

ВЛИЯНИЕ ДИНАМИКИ МИКРООКРУЖЕНИЯ ТРИПТОФАНА НА ПАРАМЕТРЫ ЕГО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

© 2023 г. В.В. Горохов*, П.П. Нокс*, Б.Н. Корватовский*, С.Н. Горячев*, В.З. Пашенко*, #, А.Б. Рубин*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 2/12, Москва, 119234, Россия

#E-mail: vz.paschenko@gmail.com

Поступила в редакцию 21.12.2022 г.

После доработки 16.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Исследованы температурные зависимости быстрых и медленных компонент затухания флуоресценции водного раствора молекул триптофана в диапазоне $-170^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$, замороженных на свету и в темноте. Для количественного анализа использована модель прямых и обратных электронных переходов в молекуле триптофана из возбужденного состояния в основное состояние и в состояние с переносом заряда. Выделены три основные спектральные области флуоресценции триптофана, отличающиеся различным поведением температурных зависимостей скоростей перехода из возбужденного состояния триптофана в состояние с переносом заряда. Показана ключевая роль динамики системы водородных связей, определяющих нелинейный характер изменения параметров флуоресценции триптофана в выделенных спектральных областях. Нелинейное поведение длительности флуоресценции и спектров флуоресценции при изменении температуры определяется характером взаимодействия триптофана с водой и льдом. Показана важная роль, которую играют температурные перестройки в системе водородных связей структурных конфигураций H_2O , окружающей молекулу триптофана в возбужденном состоянии.

Ключевые слова: триптофан, кинетика затухания флуоресценции, температурная зависимость, водородные связи, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302923040014, EDN: KIKARV

Флуоресценция триптофанилов в составе белков широко используется в качестве природного индикатора их внутримолекулярной конформационной динамики, тесно связанной с функциональной активностью, в частности, при изменении температуры. Источником информации о характере внутримолекулярной динамики ближайшего окружения возбужденной молекулы триптофана (Тгр) являются температурные зависимости спектров и длительности флуоресценции Тгр [1–3]. Кинетика затухания флуоресценции Тгр как в растворе, так и в составе полипептидов многокомпонентна. В зависимости от типа растворителя, фактора рН, регистрируют две-три кинетики затухания компонент флуоресценции в интервале от сотен пикосекунд до ~ 10 нс [4–7].

Сольватация возбужденных молекул Тгр в ходе взаимодействия с ближайшим окружением мо-

жет индуцировать зависимые от температуры сдвиги их спектров поглощения и флуоресценции [5, 8]. В частности, в результате сложного перераспределения электронной плотности в возбужденных молекулах Тгр происходит красный сдвиг максимума спектра флуоресценции. Температура влияет на процессы сольватации, меняя состояние водородных связей – их жесткость и упорядоченность. Спектры и время жизни возбужденных электронных состояний Тгр при разных температурах обусловлены процессом внутримолекулярного переноса электрона от пирольного кольца возбужденной молекулы на индольную часть и на амидные группы основного скелета молекулы. В этот процесс вовлекается также система водородных связей (Н-связей) между молекулами Тгр и их водным окружением [8–11] с образованием состояния с переносом заряда (CTS).

Согласно данным метода квазиупругого рассеяния нейтронов [12, 13], можно выделить следую-

Сокращения: Тгр – триптофан, Н-связи – водородные связи, CTS – состояние с переносом заряда.

щие температурные области, в которых динамика протонов водородных связей в водно-белковой среде влияет на время жизни возбужденных электронных состояний Тгр. При $T < -150^\circ\text{C}$ (область I) происходят чисто гармонические колебания протонов около равновесных положений. В области II ($-150^\circ\text{C} \leq T < -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды характеризуется скачкообразной диффузией протонов по Н-связям в пикосекундном временном диапазоне. При $T > -30^\circ\text{C}$ (область III) динамика водно-белковой среды характеризуется более медленными масштабными движениями крупных молекулярных фрагментов [12,13].

Исследованию динамики водородных связей в окружении возбужденных молекул Тгр и их влиянию на фотофизические и фотохимические переходы в таких системах в последние годы уделяется большое внимание [8–11, 14, 15]. В частности, в работе [15] было показано, что в водном растворе образуется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей с молекулой Тгр. Вокруг этого комплекса формируется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами Тгр [14, 15]. В ближайшем окружении возбужденной молекулы Тгр может происходить укорочение длин и, как следствие, усиление Н-связей молекул воды, взаимодействующих с электрическим полем индольной части молекул Тгр. В результате увеличивается жесткость и происходит их дополнительное упорядочение [15]. В свою очередь, в упорядоченной системе Н-связей может формироваться квазизона проводимости, на которую электрон переходит от индольной части возбужденной молекулы Тгр и делокализуется. Затем делокализованный электрон может перейти на амидные группы и образовать состояние с переносом заряда [15]. Такой процесс наиболее вероятен в области достаточно низких температур (область I). При этом при дальнейшем понижении температуры скорость переноса электрона от индольной части Тгр* в систему водородных связей должна увеличиваться. В области более высоких температур (области II и III) за счет тепловых флуктуаций молекул растворителя квазизона проводимости вырождается. В результате перенос электрона с индольной части на амидные группы будет идти уже по термоактивационному механизму. В окрестности возбужденной молекулы триптофана в системе водородных связей возможен также конформационный (фазовый) переход, приводящий к возникновению в этой системе электрического дипольного момента [16]. Этот процесс может происходить в определенном интервале температур $T_1 < T < T_2$, когда энергия теплового движения протонов достаточно велика для их перескоков вдоль водородной связи ($T > T_1$), однако все

еще остается меньше энергии взаимодействия диполей Н-связей молекул, что позволяет сохранять упорядоченность ($T < T_2$) [16]. В результате происходит перестройка системы водородных связей за счет диффузионного перескока протонов по Н-связям [13], что приводит к образованию суммарного дипольного момента, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Тгр. При этом изменение состояния системы водородных связей в окрестности Тгр* играет роль мягкой моды, т.е. критической подсистемы, испытывающей фазовый переход в результате взаимодействия дипольных моментов водородных связей в области температур $T_1 < T < T_2$ [16]. Кулоновское взаимодействие Тгр* с суммарным дипольным моментом системы водородных связей будет вызывать значительный красный сдвиг спектра флуоресценции триптофана в водно-белковой среде.

В данной работе выполнено детальное изучение температурных зависимостей длительности флуоресценции замороженных в темноте и на свету водных растворов триптофана в различных областях его спектра флуоресценции. Изучена также динамика спектров флуоресценции в наносекундном временном интервале и обнаружено увеличение скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции в области фазового перехода в системе водородных связей в диапазоне температур от -80°C до 20°C . Анализ экспериментальных данных базировался на идее формирования промежуточного состояния с переносом заряда в процессе дезактивации Тгр* и опосредованном влиянии динамики водородных связей ближайшего водного окружения на процессы дезактивации возбужденного состояния молекул триптофана. Настоящая статья является продолжением и развитием опубликованных ранее работ [8–11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали триптофан фирмы Sigma (США). Измерения кинетики флуоресценции проводили на установке с коррелированным по времени и длине волны счетом единичных фотонов PML-16 (Becker & Hickl GmbH, Германия; <http://www.becker-hickl.de/pdf/pml16c21.pdf>2006). Данная установка оборудована 16-канальной мультианодной трубкой Hamamatsu R5900, содержащей 16 отдельных входных анодных элементов и общую катодную и диодную систему. Получаемый сигнал флуоресценции направляется в полихроматор с дифракционной решеткой 600 штрихов/мм, обеспечивающей ширину спектральной полосы измерительной системы 200 нм с разрешением 12.5 нм/канал. Это позволяет ре-

гистрировать трехмерную картину флуоресценции, отражающую изменения длительности (τ), длины волны (λ) и интенсивности (I) свечения. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового диода EPLED 280 (Edinburg Photonics, Шотландия), длительность импульса света составляла 870 пс, спектральная ширина – 10 нм, частота следования импульсов 10 МГц. Для получения хорошего отношения сигнал/шум время накопления сигнала было выбрано равным 30 с. Таким образом, регистрируя трехмерное (τ , λ , I) изображение свечения триптофанилов, мы могли измерять кинетики затухания флуоресценции в любом спектральном канале. Одновременно мы имели возможность регистрировать динамику спектров флуоресценции образца с различными временными задержками после возбуждения. В эксперименте образец, содержащий триптофан при концентрации 10 мМ, находился в охлаждаемой жидким азотом кювете. Время охлаждения до -170°C составляло около 10 мин, скорость последующего нагревания была равной 5–7 град/мин.

Получаемый в результате измерений массив спектрально-кинетических данных представляет собой набор кинетик затухания флуоресценции, зарегистрированных при разных λ в спектральной области 286–425 нм с интервалом 12.5 нм. Число экспериментальных точек при регистрации каждой кинетики составляло 4096. Для каждого спектрального канала измеряли также число

фотонов, зарегистрированных в данной области спектра.

Аппроксимацию экспериментальных кинетик флуоресценции проводили для каждого спектрального канала при помощи программы SPCImage (Becker & Hickl GmbH, Германия) по формуле (1), позволяющей разлагать кинетики по методу Марквардта–Левенберга на сумму от одной до пяти экспонент, свернутых с аппаратной функцией системы регистрации, измеряемой для каждого спектрального канала.

$$F(t, \lambda) = \sum_i a_i(\lambda) \exp(-t/\tau_i), \quad i = 1, 2. \quad (1)$$

Здесь $a_i(\lambda)$ представляет собой зависящий от длины волны сигнала флуоресценции предэкспоненциальный множитель компоненты с временем жизни τ_i . При разложении экспериментальных кинетик мы ограничились двумя экспонентами, так как дальнейшее увеличение числа компонент не приводило к снижению χ_r^2 . Для всех выбранных спектральных областей значение χ_r^2 не превышало величины 1.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Процессы возбуждения и дезактивации возбужденного состояния молекулы Трп представим в виде схемы 1. В соответствии с этой схемой кинетика затухания флуоресценции Трп имеет двухкомпонентный характер: дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит по

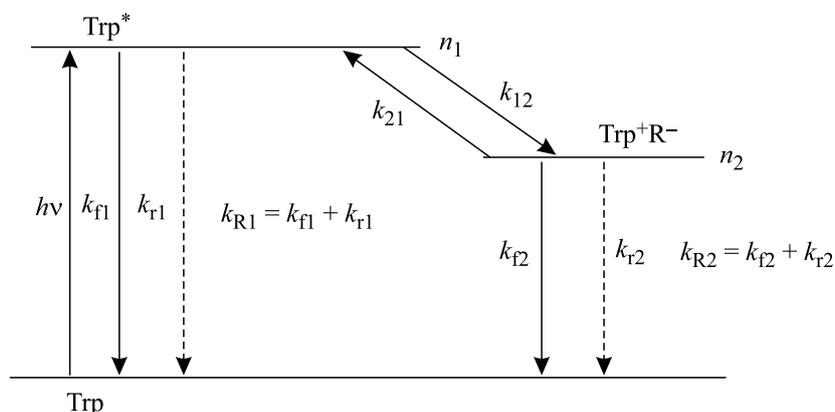


Схема 1. Модельная схема кинетических переходов в триптофане: n_1 , n_2 – населенности возбужденного состояния молекул Трп и состояния с переносом заряда; $\text{Трп}^+\text{R}^-$ – состояние с переносом заряда, где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Трп, так и амидные группы с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Трп; k_{R1} – константа скорости затухания возбужденного состояния Трп,

включающая флуоресценцию (k_{f1}) и безызлучательную релаксацию (k_{r1}): $\text{Трп}^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$, ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$); k_{12} – скорость перехода Трп^* в состояние CTS; k_{21} – скорость рекомбинации $\text{CTS} \rightarrow \text{Трп}^*$; k_{R2} – скорость затухания

CTS за счет флуоресценции и безызлучательной релаксации: $\text{CTS}^* \xrightarrow{k_{R2}} S_0$, $k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$.

двум каналам – с испусканием флуоресценции (k_{f1}) и безызлучательной релаксацией (k_{r1}) в основное состояние $S^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$ ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$), а также с переходом молекулы Трр в промежуточное состояние (состояние с переносом заряда) $\text{Трр}^* \rightarrow \text{Трр}^+\text{R}^-$ со скоростью k_{12} , рекомбинирующего затем со скоростью k_{21} обратно в S^* -состояние: $S^* \xrightarrow{k_{12}} \text{CTS} \xrightarrow{k_{21}} S^* \xrightarrow{k_{R1}} S_0$. Согласно работе [17], помимо обратного перехода в S^* -состояние распад CTS также может происходить с испусканием флуоресценции и за счет безызлучательной релаксации в основное состояние ($\text{CTS} \xrightarrow{k_{R2}} S_0$) ($k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$). В этом отношении интересно отметить, что релаксация ион-радикальной пары реакционного центра фотосистемы II в основное состояние также сопровождается испусканием флуоресценции в длинноволновой области спектра [18, 19].

Мы детально исследовали кинетики затухания флуоресценции Трр в водном растворе в диапазоне температур от -170°C до 20°C для различных спектральных областей свечения при замораживании образцов в темноте (D) и на свету (L). Обработку экспериментальных кинетик проводили так, как это описано в работе [11].

На рис. 1–3 показаны рассчитанные температурные зависимости констант скоростей прямого перехода k_{12} ($\text{Трр}^* \rightarrow \text{CTS}$) и обратного перехода k_{21} ($\text{CTS} \rightarrow \text{Трр}^*$). При аппроксимации кинетик затухания флуоресценции варьировали значения скоростей перехода k_{12} и k_{21} . Остальные параметры схемы 1 фиксировали. Из рис. 1–3 видно, что температурная зависимость константы скорости перехода k_{12} в области $T < -125^\circ\text{C}$ носит безактивационный характер: с увеличением температуры k_{12} уменьшается пропорционально величине $1/\sqrt{T_K}$, где T_K – абсолютная температура. Как видно из рис. 1–3, для Трр в водной среде образование квазизоны проводимости системы Н-связей может происходить уже при температурах ($T < -125^\circ\text{C}$), что следует из безактивационного характера переноса электрона на амидные группы по системе Н-связей. Видно также, что при $T > -90^\circ\text{C}$ с ростом температуры происходит термоактивационное увеличение константы скорости k_{12} при постоянной энергии активации перехода.

Обработка экспериментальных результатов выявляет различный характер температурной зависимости скоростей перехода k_{12} и k_{21} в той области, где предполагается нелинейный характер сольватации возбужденного состояния триптофана ($-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$) для различных участков

спектра. Для адекватной аппроксимации экспериментальной температурной зависимости k_{12} во всей исследованной области температур предполагалась зависимость энергии активации перехода E_a от температуры в области $-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$ в следующем виде [20]

$$E_a = \frac{(-G + E_r)^2}{4E_r}. \quad (2)$$

Здесь E_r – энергия реорганизации среды преобразования CTS, ΔG – разность уровней свободной энергии состояний Трр^* и CTS (схема 1). При этом считалось, что процессы переноса электрона происходят в неинвертированной области параметров соотношения (2), для которой выполняется условие $\Delta G \leq E_r$. В этом случае при уменьшении энергии реорганизации E_r энергия активации перехода E_a также уменьшается и достигает нуля при $\Delta G = E_r$ (безактивационный переход). Водородные связи ближайшего окружения Трр^* дают определенный вклад в энергию реорганизации среды и, согласно уравнению (2), также влияют на величину энергии активации перехода $\text{Трр}^* \rightarrow \text{CTS}$.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [15] показано, что в окружении молекулы триптофана в водном растворе и льдах образуется упорядоченная система водородных связей, имеющая вид цвиттерионного комплекса, которая оказывает существенное влияние на динамику возбуждений в системе. Показано также, что при электронном возбуждении молекулы триптофана происходит увеличение жесткости водородных связей, что приводит к делокализации электрона между индольной частью Трр и водородными связями цвиттерионного комплекса и вызывает значительный сдвиг спектра флуоресценции триптофана в красную область. Однако в работе [15] рассмотрены только стационарные спектры поглощения и флуоресценции триптофана в водном растворе без учета их зависимости от температуры. Поэтому представляло интерес исследовать динамику спектральных и кинетических параметров, описывающих процессы затухания флуоресценции триптофана в водной среде при импульсном фотовозбуждении в зависимости от температуры.

Анализ полученных в работе экспериментальных и теоретических кривых позволил выделить три области в спектре флуоресценции Трр: коротковолновую область (В) ($300 \text{ нм} < \lambda < 386 \text{ нм}$), промежуточную область (М) ($386 \text{ нм} < \lambda < 400 \text{ нм}$) и длинноволновую область (R) ($400 \text{ нм} < \lambda < 470 \text{ нм}$), для которых температурная зависимость скорости образования CTS имеет различ-

ный характер. Оказалось, что в области спектра флуоресценции (В) при изменении температуры от -80°C до 20°C наблюдается отступление температурной зависимости скорости перехода k_{12} (рис. 1) от стандартного аррениусовского поведения с постоянной энергией активации. В температурной области $-80^{\circ}\text{C} < T < -20^{\circ}\text{C}$ скорость перехода k_{12} увеличивается до максимума при $T = -20^{\circ}\text{C}$. При дальнейшем росте температуры до 20°C происходит уменьшение k_{12} (рис. 1). Нелинейную колоколообразную зависимость скорости перехода возбужденного состояния Trp^* в состояние CTS по сравнению со стандартной реакцией с постоянной энергией активации E_a можно связать с возможным структурным фазовым переходом системы водородных связей в окружении Trp^* в области температур $-80^{\circ}\text{C} < T < 20^{\circ}\text{C}$. Действительно, система водородных связей в окружении возбужденной молекулы триптофана при фазовом переходе в температурной области ($T_1 < T < T_2$) перестраивается и описывается критической, мягкой модой [16], при которой протоны водородных связей переходят в новое положение равновесия. Возникающее электрическое поле индольной части возбужденной молекулы триптофана способствует процессу фазового перехода в системе окружающих водородных связей, при этом важную роль играет их взаимное (mutual) взаимодействие.

Характер температурных эффектов в спектральной области $300\text{ нм} < \lambda < 386\text{ нм}$. Коротковолновый участок спектра флуоресценции $300\text{ нм} < \lambda < 386\text{ нм}$ (область В) соответствует излучению той части возбужденных молекул триптофана, в окрестности которых система водородных связей в находится в начале перестройки и испытывает флуктуации положений протонов вдоль водородных связей. Известно, что потенциальная энергия движения протонов вдоль водородных связей имеет вид двухъямного потенциала [16]. Под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы триптофана энергия движения протонов становится выше барьеров потенциальных ям, в результате они могут определенное время двигаться вдоль водородных связей практически свободно. Также возможен переход протона вдоль водородной связи из одной потенциальной ямы в более близкую к индольной части потенциальную яму возбужденной молекулы триптофана по туннельному механизму. Данный механизм рассмотрен в работах [21, 22]. В этом участке спектра аномальный характер температурной зависимости скорости k_{12} перехода Trp^* в состояние CTS можно объяснить уменьшением энергии реорганизации данной реакции за счет уменьшения коэффициента упругости (жесткости) части водородных связей при их перестройке. При уменьшении энергии реоргани-

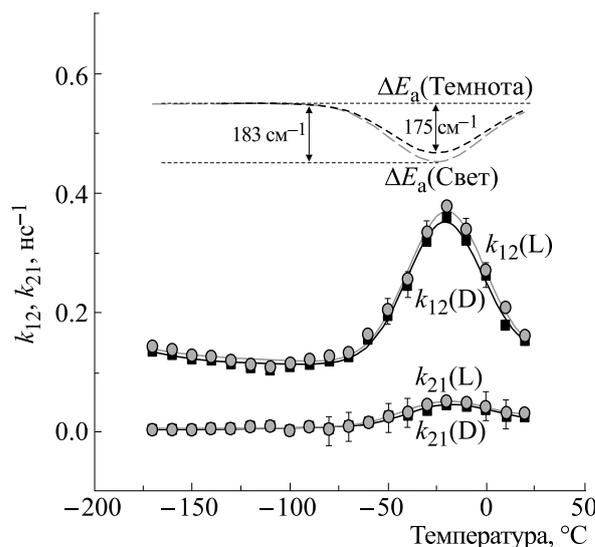


Рис. 1. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$, k_{21} — обратной реакции $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ и энергии активации реакции ΔE_a для замороженных в темноте (D, ■) и на свету (L, ●) образцов в коротковолновой спектральной области (В). Зависимости ΔE_a от температуры для D- и L-образцов показаны в относительном масштабе. Среднеквадратичная ошибка значения k_{12} не превышала величины 0.01 нс^{-1} , значения $k_{21} = 0.015\text{ нс}^{-1}$ для образцов, замороженных в темноте и на свету соответственно. Сплошные линии построены согласно модели рис. 2 (система уравнений (2)), с зависящей от температуры энергией активации ΔE_a в температурной области $-80^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$.

зации процесса переноса электрона уменьшается и энергия активации этого перехода E_a (уравнение 2), так как при этом величина ΔG остается еще практически постоянной. С ростом температуры количество взаимодействующих критических водородных связей, теряющих часть жесткости в начале фазового перехода, растет за счет увеличения числа эффективно взаимодействующих протонов, в результате продолжает уменьшаться энергия реорганизации перехода. Это приводит к уменьшению энергии активации перехода E_a для синего участка спектра с ростом температуры, которая достигает минимума при температуре $T_m = -20^{\circ}\text{C}$. При этом скорость перехода k_{12} возбужденного состояния триптофана в CTS состояние (рис. 1) увеличивается и достигает максимума при этой же температуре T_m (рис. 1). При дальнейшем росте температуры от T_m до $T_2 = 20^{\circ}\text{C}$ растет тепловая энергия движения протонов, уменьшается количество взаимно (mutual) взаимодействующих водородных связей мягкой моды, участвующих в фазовом переходе,

что приводит в результате к увеличению энергии реорганизации и соответствующему увеличению энергии активации. В результате при достижении максимальной температуры фазового перехода T_2 энергия активации возвращается к постоянной величине стандартного термоактивационного перехода. При этом скорость перехода $\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$ уменьшается до величины, наблюдаемой при стандартном переходе с постоянной энергией активации (рис. 1). Отсюда следует подтверждение ранее высказанного предположения, что в начале перестройки водородных связей в результате их взаимодействия, а также под воздействием электрического поля индольной части возбужденной молекулы Trp образуется виртуальная (временная) зона проводимости системы водородных связей, которая приводит к увеличенной скорости перехода возбужденного состояния Trp в состояние с переносом заряда в коротковолновой области спектра (В).

Температурная зависимость скорости обратного перехода k_{21} в спектральной области (В) хорошо описывается следующим выражением с постоянным значением свободной энергии перехода ΔG :

$$k_{21}(T) = k_{12}(T)\exp(-\Delta G/k_B T_K), \quad (3)$$

где k_B – постоянная Больцмана, T_K – абсолютная температура по шкале Кельвина. Оценка величины ΔG для D-образцов дает значение 375 см^{-1} . Для L-образцов температурная область в участке спектра (В), в которой происходит увеличение скорости перехода k_{12} , несколько шире, чем для D-образцов. При этом энергия активации для L-образцов уменьшается на большую величину, чем для D-образцов, что сопровождается соответствующим увеличением скорости k_{12} (рис. 1). Данный эффект может быть связан с тем, что для L-образцов в процессе замораживания на свету в системе Н-связей происходит предварительное накопление водородных связей в состоянии увеличенной жесткости в окрестности молекулы триптофана. В результате при перестройке водородных связей их жесткость уменьшается на большую величину, чем в D-образцах. Это вызывает дополнительное снижение энергии реорганизации перехода $\text{Trp}^* \rightarrow \text{CTS}$ и соответствующее уменьшение энергии активации (уравнение (2)). Температурная зависимость скорости обратного перехода k_{21} для образцов, замороженных на свету, также описывается выражением (3). Оценка величины G для L-образцов дает значение 330 см^{-1} . При этом для L-образцов скорость обратного перехода k_{21} в температурной области $-80^\circ\text{C} < T < -20^\circ\text{C}$ несколько больше, чем для Dh-образцов (рис. 1). Таким образом, из полученных результатов следует, что, в отличие от

данных работы [15], в спектральной области (В) динамика процессов прямого (k_{12}) и обратного (k_{21}) переходов определяется, главным образом, процессом перестройки водородных связей в окрестности возбужденной молекулы триптофана, сопровождающейся уменьшением их жесткости.

Характер температурных эффектов в спектральной области $386 \text{ нм} < \lambda < 400 \text{ нм}$. Средний участок спектра флуоресценции триптофана ($386 \text{ нм} < \lambda < 400 \text{ нм}$) соответствует излучению той части возбужденных молекул триптофана, в окружении которых уже произошел фазовый переход некоторого числа водородных связей, сопряженный с возникновением дипольного момента системы водородных связей и восстановлением их жесткости. Такой фазовый переход приводит к увеличению энергии реорганизации перехода E_T и уменьшению свободной энергии перехода ΔG , что вызывает соответствующий рост энергии активации E_a (уравнение (2)). В то же время для оставшейся части возбужденных молекул система водородных связей все еще находится в состоянии перестройки и вносит вклад в уменьшение энергии реорганизации перехода E_T и энергии активации E_a . В результате в данной спектральной области (М) увеличение энергии активации за счет фазового перехода и соответствующего уменьшения свободной энергии перехода ΔG компенсируется снижением величины E_a за счет уменьшения E_T для той части молекул, в окрестности которых перестройка системы водородных связей еще не завершена. При этом в спектральной области М энергия активации слабо зависит от температуры (рис. 2). Из этого рисунка видно также, что для L-образцов константа скорости прямого перехода k_{12} больше, чем для D-образцов. При температуре $T < -100^\circ\text{C}$ увеличение скорости k_{12} для L-образцов происходит в результате того, что при охлаждении в условиях постоянного освещения образцы замораживаются с большей жесткостью и упорядоченностью водородных связей, что приводит к образованию зоны проводимости. Такое явление способствует безактивационному переносу электрона с индольной части Trp^* на водородные связи и амидные группы. В области температур фазового перехода ($-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$) при замораживании на свету в системе водородных связей сохраняются микрoконформационные смещения, благоприятствующие развитию взаимодействия водородных связей в окружении молекул Trp . В результате растет количество перестраиваемых Н-связей, что вызывает большее снижение энергии реорганизации E_T и соответствующее уменьшение энергии активации E_a для L-образцов по сравнению с D-образцами (рис. 2). В результате скорость пере-

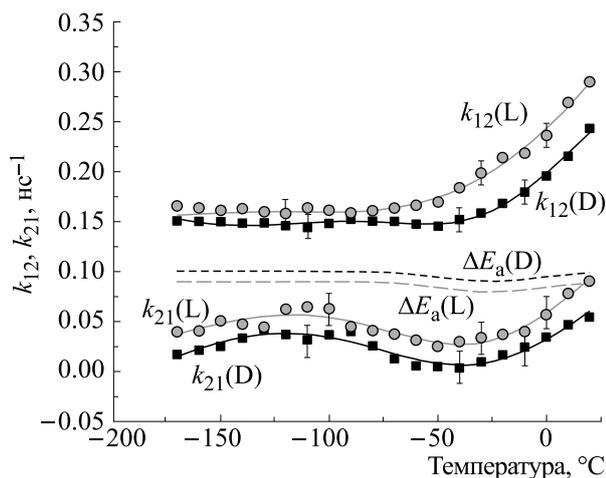


Рис. 2. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Tgr}^* \rightarrow \text{Tgr}^+\text{R}^-$, k_{21} — обратной реакции $\text{Tgr}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Tgr}^*$ и энергии активации реакции ΔE_a для замороженных в темноте (D, ■) и на свету (L, ●) образцов в спектральной области (M). Зависимости ΔE_a от температуры для D- и L-образцов показаны в относительном масштабе. Среднеквадратичная ошибка значения k_{12} не превышала величины 0.012 ns^{-1} , значения k_{21} — 0.018 ns^{-1} для образцов, замороженных в темноте и на свету соответственно. Максимальное изменение ΔE_a для D- и L-образцов в области температуры -40°C не превышало величины 10 cm^{-1} .

хода Tgr^* в CTS для L-образцов больше, чем для D-образцов (рис. 2).

Для температурной зависимости константы скорости обратного перехода k_{21} (CTS \rightarrow Tgr^*) в средней области спектра флуоресценции наблюдается минимум в районе -40°C для образцов, замороженных в темноте и на свету. Можно сделать вывод, что в окружении молекул Tgr , находящихся в CTS-состоянии в температурной области фазового перехода свободная энергия перехода ΔG уменьшается на большую величину, чем энергия реорганизации E_r в уравнении (2). Такой эффект вызывает дополнительную сольватацию молекул Tgr , перешедших в CTS-состояние. В результате происходит уменьшение константы скорости обратного перехода k_{21} (рис. 2). Видно также, что в образцах, замороженных на свету, константа скорости обратного перехода k_{21} превышает значение k_{21} в образцах, замороженных в темноте (рис. 2). Это, возможно, обусловлено тем, что свободная энергия перехода ΔG для L-образцов уменьшается на меньшую величину за счет большего числа «замороженных» микроконформационных искажений в системе Н-связей в окружении молекул Tgr на свету, чем для D-образцов.

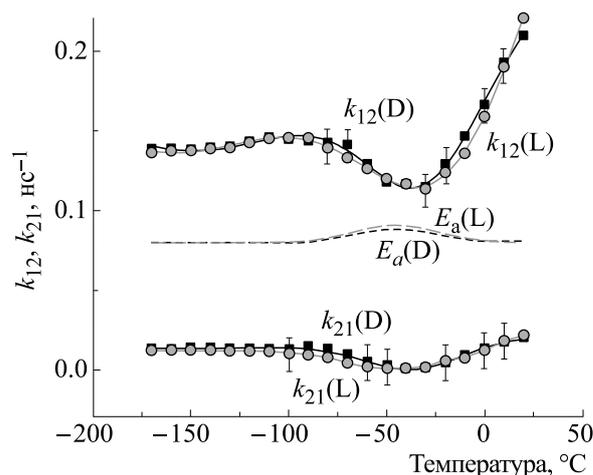


Рис. 3. Температурные зависимости констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Tgr}^* \rightarrow \text{Tgr}^+\text{R}^-$ и энергии активации реакции ΔE_a для замороженных в темноте (D, ■) и на свету (L, ●) образцов в спектральной R-области. Зависимости ΔE_a от температуры для D- и L-образцов показаны в относительном масштабе. Среднеквадратичная ошибка значения k_{12} не превышала величины 0.015 ns^{-1} , значения k_{21} — 0.025 ns^{-1} для образцов, замороженных в темноте и на свету соответственно. Максимальное увеличение E_a для D-образцов в области -40°C равно 80 cm^{-1} , для L-образцов — 85 cm^{-1} .

Характер температурных эффектов в спектральной области $400 \text{ nm} < \lambda < 470 \text{ nm}$. Для молекул Tgr^* , флуоресцирующих в длинноволновом участке спектра $400 \text{ nm} < \lambda < 470 \text{ nm}$ (область R), фазовый переход водородных связей в окружении возбужденных молекул триптофана в основном завершен, водородные связи находятся в новом устойчивом положении за счет затухания флуктуаций движения протонов вдоль водородных связей. В результате увеличивается их жесткость, что вызывает соответствующее увеличение энергии реорганизации перехода. При этом в данной температурной области в окружении возбужденных молекул Tgr за счет смещения протонов возникает дополнительный дипольный момент в системе водородных связей. В результате взаимодействия электрического поля возникающего дипольного момента системы элементарных ячеек Н-связей с возбужденным электронным состоянием молекулы Tgr происходит ее дополнительная сольватация, которая достигает максимума при $T_s = -40^\circ\text{C}$. Как следствие, в данной области температур происходит уменьшение свободной энергии перехода $\Delta G(T)$ и увеличение энергии активации перехода E_a (рис. 3). В результате в температурной области $-80^\circ\text{C} < T < -40^\circ\text{C}$ наблюдается уменьшение скорости перехода (рис. 3) и соответствующее увеличение времени жизни

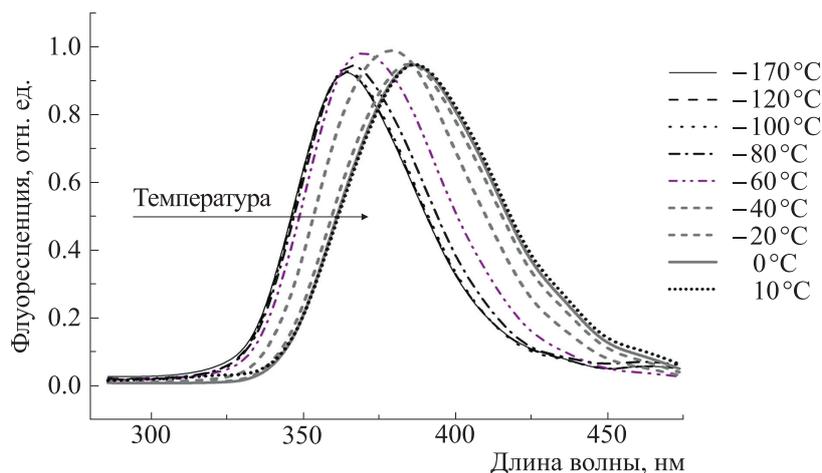


Рис. 4. Температурный сдвиг спектров флуоресценции триптофана с ростом температуры. Заметно увеличение скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции с ростом температуры в области фазового перехода в системе водородных связей в окружении Trp^* ($-70^\circ\text{C} < T < 10^\circ\text{C}$).

возбужденного состояния Trp^* относительно стандартной аррениусовской зависимости данных величин с постоянной энергией активации. При росте температуры выше -40°C увеличивается тепловая энергия протонов водородных связей, нарушающая их взаимное (mutual) взаимодействие и происходит уменьшение $\Delta G(T)$. Как следствие, происходит уменьшение энергии активации E_a до значения стандартного Аррениусовского перехода и, соответственно, увеличивается константа скорости k_{12} . Видно (рис. 2), что скорости прямого перехода k_{12} для образцов, замороженных на свету и в темноте, имеют близкие температурные зависимости, так как после завершения фазового перехода практически все дополнительные микроконформационные изменения водородных связей на свету нивелированы. Отметим, однако, что после перехода Trp в CTS -состояние, в L -образцах наблюдается сдвиг температурной зависимости минимума скорости обратного перехода в область -50°C по сравнению с -40°C для D -образцов. Следовательно, в окружении возбужденной молекулы Trp в CTS -состоянии для образцов, замороженных на свету, сохра-

няется часть микроконформационных смещений в системе водородных связей, что приводит к смещению минимума температурной зависимости константы скорости обратного перехода $\text{CTS} \rightarrow \text{Trp}^*$ в область -50°C и ее уширение на 10°C (рис. 2).

Температурная зависимость спектров флуоресценции триптофана. На рис. 4 показано поведение спектров флуоресценции триптофана с ростом температуры для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, получены близкие результаты. Отчетливо видно увеличение скорости сольватационного сдвига спектров флуоресценции с ростом температуры в области фазового перехода в системе водородных связей в окружении Trp^* ($-80^\circ\text{C} < T < 20^\circ\text{C}$), что связано с возникновением электрического поля, дающего вклад в дополнительную сольватацию возбужденного состояния молекулы триптофана.

Для детального анализа особенностей спектров флуоресценции Trp на рис. 5 показаны спектры флуоресценции триптофана для температур -60°C , -40°C , -20°C и 0°C . Проведена аппрок-

Таблица 1. Параметры разложения спектров флуоресценции триптофана на сумму гауссовых компонент

| $T, ^\circ\text{C}$ | (1) -60°C | (2) -40°C | (3) -20°C | (4) 0°C |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| A_{C1} | 0.64 | 0.77 | 0.78 | 0.79 |
| λ_{C1}, nm | 365.1 | 373.4 | 380.6 | 382.8 |
| W_{C1}, nm | 19.3 | 23.97 | 26.0 | 26.5 |
| A_{C2} | 0.59 | 0.45 | 0.36 | 0.34 |
| λ_{C2}, nm | 386.1 | 398.9 | 408.7 | 412 |
| W_{C2}, nm | 33.1 | 35.7 | 37.9 | 39.1 |

Примечание. A_{Cj} – амплитуда, λ_{Cj} – длина волны максимума, W_{Cj} – ширина j -й гауссовой компоненты спектра, $j = 1, 2$.

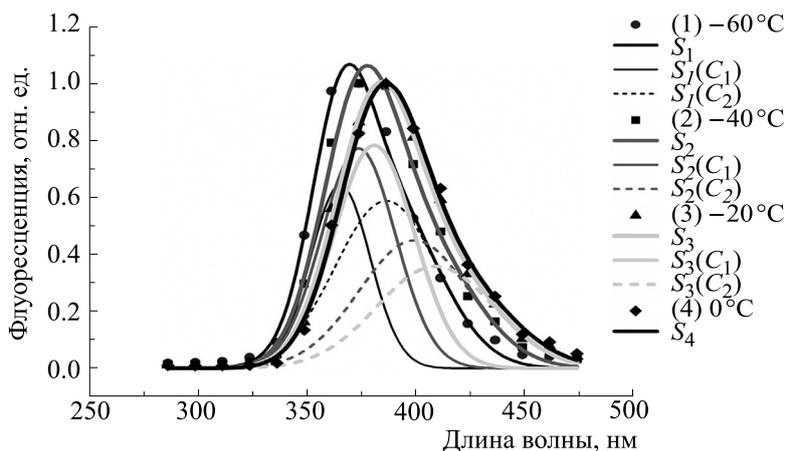


Рис. 5. Спектры флуоресценции триптофана в водном растворе при температурах -60°C , -40°C , -20°C и 0°C . Проведено разложение спектров флуоресценции на две гауссовых компоненты ($S_i(C_1)$) и ($S_i(C_2)$). S_i ($i = 1, 2, 3, 4$) обозначают аппроксимацию i -го спектра суммой гауссовых компонент ($S_i = S_i(C_1) + S_i(C_2)$, показаны жирными линиями). Компоненты разложения спектра (4) не показаны. Параметры разложения представлены в таблице. Данные приведены для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, получены близкие результаты.

симация данных спектров суммой двух гауссовых компонент, результаты разложения представлены в табл. 1. Данные получены для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, были получены близкие результаты.

На рис. 6 показана температурная зависимость положений спектральных гауссовых компонент разложения спектров флуоресценции триптофана, а также скорости изменения положений этих максимумов от температуры. Данные показаны для D-образцов. Отчетливо видно, что максимальное увеличение скорости сольватационного сдвига наблюдается в области -40°C для обеих компонент разложения. При этом поведение кривых $\Delta\lambda_m/\Delta T$ в области температур $-80^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$ близко к форме кривых τ_1 и τ_2 в этой же области температур (данные не приведены). По нашему мнению, этот результат подтверждает уже сделанный ранее вывод, что в указанной области температур происходят конформационные (фазовые) перестройки систем Н-связей в окрестности возбужденной молекулы Трп. Была определена также разность энергий спектральных максимумов состояний Трп* и СТС в см^{-1} в зависимости от температуры. Результаты представлены на рис. 7. Видно, что в области температур от -170°C до -110°C разность энергий спектральных максимумов состояний Трп* и СТС примерно постоянна. Это соответствует случаю «замороженной» сольватационной координаты. В области $-110^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$ разность энергий спектральных максимумов состояний Трп* и СТС уменьшается, а затем начинает увеличиваться. Как предполагалось ранее, в области температур

$-110^{\circ}\text{C} \div -80^{\circ}\text{C}$ молекула Трп* действительно сольватируется быстрее, чем СТС, поэтому наблюдается минимум кривой $\Delta EC_{1,2}$. С дальнейшим ростом температуры уже СТС начинает соль-

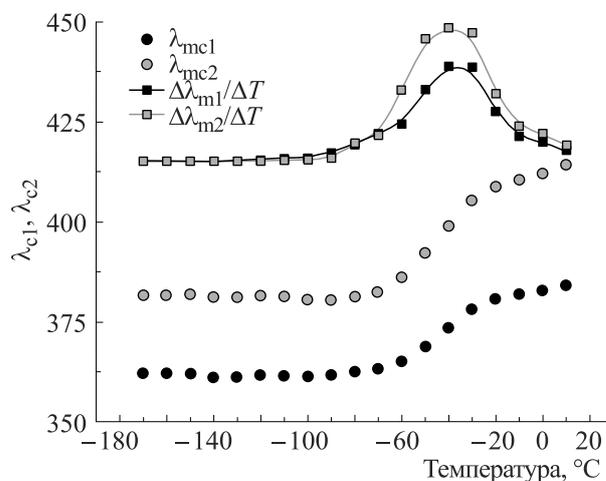


Рис. 6. Температурная зависимость положений спектральных максимумов компонент разложения спектров флуоресценции триптофана на гауссовы компоненты. λ_{mC1} (●) соответствует компоненте флуоресценции Трп*, λ_{mC2} (◆) соответствует компоненте флуоресценции СТС. Данные зависимости показаны для образцов, замороженных в темноте. Для образцов, замороженных на свету, получены близкие данные. $\Delta\lambda_{m1}/\Delta T$ (■) и $\Delta\lambda_{m2}/\Delta T$ (▲) – скорости изменения положений максимумов первого и второго гауссовых компонент разложения спектров флуоресценции от температуры. Данные зависимости показаны в относительном масштабе.

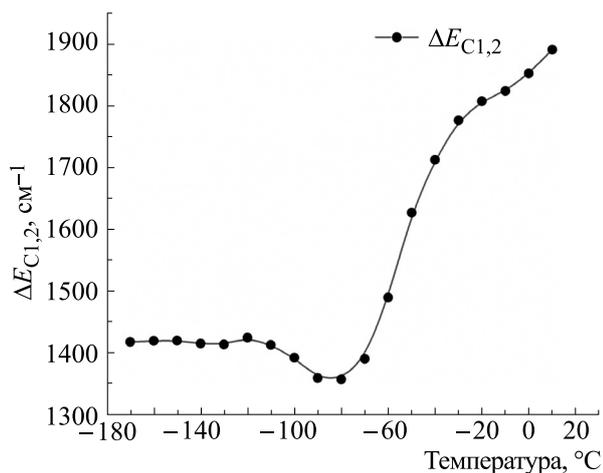


Рис. 7. Разность энергий спектральных максимумов компонентов разложения спектров флуоресценции триптофана $\Delta E_{C1,2}$ в зависимости от температуры.

ватироваться быстрее, чем Тгр*, это приводит к увеличению разности энергий спектральных максимумов состояний Тгр* и СТС (рис. 7). Максимальный прирост разности энергий спектральных максимумов состояний Тгр* и СТС происходит в области температуры -40°C . Таким образом, мы отчетливо видим, что с увеличением температуры от -80°C до 10°C СТС сольватируется быстрее, чем состояние Тгр*, так как в этой области температур в окружении СТС структурный (фазовый) переход захватывает большее количество водородных связей, чем в окружении Тгр*. Этот результат подтверждает уже сделанное нами предположение о том, что в температурном диапазоне от -80°C до 10°C происходит отступление температурной динамики переходов возбужденной молекулы триптофана от стандартного аррениусовского поведения с постоянной энергией активации за счет фазового перехода в системе водородных связей в ее окружении.

Отметим, что обнаруженные в работе температурные зависимости константы скорости прямого перехода Тгр* \rightarrow СТС (k_{12}) и обратного перехода СТС \rightarrow Тгр* (k_{21}) наблюдаются только для замороженных водных растворов триптофана, для которых возможно возникновение упорядоченной сетки водородных связей, тогда как для триптофана, например, в глицерине, такие эффекты не наблюдаются (данные не показаны).

Использованный в работе спектрально-динамический подход при исследовании температурных зависимостей процессов переходов возбужденных состояний Тгр позволил обнаружить и обосновать возникновение неравновесных фазовых переходов в системе водородных связей в определенном диапазоне температур в окруже-

нии Тгр* и СТС. Такой подход может, очевидно, быть полезен и при исследовании переходов возбужденных пигментов в белковой среде, обладающей упорядоченной системой водородных связей. Состояние системы водородных связей во многом определяет характер внутримолекулярной микроконформационной динамики водно-белковой среды, влияющей на функциональную активность триптофана.

Полученные в работе результаты во многом объясняются уникальными свойствами водной среды, ее переходами в неравновесные состояния, а также способностью к самоорганизации при внешнем воздействии. Такие структурные особенности воды изучались разными авторами во многих работах. В частности, в работе [23] изучали модуляцию спектра спонтанной флуоресценции триптофана, при этом авторы интерпретировали воду и водные растворы как неравновесные системы, способные к самоорганизации. В работе [24] было показано, что неравновесность воды обеспечивается сильно неравновесным отношением *орто/пара*-спиновых изомеров H_2O , вращательные спектры которых в терагерцовой области обнаружены в воде методом нелинейно-оптической спектроскопии когерентного антистоксового рассеяния. Способность воды к самоорганизации было подтверждено в эксперименте. Так устойчивое образование льдоподобных структур в воде наблюдалось в воде при комнатной температуре в работе [25]. Также существенно, что эти структуры формируются и в гидратных оболочках водных растворов спиртов [26], что позволяет существенно расширить номенклатуру исследуемых сред, в том числе водно-белковых фотобиологических структур.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. L. Dashnau, B. Zelent, and J. M. Vanderkooi, *Bio-phys. Chem.*, **114**, 71 (2005).
2. D. E. Schlamadinger, J. E. Gable, and J. E. Kim, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 14769 (2009).
3. Э. А. Бурштейн, *Молекуляр. биология*, **17**, 455 (1983).
4. A. G. Szabo and D. M. Rayner, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 554 (1980).

5. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3rd ed. (Springer, New York, 2006).
6. P. D. Adams, Y. Chen, K. Ma et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 9278 (2002).
7. J. A. Ross and D. M. Jameson, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 1301 (2008).
8. P. P. Knox, E. P. Lukashov, V. V. Gorokhov, et al., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, **189**, 145 (2018).
9. P. P. Knox, V. V. Gorokhov, B. N. Korvatovsky, et al. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **393**, 112435 (2020).
10. В. В. Горохов, Б. Н. Корватовский, П. П. Нокс и др., Докл. РАН. Науки о жизни, **498**, 19 (2021).
11. В. З. Пашенко, В. В. Горохов, Б. Н. Корватовский и др., *Биофизика*, **66**, 354 (2021).
12. J. Pieper, Th. Hauss, A. Buchsteiner, et al., *Biochemistry*, **46**, 11398 (2007).
13. W. Doster, *Eur. Biophys. J.*, **37**, 591 (2008).
14. K. L. Han and G. J. Zhao, *Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State* (John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2011).
15. H. Liu, H. Zhang, and B. Jin. *Spectrochim. Acta. Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **106**, 54 (2013).
16. Р. Блинц и Б. Жекш, *Сегнетоэлектрики и антисегнетоэлектрики. Динамика решетки* (Мир, М., 1975).
17. K. Vandewal, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **67**, 113 (2016).
18. M. G. Müller, K. Griebenow, and A. R. Holzwarth, *Chem. Phys. Lett.*, **199**, 465 (1992).
19. Y. Miloslavina, M. Szczepaniak, M. G. Muller, et al. *Biochemistry*, **45**, 2436 (2006).
20. R. A. Marcus and N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 265 (1985).
21. P. M. Krasilnikov, P. P. Knox, and A. B. Rubin, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 181 (2009).
22. А. Б. Рубин, *Биофизика* (М., 2013), т. 3.
23. В. И. Лобышев, Б. Д. Рыжиков и Р. Э. Шихлинская, *Биофизика*, **43** (4), 710 (1998).
24. S. Pershin and A. Bunkin, *Laser Physics*, **19**, 1410 (2009). DOI: 10.1134/S1054660X0907007X
25. K. B. Jinesh and J. W. M. Frenken, *Appl. Phys. Lett.*, **101**, 036101 (2008).
26. J. Davis, K. Gierszal, P. Wang, and D. Ben-Amotz, *Nature*, **491**, 582 (2012). DOI: 10.1038/nature11570

Influence of the Microenvironment Dynamics of Tryptophan on Its Fluorescence Parameters at Different Temperatures

V.V. Gorokhov*, P.P. Knox*, B.N. Korvatovsky*, S.N. Goryachev*, V.Z. Paschenko*, and A.B. Rubin*

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

The temperature dependences of the fast and slow fluorescence decay components of aqueous solution of tryptophan molecules after freezing to $-170^{\circ}\text{C} \div 20^{\circ}\text{C}$ under actinic light and in the dark were investigated. A model of the direct and reverse electronic transitions from an excited state to the ground state and to the state with charge transfer for a tryptophan molecule was used to perform quantitative analysis. Three main spectral regions of tryptophan fluorescence are shown, they differ in the behavior of the temperature dependences depicted for the rates of transition from the excited state of tryptophan to the state with charge transfer. It has been shown that the dynamics of the hydrogen bonded system plays a key role in this transition. The system of hydrogen bonding determines the nonlinear nature in tryptophan fluorescence in the selected spectral regions. The non-linear behavior of the fluorescence lifetime and fluorescence spectra with temperature change is determined by the type of the interaction of tryptophan with water and ice. It has been found that temperature rearrangements play a critical role in hydrogen bonding structure of H_2O_2 that surrounds a tryptophan molecule in the excited state.

Keywords: tryptophan, fluorescence decay kinetics, temperature dependence, hydrogen bonds, molecular dynamics