белках характеризуется универсальным показателем и драматически отличается как от броуновского движения, для которого $a = 0,5$, так и от спектральной диффузии в низкотемпературных стеклах, для которых типично логарифмическое уширение $\sigma_v(t_w) \sim \ln t_w$ (см. обсуждение в [27]). Было также установлено, что в денатурированных (функционально неактивных) белках спектральный провал уширяется логарифмически $\sigma_v(t_w) \sim \ln t_w$ [31], т.е. при низкой температуре денатурированные белки подобны стеклам, но нативные белки нет.

3) *Старение спектральной диффузии*: Уширение спектрального провала в нативных белках оказалось зависимым и от времени старения образца t_{ag} . Чем позже выжигался спектральный провал, тем меньше оказывалась та ширина $\sigma_v(t_w)$, которая достигалась к некоторому контрольному времени ожидания t_w . Выяснилось, что для достаточно больших времен ожидания $t_w \sim 10^4$ мин., и не слишком больших (в сравнении с 10^4 мин) временах старения t_{ag} , зависимость $\sigma_v(t_{ag})$ хорошо описывается степенной функцией $\sigma_v(t_{ag}) \sim t_{ag}^{-b}$ с показателем $b = 0,07 \pm 0,01$. Величина показателя b , что примечательно, тоже оказалась универсальной для нативных белков.

Столь необычные свойства спектральной диффузии в белках естественно породили множество теорий, опиравшихся, в основном, на модели релаксации в неупорядоченных конденсированных средах, и предлагавших разные, никак не связанные друг с другом механизмы уширения и старения спектральной диффузии в белках, и уж тем более, не связанные со свойствами кинетики связывания СО миоглобином.

В действительности, как было показано в [18,21], за всеми этими свойствами стоит одна и та же особенность белкового энергетического ландшафта – иерархически самоподобная бассейновая структура состояний и энергетического ландшафта. Ниже мы показываем, что простое и удивительно точное описание спектральной диффузии в нативных белках может быть получено прямо из описания флуктуационно-динамической подвижности белка p -адическим уравнением ультраметрической диффузии. Важно, что в случае спектральной диффузии ультраметрическое описание подвижности белковой молекулы полностью совпадает с тем, которое было выше использовано при описании кинетики связывания СО миоглобином (см., также, [15-17]), и в этом отношении, p -адическое описание подвижности белка оказывается универсальным для обоих типов экспериментов.

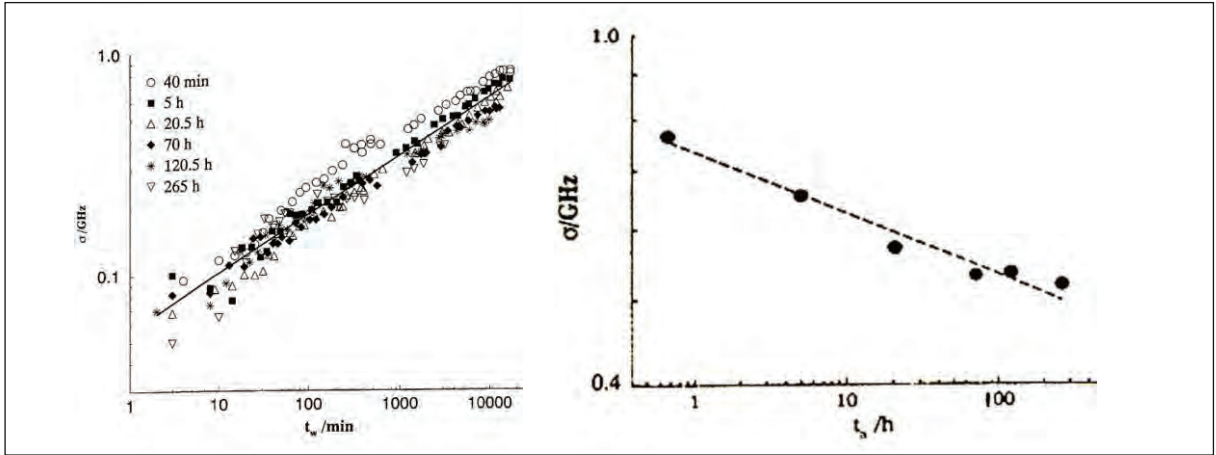


Рис. 7. На левом графике показано изменение (гауссовской) ширины спектрального провала от времени ожидания t_w в координатах log-log для нескольких значений времени старении (вверху слева). Прямая, нанесенная на экспериментальные точки, представляет степенную зависимость $\sigma_v(t_w) \sim t_w^{0,27}$. На правом графике показана зависимость ширины спектрального провала от времени старения t_{ag} при фиксированной величине времени ожидания $t_w = 10^4$ минут. Пунктирная прямая представляет степенную зависимость $\sigma_v(t_{ag}) \sim t_{ag}^{-0,07}$.

Так же, как и в случае кинетики связывания СО миоглобином, флуктуационная динамика белковой молекулы в спектральной диффузии описывается p -адическим уравнением ультраметрической диффузии вида (3.2):

$$\frac{\partial f(x,t)}{\partial t} = \int_{Q_p} \frac{f(y,t) - f(x,t)}{|x - y|_p^{\alpha+1}} d_p y, \quad (4.3)$$

где $f(x,t): Q_p \times R_+ \rightarrow R_+$ есть плотность вероятности находиться в состоянии $x \in Q_p$ в момент времени t .

Опишем спектральную диффузию в белках, используя уравнение (4.3). Прежде всего, поясним, как случайные изменения частоты поглощения метки связаны с изменениями конфигурационных состояний белка. Для понимания этой связи достаточно сопоставить число частотно различимых конфигураций ближайших соседей метки и число конфигурационных состояний белковой молекулы. Оценку первой величины можно получить из отношения ширины спектра поглощения образца ($\sim 10^3$ Гц) к ширине отдельной линии поглощения метки (~ 0.1 Гц). Это дает порядка 10^4 конфигурационных состояний окружения хромофорной метки, изменение которых прямо влияет на частоту поглощения метки. Если считать, что каждый из элементов окружения имеет несколько степеней свободы, условно скажем две, то число степеней свободы окружения метки будет порядка 10. В отличие от этого, белковая молекула имеет сотни и тысячи степеней свободы. Поэтому число конфигурационных состояний белка, как уже отмечалось во введении, выражается такими астрономическими числами как, например, 10^{100} . Сопоставляя числа 10^4 и 10^{100} , мы, при всей условности этих оценок, определенно можем утверждать, что "почти все" переходы между конфигурационными состояниями белка не затрагивают ближайшего окружения метки и, следовательно, не приводят к изменениям частоты поглощения метки. Спектральная диффузия, таким образом, обусловлена редкими событиями в череде флуктуационных перестроек белковой молекулы. Такие редкие события можно понимать как попадания белковой молекулы в очень определенные конфигурационные состояния, которых несопоставимо меньше, чем число конфигурационных состояний белка. Такие специфические состояния были названы в [18,21] "нулями динамической траектории" белка, а последовательность моментов вре-

мени их посещений – "скоплениями нулей". Иначе говоря, спектральную диффузию следует понимать как одномерный гауссовский случайный процесс, временная последовательность которого задается скоплениями нулей динамической траектории белка. Подчеркнем, что сама спектральная диффузия развивается на частотной прямой, в то время как динамическая траектория белка развивается в (ультраметрическом) пространстве конфигурационных состояний.

Множество нулей динамической траектории белка "исчезающее мало" по сравнению с множеством конфигурационных состояний белка, и модельно его можно определить как ультраметрический шар единичного радиуса ($x \in Z_p, |x|_p \leq 1$) в неограниченном ультраметрическом пространстве состояний белковой молекулы Q_p .

Исходя из сказанного выше, спектральную диффузию можно описать случайным процессом с независимыми приращениями

$$v(\tau) = \bar{v} + \sum_{i=1}^{n(\tau)} \Delta v_i \quad (4.4)$$

где \bar{v} есть среднее значение частоты спектрального провала, а Δv_i есть независимые случайные изменения частоты, возникающие в моменты попадания динамической траектории белка в нули. Для простоты можно считать, что случайная величина Δv_i принимает значения $\Delta v_i = \pm \Delta_0$ с вероятностью 0,5. Случайная величина $n(\tau)$ есть число попаданий динамической траектории белка в нули (ультраметрический шар Z_p) за интервал времени $\tau = [t_{ag}, t_{ag} + t_w]$.

Заметим, что среднеквадратичное отклонение $\sigma_v^2(t_{ag}, t_w)$ для случайного процесса (4.4) растет со временем ожидания t_w так же, как и среднее значение случайной величины $n(\tau)$:

$$\sigma_v^2(t_{ag}, t_w) = \langle \left(\sum_{i=1}^{n(\tau)} \Delta v_i \right)^2 \rangle_{\Delta v} = \Delta_0 \langle n(\tau) \rangle = \Delta_0 \bar{n}(t_{ag}, t_w), \quad (4.5)$$

Поэтому для вычисления $\sigma_v^2(t_{ag}, t_w)$ и сопоставления свойств модели и наблюдаемых свойств спектральной диффузии нужно просто найти среднее число попаданий в область Z_p за интервал времени $[t_{ag}, t_{ag} + t_w]$ для ультраметрической диффузии. Данная задача была впервые рассмотрена в работах [19,20], в которых вычислено распределение времен первого возвращения и числа возвращений для ультраметрической диффузии. Математически строгое решение этой задачи можно найти в этих же работах, а здесь мы ограничимся нестрогими, но физически прозрачными соображениями.

Поскольку нас интересует число попаданий в Z_p , обратимся к вспомогательной величине, survival probability – вероятности обнаружить блуждающую на Q_p "частицу" в области Z_p в момент времени t , при условии, что в начальный момент она находилась в Z_p . Эта вероятность определяется выражением $S(t) = \int_{|x|_p \leq 1} f(x, t) d_p x$, где $f(x, t)$ есть решение задачи Коши для уравнения (4.3) и указанного начального условия.

Интегрируя уравнение (4.3) по Z_p , запишем уравнение для $S(t)$ в виде

$$\frac{\partial S(t)}{\partial t} = -B(\alpha)S(t) + G(t) \quad (4.6)$$

где $G(t) = \int_{|x|_p > 1} |x|_p^{-(\alpha+1)} f(x, t) d_p x$ и $B(\alpha) = (p-1)(p^{\alpha+1} - 1)(p^{\alpha+1} - p)^{-2}$. Заметим теперь,

что последнее слагаемое в правой части уравнения (4.6) можно понимать как среднее по ансамблю число переходов в Z_p за малый интервал времени $[t, t + dt]$. Отсюда среднее число переходов в Z_p за интервал времени $[t_{ag}, t_{ag} + t_w]$ равно

$$\bar{n}(t_{ag}, t_w) = \int_{t_{ag}}^{t_{ag}+t_w} G(t)dt = B(\alpha) \int_{t_{ag}}^{t_{ag}+t_w} S(t)dt + [S(t_{ag} + t_w) - S(t_{ag})] \quad (4.7)$$

Величину $S(t)$ можно вычислить из решения задачи Коши для уравнения (4.3) и начального распределения

$$f(x,0) = \begin{cases} 1, & |x|_p \leq 1 \\ 0, & |x|_p > 1 \end{cases}.$$

Как показано в [15,16], $S(t)$ имеет вид

$$S(t) = (1 - p^{-1}) \sum_{\gamma=0}^{\infty} p^{-\gamma} \exp(-p^{\alpha\gamma} t) \quad (4.8)$$

и там же имеется оценка $S(t)$ для $t \gg 1$:

$$S(t) \approx A(\alpha) t^{-\frac{1}{\alpha}} \quad (4.9)$$

где $A(\alpha) = (1 - p^{-1}) \Gamma(\alpha^{-1}) (\alpha - 1)^{-1}$ и $\Gamma(\alpha^{-1})$ – гамма функция. Собирая вместе (4.5),

(4.7) и (4.9) и пренебрегая членами порядка $\sim t^{-\frac{1}{\alpha}}$, получаем искомую зависимость

$$\sigma_v(t_{ag}, t_w) \approx A(\alpha) B(\alpha) \left[(t_{ag} + t_w)^{\frac{\alpha-1}{2\alpha}} - (t_{ag})^{\frac{\alpha-1}{2\alpha}} \right] \quad (4.10)$$

Видно, что при $t_{ag} \ll t_w$ уширение спектрального провала следует степенному закону с показателем $\frac{(\alpha-1)}{2\alpha}$. При этом становится понятен и механизм "старения" спектральной диффузии. С увеличением времени старения t_{ag} , распределение временных интервалов между попаданиями в "нули" динамической траектории белка смещается в область бо'льших значений и среднее число попаданий в "нули" на одном и том же временном интервале уменьшается. Поскольку все дело в уменьшении числа попаданий в нули из за "расплывания" функции распределения, для оценки "старения" достаточно учесть, что вероятность находиться в момент времени t_{ag} в области Z_p умень-

шается по тем же причинам как $S(t_{ag}) \sim (t_{ag})^{-\frac{1}{\alpha}}$ (см [19,20]). Переопределяя теперь число попаданий в "нули" за интервал времени $[t_{ag}, t_{ag} + t_w]$ относительно $S(t_{ag})$, нетрудно получить оценку для (4.10) в виде

$$\sigma_v(t_{ag}, t_w) \sim t_{ag}^{-\frac{\alpha-1}{2\alpha(2\alpha-1)}} t_w^{\frac{\alpha-1}{2\alpha}}, \quad (4.11)$$

Вид этой оценки прямо воспроизводит экспериментально установленные степенные законы для уширения и старения. Следует обратить внимание на то, что в выражении (4.11) параметр α , масштабирующий иерархию переходов на энергетическом ландшафте белка, определяет характеристические показатели как для уширения спектральной диффузии, так и для старения спектральной диффузии. Универсальные показатели степенных законов уширения и старение получаются *при одном том же значении масштабирующего параметра α* .

На рис. 8 приведены теоретические результаты для сравнения их с экспериментальными (рис. 7).

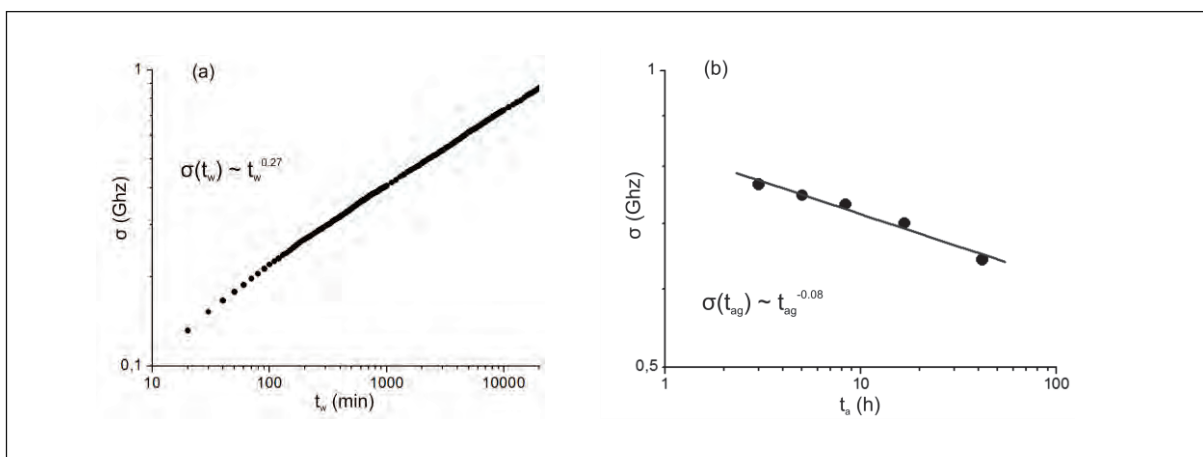


Рис. 8. Уширение (слева) и старение (справа) спектральной диффузии, полученные согласно выражению (5.11) для значений параметров $\alpha = 2,2$ и $\Delta_0 = 0,3$ Гц.

Столь хорошее совпадение теоретической оценки (4.11) с экспериментальными данными, полученное для описания многомасштабной флуктуационно-динамической подвижности белковой молекулы физически "экстравагантным" p -адическим уравнением ультраметрической диффузии, не может не впечатлять. Важно и то, что это же описание, как было показано выше, оказывается адекватным и для кинетики связывания СО миоглобином. Поэтому p -адическое уравнение (4.3), в действительности, оказывается универсальным инструментом описания перестроек функционально активных белковых структур на исключительно широкой шкале временных масштабов, от комнатной до гелиевой температур.

Модель рабочего цикла молекулярной машины.

Остановимся теперь на математическом моделировании рабочего цикла молекулярной машины, имея в виду то обстоятельство, что природными прототипами молекулярных машин являются как раз белковые молекулы.

Традиционная схема функционального цикла белка, как молекулярной машины, (см., например, [1,2]) выделяет три основные стадии – образование "рабочего комплекса" с молекулярным объектом (субстрат-ферментного комплекса), рабочая стадия, включающая многомасштабные движения машины (белковой молекулы), в ходе которой реализуется функция машины (ферментативная функция), например, превращение исходного субстрата в конечный продукт, распад рабочего комплекса с выделением продукта, и возвращение машины в начало рабочего цикла. Согласно этим представлениям, образование рабочего комплекса и его распад происходят в определенных (конформационных или конфигурационных) состояниях машины, а функция машины осуществляется путем циклических перестроек между этими состояниями (рис. 9).

В данном разделе, следуя работе [33], мы показываем, как можно конструировать модели функционального цикла машины нано-размерного масштаба на основе ультраметрического описания многомасштабных перестроек молекулярной структуры машины. Физическая картина и математическая основа такого описания изложены в предыдущих разделах.

Как и для связывания СО с миоглобином и спектральной диффузии, описание нелокальных многомасштабных перестроек молекулярной машины основано на представлении о "бассейновом" характере переходов между локальными минимумами многомерного энергетического ландшафта молекулярной структуры машиной.

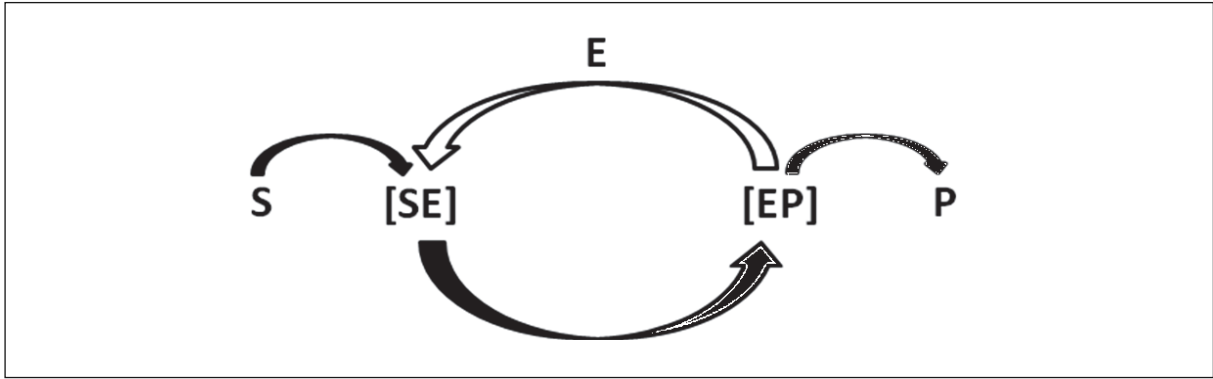


Рис. 9. Трехстадийная схема рабочего цикла молекулярной машины. S-субстрат, E-молекулярная машина, P-продукт ее функционирования, [SE] [EP]-начальное и конечное состояния рабочего комплекса.

Такие перестройки мы моделируем ультратметрической диффузией и описываем их p -адическим уравнением вида

$$\frac{\partial f(x,t)}{\partial t} = -D_x^\alpha f(x,t) \tag{4.12}$$

где D_x^α p -адический псевдо-дифференциальный оператор Владимирова [22]:

$$\left[D_x^\alpha f \right](x,t) = -\frac{1}{\Gamma(-\alpha)} \int_{Q_p} \frac{f(y,t) - f(x,t)}{|x-y|_p^{\alpha+1}} d_p y, \quad \Gamma(-\alpha) = \frac{1-p^{-\alpha-1}}{1-p^\alpha}$$

Это уравнение аналогично уравнению (3.3), а обозначение D_x^α здесь использовано для краткости записи. В нашем рассмотрении, параметр $\alpha > 0$ характеризует флуктуационную подвижность молекулярной структуры машины, а именно, большей подвижности структуры отвечают меньшие значения α .

Построим пример описания рабочего цикла молекулярной машины согласно схеме, представленной на рис. 9. Прототипом такого рабочего цикла может служить связывание лигандов миоглобином, которое мы обсуждали выше.

Математически, модель функционального цикла определяется следующим образом. Ставится задача Коши, заданная на ультратметрическом шаре $B_r = \{x \in Q_p : |x|_p \leq p^r\}$ системой уравнений

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} f_1(x,t) &= -D_x^\alpha(B_r) f_1(x,t) + \lambda_1 \Omega(|x|_p \leq 1) f_2(x,t) - \lambda_2 \Omega(|x-a|_p \leq 1) f_1(x,t) \\ \frac{\partial}{\partial t} f_2(x,t) &= -D_x^\alpha(B_r) f_2(x,t) - \lambda_1 \Omega(|x|_p \leq 1) f_2(x,t) + \lambda_2 \Omega(|x-a|_p \leq 1) f_1(x,t) \end{aligned} \tag{4.13}$$

с начальными условиями $f_1(x,0) = \Omega(|x|_p \leq 1)$, $f_2(x,0) = 0$. Здесь $D^\alpha(B_r)$ оператор Владимирова на ультратметрическом шаре B_r .

$$D^\alpha(B_r) f(x) = -\frac{\Omega(|x|_p \leq p^{-r})}{\Gamma(-\alpha)} \int_{Q_p} \frac{f(y,t) - f(x,t)}{|x-y|_p^{\alpha+1}} d_p y,$$

$\Omega(|x|_p \leq p^{-r})$ индикатор шара B_r . Функции $f_1(x,t)$ и $f_2(x,t)$ определены на B_r , $a \in Q_p$, причем $1 < |a|_p < p^r$. Затем, используя решения $f_1(x,t)$ и $f_2(x,t)$, конструируются величины, характеризующие функционирование машины. Примеры таких величин даны ниже.

Модель (4.13) можно понимать как систему кинетических уравнений типа "реакция-ультратметрическая диффузия", описывающую поведение двухкомпонентного ан-

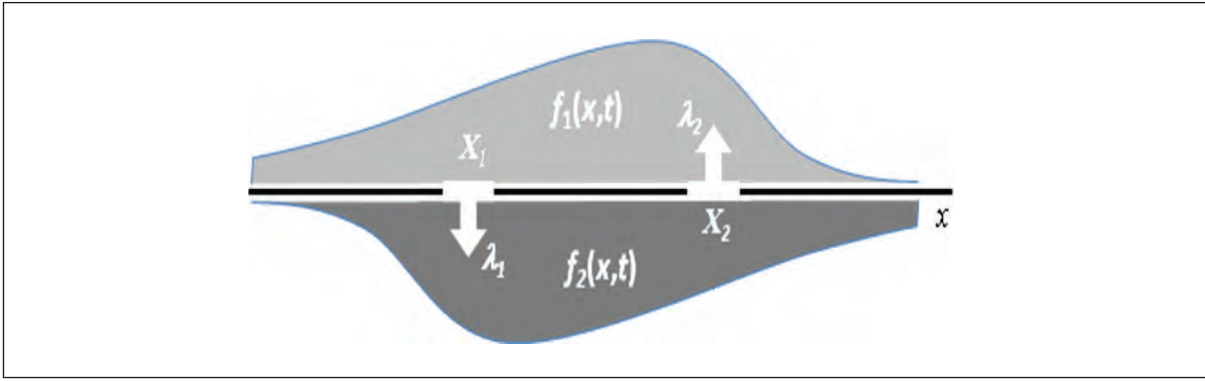


Рис. 10. Схема математической модели рабочего цикла молекулярной машины с двумя функциональными состояниями: 1 соответствует рабочему состоянию, 2 – свободному состоянию. Прямую x следует воспринимать как условное обозначение ультраметрического пространства состояний молекулярной машины: X_1 и X_2 области пространства состояний, в которых возможно образование и распад рабочего комплекса (λ_1 и λ_2 соответствующие константы скорости). Функции $f_1(x,t)$ и $f_2(x,t)$ имеют смысл распределений плотности вероятности найти молекулярную машину в состоянии x в момент времени t для рабочего и свободного состояний соответственно.

самбля, в котором одна из компонент, например, $i = 1$, относится к рабочему состоянию машины (например, связанное состояние миоглобина), а другая к свободному состоянию машины (несвязанное состояние миоглобина) (см. рис. 10).

Состояние ансамбля задается распределениями концентраций $f_i(x,t)$, $i = 1, 2$ по состояниям в момент времени t , для функционально активных и свободных машин, соответственно. Уравнения (4.13) можно интерпретировать и для одной молекулярной машины. В этом случае функция $f_1(x,t)$, относящаяся к "связанному" состоянию машины, есть плотность вероятности находиться в (конформационном) состоянии x в момент времени t . Соответственно, $F_1(t) = \int_{B_r} f_1(x,t) d_p x$ есть вероятность обнаружить машину в момент времени t в функционально активном состоянии. Естественно, что вероятность обнаружить молекулярную машину в функционально неактивном состоянии равна $F_2 = 1 - F_1$.

Перейдем к описанию некоторых свойств такой модели. Решение описанной выше задачи Коши можно найти, применив преобразование Лапласа по t и p -адическое Фурье преобразование по x . Детали этих достаточно громоздких вычислений и вид самого решения в Лаплас–Фурье образах можно найти в [32]. Здесь мы выпишем и обсудим только свойства стационарного решения, которое характеризует стационарные характеристики функционального цикла, без "переходных" режимов. Оно имеет следующий вид:

$$f_1(x) = p^{-r} \frac{\lambda_1 + \lambda_1 \lambda_2 (I(0) - I(|a|_p))}{\lambda_1 + \lambda_2 + 2\lambda_1 \lambda_2 (I(0) - I(|a|_p))} + \frac{\lambda_1 \lambda_2 p^{-r}}{\lambda_1 + \lambda_2 + 2\lambda_1 \lambda_2 (I(0) - I(|a|_p))} \times \\ \times (I(|x|_p) - I(|a-x|_p)) \quad (4.14)$$

$$f_2(x) = p^{-r} \frac{\lambda_1 + \lambda_1 \lambda_2 (I(0) - I(|a|_p))}{\lambda_1 + \lambda_2 + 2\lambda_1 \lambda_2 (I(0) - I(|a|_p))} - \frac{\lambda_1 \lambda_2 p^{-r}}{\lambda_1 + \lambda_2 + 2\lambda_1 \lambda_2 (I(0) - I(|a|_p))} \times \\ \times (I(|x|_p) - I(|a-x|_p))$$

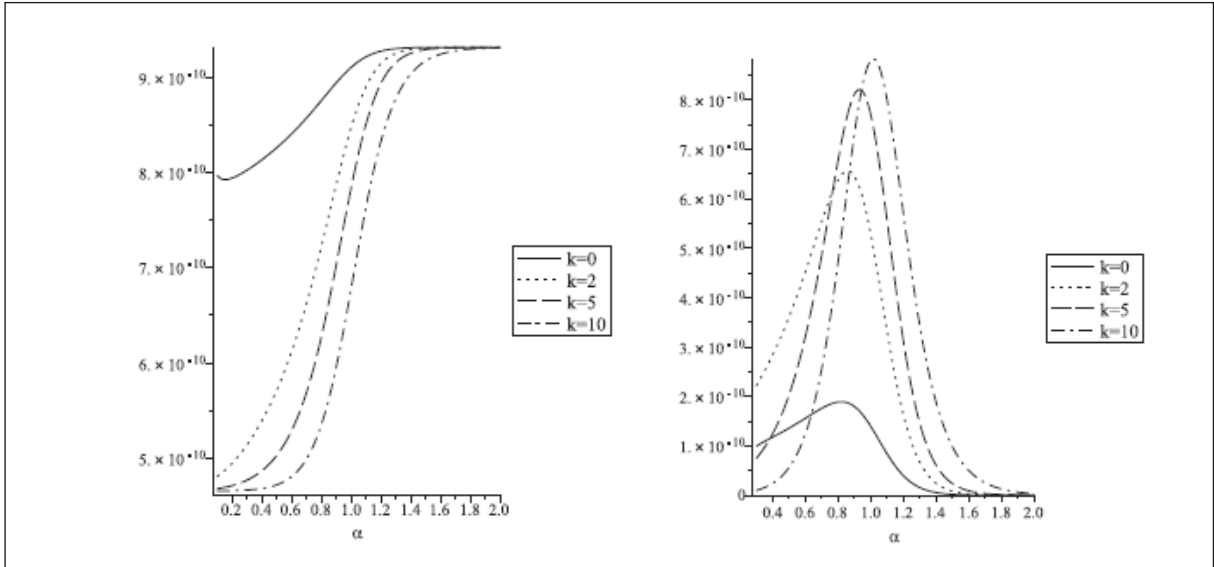


Рис. 11. Критическое поведение функционального цикла молекулярной машины от подвижности. Слева показана зависимость $f_1(\alpha)$ от α в различных областях пространства состояний (параметр k). Справа показана зависимость производной $df_1(\alpha)/d\alpha$ от α .

где $I(|a|_p) = \left| \left(I(s, |a|_p) - p^{-r} \frac{1}{s} \right) \right|_{s=0}$. Лаплас образ $I(s, |a|_p)$ есть

$$I(s, |a|_p) = p^{-r} \frac{1}{s} + \sum_{i=m}^{r-1} p^{-i} (1 - p^{-1}) \left(s + p^{-\alpha i} - (1 - p^{-1}) \frac{p^{-\alpha r}}{1 - p^{-\alpha-1}} \right)^{-1} - \left(s + p^{-\alpha(1-m)} - (1 - p^{-1}) \frac{p^{-\alpha r}}{1 - p^{-\alpha-1}} \right) p^{-m} (1 - \Omega(|a|_p))$$

и m определяется их условия $|a|_p = p^m$.

Семейство стационарных решений (4.14) для различных значений α было получено и исследовано численно в [33] при значениях $p = 2, |a|_p = p^{20}, \lambda_1 = \lambda_2 = 2$. На рис. 11 представлены зависимости от α стационарного распределения $f_1(x)$ и ее производной по α в различных областях пространства состояний ($|x|_p = 1, p^2, p^5, p^{10}$).

Видно, что существует достаточно узкая область значений параметра α , в которой резко меняется состояние рабочего цикла машины. Вне этой области, как справа, так и слева, рабочий цикл слабо зависит от подвижности молекулярной структуры. При высокой молекулярной подвижности (малые значения α), функциональная способность машины низкая. Физическая причина этого проста – в огромном пространстве конфигурационных состояний молекулярной структуры нано-размерного масштаба трудно отыскать специфические состояния, в которых машина может запустить рабочий цикл, либо остановить его. При высокой флуктуационной подвижности, попадание структуры нано-размерного масштаба в любое специальное состояния оказывается мало, прежде всего, из-за большого пространства конфигурационных состояний нано-структуры. Снижение подвижности (увеличение α) не меняет такой ситуации вплоть до некоторых "критических" значений α . При достижении критической подвижности вероятность для запуска рабочего цикла возрастает скачкообразно. При дальнейшем снижении подвижности, вероятность запуска рабочего цикла не меняется, но увеличивается время рабочего цикла, так что при низкой подвижности активность молекулярной машины может также оказаться низкой. Наилучшие условия для функционирования ма-

шины оказываются вблизи "критической зоны", именно там, где, как следует из графиков на рис. 11, чувствительность рабочего цикла машины к изменению подвижности ее молекулярной структуры высокая. Заметим, в рамках традиционных моделей ферментативного катализа такой механизм параметрического управления функцией выявить нельзя.

Исследование многомасштабных математических моделей молекулярных машин, в частности, моделей, основанных на ультраметрической диффузии, позволяет увидеть такие особенности в поведении этих сложных в динамическом отношении объектов, которые скрыты для других методов и моделей, включая и методы компьютерного моделирования (см, например, [33,34]). Тот факт, что функциональная активность белков зависит от их флуктуационной подвижности, известен давно, но то, что эта зависимость носит критический характер, показали только изложенные выше математические модели. Особенно интересно то, что, функциональная активность белка может резко меняться даже при небольших изменениях температуры или характеристик внешней среды. Это явление тоже был давно замечен, однако считалось, что резкое снижение ферментативной активности, например, при небольшом повышении температуры или изменении состава окружающей среды, обусловлено частичной (но почему-то обратимой!) денатурацией белка. В действительности, как показывает рассмотренная нами модель, такое поведение может быть обусловлено структурой пространства состояний белка. Уже только это теоретическое наблюдение способно прояснить ряд "загадочных" феноменов, связанных с механизмами управления метаболизмом в живой клетке.

Значение методов многомасштабного математического моделирования молекулярных машин для развития нано-технологий трудно переоценить. Мы полагаем, что изложенные в данном обзоре модели и методы их построения могут оказаться полезными также и в дизайне искусственных молекулярных нано-устройств, способных манипулировать на атомном уровне. То, что это возможно, впечатляющим образом демонстрирует сама природа, создавшая такую технологию в ходе эволюции от неживого к живому.

Данный обзор написан в рамках проекта Министерства образования и науки РФ № 2011-2.3-647-006 "Создание мультидисциплинарного эмуляторного комплекса для информационно-аналитического сопровождения подготовки кадров и поисковых разработок в области математического моделирования наноразмерных устройств и наноматериалов". Авторы благодарят также РФФИ (грант 11-01-90427-м-2011) за поддержку математических исследований в этом направлении.

Литература

1. *Шайтан К.В., Рубин А.Б.* Конформационная динамика белков и простейшие молекулярные "машины"// Биофизика, 1982, **27**(3), 386-390.
2. *Блюменфельд Л. А.* Проблемы биологической физики// Наука, М.,1977, 336 стр.
3. *Чернавский Д.С., Чернавская Н.М.* "Белок-машина". Биологические макромолекулярные конструкции.//Янус-К, М., 1999, 256 стр.
4. *Eigen M., McCaskil J., Schuster P. J.* Evolution of quasi-spices.// J. Phys. Chem. 1988, **92**, 6881-6887.
5. *Аветисов В. А., Гольданский В. И.,* Физические аспекты нарушения зеркальной симметрии биоорганического мира.// УФН, 1996, **166** (8), 873-891.
6. *Wales D. J.* Energy Landscapes. Applications to Clusters, Biomolecules and Glasses. Cambridge University Press, Cambridge, 2004.,692 pp.
7. *Stillinger F. H., Weber T.A.* Packing structures and transitions in liquids and solids.// Science. 1984, **225**, 983-1007.
8. *Becker O.M., Karplus M.* The topology of multidimensional protein energy surfaces: theory and application to peptide structure and kinetics.// J. Chem. Phys. 1997, **106**, 1495-1512.
9. *Wales D.J., Miller M.A., Walsh T.R.* Archetypal energy landscapes.// Nature, 1998, **394** 758-761.

10. *Parisi G.* Infinit number of order parameters for spin glasses.// *Phys Rev Lett.* 1979, **43**, 1754-1760.
11. *Hoffmann K.H., Sibani P.* Diffusion in hierarchies.// *Phys. Rev. A*, 1988, **38**, 4261-4270.
12. *Ogielski A.T., Stein D.L.* Dynamics on ultrametric spaces.// *Phys. Rev. Lett.* 1985, **55**, 1634-1637.
13. *Rammal R., Toulouse G., Virasoro M.A.* Ultrametricity for physicists.// *Rev. Mod. Phys.* 1986, **58**, 3, 765-788 .
14. *Avetisov V A, Bikulov A Kh, Kozyrev S V,* Application of p-adic analysis to model of breaking of replica symmetry.// *J. Phys. A: Math. and Gen.* 2002, **32**, 8785-8791
15. *Avetisov V A, Bikulov A Kh, Kozyrev S V, Osipov V A.* p-Adic models of ultrametric diffusion constrained by hierarchical energy landscapes.// *J. Phys. A: Math. and Gen.* 2002, **35**, 177-189.
16. *Avetisov V A, Bikulov A Kh, Osipov V A.* p-Adic description of characteristic relaxation in complex systems.// *J. Phys. A: Math. and Gen.* 2003, **36**, 4239-4246.
17. *Аветисов В. А., Биколов А. Х., Осипов В.А.* p-Адические модели ультраметрической диффузии в конформационной динамике макромолекул.// Труды Математического института им. В. А. Стеклова. 2004, **245**, 55-64.
18. *Avetisov V. A., Bikulov A. Kh.* Protein ultrametricity and spectral diffusion in deeply frozen proteins.// *Biophysics Reviews and Letters*, 2008, **3**(3) 387-396.
19. *Аветисов В. А., Биколов А. Х., Зубарев А. П.* О распределении моментов времени первого возвращения для ультраметрического случайного блуждания.// Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия, 2008 **8/1** (67), 8-21.
20. *Avetisov V.A., Bikulov A. Kh., Zubarev A. P.* First passage times and number of returns for ultrametric random walk.// *J. Phys. A: Math. Theor.* 2009, **42**, 085003-085021 .
21. *Аветисов В. А., Биколов А.Х.* Об ультраметричности флуктуационно динамической подвижности белковых молекул.// Труды математического интситута им. В. А. Стеклова, 2009, **265**, 82-89,..
22. *Владимиров В. С., Волович И. В., Зеленев Е. И.* p-Адический анализ и математическая физика. Физматлит, М., 1994, 352 стр.
23. *Frauenfelder H.* The connection between low-temperature kinetics and life// R. Austin (et al eds), In *Protein Structures*, Springer-Verlag, New York, 1987, 245-261.
24. *Steinbach P. J., Ansari A., Berendzen J., Braunstein D., Chu K., Cowen B., Ehrernstein D., Frauenfelder G., Johnson J. B., Lamb D. C., Luck S., Nienhaus G. U., Orinos P., Phillip R., Xie A., Young R.* Ligand binding to heme proteins: connections between dynamica and function.// *Biochemistry* 1991, **30**, 3988-4001.
25. *Frauenfelder H., Leeson D. Th.* The energy landscape in non-biological and biological molecules. // *Nature Struct. Biol.* 1998, **5**, 757-759.
26. *Leeson D. Th., Wiersma D. A.* Looking into the energy landscape of myoglobin. // *Nature Struct. Biol.* 1995 **2**, 848-851.
27. *Schlichter J., Friedrich J., Herenyi L., and J. Fidy.* Protein dynamics at low temperatures.// *J. Chem. Phys.* 2000, **112**, 3045-3051.
28. *Schlichter J., Friedrich J.* Glasses and proteins: similarity and difference in their spectral diffusion dynamics.// *J. Chem. Phys.* 2001, **114**, 8718-8722.
29. *Herenyi L., Szigeti K., Fidy J., Temesvari T., Schlichter J., and Friedrich J.* Aging dynamica in globular proteins: summary and analysis of experimental results and simulation by a modified reep model. // *Eur. Biophys. J.* 2004, **33**, 68-75.
30. *Ponkratov V. V., Friedrich J., Burin A. L., Berlin Yu. A.* Physics of proteins at low temperature.// *J. Low Temp. Phys.* 2004, 137, 289-317.

MULTI-SCALE MATHEMATICAL MODELING OF MOLECULAR MACHINES: THE PROBLEMS AND MODERN APPROACHES

Avetisov V.A.¹, Bikulov A.Kh.¹, Meshkov D.A.¹, Zubarev A.P.²

¹ *Semenov Institute of Chemical Physics of the RAS, Moscow*

² *Samara State University, Samara*

avetisov@chph.ras.ru

Received 26.01.2012

This review presents a new approach to mathematical modeling of nano-scale "molecular machines", which natural prototypes are proteins. The approach is based on ultrametric mathematical patterns and their descriptions by p -adic equations. We describe the experiments, which demonstrate nontrivial features of the protein fluctuation mobility and the protein functioning, the basic p -adic models of multi-scale protein dynamics and their physical interpretations, and show how the models present the actual properties of the protein dynamics and functioning. Some perspectives of this approach in mathematical modeling of molecular machines are shown and discussed.