

Импульсный двойной электрон-электронный резонанс (PELDOR) — спектроскопия ЭПР в нанометровом диапазоне расстояний

Ю.Д.Цветков, А.Д.Милов, А.Г.Марьясов

*Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук
630090 Новосибирск, ул. Институтская, 3, факс (383)330–7350*

Обобщены и систематизированы результаты разработки и применения в структурных исследованиях метода импульсного двойного электрон-электронного резонанса (PELDOR). Изложены основы теории метода, рассмотрены его некоторые методические особенности и приложения, в том числе определение расстояний между спиновыми метками в нанометровом диапазоне для нитроксильных бирадикалов, спин-меченых биомакромолекул, ион-радикальных пар, пептид-мембранных комплексов. Особое внимание уделено радикальным системам, возникающим при самосборке наноразмерных комплексов (в частности, из пептидов), пространственным эффектам, радикальным парам при фотолизе и в фотосинтезе. Проанализировано место метода PELDOR среди других структурных методов спектроскопии ЭПР.

Библиография — 157 ссылок.

Оглавление

I. Введение	515
II. Основы теории метода PELDOR	517
III. Некоторые методические особенности PELDOR	522
IV. Приложения метода PELDOR	523
V. Заключение	547

I. Введение

Одна из основных задач структурной химии состоит в измерении расстояний между атомами или группами атомов в молекулах и расстояний между молекулами в разных молекулярных системах. Рентгеновская кристаллография — основной классический метод таких исследований. Однако выращивание кристаллов и установление структур по данным рентгеноструктурного анализа остается сложной задачей. Кроме того, характерная для монокристаллов структура биомакромолекул и их комплексов может и не обладать каталитическими свойствами или не быть биологически

активной. Поэтому такие методы, как ЯМР, ЭПР или некоторые другие спектроскопические методы, работающие с неупорядоченными образцами, оказываются полезными для получения структурной информации в жидкости или в замороженных растворах, т.е. в условиях, лучше моделирующих биологические системы, чем монокристаллы. Ценную информацию о строении и поведении нуклеиновых кислот, белков и их комплексов дают расчетные методы классической молекулярной динамики (МД), развитые в последнее десятилетие. Важным шагом, открывающим новые перспективы структурных исследований методом ЭПР, стали импульсные методы, в частности метод двойного электрон-электронного резонанса (PELDOR). В настоящем обзоре обобщены и систематизированы результаты применения этого метода для решения ряда задач.

Стационарный метод ЭПР широко используется для исследований структуры и динамики парамагнитных центров, в особенности для спиновых меток в различных биологических макромолекулах. Однако он имеет существенные ограничения при исследованиях слабых магнитных дипольных взаимодействий. Между тем изучение именно этих взаимодействий может дать структурную информацию о системах, в которых парамагнитные частицы расположены на расстояниях (r) порядка 1 нм и более. Величина дипольных взаимодействий пропорциональна $1/r^3$, что дает вклад в ширину линий ЭПР ~ 0.3 мТл при расстоянии 2 нм. Этот вклад в ширину линий в хаотически ориентированных образ-

Ю.Д.Цветков. Академик, советник РАН ИХКГ СО РАН.

Телефон (383)333–2192, e-mail: tsvetkov@kinetics.nsc.ru

А.Д.Милов. Кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник того же института. Телефон: (383)333–1377, e-mail: milov@kinetics.nsc.ru

А.Г.Марьясов. Кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник того же института. Телефон: (383)333–1377, e-mail: maryasov@kinetics.nsc.ru

Область научных интересов авторов: химическая физика, радиоспектроскопия, химия и физика свободных радикалов, теория магнитной радиоспектроскопии.

Дата поступления 11 февраля 2008 г.

цах значительно меньше вкладов, возникающих из-за других неоднородных уширений линий, например анизотропного сверхтонкого уширения или анизотропии g -фактора. Получить надежные данные о дипольных взаимодействиях для расстояний $r \geq 1.5$ нм на фоне других источников уширений с помощью стационарного метода ЭПР весьма затруднительно. Поэтому в настоящее время для исследований дипольных взаимодействий применяют импульсные методы ЭПР, позволяющие исключить неоднородное уширение, обусловленное всеми другими механизмами, кроме дипольного взаимодействия. Методом электронного спинового эха (ЭСЭ)¹ можно получить информацию о дипольных взаимодействиях, изучая кинетику спада сигнала ЭСЭ при изменении временного интервала между СВЧ-импульсами. Этот импульсный метод был развит и успешно применялся в 1970–1990-е гг. для определения расстояний и исследования пространственного распределения радикалов в облученных веществах и в других системах.^{2–4}

Отметим, однако, что метод ЭСЭ имеет ряд ограничений. Измеряемая величина минимального расстояния между частицами составляет ~ 3 нм (или максимальная концентрация спинов $\sim 10^{19}$ см⁻³) и определяется минимально измеряемым временем фазовой релаксации $(T_1)_{\min}$, величина которого, в свою очередь, связана с мертвым временем импульсного спектрометра ЭПР. Если в ближайшем окружении частицы присутствуют магнитные ядра, спад сигнала ЭСЭ будет модулирован на частотах анизотропного сверхтонкого взаимодействия с этими ядрами (эффекты модуляции в ЭСЭ, так называемые эффекты ESEEM — Electron Spin Echo Envelope Modulation).⁵ Такая модуляция осложняет анализ кинетики спада: возникает неоднозначность при выделении параметров (частот) дипольного взаимодействия. Из-за этих ограничений нередко оказывается, что извлечь надежную информацию о дипольном взаимодействии с помощью простейшей импульсной методики ЭСЭ хотя и возможно, но так же сложно, как и для стационарного метода ЭПР.

Эти проблемы удалось решить, когда в ИХКГ СО РАН (Новосибирск) был предложен⁶ двухчастотный импульсный вариант ЭСЭ для определения расстояний между парамагнитными центрами на основе данных о магнитных спиновых дипольных взаимодействиях.⁷ Этот импульсный метод получил сокращенное название PELDOR, что соответствует принятому в литературе сокращению ELDOR (Electron Double Resonance) для двухчастотного непрерывного метода ЭПР. Некоторые исследователи предпочитают сокращение DEER (Double Electron Electron Resonance). При этом, однако, возникают трудности, например, при работе с компьютерными поисковыми системами. Импульсная последовательность этого метода показана на рис. 1.

При теоретическом анализе импульсных экспериментов в спектроскопии ЭПР выделяют два типа спинов: А и В (рис. 2,а). В обычной спектроскопии ЭСЭ только спины А на частоте регистрации сигнала эха ν_A меняют свою ориентацию под действием $\pi/2$ - и π -импульсов, формирующих сигнал эха. В двухчастотном методе воздействуют на спины В π -импульсами накачки на частоте ν_B , расположенными во временном интервале τ в момент времени $t = T$ между первым и вторым импульсами на частоте регистрации ν_A (см. рис. 1,а).

Действующий на спины В импульс изменяет их z -проекцию и, как результат, меняет локальное магнитное поле на спинах А (рис. 2,б). Величина этого изменения определяется магнитным дипольным взаимодействием спинов А и В. В результате изменение локального магнитного поля спинов

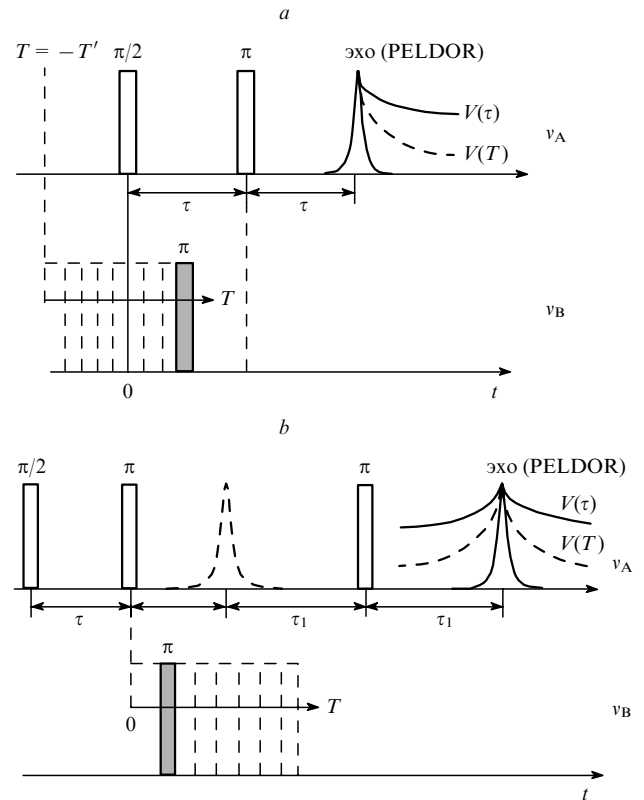


Рис. 1. Импульсные последовательности метода PELDOR.

а — трехимпульсный PELDOR. Сигнал спинового эха $V(\tau)$ возникает после действия $\pi/2$ - и π -импульсов на частоте ν_A . Между этими импульсами на частоте ν_B приложен π -импульс накачки. Этот импульс в момент T в интервале времени $0-\tau$ меняет амплитуду сигнала эха. Изменение фиксируется как сигнал PELDOR $V(T)$. б — четырехимпульсный PELDOR. Сигнал эха образуется под действием трех импульсов ($\pi/2$, π , π) на частоте ν_A , а его изменение (эффект PELDOR) возникает за счет π -импульса, приложенного в интервале времени от τ до $\tau + \tau_1$ на частоте ν_B .

А вызывает их дополнительную расфазировку при прецессии вектора намагниченности в плоскости xy после действия первого $\pi/2$ -импульса. Это, в свою очередь, изменяет амплитуду сигнала эха $V(\tau)$ по сравнению с его амплитудой в

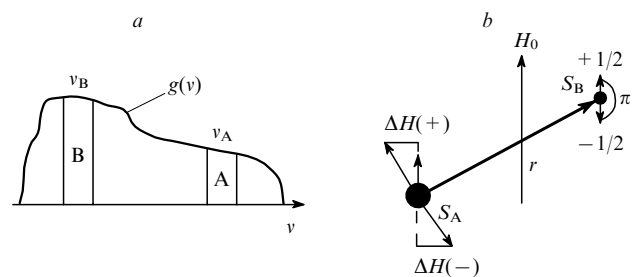


Рис. 2. Спектр ЭПР, форма линии которого описывается функцией $g(\nu)$, и дипольное взаимодействие между спинами А и В. Части спектра, возбуждаемые импульсами А и В (спины А и В) (а). Изменение локального поля в месте расположения спина А с $\Delta H(+)$ на $\Delta H(-)$, когда спин В меняет свою ориентацию под действием π -импульса на частоте ν_B (б).

отсутствие импульсной накачки спинов В. Эффект зависит от времени задержки (T) импульса накачки после первого $\pi/2$ -импульса на частоте ν_A (см. рис. 1,а). Интервал $\tau = \tau_0$ фиксируется в эксперименте. В двухчастотном импульсном методе исследуется кинетика спада амплитуды сигнала ЭСЭ, нормированной на амплитуду сигнала в отсутствие накачки

$$V(T) = \frac{V(T, \tau_0)}{V(\tau_0)},$$

как функция временного интервала T . Поскольку интервал t между $\pi/2$ - и π -импульсами фиксирован, то удается исключить из кинетики спада сигнала эха маскирующее влияние динамических и релаксационных процессов, присущих кинетике $V(\tau)$ в обычном двухимпульсном ЭСЭ, и получить изменение сигнала эха исключительно за счет дипольных взаимодействий. Следует подчеркнуть, что метод PELDOR в отличие от обычного метода ЭСЭ не имеет мертвого времени и минимальное значение T определяется только длительностью импульса накачки (этот импульс может быть приложен до первого импульса на частоте ν_A в момент времени $t = -T'$, см. рис. 1,а). Отметим, что в спектроскопии ЯМР используется аналогичный метод изучения дипольных взаимодействий ядер.^{8,9}

Предложен¹⁰ и достаточно широко применяется в настоящее время также вариант метода PELDOR с тремя возбуждающими импульсами на частоте ν_A (см. рис. 1,б). В этом случае (четырёхимпульсный PELDOR) два первых импульса формируют сигнал эха в момент времени 2τ , а дополнительный третий импульс в момент $2\tau + \tau_1$ рефокусирует намагниченность, создавая сигнал эха в момент времени $2\tau + 2\tau_1$. Импульс накачки на частоте ν_B приложен между вторым и третьим импульсами на частоте ν_A (см. рис. 1,б). Измеряется зависимость амплитуды рефокусированного эха $V(T)$ от положения импульса накачки в интервале $\tau - (\tau + \tau_1)$. Как и в трехимпульсном варианте PELDOR, информация о дипольном взаимодействии содержится в кинетике спада $V(T)$, которая может регистрироваться в виде симметричной относительно момента времени $t = 2\tau + 2\tau_1$ функции. Четырёхимпульсный метод обладает нулевым мертвым временем.

После первых работ по использованию метода PELDOR был предложен ряд импульсных методов ЭПР, эффективно работающих на одной частоте при отсутствии мертвого времени.^{11,12} Следует отметить так называемый $(2+1)$ -метод ЭСЭ,¹³ по постановке эксперимента близкий к PELDOR. Он, однако, не получил достаточно широкого применения из-за необходимости создания дополнительного $(+1)$ СВЧ-импульса на рабочей частоте спектрометра, некогерентного с основными двумя импульсами, которые формируют сигнал ЭСЭ. Одночастотные методы имеют свои преимущества и недостатки по сравнению с PELDOR. Детальное обсуждение этих вопросов не входит в задачи настоящего обзора, хотя на некоторых моментах мы остановимся в заключении. Метод PELDOR, несомненно, является наиболее простым вариантом для приложений и анализа результатов. Трудности имеются только при практической реализации конструкции спектрометра с двумя источниками микроволнового излучения. Недавно они были успешно решены в коммерчески доступных спектрометрах ЭПР E 580 и E 680 фирмы Brüker (Германия), популярность которых быстро растёт.

Первые исследования с применением метода PELDOR нашли свое отражение в обзорах^{14–20}. За последнее время в

литературе появилось еще несколько работ обзорного характера. В них метод PELDOR либо кратко рассмотрен наряду с другими методами ЭПР,^{21,22} либо обсуждаются отдельные методические вопросы с примерами его приложений.^{23,24}

Как импульсная спектроскопия ЭПР высокого разрешения с достаточно детально разработанной теорией и методикой эксперимента и доступным оборудованием метод PELDOR быстро находит все больше и больше приложений в химии, биологии и смежных областях. Поэтому мы решили подвести некоторые итоги в этой области химической радиоспектроскопии в настоящем обзоре, включающем работы 2007 г.

II. Основы теории метода PELDOR

В данном разделе рассмотрены некоторые теоретические результаты, необходимые при анализе кинетики спада сигналов PELDOR для различных модельных пространственных организаций спиновых систем.

Поскольку существующие спектрометры позволяют достаточно эффективно исследовать только удаленные пары спинов с расстоянием между частицами не менее 1–1.5 нм, при теоретическом анализе обычно предполагается, что величина магнитного дипольного взаимодействия между спинами А и В существенно меньше, чем разность частот импульсов $\Delta\nu_{AB}$. Это взаимодействие также мало по сравнению с амплитудой СВЧ-импульсов, которые поэтому возбуждают в равной степени обе компоненты дипольного дублета. Амплитуда и длительность СВЧ-импульсов такова, что влиянием возбуждающих эхо импульсов на спины В и импульса накачки на спины А можно пренебречь. Использование перечисленных предположений оправдано при теоретическом анализе в большинстве случаев применения метода PELDOR.

1. Пространственно ориентированные пары

Предполагается, что в исследуемой спиновой системе время спин-решеточной релаксации T_1 значительно больше, чем время фазовой релаксации T_2 , а интервал между импульсами τ гораздо короче этого времени ($\tau < T_1$). В этом случае спин-решеточной и фазовой релаксацией спинов парамагнитных центров можно пренебречь и сигнал PELDOR можно представить как^{6,7}

$$V(T) = V(0)[1 - p_b(1 - \cos(DT))], \quad (1)$$

где $V(0)$ — сигнал эха в отсутствие накачки, p_b — вероятность изменения ориентации спина В под действием импульса накачки или степень возбуждения спектра на частоте ν_B ,

$$D = \omega_D(1 - 3\cos^2\theta) + J, \quad (2a)$$

$$\omega_D = 2\pi\nu_D = \frac{\gamma^2\hbar}{r_{AB}^3}. \quad (2b)$$

Здесь θ — угол между направлением внешнего магнитного поля и вектором r , J — константа обменного взаимодействия, γ — гиромагнитное отношение для электронного спина, \hbar — постоянная Планка, r_{AB} — расстояние между спинами А и В. Нижний предел измерений D определяется скоростью фазовой релаксации $1/T_2$. Поскольку $V(0) \sim \exp(-2\tau/T_1)$, а величина интервала $T \leq \tau$, то минимальное значение D_{\min} , которое можно измерить экспериментально, составляет $D_{\min} \approx 1/T_1$. Соотношение (1) содер-

жит информацию, необходимую для анализа данных по PELDOR в простейших ориентированных системах, например для пар парамагнитных центров в монокристаллах.^{1,5} Кинетику спада сигнала $V(T)$ для полиориентированных систем можно получить соответствующим усреднением выражения (1).

2. Хаотически распределенные парамагнитные центры

Спад сигнала PELDOR в этом случае может быть рассчитан с помощью метода Маркова,^{6,14,25,26} если принять во внимание действие всех спинов В на спины А и считать это действие независимым. Тогда спад $V(T)$ задается выражением

$$V(T) = V(0) \left\langle \prod_j (1 - p_b [1 - \cos(D_j T)]) \right\rangle_{r, \theta}, \quad (3)$$

где индекс j относится к спином В, а угловые скобки означают усреднение по углу и расстояниям между спинами исследуемых центров. В данном случае мы предполагаем, что частицы распределены случайно по всему объему. Усреднение согласно выражению (3) дает экспоненциальный спад $V(T)$ в виде

$$\begin{aligned} V(T) &= V(0) \exp\left(-\frac{8\pi^2}{9\sqrt{3}} \gamma^2 \hbar p_b C T\right) = \\ &= V(0) \exp(-2p_b \Delta\omega_{1/2} T), \end{aligned} \quad (4)$$

где $\Delta\omega_{1/2} = 8.2 \cdot 10^{13} C \text{ см}^3 \cdot \text{с}^{-1}$ — дипольная ширина линии, C — концентрация парамагнитных центров. Этот результат для PELDOR полностью соответствует выражению для спада сигнала ЭСЭ за счет дипольного взаимодействия в случае случайного распределения частиц.^{1,3}

3. Хаотически ориентированные пары

Если расстояние в паре между взаимодействующими центрами фиксировано ($r = \text{const}$), то функцию, описывающую кинетику спада сигнала PELDOR, можно легко найти, проведя усреднение выражения (1) только по углу θ . При этом получается следующее соотношение:^{7,14,15}

$$V(T) = V(0) \{1 - p_b [1 - \Phi(T)]\}, \quad (5)$$

$$\Phi(T) = \left[\frac{\pi(c^2 + s^2)}{6\omega_D T} \right]^{1/2} \cos \left[(\omega_D + J)T - \arctg\left(\frac{s}{c}\right) \right], \quad (6)$$

где c и s — интегралы Френеля

$$\begin{aligned} c &= \int_0^v \cos\left(\frac{\pi}{2}x^2\right) dx, \\ s &= \int_0^v \sin\left(\frac{\pi}{2}x^2\right) dx, \\ v &= \left(\frac{6\omega_D T}{\pi}\right)^{1/2}. \end{aligned} \quad (7)$$

Соотношение (5) показывает, что в спаде сигнала PELDOR из-за дипольного и обменного ($J > 0$) взаимодействий в хаотически ориентированных системах возникают осцилляции на частоте $\omega_D + J$ (рис. 3,а). Отметим, что в случае отрицательного обменного взаимодействия ($J < 0$)

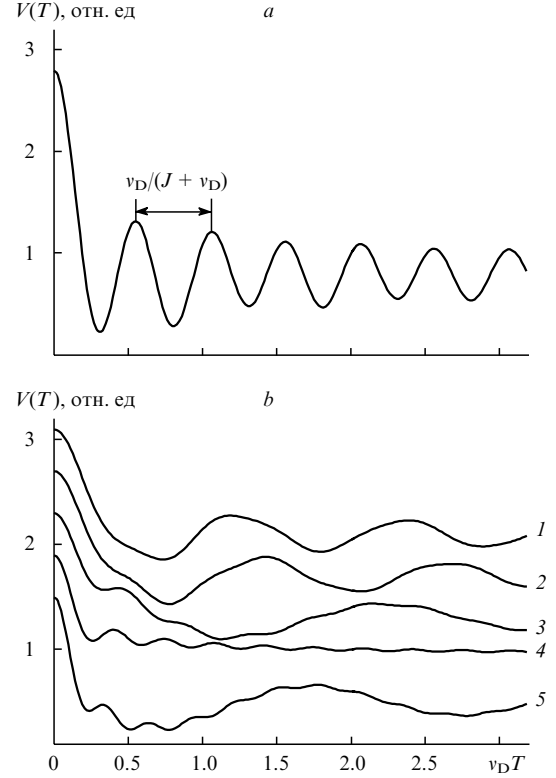


Рис. 3. Осцилляция спада сигнала PELDOR из-за диполь-дипольных и обменных взаимодействий для хаотически ориентированных пар при фиксированном расстоянии между спинами: $J > 0$ (а), $J < 0$ для различных отношений J/v_D : -0.1 (1), -0.2 (2), -0.5 (3), -1.0 (4), -1.5 (5) (б).

временная зависимость сигнала существенным образом искажается по сравнению со случаем $J > 0$ (рис. 3,б). Так, при $J = -\omega_D$ осцилляции наблюдаются на частоте $\sim 3\omega_D$. Необходимо иметь в виду, что прямой анализ кинетики спада сигнала PELDOR $V(T)$ возможен только при $J > 0$, а при $J < 0$ функция $V(T)$, как показывает расчет, содержит набор различных гармоник в зависимости от отношения J/ω_D (см. рис. 3,б). Это означает, что анализ сигнала только во временной области может приводить к серьезным ошибкам в оценке расстояния при ненулевом обменном взаимодействии.

В общем случае фурье-анализ кинетики $V(T)$ (т.е. частотный спектр в виде так называемого дипольного пейковского дублета) позволяет получить информацию не только о величинах ω_D и J , но и о знаке J .²⁷ Действительно, с учетом аксиальной анизотропии дипольного взаимодействия дипольное расщепление линий в дублете соответствует частотам

$$\begin{aligned} \omega_{\parallel} &= |2\omega_D - J|, \\ \omega_{\perp} &= |\omega_D + J|. \end{aligned}$$

Заметим, что в большинстве случаев фурье-анализ в значительной мере упрощается, так как метод PELDOR позволяет проводить измерения расстояний при $r > 1.5 - 2.0$ нм (см. ниже), когда, за редкими исключениями, обменное взаимодействие мало,²⁸ $J \approx 0$ и дипольный спектр позволяет сразу получить $\omega_{\parallel} = 2\omega_D$ и $\omega_{\perp} = \omega_D$ (рис. 4).

Амплитуда осцилляций сигнала PELDOR в полиориентированных системах, согласно уравнению (6), уменьшается

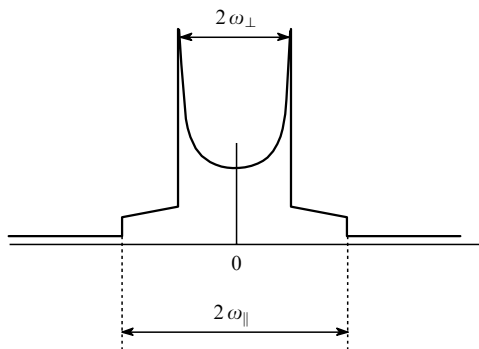


Рис. 4. Дипольный пейковский дублет при $J = 0$.

с ростом T и при увеличении дипольной частоты ω_D . Важной причиной затухания осцилляций является также разброс расстояний r_{AB} между парамагнитными центрами. Из рис. 5 видно, что даже небольшой разброс $\delta r_{AB}/r_{AB} \approx 0.1$ приводит к сильному затуханию осцилляций, а при $\delta r_{AB}/r_{AB} = 0.25$ они практически исчезают. Таким образом, простой фурье-анализ сигнала $V(T)$ для определения r и J оказывается неполным. Ниже мы вернемся к анализу кинетики спада сигнала PELDOR, который содержит также важную информацию о функции распределения расстояний в парах.

Отметим, что в работе²⁹ предложен непараметрический метод определения среднего расстояния между спинами в паре парамагнитных центров при наличии широкого распределения по расстояниям. Он основан на определении положения первого минимума производной сигнала PELDOR по времени T . Метод требует относительно высокой точности измерения сигнала и дает возможность быстрой оценки среднего расстояния, не накладывая никаких ограничений на функцию распределения.

4. Внутримолекулярные и межмолекулярные дипольные взаимодействия

В сложных реальных системах, таких как образцы с парами радикалов, кластерами или агрегатами парамагнитных частиц, имеется два типа дипольных взаимодействий: между парамагнитными центрами внутри такого элемента и

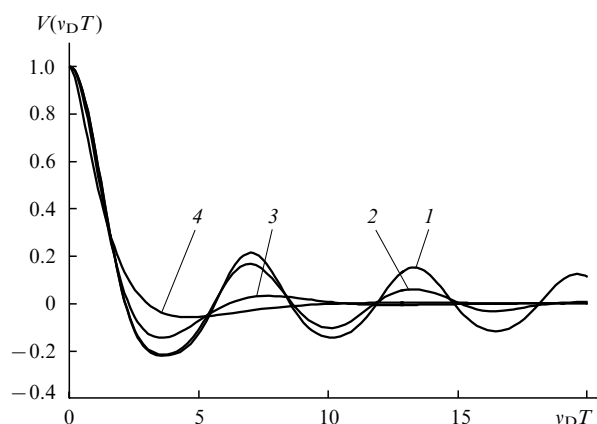


Рис. 5. Влияние разброса расстояний между спинами ($\delta r_{AB}/r_{AB}$) на спад сигнала PELDOR. $\delta r_{AB}/r_{AB} = 0$ (1), 0.1 (2), 0.15 (3), 0.25 (4).

между центрами из различных элементов. Если эти взаимодействия считать независимыми и спад сигнала PELDOR за счет этих вкладов обозначить как $V(T)_{intra}$ и $V(T)_{inter}$ соответственно, то полную функцию, описывающую спад сигнала $V(T)$, можно представить как

$$V(T) = V(T)_{intra} V(T)_{inter}.$$

Это дает возможность разделения дипольных вкладов в сложных системах. Например, для замороженных растворов бирадикалов дипольный внутрипарный вклад $V(T)_{intra}$ соответствует выражениям (5)–(7), а взаимодействие между парами $V(T)_{inter}$ может описываться соотношением типа (4). Вклады удастся разделить, измеряя $V(T)$ при разных концентрациях радикальных пар, агрегатов, кластеров.^{18, 30} Простое извлечение экспоненциальной составляющей, что чаще всего и делают, имея в виду соотношение (4), представляется достаточно опасным приемом. При этом следует убедиться в отсутствии эффектов пространственной неоднородности (см. ниже) либо других осложняющих факторов, например наличия расстояния наименьшего сближения между спинами А и В,³¹ которые не описываются простой экспонентой (4). В этом случае возможны осложнения и при восстановлении функции парного распределения из $V(T)$, а именно появление ложных максимумов.

5. Спад сигнала PELDOR для групп из N спинов

Довольно часто расстояния между частицами в группе значительно меньше, чем между группами, например в радикальных парах, образующихся при фотолизе или радиоллизе твердых тел. В этих случаях анализ спада сигнала PELDOR позволяет оценить геометрические параметры таких групп и число парамагнитных центров в группе.^{14, 15, 32} В простейшем варианте можно предположить, что исследуемая система состоит из одинаковых групп, содержащих по N частиц каждая. Если пренебречь возможной корреляцией в положениях и ориентациях частиц в группе, то спад сигнала PELDOR за счет дипольных взаимодействий внутри группы можно представить как

$$V(T)_{intra} = V(0)[1 - p_b \langle 1 - \cos(DT) \rangle_{r, \theta}]^{N-1}, \tag{8}$$

где $\langle \dots \rangle_{r, \theta}$ означает усреднение по углу и расстояниям между спинами в группе.

Усреднение (8) дает быстрый спад $V(T)_{intra}$ на малых временах $T \leq T^*$, соответствующих дипольному взаимодействию спинов с эффективным расстоянием (r_{eff}) между ними в группе, где

$$T^* = \frac{r_{eff}^3}{\gamma^2 \hbar}. \tag{9}$$

Функция $V(T)_{intra}$ в виде выражения (8) стремится к своему предельному значению V_p на временах $T \geq T^*$ (рис. 6,а), когда можно считать, что $\langle \cos(DT) \rangle = 0$. Предельное значение V_p имеет вид³²

$$V_p = (1 - p_b)^{N-1} \approx 1 - (N - 1)p_b. \tag{10}$$

Приближенное равенство в правой части выполняется при $Np_b < 1$. Из выражения (10) следует, что если известны V_p и p_b из эксперимента, то возможны оценки числа спинов в группе (N) (рис. 6,б).

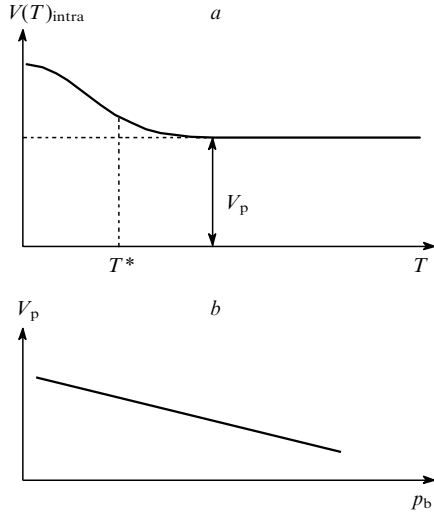


Рис. 6. Спад сигнала PELDOR для группы из N спинов в случае хаотически ориентированных пар без фиксированных расстояний в парах (а) и зависимость предельного значения спада (V_p) от степени возбуждения спектра p_b (б).

Если имеется распределение по числу (N) частиц в группах, которое описывается функцией $F(N)$, метод PELDOR дает возможность делать оценки моментов функции распределения числа частиц или определять эффективное значение N_{eff} в группе.³² В этом случае кроме зависимости $V_p(p_b)$ исследуется также зависимость $V_p(p_a)$ или $N = N(p_a)$, где p_a — вероятность возбуждения спинов на частоте ν_A . Разработаны^{33,34} специальные методы анализа экспериментальных данных PELDOR для оценки моментов функции распределения $F(N)$.

6. Функция распределения по расстояниям между парамагнитными частицами

Способы расчета функции распределения по расстояниям в радикальных парах из данных PELDOR разработаны сравнительно недавно^{29,35–38} и сразу стали активно применяться на практике. Рассмотрим один из способов такого расчета несколько подробнее. Проблема сводится по существу к решению обратной задачи методами регуляризации Тихонова.³⁹ При этом необходимо иметь в виду, что сохраняются свойства неустойчивости решения обратной задачи.

Для получения функции распределения по расстояниям между спиновыми метками в группах (агрегатах) используется спад $V_{\text{intra}}(T)$. Функцию распределения спиновых меток по расстояниям будем обозначать как $F(r) = dn(r)/dr$, где $dn(r)$ — доля пар спиновых меток в агрегате с расстоянием между метками в паре в диапазоне от r до $r + dr$. Вид функции $F(r)$ будем находить сопоставлением экспериментальных зависимостей V_{intra} с рассчитанными (V_{calc}) для агрегатов, содержащих N спиновых меток. Для расчета будем использовать известную зависимость сигнала PELDOR для хаотически ориентированных пар спиновых меток (уравнения (5)–(7)) в предположении, что в каждом из агрегатов в формировании сигнала участвует не более одной пары меток. Такой подход оправдан при достаточно малых амплитудах импульса накачки p_b , когда этот импульс возбуждает только небольшую долю от N спиновых меток и вероят-

ностью возбуждения двух или более спиновых меток можно пренебречь. Соотношение для нормированного сигнала PELDOR после усреднения по углу θ ($J = 0$) в выражении (8) имеет вид

$$V(T) = 1 - (N - 1)p_b[1 - \langle f(r, T) \rangle_r], \quad (11)$$

где

$$f(r, T) = \left\langle \cos \left\{ \frac{\gamma^2 \hbar}{r^3} [1 - 3 \cos^2(\theta)] T \right\} \right\rangle_{\theta}. \quad (12)$$

Функция $\langle f(r, T) \rangle$ в выражении (11) имеет смысл усредненного по расстоянию соотношения (12). В случае непрерывного распределения по расстояниям между метками в агрегатах кинетику спада (11) можно представить в виде

$$V(T) = V_p + (1 - V_p) \int_{r_1}^{r_2} F(r) f(r, T) dr, \quad (13)$$

где

$$V_p = 1 - (N - 1)p_b,$$

а $F(r)$ — функция распределения по расстояниям между спиновыми метками в агрегатах. Пределы интегрирования r_1 и r_2 в соотношении (13) ограничивают физически разумный диапазон расстояний между спиновыми метками. Разбивая интервал от r_1 до r_2 на ряд дискретных значений r_k и заменяя интеграл в выражении (13) суммой, получаем уравнение для экспериментального набора значений времени T_z

$$V(T_z) = V_p + (1 - V_p) \sum_k F(r_k) \left[\int_{r_k}^{r_k + dr_k} f(r, T_z) \frac{dr}{dr_k} \right]. \quad (14)$$

Соотношение (14) дает возможность получать функцию распределения $F(r_k)$ и величину V_p путем сопоставления экспериментальной зависимости V_{intra} с расчетной зависимостью $V(T_z)$. Для решения этой задачи соотношение (14) удобно записать в виде

$$\begin{aligned} V_{\text{calc}} = 1 - \frac{V_z}{V_0} &= \sum_k F(r_k) (1 - V_p) \left[1 - \int_{r_k}^{r_k + dr_k} f(r, T_z) \frac{dr}{dr_k} \right] dr_k = \\ &= \sum_k X_k \left[1 - \int_{r_k}^{r_k + dr_k} f(r, T_z) \frac{dr}{dr_k} \right], \end{aligned} \quad (15)$$

где

$$X_k = (1 - V_p) F(r_k) dr_k.$$

В таком виде выражение (15) представляет собой систему линейных уравнений, где неизвестными являются величины X_k . Величины

$$\int_{r_k}^{r_k + dr_k} f(r, T_z) \frac{dr}{dr_k}$$

рассчитываются численно с использованием формулы (12) для набора экспериментальных значений величин T_z . В соответствии с соотношением (15) величину V_{calc} теперь следует сопоставлять с экспериментальной величиной $V_e = 1 - V_{\text{intra}}$. Из полученных величин X_k можно найти как вид $F(r)$, так и значение V_p , т.е. величину N , поскольку, в соответствии с условием нормировки $F(r)$ на единицу, сумма

$$\sum_k X_k = 1 - V_p.$$

Для получения функции распределения использовали метод регуляризации решения неустойчивых задач Тихонова,³⁹ применимость которого для анализа данных PELDOR рассмотрена в работе³⁸. Варьировали величины X_k при условии $X_k \geq 0$, чтобы численно минимизировать функционал M вида

$$M = R - \lambda \Omega,$$

$$R = \sum_{z=1}^n [V(T_z)_{\text{calc}} - V(T_z)_c]^2,$$

$$\Omega = \sum_{k=1}^m X_k^2.$$

Здесь n — число экспериментальных точек по времени T , m — число точек по расстоянию r , $\lambda \geq 0$ — параметр регуляризации Тихонова.³⁹ От величины параметра регуляризации λ зависит степень сглаженности получаемой зависимости $F(r)$. При малых λ решение неустойчиво к малым отклонениям экспериментальных значений V_{intra} , т.е. $F(r)$ может хаотически колебаться с большой амплитудой относительно устойчивого решения. При больших λ решение становится слишком сглаженным, в нем могут теряться характерные детали распределения и оно хуже описывает экспериментальные данные. После нахождения $F(r)$ рассмотренными выше методами следует убедиться, насколько хорошо полученная функция $F(r)$ описывает исходные экспериментальные спады сигнала PELDOR.

Выше представлен подход к определению $F(r)$, использованный в наших последних работах^{36,40–45}. Пользуются успехом специально разработанные программы восстановления $F(r)$ по результатам PELDOR, детальное описание которых дано в работе⁴⁶. По нашему мнению, решение обратной задачи со свойством неустойчивости требует особо критически оценивать возможные систематические и случайные ошибки в эксперименте.

7. Ориентационная селективность в методе PELDOR

Импульсы А и В действуют в разных узких интервалах частот спектра ЭПР. Относительно большая величина анизотропии магнитно-резонансных параметров ЭПР нитроксильных радикалов приводит к тому, что возбуждается только та часть спектра ЭПР, которая соответствует радикалам, определенным образом ориентированным относительно внешнего магнитного поля. Возникает ориентационная селективность в спектроскопии PELDOR. По-разному ориентированные в пространстве радикалы в разной степени возбуждаются импульсами, формирующими сигнал спинового эха, и импульсом накачки.

Если радикальные пары имеют вполне определенную ориентацию по отношению друг к другу, то будет существовать и корреляция между величинами параметров $V(0)$, p_b и D в уравнении (1), которую следует корректно учесть.^{14,47} Когда пара парамагнитных центров имеет фиксированную геометрию, а образец в целом является неупорядоченным, усредняемые величины однозначно определяются ориентацией внешнего магнитного поля в системе координат, связанной с парой.¹⁴ Ее можно задать с помощью шести параметров: трех углов Эйлера, описывающих поворот от молекулярных осей одной спиновой метки к молекулярным осям другой, и трех компонент вектора r_{AB} , соединяющего эти метки. Усреднение сигнала PELDOR, выраженного соотношением (1), проводится по всем возможным ориентациям

внешнего магнитного поля H_0 в этой молекулярной системе координат. При этом удобно пользоваться величиной разности амплитуд сигналов эха без импульса накачки $V(0)$ и с импульсом накачки $V(T)$

$$V_d(T) = \langle V(0) - V(T) \rangle_{\Omega, g(v)},$$

где символами Ω и $g(v)$ обозначено усреднение величины $V_d(T)$ по ориентациям внешнего магнитного поля и по неоднородному контуру линии ЭПР каждого из радикалов пары. Приведем результат такого усреднения:²⁷

$$V_d(T) = A \int_0^1 \xi(\cos \theta) \left(1 - \cos \{ [\omega_D (1 - 3 \cos^2 \theta) + J] T \} \right) d \cos \theta,$$

где A — нормирующий множитель; θ — угол, который определяет ориентацию внешнего магнитного поля относительно вектора, соединяющего пару спинов. Видно, что по сравнению с выражениями (5)–(7) вся информация о взаимной ориентации радикалов содержится в функции $\xi(\cos \theta)$, которую в работе²⁷ предложено называть геометрическим формфактором. Эта функция также зависит от параметров СВЧ-импульсов.

Аналитическое выражение и примеры расчетов формфактора для нитроксильных радикалов в X-диапазоне даны в работе²⁷.

В работе⁴⁸ результаты исследования²⁷ обобщены на случай СВЧ-импульсов конечной амплитуды, когда дипольное расщепление в спектре может быть сравнимо по величине и даже больше переменных магнитных полей, воздействующих на систему. Показано, что импульс накачки должен возбуждать обе компоненты пейковского дублета спина В, чтобы амплитуда модуляции сигнала PELDOR имела заметную величину.

На ориентационную селективность в методе PELDOR впервые указано в работе⁴⁷, где получены сведения об этих эффектах в X-диапазоне для нитроксильных радикальных пар (см. бирадикал **2** в табл. 1 в разделе IV.1). Отметим, однако, что ориентационная селективность слабо проявляется в X-диапазоне. Совершенно новые возможности для экспериментальных исследований взаимной ориентации парамагнитных центров открывают диапазоны высоких частот (полей). В этом случае благодаря высокому разрешению спектра ЭПР по g -фактору можно проводить PELDOR-измерения, возбуждая импульсами на частотах ν_A и ν_B линии в спектре ЭПР с заданными значениями g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , и получать надежные данные о взаимной ориентации радикалов в паре. Детальная информация об ориентационной селективности получена недавно в диапазонах 95 (W-диапазон),^{49–51} 180 (см.^{52–54}) и 360 ГГц.⁴⁹ Эти новые экспериментальные результаты способствовали дальнейшему развитию теории и методов анализа ориентационной селективности в PELDOR.^{50,51}

В заключение этого раздела можно сформулировать следующую последовательность анализа экспериментальных данных PELDOR на основе существующих теоретических представлений.

1. Из исходной кинетики спада сигнала $V(T)$ выделяются множители $V(T)_{\text{inter}}$ и $V(T)_{\text{intra}}$.
2. Закономерности $V(T)_{\text{inter}}$ позволяют сделать заключение об особенностях пространственного распределения парамагнитных частиц.
3. Кинетика $V(T)_{\text{intra}}$ дает возможность идентифицировать агрегаты, определить число частиц в них или особенности статистики частиц в группах, сделать оценки расстоя-

ний из фурье-анализа $V(T)_{\text{intra}}$, провести расчет функции распределения по расстояниям $F(r)$.

Эти данные, как правило, создают основу для заключений о строении радикальных пар или агрегатов. Достоверность полученных результатов может быть проверена расчетными методами квантовой химии, например методами молекулярной динамики.

III. Некоторые методические особенности PELDOR

1. Спектрометр для метода PELDOR

В наших исследованиях с применением метода PELDOR используется импульсный спектрометр ЭПР, детально описанный в работе⁵⁵. Спектрометр работает в диапазоне частот 8–10 ГГц, мощность импульсов ~ 1 кВт при минимальной длительности 20 нс. Источником накачки служит магнетрон, работающий в режиме самовозбуждения на фиксированной частоте 9400 МГц. Максимальная выходная мощность СВЧ-колебаний магнетрона 5 кВт, длительность импульсов 15–40 нс. Импульсная последовательность, длительность импульсов, интервалы между ними, частота повторения задаются специальным программатором.

Наибольшее распространение в настоящее время получили спектрометры PELDOR X-диапазона длин волн (8–10 ГГц), хотя недавно появились спектрометры с рекордными частотами до 360 ГГц.⁴⁹ Учитывая возрастающую популярность метода PELDOR, фирма Brücker выпустила серию импульсных спектрометров ЭПР, имеющих специальное оборудование для спектроскопии PELDOR и работающих в X-, Q-, W-диапазонах длин волн.^{56–58} В X-диапазоне в таком спектрометре (модель E 580) используются СВЧ-импульсы длительностью до 8 нс с мощностью после усиления до 1 кВт, возможная разность частот $\Delta\nu = \nu_A - \nu_B = 800$ МГц, измерения ведутся по четырехимпульсной методике PELDOR. Возможности по чувствительности и разрешающей способности по времени этого спектрометра иллюстрирует тот факт, что он способен детектировать сигнал мощностью 10^{-9} Вт через 10^{-8} с после импульса мощностью в несколько киловатт.

Импульсный спектрометр ЭПР для метода PELDOR работает на двух частотах (ν_A и ν_B), которые действуют на исследуемый образец. Используются два типа резонаторов: мономодальный низкой добротности, позволяющий возбуждать резонатор одновременно на двух частотах, и бимодальный, имеющий два объема, отдельно возбуждаемых на частотах ν_A и ν_B . В этом случае исследуемый образец помещается в общую часть резонатора.

Конструкция резонатора для спектроскопии PELDOR должна создавать достаточно большие значения напряженности микроволнового поля (H_1) в образце для поворота вектора намагниченности и возбуждения по возможности всего или большей части спектра ЭПР (для поворота $\pi/2$ -импульсом длительностью 10 нс необходима амплитуда $H_1 = 1$ мТл). Это достигается применением специальных конструкций резонаторов, концентрирующих поле H_1 в образце при относительно низкой добротности. Обзор таких конструкций можно найти в статье⁵⁹. В наших работах мы используем бимодальный резонатор. Его схематическое изображение вместе с сосудом Дьюара и образцом показано на рис. 7. В этом резонаторе две моды TE_{102} перекрываются под прямым углом, конструкция аналогична предложенной для экспериментов по двойному резонансу в стационарной спект-

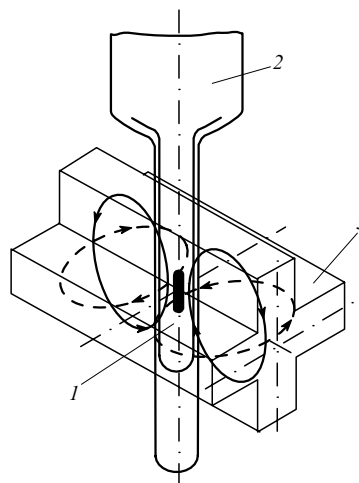


Рис. 7. Измерительная ячейка в экспериментах PELDOR.

1 — образец; 2 — кварцевый сосуд Дьюара; 3 — бимодальный резонатор, объемы которого с колебаниями типа TE_{102} настроены на частоты ν_A и ν_B .

роскопии ЭПР.⁶⁰ Оба резонатора настраиваются кварцевыми или тефлоновыми стержнями, введением их в соответствующий объем. Развязка между резонаторами на частотах ν_A и ν_B составляет 20 дБ при $\nu_A = 9.4$ ГГц, $\nu_A - \nu_B = 100$ МГц, добротностях $Q_A = 220$ и $Q_B = 150$. Для работы при различных температурах возможна замена сосуда Дьюара на трубку с газовым потоком.

Концентрационная чувствительность спектрометров PELDOR соответствует чувствительности импульсных спектрометров ЭПР. По сравнению со спектрометрами непрерывного СВЧ-действия (в этих спектрометрах фирмы Brücker чувствительность составляет 10^{10} – 10^{11} спинов в образце) для спектрометров PELDOR она ниже на 1–2 порядка, в особенности для широких спектров ЭПР, где импульсами возбуждается лишь часть исследуемого спектра. В то же время следует иметь в виду, что сам эффект PELDOR пропорционален степени возбуждения спектра V импульсом, т.е. величине ρ_b .

Измерения в методе PELDOR ограничены временным интервалом $0 - \tau$. В этом интервале спад сигнала эха в результате фазовой релаксации не должен быть большим. Потеря интенсивности сигнала эха из-за фазовой релаксации лимитирует начальную амплитуду сигнала PELDOR. Существует несколько способов частично компенсировать эти потери. Чувствительность можно увеличить, уменьшив, например, фазовую релаксацию путем понижения концентрации парамагнитных центров (C_R), так как $T_f \sim 1/C_R$. Другой подход основан на снижении фазовой релаксации путем уменьшения влияния спиновой ядерной диффузии. Эффект достигается заменой ядер водорода на дейтерий и использованием растворителей без подвижных вращающихся групп типа CH_3 , укорачивающих фазовую релаксацию.⁶¹ Из-за спектральной диффузии фазовая релаксация может зависеть от температуры, в особенности для образцов типа T_1 (см.^{1,3}). Поэтому, как правило, наиболее надежный путь удлинить T_f — проводить измерения при возможно низких (криогенных) температурах. Для увеличения чувствительности у экспериментатора есть и временной фактор — удлинение времени накопления сигнала, но в этом случае все лимитируется временной стабильностью спектрометра.

Некоторое увеличение чувствительности достигается в четырехимпульсном PELDOR, когда одновременно с изменением интервала T фиксируется интервал времени между импульсом накачки и третьим π -импульсом серии регистрации (см. рис. 1, б).⁶²

2. Определение параметра p_b

Для анализа кинетики спада сигналов PELDOR необходимо определить параметр p_b . Он связан с углом поворота намагниченности спинов B под действием импульса накачки. Если ширина линии мала по сравнению с амплитудой импульса накачки (H_1), то все спины будут повернуты на одинаковый угол, а величина p_b будет определяться выражением

$$p_b = \sin^2 \frac{\gamma H_1 \tau_p}{2}, \quad (16)$$

где τ_p — длительность (экспериментальный параметр) импульса накачки. Для широкой линии ЭПР соотношение (16) следует усреднить по функции, описывающей контур линии $g(\nu)$, и для прямоугольного импульса величина p_b может быть рассчитана как^{1, 63}

$$p_b = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{\omega_1^2 g(\nu)}{\omega_1^2 + 4\pi^2(\nu_B - \nu)^2} \sin^2 \left[\frac{\tau_p}{2} \sqrt{\omega_1^2 + 4\pi^2(\nu_B - \nu)^2} \right] d\nu, \quad (17)$$

где $\omega_1 = \gamma H_1$, а ν_B соответствует частоте импульса накачки, и, таким образом, при известных параметрах эксперимента возможен расчет p_b .

Однако экспериментальный путь определения p_b представляется более надежным. Например, этот параметр можно определить из экспериментального экспоненциального спада $V(T)$ для равномерно распределенных в образце частиц, если их концентрация известна (см. соотношение (4)). Это особенно удобно делать для растворов стабильных радикалов. Величину p_b можно также получить, используя формулу (10) для радикальных пар, когда известно, что $N = 2$. В некоторых экспериментах важно знать также параметр p_a . Для его расчета или экспериментального определения используются те же методы, что и для параметра p_b .

3. Диапазон расстояний, измеряемых методом PELDOR

Можно сделать оценку границ диапазона расстояний r , доступных для измерений по осцилляциям спада сигнала PELDOR. Наименьшее значение дипольной частоты (ω_D) определяется максимальным временным интервалом τ_{\max} между возбуждающими эхо импульсами на частоте ν_A , при котором все еще возможно детектировать сигнал в двухимпульсной методике ЭСЭ. Это время соответствует времени фазовой релаксации (T_f) и определяется концентрацией электронных и ядерных спинов, температурой и другими свойствами спиновой системы. Для органических матриц неустранимой причиной фазовой релаксации (даже при температуре жидкого гелия) является спектральная диффузия в системе электронных спинов, обусловленная спиновой диффузией в системе ядерных спинов (протонов матрицы),¹ причем спад сигнала спинового эха в этом случае происходит по закону $\exp[-(\tau/T_f)^3]$. В обычных случаях для органических матриц $T_f \approx \tau_{\max} \approx 5$ мкс. Полагая, что для регистрации одного полупериода осцилляций в спаде $V(T)$ необходимо, чтобы выполнялось условие $\omega_D \tau_{\max} = \pi$, для r_{\max} в соответствии с формулами (2) получим

$$r_{\max} = \left(\frac{\gamma^2 \hbar}{\pi} \tau_{\max} \right)^{1/3}.$$

Это дает оценку верхнего предела расстояний $r_{\max} \approx 8$ нм при $\tau_{\max} \approx 5$ мкс.

Если ширина полосы пропускания приемника достаточно велика, минимальное значение (r_{\min}) или максимальная дипольная ширина определяется амплитудой микроволнового поля на образце (H_1) на частоте ν_B . Эта величина должна быть достаточной, чтобы возбуждать обе линии пейковского дипольного дублета, расщепление в котором равно $2\omega_D$ (см. рис. 4). В этом случае $2\omega_D = \gamma H_1$ и для π -импульса накачки $\gamma H_1 \tau_p = \pi$, где τ_p — длительность импульса на частоте ν_B . Для r_{\min} получаем

$$r_{\min} = \left(2 \frac{\gamma^2 \hbar}{\pi} \tau_p \right)^{1/3},$$

что дает при $\tau_p \approx 30$ нс величину $r_{\min} \approx 1.8$ нм. Таким образом, диапазон измерений расстояний по осцилляциям спада сигнала PELDOR составляет 1.8–8 нм. Эксперименты и более детальный расчет с учетом длительности импульсов сдвигают нижнюю границу до ~ 1.5 нм, а верхнюю — до 7.0–7.5 нм.^{40, 48}

Для спектроскопии PELDOR на двух частотах ν_A и ν_B возникают ограничения, связанные с шириной линии ЭПР, разностью частот $\Delta\nu_{AB}$ и длительностью микроволновых импульсов τ_p . В частотном диапазоне прямоугольные импульсы не должны перекрываться, т.е. необходимо, чтобы $\Delta\nu_{AB} < \Delta$ и $\Delta\nu_{AB} \tau_p \gg 1$, где Δ — эффективная ширина спектра ЭПР. Для нитроксильных радикалов $\Delta \approx 300$ МГц, и если эксперимент проводится при $\Delta\nu_{AB} \approx 100$ МГц и $\tau_p \approx 40$ нс, то эти условия выполняются. Однако это обстоятельство вносит существенные ограничения при изучении узких спектров ЭПР и при использовании импульсов малой длительности для PELDOR. Ряд полезных деталей, касающихся техники эксперимента PELDOR и обработки результатов, приводится в обзорах^{23, 24}.

IV. Приложения метода PELDOR

1. Нитроксильные бирадикалы и полирадикалы

Нитроксильные бирадикалы оказались удобными модельными системами, на которых проводилась экспериментальная проверка большинства теоретических представлений метода PELDOR. Использовались, как правило, линейные молекулярные структуры с двумя пиперидиновыми, пирролидиновыми, пирролиновыми или 3-имидазолиновыми концевыми радикальными фрагментами. Строение и свойства бирадикалов такого типа, определенные при помощи стационарного метода ЭПР, детально обсуждаются в монографиях^{28, 64, 65}. Ниже представлены данные, относящиеся к исследованиям этих соединений методом PELDOR. Структура изученных нитроксильных бирадикалов и результаты измерений расстояний (R) между >NO -фрагментами в них этим методом приведены в табл. 1.

Модуляция спада сигнала PELDOR за счет дипольных взаимодействий впервые обнаружена в экспериментах с замороженными стеклообразными растворами нитроксильных бирадикалов типа **1** (см. табл. 1, рис. 8).⁷ Расстояние между несвязанными электронами определяли либо прямым измерением периода модуляции спада сигнала PELDOR, либо по его фурье-спектру. В дальнейшем этот бирадикал

Таблица 1. Нитрокислые бирадикалы и полирадикалы, изученные методом PELDOR.

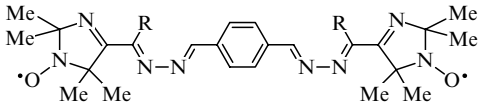
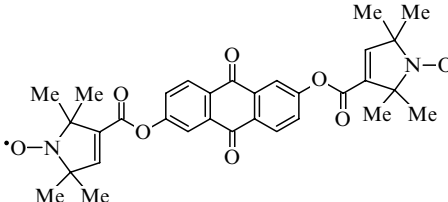
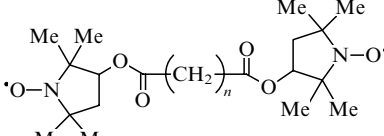
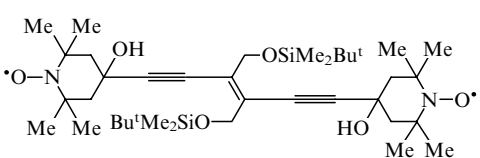
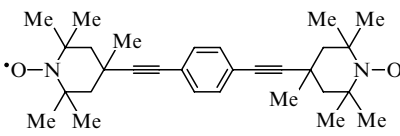
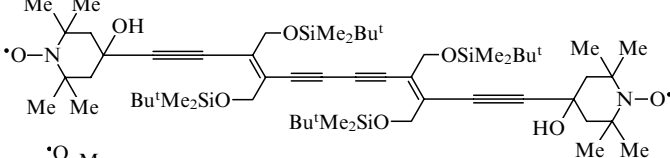
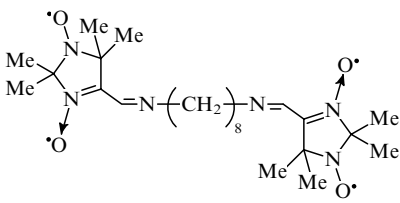
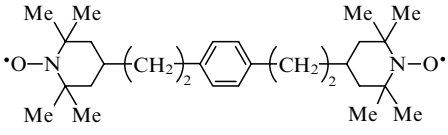
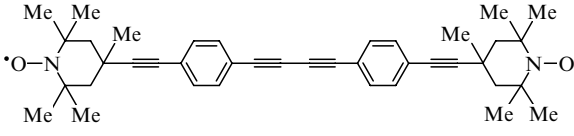
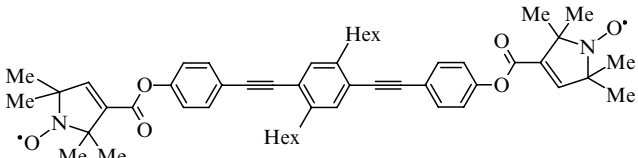
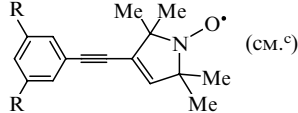
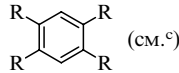
Радикал	Структура	R , нм (J , МГц)	Ссылки
1	 <p>R = H, Me.</p>	1.9 ± 0.16 1.94 ± 0.02 1.99 ± 0.06 (0.7 ± 0.4)	7 66 40
2		1.97 1.97 ± 0.03 1.94 ± 0.05 1.98 ± 0.07	47 67 10 68
3	 <p>$n = 8$ $n = 12$ $n = 14$ $n = 20$</p>	2.04 ± 0.07 2.48 ± 0.13 2.71 ± 0.19 3.28 ± 0.44	68 68 68 68
4		1.54 ± 0.02	69
5		1.72 ± 0.03	69
6		2.20 ± 0.07	69
7		См. ^a	32
8		См. ^a	32
9		2.57 ± 0.14	69
10		2.83 ± 0.05 2.92 ± 0.04	12 67

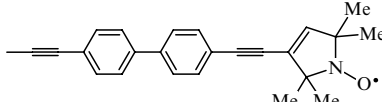
Таблица 1 (продолжение).

Радикал	Структура	R , нм (J , МГц)	Ссылки
11		3.63 ± 0.10	12
12		4.92 ± 0.20 5.00 ± 0.40	12 62
13		7.44 ± 0.82	62
14		$n = 1$ $n = 2$ 1.54 ± 0.03 1.97 ± 0.03	67 67
15		2.40 ± 0.04 (11.0 ± 0.3)	67
16		1.62 ± 0.04 1.70 ± 0.04 (1.4 ± 0.5)	40 40
17		$n = 2$ $n = 3$ $n = 4$ $n = 5$ $n = 6$ 2.37 ± 0.10 2.67 ± 0.17 2.94 ± 0.10 3.23 ± 0.14 3.45 ± 0.11	70 70 70 70 70
18		$3.40 (1.0)^b$	71
19		$3.30 (4.0)^b$	71
20		$3.30 (4.0)^b$	71

Таблица 1 (окончание).

Радикал	Структура	R , нм (J , МГц)	Ссылки
21	 (см. ^с)	2.50 (4.0) ^b 3.40 (4.0) ^b	71
22	 (см. ^с)	2.20 (5.0) ^b (<i>орто</i>) 3.30 (4.0) ^b (<i>мета</i>) 3.80 (3.0) ^b (<i>пара</i>)	71

Примечание. Принято обозначение: Hex — *n*-гексил. ^a Широкое распределение по конформациям. ^b В скобках указана ширина функции

распределения по расстояниям на полувысоте. ^c R = 

(с R = H) был выбран в качестве тестовой системы в первой работе, в которой предложен метод PELDOR со скачком магнитного поля.⁶⁶

В работе⁴⁰ для бирадикалов **1** и **16** проведен расчет функций парного распределения (рис. 9). В отличие от обычных методов при расчете функции $F(r)$ учитывали длительность импульсов в экспериментах PELDOR. Это позволило повысить надежность функции распределения $F(r)$ и определить величину и знак обменного интеграла J для бирадикалов с расстояниями между >NO-фрагментами менее 2 нм (см. табл. 1). Для бирадикала **16** обнаружены две конформации с близкими значениями расстояний (1.62 и 1.70 нм). Отметим, что ранее обменный интеграл ($J = 11.0$ МГц) определялся достаточно надежно лишь для бирадикала **15** с эффективным сопряжением в мостике.⁶⁷ Вероятно, что $J \neq 0$ и для бирадикалов **5** и **9**, однако данные об обмене в этих случаях отсутствуют. По-видимому, эфирные группы в

структуре многих нитроксильных бирадикалов блокируют эффективное обменное взаимодействие.

Наиболее популярным среди исследователей оказался нитроксильный бирадикал **2**. Расстояние между >NO-фрагментами определено по фурье-спектрам трехимпульсного^{47, 68} и четырехимпульсного¹⁰ PELDOR. (Отметим, что в последнем случае этот бирадикал использовался для тестирования впервые предложенной методики четырехимпульсного метода PELDOR.) Среднее расстояние, измеренное разными авторами, составляет 1.97 ± 0.07 нм (см. табл. 1), что соответствует расчету с помощью молекулярных моделей.⁶⁸ Предполагается, что бирадикал **2** стабилизируется в условиях эксперимента (стеклообразная матрица, 80 К) в одной из возможных конформаций, поскольку линии фурье-спектра оказались достаточно узкими ($\sim 3-4$ МГц).

В работах^{67, 68} нитроксильные радикалы использовались в качестве «линейки» для сопоставления измеряемых с помощью PELDOR расстояний между спиновыми метками и расчетными значениями этих величин, а также для экспери-

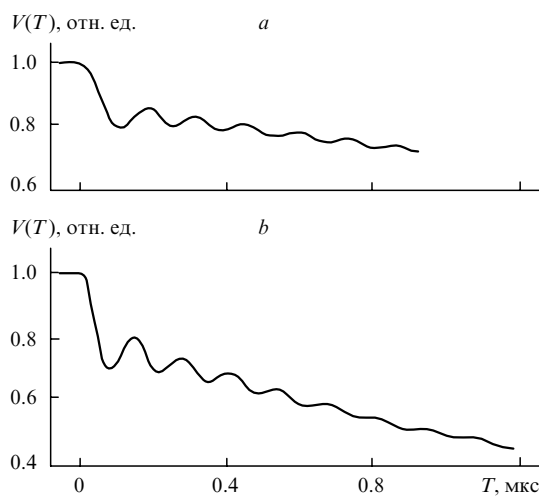


Рис. 8. Спад сигналов PELDOR для бирадикалов **1** (см. табл. 1).⁸ R = H (a), Me (b).

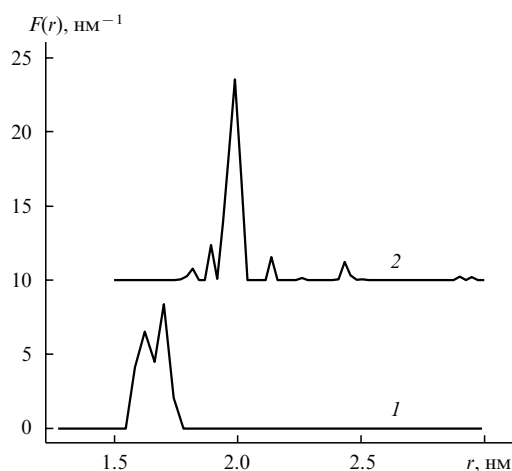


Рис. 9. Функции распределения по расстояниям $F(r)$ для бирадикалов **16** (1) и **1** (R = H) (2).⁴⁰ Кривая 2 сдвинута на 10 нм^{-1} .

ментальной оценки предельных расстояний, определяемых этим методом. Расстояния варьировались размерами мостиковой группы, соединяющей радикальные фрагменты. Так, в работе⁶⁸ изучены бирадикалы **3** с алифатическими мостиками $(\text{CH}_2)_n$. Измерения проводили при 80 К с образцами бирадикалов, растворенными в полимерной матрице полистирола. Несмотря на то, что полученные в эксперименте фурье-спектры имеют достаточно большую ширину, их максимумы последовательно сдвигаются с увеличением длины цепи в область низких частот. Получены значения расстояний от 2.04 нм при $n = 8$ до 3.28 нм при $n = 20$ (см.⁶⁸). Увеличение цепочки на одно звено приводит к возрастанию расстояния между >NO -фрагментами в бирадикале **3** на величину ~ 0.1 нм. Ширина фурье-линий в этих экспериментах определяется набором конформаций алифатической полимерной цепи. Оказалось, что определенные в работе значения расстояний находятся в согласии с расчетами, если применить методы статистики в предположении о полностью вытянутой конформации алифатической цепочки. Отметим, что бирадикал **3** является, по-видимому, исключением, поскольку для весьма близких по строению бирадикалов **7** и **8** нам не удалось зафиксировать модуляционных биений в спаде сигнала PELDOR.³² Это связано, по нашему мнению, с широким набором конформаций (повышенной гибкостью) алифатического мостика в указанных двух бирадикалах.

В последующих работах строение группы, связывающей >NO -фрагменты, выбиралось по возможности максимально жестким и конформационно фиксированным. Так, нитроокисильные бирадикалы **14** и **15** детально изучены в замороженных растворах дейтеротолуола методом PELDOR в X- (9.7 ГГц) и S-диапазонах (2.1 ГГц) частот.⁶⁷ Это позволило провести однозначное отнесение линий фурье-спектра к дипольным или сверхтонким взаимодействиям, сигналы которых лежат в одном диапазоне частот. Для всех бирадикалов в X- и S-диапазонах обнаружены линии на частотах, соответствующих ν_{\perp} и ν_{\parallel} , но только для бирадикала **14** оказалось, что $\nu_{\perp} \neq 2\nu_{\parallel}$. Расчет для этого бирадикала позволил определить величину и знак обменного интеграла $J = +11.0$ МГц.

Представляет интерес еще один результат работы⁶⁷. Для бирадикала, похожего по структуре на радикал **15**, но с одним бензольным кольцом в мостиковой группе, не было обнаружено никакой модуляции спада сигнала PELDOR как в X-, так и в S-диапазонах. По мнению авторов, причина в том, что такой бирадикал обладает сильным обменом (анализ спектра ЭПР дает значение обменного интеграла $|J| = 73$ МГц) и имеет два связанных состояния (триплетное и синглетное), а не два дублетных слабо связанных состояния, что обычно для бирадикалов со слабым обменом ($J \approx 0$), дающих модуляцию в PELDOR.

Определить верхнюю границу расстояний, измеряемых с помощью метода PELDOR, попытались авторы работ^{12,62}, исследуя бирадикалы с жесткой структурой, строение которой задается молекулярной «линейкой» из тройных связей и бензольных колец (бирадикалы **9–13**). Наибольшее расстояние (7.44 ± 0.82 нм) между неспаренными электронами зафиксировано⁶² для растворов бирадикала **13** в дейтеро-*o*-терфениле при 50 К. С хорошей точностью определено расстояние (5.0 ± 0.4 нм) в бирадикале **12** в работах^{12,62}. Для этого радикала расстояние между спинами (5.10 ± 0.12 нм) найдено также с помощью предложенного в работе¹² импульсного одночастотного метода SIFTER (Single Frequency Technique for Refocusing). Теоретический расчет для бирадикала **12** дал значение расстояния

5.23–5.15 нм. Отметим, что корреляция между расчетом линейной сопряженной структуры методом МД и измеренными методом PELDOR расстояниями между >NO -фрагментами концевых радикалов обнаруживается и для других более коротких, но «жестких» бирадикалов **4–6**, **9**, **10** (см.^{12,67,69}).

Функция распределения по расстояниям $F(r)$ содержит важную информацию о возможном наборе конформаций исследуемого бирадикала; это конформации спиновых меток, в том числе конформации цепочек, соединяющих нитроокисильный радикал с молекулярной основой, конформации нитроксила и конформации самой молекулярной цепи. Для оценки реального размера молекулярной основы бирадикала и ее гибкости необходимо оценить возможные величины всех этих конформационных вкладов методами МД и сопоставить результаты таких расчетов с данными, полученными при измерениях методом PELDOR. Такой анализ проведен для бирадикалов **10–13**, моделирующих олигомеры *n*-фениленэтилена,⁷² и для серии биспептидных бирадикалов **17**.⁷⁰ Обе эти «жесткие» молекулярные системы могут служить блоками для построения различных наноструктур. Авторы работы⁷² считают, что предложенный ими метод расчета может быть использован для оценки гибкости молекул и олигомеров, используемых при конструировании молекулярных наноструктур с заданными свойствами.

Молекулярные лестнично-спиральные блоки, построенные из биспептидных мономеров, меченные с двух концов пирролиновыми радикалами, изучены в работе⁷⁰. Число мономеров можно последовательно увеличивать с помощью специально разработанной методики синтеза. Структура таких спин-меченных блоков **17** с $n = 4–8$ приведена в табл. 1. В отличие от других бирадикалов из этой таблицы, которые, как правило, растворимы только в органических растворителях, бирадикалы **17** водорастворимы. Их водные растворы исследовали при 80 К в буфере с добавлением для стеклования глицерина. Кинетика спада сигналов четырехимпульсного PELDOR анализировалась с использованием фурье-спектров и расчета функции распределения по расстояниям. Определены расстояния между >NO -фрагментами в этих соединениях, а также соответствующие функции распределения $F(r)$ (рис. 10). С увеличением числа n среднее рас-

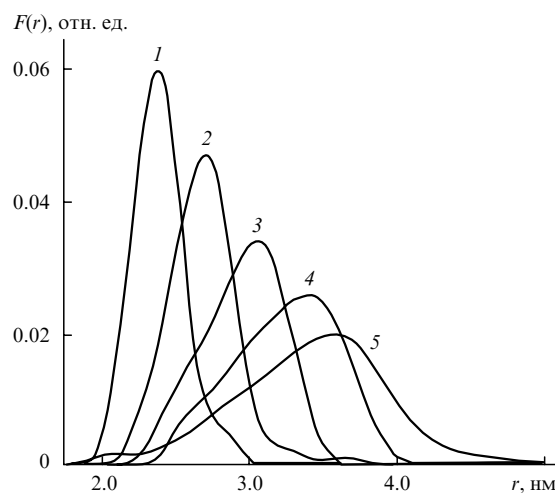


Рис. 10. Функции распределения по расстояниям $F(r)$ для бирадикалов **17**.⁷⁰ $n = 4$ (1), 5 (2), 6 (3), 7 (4), 8 (5).

стояние увеличивается с 2.37 нм при $n = 4$ до 3.46 нм при $n = 8$, так что каждый дополнительный блок, соединяющий радикалы цепочки, вносит 0.27 нм в среднее расстояние. Примечательно, что разброс расстояний (стандартное отклонение) увеличивается с увеличением длины цепочки от 0.18 нм для $n = 4$ до 0.58 нм для $n = 8$. Эта величина характеризует молекулярную гибкость данной структуры. Показано, что полученные результаты в целом согласуются с расчетами методами МД.

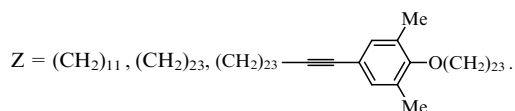
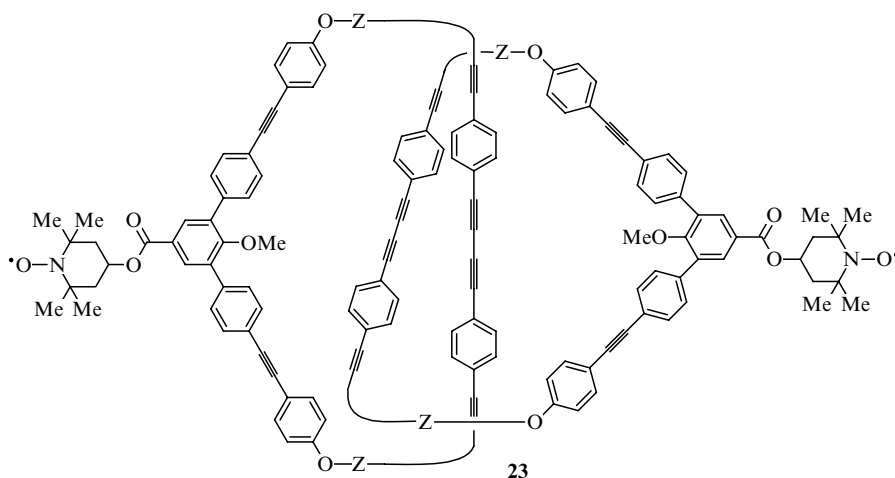
Примером широкого распределения по конформациям и взаимным пространственным ориентациям могут служить спин-меченые [2]катенаны **23**.⁷³ Эти супрамолекулярные структуры представляют собой кольца, продетые друг в друга. Кольца достаточно большие и построены из молекулярных групп, практически не взаимодействующих между собой. При введении спиновых меток проблема взаимной ориентации колец становится эквивалентной проблеме нахождения функции парного распределения по расстояниям между метками, которая может быть решена с помощью метода PELDOR.

В работе⁷³ проведен расчет модельной функции $F(r)$, учитывающей равновероятное взаимное расположение меток в модели цепочки из двух круговых колец с эффективным радиусом r_{eff} . Затем расчетная функция $F(r)$ сопоставлена с данными эксперимента PELDOR для замороженных растворов [2]катенанов в трех растворителях (в хлороформе, *o*-терфениле и 2-метилтетрагидрофуране) при 15 К. Авторы работы⁷³ обнаружили, что только в случае хлороформа экспериментальная функция $F(r)$ соответствует предложенной теоретической модели. Для других растворителей наблюдается либо агрегация [2]катенанов (в 2-метилтетрагидрофуране), либо существенное искажение геометрии кольца, которое, по-видимому, связано с нелинейной конформацией алкильной части макроцепи в *o*-терфениле. Расчетные значения r_{eff} близки к экспериментальным для растворов в хлороформе, т.е. для этого растворителя все относительные положения спиновых меток возможны, а значит, кольца свободно перемещаются относительно друг друга. Принятая авторами простейшая модель достаточно хорошо описывает свойства молекул размером несколько нанометров и может быть полезной, по их мнению, и в других случаях для анализа больших супрамолекулярных систем.

Как мы уже отмечали, важным параметром, который определяется методом PELDOR, является число частиц N в группе спинов. Такими группами могут быть агрегаты молекул, кластеры, другие пространственно локализованные состояния, в которых расстояния между парамагнитными частицами фиксированы или имеют незначительный разброс. В простейшем случае это димеры, тримеры, тетрамеры и другие агрегаты молекул, которые особенно характерны для сложных биологических структур. Чаще всего в структурных исследованиях таких систем встает проблема не только измерения расстояний, но и определения числа частиц в агрегате.

В агрегатах с одинаковой структурой может быть несколько выделенных расстояний. Кинетика спада сигнала PELDOR реагирует на полное число N радикальных центров в агрегате или, в общем случае, на функцию распределения по числу частиц в агрегате $F(N)$.^{32–34} Уже в первых работах с применением метода PELDOR определяли число частиц в агрегате. Парное распределение ($N = 2$) было зафиксировано³² для радикалов, образующихся в результате сенсibilизированной фотоионизации замороженных растворов нафталина в декалине. Даже когда имеется достаточно широкое распределение по расстояниям между парамагнитными центрами, как в этом случае, парное распределение четко фиксируется по характерному быстрому спаду сигнала PELDOR на малых временах T , что отличает данную ситуацию от экспоненциального спада для хаотически распределенных в пространстве радикалов.

Наиболее четкие результаты получены недавно на модельных нитроксильных полирадикалах (специально синтезированных би-, три- и тетрарадикалах).⁷¹ Авторы работы поставили цель экспериментально проверить теоретические расчеты, составляющие базу для определения числа частиц в группе спинов для фиксированных значений $N = 2, 3, 4$, и определить функцию парного распределения в этих полирадикалах. Строение исследованных соединений показано в табл. 1 (структуры **18–22**). Исследовали модулированные спады четырехимпульсного PELDOR (рис. 11). Два параметра спада определены экспериментально — предельное значение амплитуды сигнала V_p после нормирования к экспоненциальному спаду за счет дипольных межмолекулярных взаимодействий и вероятность возбуждения спектра импуль-



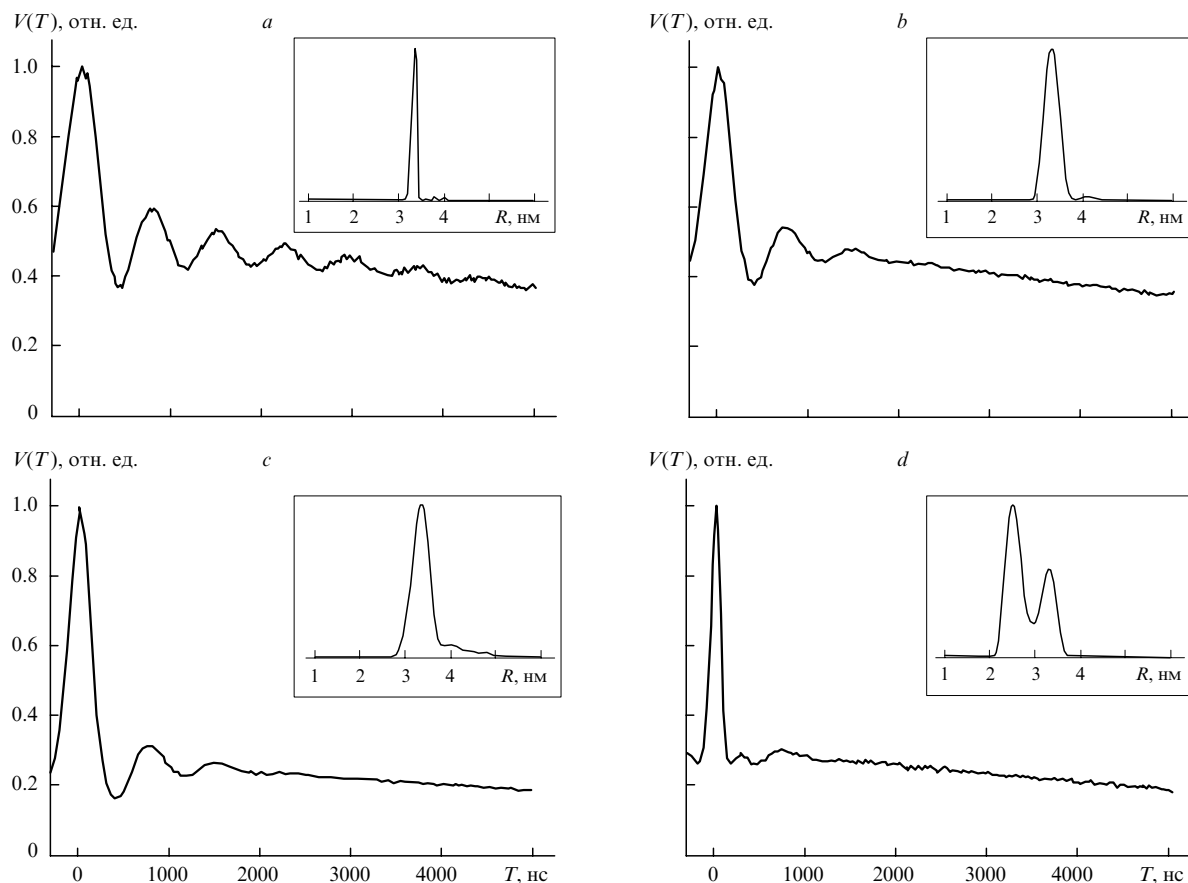


Рис. 11. Спад сигналов четырехимпульсного PELDOR и соответствующие функции парного распределения, рассчитанные из этих спадов (на врезках) для бирадикалов **18** (a), **19** (b) и трирадикалов **20** (c), **21** (d) (см. табл. 1).⁷¹

сом накачки p_b . Последний параметр ($p_b = 0.43$ и 0.12 для длительностей импульса накачки 12 и 92 нс соответственно) определяли из спада сигнала PELDOR для модельных бирадикалов **2**, **14**, **15**. В этом случае полагали $N = 2$. Для расчета N авторы работы использовали соотношение (10). С точностью около 5% экспериментальные величины для бирадикалов **18**, **19** оказались равными $N = 2.1$, для трирадикалов **20**, **21** $N = 3.0$ и для тетрарадикала **22** $N = 3.9$ (см. табл. 1), что полностью соответствует ожидаемым значениям N для этих полирадикалов. Экспериментальные величины p_b могут зависеть от взаимной ориентации нитроксильных меток в полирадикалах (ориентационная селективность), а следовательно, это окажет влияние на определяемые по формуле (10) значения N . Расчеты p_b , проведенные авторами работы⁷¹ для спадов сигнала бирадикала **19** и трирадикала **20**, показали, что эта зависимость либо очень слабая, либо отсутствует, так что можно в первом приближении считать ориентации меток некоррелированными в пространстве.

Распределение по расстояниям для полирадикалов имеет свои особенности. Если для бирадикалов **18**, **19** и симметричного трирадикала **20** функция $F(r)$ имеет только один максимум, то для трирадикала типа **21** из-за неэквивалентных положений спиновых меток спектр расстояний содержит две линии с соотношением интенсивностей $2:1$ (см. рис. 11,d). Тетрарадикал **22** дает $F(r)$ с тремя максимумами, соответствующими трем возможным расстояниям в прямоугольнике, вершинами которого являются спиновые метки.

Данные о расстояниях в этих полирадикалах приведены в табл. 1, где в скобках для сравнения приведены также результаты молекулярного моделирования.

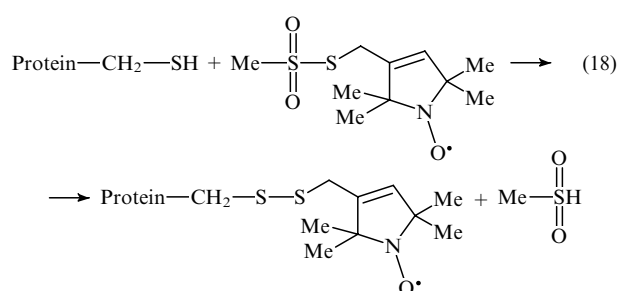
Четырехимпульсный PELDOR в W-диапазоне использован для исследования ориентационной селективности в бирадикале **11** и в трирадикале **20** (см. табл. 1).⁵⁰ Исследовали спектры PELDOR и глубину модуляции в шести точках спектра ЭПР, отвечающих константам сверхтонкого взаимодействия (СТВ) A_{\perp} и A_{\parallel} анизотропного нитроксильного триплета. Соответствующие линии разрешены в W-диапазоне. В эксперименте фиксировались частоты ν_A и ν_B и изменялось постоянное магнитное поле H_0 . Полученные результаты показали, что относительные ориентации спиновых меток из-за заторможенного вращения в пространстве не фиксированы, но их движение коррелировано. Расчеты методами МД подтвердили эти выводы.

2. Спин-меченые биомолекулы и системы

Разработка методов направленного введения спиновых меток открыла новое направление приложений метода ЭПР в биохимии и биофизике. Это определение элементов вторичной и третичной структуры мембранных белков, включая влияние среды на их элементы, исследование ориентаций и движения отдельных элементов белка в физиологических условиях, определение конформационных переходов в ходе функционирования систем белок – мембрана и многие другие приложения.

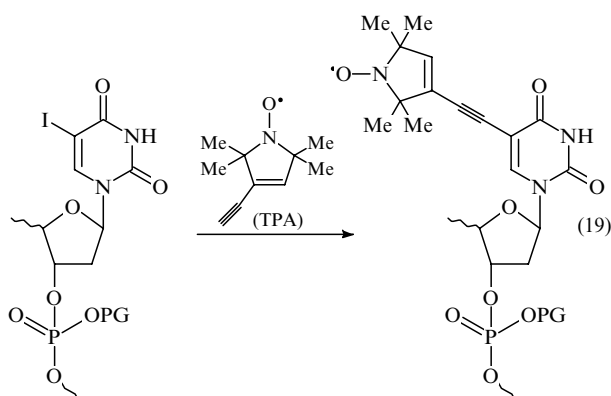
Как правило, эти исследования выполняются с помощью традиционного стационарного метода ЭПР. Их обзоры систематически публикуются в серии сборников под редакцией Л.Берлинера (*Biological Magnetic Resonance*, Ed. L. Berliner; к 2007 г. вышло 22 книги). Ниже мы остановимся только на работах, связанных с применением метода PELDOR. Первые исследования в этой области нашли свое отражение в томах 14 и 21 указанной серии.^{74, 75}

Важнейший этап, который по существу определил возможность постановки и выполнения этих работ, — разработка эффективных методов направленного синтеза спин-меченых биологически важных соединений. Методы решения этой проблемы для нуклеиновых кислот и олигонуклеотидов рассматриваются в обзоре⁷⁴. Из наиболее популярных отметим разработанный и широко используемый сейчас метод введения спиновой метки (с помощью радикалзамещенного тиосульфата) через сульфгидрильную группу цистеинового остатка белковой молекулы по реакции (18).^{76–79}

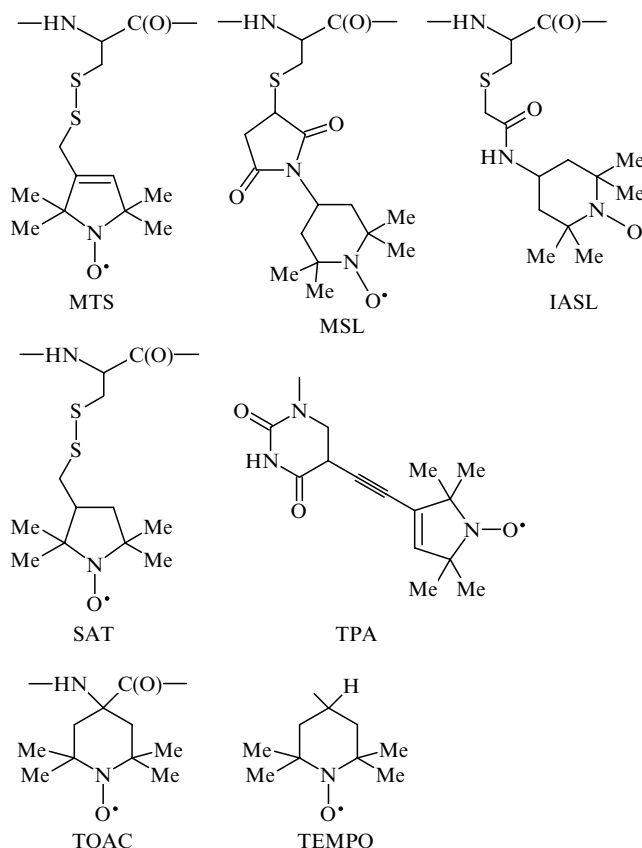


Синтез осуществляется либо путем введения метки в известное положение цистеина в белке, либо после замещения определенного основания в олигонуклеотиде на цистеин.

Другой часто применяемый метод состоит в проведении реакции Соногаширы в процессе автоматического твердофазного (на пористом стекле (PG)) синтеза олигонуклеотидов; при этом происходит замещение атома иода в уридиновом фрагменте нуклеотида на радикал, содержащий тройную связь (например, с использованием 2,2,5,5-тетраметилпирролин-1-илокси-3-ацетилена, TPA) (реакция (19)).⁸⁰



Такая метка имеет ограниченную конформационную подвижность, что повышает точность определения расстояний методом PELDOR. В большинстве случаев метки присоединяются либо к β -атому углерода пептидной цепи через связь $C_\beta\text{-S}$, либо к уридиновому остатку олигонуклеотида, например:



(Следует отметить, что иногда метки обозначают теми же аббревиатурами, что и реагенты, используемые для их введения, — TPA, TEMPO и др., а иногда добавляют буквы SL — spin labeling.) В таких случаях между $>N\text{-O}$ -группой и остатком аминокислоты или нуклеотида исследуемой биомолекулы располагается не менее 5–7 связей (метки MTS, MSL, IASL, SAT, TPA), что существенно влияет на интерпретацию результатов измерений расстояний методами ЭПР. Исключениями являются метка TOAC, непосредственно входящая в пептидную цепь и замещающая остаток Aib, а также метка TEMPO, присоединяющаяся к N- или C-концевым группам белка.

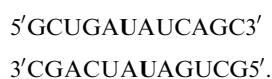
Конформационная гибкость цепочки, соединяющей белок с меткой, увеличивает неопределенность при построении молекулярных структур на основе измерений методом ЭПР. В особенности острой эта проблема становится при интерпретации данных для коротких расстояний 1.0–2.0 нм, где связывающая цепочка имеет размеры того же порядка. В работе⁸¹ сделана попытка учесть конформационные и структурные эффекты при расчете расстояний по данным о дипольных взаимодействиях стационарного и импульсного ЭПР. Наиболее распространенный расчетный подход — измерение расстояний между C_β -атомами на молекулярных моделях спин-меченых белков (C_α — атомы белковой цепи). В этом случае, однако, расхождение между расчетом и экспериментом может достигать 0.6 нм. Показано,⁸¹ что наилучшая корреляция ($R^2 = 0.8$) между измеренными методами ЭПР и рассчитанными значениями расстояний (отклонение ~ 0.3 нм) достигается в том случае, если в модельном расчете после начального определения возможного конформационного пространства для метки (методом Монте-Карло) методами МД находят конформеры, обладающие наименьшей

энергией. Именно для этих конформеров и рассчитывается расстояние между спиновыми метками. Дополнительное преимущество такого подхода — оценка возможного спектра расстояний, возникающего за счет разброса конформеров по расстояниям и динамической подвижности.

а. Нуклеиновые кислоты

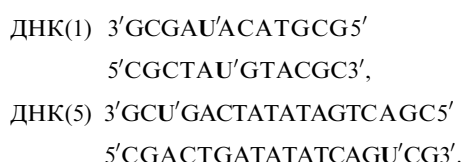
Структурные сведения о ДНК и РНК необходимы для углубления знаний о механизме передачи генетической информации и о каталитических свойствах этих важнейших биомолекул. Применение метода PELDOR для их структурных исследований основано на разработанных методиках направленного введения спиновых меток в определенные нуклеотидные остатки.^{76–80} Детальное описание применения метода Соногаширы для получения меченых ДНК и РНК дано недавно в работе⁸².

В одной из первых работ⁸³ изучена комплементарная РНК1 с метками типа IASL, введенными в уридиновые остатки (U) дуплекса:



Измерения, проведенные в замороженных водных растворах РНК1 при 20 К, дали значение расстояния между спиновыми метками 3.5 ± 0.2 нм. Авторы не обнаружили модуляции спада сигнала PELDOR спин-меченой РНК2, что, по их мнению, связано с агрегацией дуплексов РНК2.

Более детально изучены дуплексы ДНК (см.⁸⁴) и РНК.⁸⁵ С помощью четырехимпульсного метода PELDOR определены расстояния между спиновыми метками типа ТРА, введенными в фрагменты 2'-дезоксигуанидина (U') спиралей дуплекса ДНК по реакции (19). Метки вводили в остатки U', расположенные в пяти разных положениях олигонуклеотидов дуплекса, так что наиболее короткое расстояние соответствует последовательности ДНК(1), а наиболее длинное — ДНК(5) (жирным шрифтом выделены спин-меченые остатки U')



Исследовали замороженные (35 К) водные буферные растворы дуплексов с добавками 20% этиленгликоля для стеклования. По частотам фурье-спектров, полученных из соответствующих спадов сигналов PELDOR, определены с точностью 5% расстояния между метками: 1.92, 2.33, 3.47, 4.48 и 5.25 нм. Расчет методами МД, проведенный для разных конформеров дуплекса, дал наиболее близкие значения для тех же расстояний: 1.96, 2.14, 3.30, 4.33 и 5.24 нм, что, по мнению авторов, подтверждает В-конформацию спирали для дуплексов, замороженных в водных растворах.

Изучены⁸⁶ шесть дуплексов РНК, меченных меткой типа ТРА по остаткам аденозина, уридина, цитидина. Глубокая модуляция, зарегистрированная на спадах сигнала PELDOR, позволила определить с хорошей точностью расстояния в дуплексах, которые лежат в диапазоне от 1.93 ± 0.12 до 3.87 ± 0.13 нм в зависимости от числа пар оснований между метками. Сравнение результатов, полученных в работе⁸⁶, с данными работы⁸⁴ по измерениям расстояний в ДНК пока-

зывают, что при одинаковом числе пар оснований между метками в ДНК и РНК имеются разные расстояния между спиралями в дуплексе. Так, при 10 парах оснований в ДНК получено расстояние 4.48 ± 0.5 нм,⁸⁴ а в РНК 3.87 ± 0.13 нм.⁸⁶ Разница, находящаяся вне ошибки измерений, отнесена к двум разным конформациям — спираль типа А для РНК и более растянутая спираль В для ДНК. Оказалось, что полученные результаты хорошо соответствуют расчетам расстояний методами МД, коэффициент корреляции составляет 0.976 (рис. 12).⁸⁶ Этот результат, по мнению авторов, позволяет считать, что дуплексы ДНК и РНК сохраняют свою конформацию в замороженных (40 К) водно-фосфатных буферных растворах с добавкой 20% этиленгликоля.

Оригинальный способ введения спиновых меток в полинуклеотиды предложен в работе⁸⁷. Метки типа МТС вводили не в избранный нуклеотид, а в фосфотиоатные группы, введенные в заранее выбранные и фиксированные места между нуклеотидами дуплексных цепочек ДНК или РНК. В этом случае для измерения расстояния можно закрепить метку в любом месте модифицированного полинуклеотида. После образования дуплексов из меченных в разных положениях полинуклеотидов открывается возможность определения расстояний для широкого набора радикальных пар. Используя приготовленные таким способом образцы (измерения проведены при 50 К на замороженных водных растворах дуплексов ДНК), методом PELDOR из положения максимумов функции парного распределения определены 8 расстояний между метками. Минимальное и максимальное расстояния составляют соответственно 2.56 и 3.88 нм для ДНК с последовательностью нуклеотидов типа СС. Авторы работы⁸⁷ сопоставили полученные результаты измерений с результатами расчетов с использованием данных спектроскопии ЯМР, учитывающих возможные конформации рассматриваемой ДНК, и обнаружили отличную корреляцию ($R^2 = 0.98$) между результатами PELDOR-измерений и расчетом. По их мнению, предложенный метод введения меток может быть широко использован в структурных исследованиях комплексов ДНК и РНК с белками.

В работе⁸⁸ спиновые метки типа ТЕМПО последовательно введены в уридиновые остатки дуплексов ДНК таким образом, что расстояние между метками составляло 9, 12, 15, 18 или 21 пару оснований:

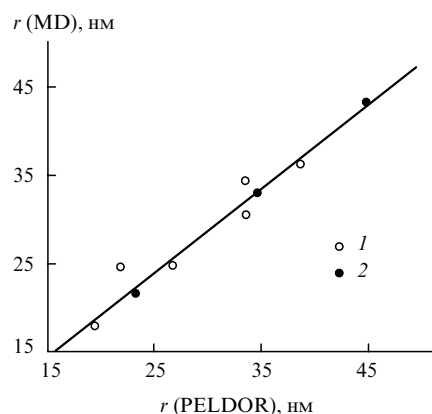


Рис. 12. Корреляция между расстояниями между спиновыми метками ТРА в дуплексах РНК и ДНК, измеренными методом PELDOR и рассчитанными методами молекулярной динамики.⁸⁶ Число пар оснований менялось от 1 до 10; 1 — данные для РНК, 2 — для ДНК.



Всего синтезировано пять дважды спин-замещенных дуплексов. Исследовали замороженные (77 К) растворы ДНК в D₂O и дейтерированном этиленгликоле. Оптимально приготовленные образцы для X-диапазона спектрометра (достаточно высокое соотношение сигнал/шум, большое время релаксации $T_1 \approx 8$ мкс) содержали $12.5 \cdot 10^{-6}$ моль \cdot л⁻¹ дуплекса ДНК в 50%-ном растворе дейтерозетиленгликоля в D₂O.

Регистрировали спад сигнала PELDOR и анализировали функции распределения по расстояниям $F(r)$, рассчитанные методом регуляризации Тихонова. Определено шесть расстояний между метками в диапазоне 2.8–6.8 нм. Наибольший интерес вызывают результаты по исследованию смесей указанных выше спин-меченых дуплексов (рис. 13). Авторы работы⁸⁸ установили, что в случае смеси из двух различных дуплексов деконволюция сложной функции $F(r)$ путем введения для каждого из дуплексов функции распределения в виде гауссовской кривой позволяет с хорошей точностью определить среднее расстояние в каждом дуплексе и его концентрацию в смеси. В то же время для смесей, содержащих большее число дуплексов, при анализе таких $F(r)$ возникают трудности, связанные, по мнению авторов, как с неточностями и неоднозначностью решения обратной задачи восстановления $F(r)$ из кинетики $V(T)$, так и с возможными превращениями под влиянием, например, стэкинг-взаимодействий в сложной смеси, меняющими простран-

ственную геометрию дуплексов ДНК. Работа тем не менее впервые демонстрирует аналитический подход с помощью метода PELDOR.

б. Пептиды

Структурные свойства пептидов дают важную информацию для понимания биофизических функций пептид-мембранных систем. Один из важных типов пептидов — пептаиболы, которые обладают активностью антибиотиков; они образуют в бактериальных мембранах ионные каналы и в результате разрушают мембраны, что ведет к гибели клеточных структур. Данные о структуре и свойствах пептаиболов и их агрегатов необходимы для создания эффективных антибиотиков.

Методы синтеза спин-меченых пептаиболов разработаны в лабораториях К.Тониоло (Падуя) и Т.Овчинниковой (Москва). В наших исследованиях мы использовали синтезированные ими спин-меченые пептаиболы трихогин (Т, цепь содержит 11 аминокислотных остатков, $n = 11$), димер трихогина (DT, $n = 22$), аламетицин (А, $n = 19$) и зервамицин (Z, $n = 15$). (Все глутаминовые остатки нативного аламетицина были замещены на остатки метилового эфира глутаминовой кислоты Glu(OMe).) Эти пептиды построены из аминокислотных остатков, среди которых важную роль играет остаток α -аминоизомасляной кислоты (Aib), и имеют различную длину цепи n и различные N- и C-концевые группы. В отличие от трихогина и аламетицина, меченных в цепи меткой TOAC (вместо остатка Aib), зервамицин был мечен по N- и C-концам меткой TEMPO (TZT):

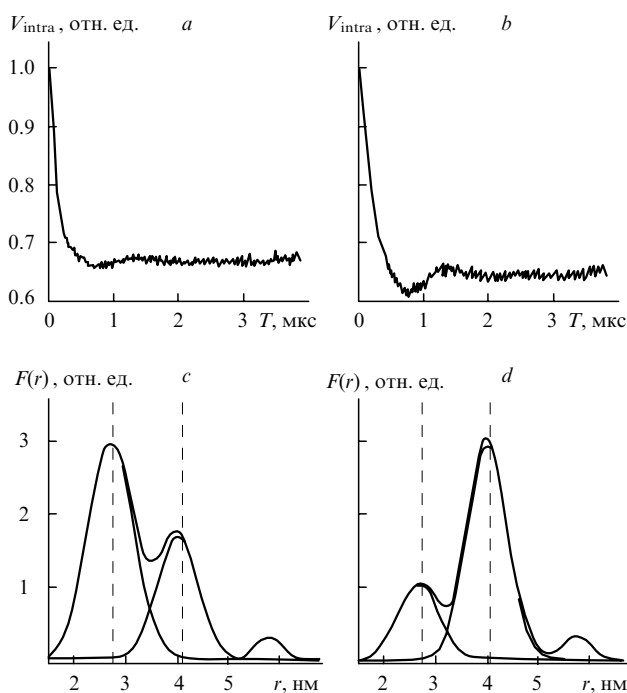
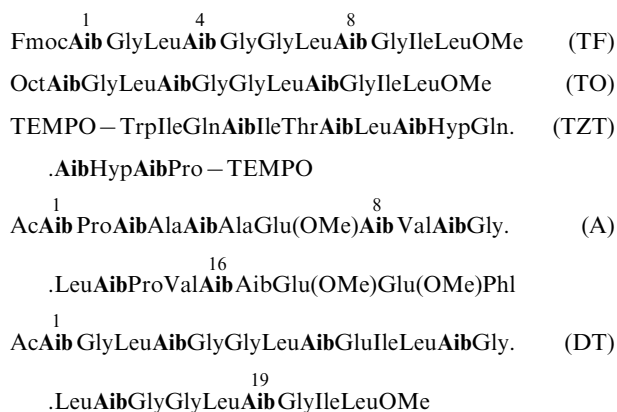


Рис. 13. Результаты исследования смесей спин-меченых дуплексов.⁸⁸

Кинетики спада сигналов PELDOR для смеси дуплексов с расстояниями 2.8 и 4.1 нм, взятых в соотношении 3 : 1 (а), и для тех же дуплексов, взятых в соотношении 1 : 3 (б); функции распределения по расстояниям $F(r)$ для этих смесей и соответствующие гауссовские кривые, моделирующие распределение по расстояниям (с, д).



Исследования проводили в стеклообразных замороженных полярных и неполярных растворах при 77 К в X-диапазоне ЭПР. В разбавленных растворах в полярных растворителях (в спиртах и др.), когда пептиды находятся в свободном мономолекулярном состоянии, удобно изучать их конформации. В неполярных растворителях (толуоле, декалине и др.), как правило, протекает самоагрегация пептидов, и в этом случае открывается возможность исследовать строение и свойства супрамолекулярных агрегатов пептидов, что важно для понимания их биологической активности. Конечно, для решения этой проблемы можно было бы привлечь данные рентгеноструктурного анализа кристаллов пептидов, но подход, основанный на изучении пептидов в средах, имитирующих гидрофобную часть клеточного бислоя, представляется более интересным. В отличие от кристаллов окружение и упаковка молекул в таких супрамолекулярных агрегатах будут определяться молекулами растворителя, а не теми же молекулами пептида.

Трихогин. В полярных растворителях и спектры стационарного ЭПР, и данные по кинетике спада сигнала PELDOR указывают на статистически однородное распределение молекул трихогина в замороженных стеклообразных растворах. В дважды меченных пептидах наблюдается модулированная дипольным взаимодействием компонента спада $V_{\text{intra}}(T)$. Для дважды меченных трихогинов TF-1,8 и TO-1,8 в смеси CHCl_3 –ДМСО из периода модуляции было найдено расстояние между метками 1.97 нм. Это расстояние чувствительно к полярности растворителя и изменялось, например, от 1.97 до 2.18 нм при переходе от метанола к этанолу для TO-1,8 (см.^{18,30,89}). Доля молекул в этой конформации (тип спирали 2_7 или 3_{10}) составляет около 30%. Остальные молекулы демонстрируют широкое распределение расстояний между спиновыми метками. В первых работах^{30,89}, к сожалению, функция распределения по расстояниям не рассчитывалась. Отнесение к той или иной конформации TOAC-меченных пептидов по данным о расстояниях между метками основано на расчетах, проведенных в работах^{30,45,90,91}.

Тип спирали зависит от многих структурных факторов: от геометрических параметров аминокислотных остатков пептида, внутри- и межмолекулярных водородных связей, полярности среды. Спад сигнала PELDOR для всех однократно меченных трихогинов в полярных растворителях экспоненциален, что свидетельствует о равномерном распределении этих частиц. Переход к неполярному растворителю качественно меняет ситуацию. Как показано в работе⁹², это изменение соответствует агрегации пептидов в неполярной среде.

В неполярных средах быстрый спад сигнала PELDOR на начальном участке переходит в медленный, модулированный дипольным взаимодействием спад (рис. 14, кривые 1, 2). При добавлении в образцы (растворы TF-4 и TO-1 в смеси хлороформ–толуол) полярного этанола спад сигнала качественно изменяется и становится экспоненциальным (рис. 14, кривые 3, 4), что указывает на распад агрегатов. Выделяя V_{intra} из общего спада $V(T)$ и получив значение V_p для этих образцов, нашли, что количество спиновых меток в агрегате составляет $N = 4 \pm 0.3$. Функция распределения по расстояниям между метками $F(r)$ дает значение $r = 2.35$ нм для агрегатов в однократно спин-меченных пептидах TF-4 и $r = 2.60$ нм для TO-1 (рис. 15).

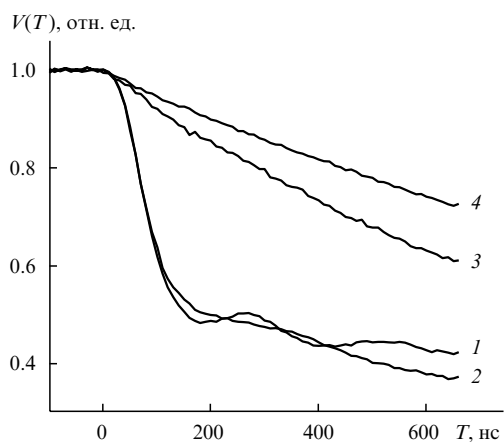


Рис. 14. Спад сигнала PELDOR для спин-меченных трихогинов TF-4 и TO-1, растворенных в смеси хлороформ–толуол (1, 2), и изменение спада для той же смеси при добавлении этанола (3, 4).⁹² Измерения проводили в X-диапазоне при 77 К.

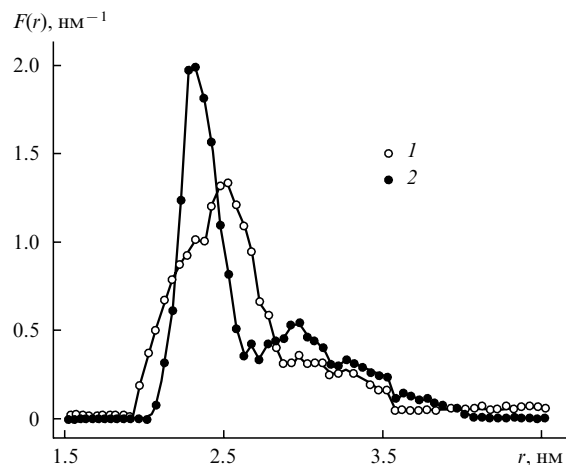


Рис. 15. Функция распределения по расстояниям $F(r)$ для трихогинов TO-1 (1) и TF-4 (2) в агрегатах, образующихся в неполярных средах.

Изучен⁹³ вопрос о возможной конформации трихогинов в таких агрегатах. Исследовали агрегаты, возникающие в смеси хлороформ–толуол из немеченного пептида с добавлением 10% дважды меченного TO-1,8. Это дало возможность выделить дипольное взаимодействие внутри одной молекулы в агрегате. Из модуляции спада сигнала PELDOR в этом эксперименте найдено $r = 1.57$ нм, что соответствует конформации спирали 3_{10} . Полученных данных оказалось достаточно для построения молекулярной модели агрегата (рис. 16). Спиральные молекулы пептида в конформации 3_{10} образуют тетрамер с полярными группами, ориентированными к центру агрегата. Положение меток TOAC показано на рис. 16 стрелками. Эти результаты впервые продемонстрировали возможности метода PELDOR в исследованиях строения агрегатов биополимеров.

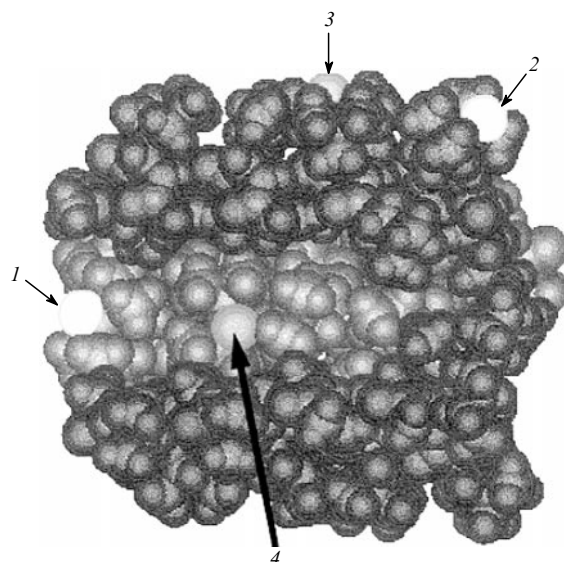


Рис. 16. Строение агрегатов трихогина, образующихся в неполярных средах.⁹² Молекулы трихогина в 3_{10} -конформации образуют тетрамер. Спиновые метки в положениях 1 и 4 пептида указаны стрелками (соответственно стрелки 1, 2 и 3, 4).

Изучена⁹⁴ агрегация однократно и дважды меченных трихогинов в разных слабополярных растворителях, а в работе⁹⁵ с помощью стационарного метода ЭПР исследован механизм агрегации. Для растворов дважды меченного пептида ТО-1,8 в хлороформе при 20°C проведено разделение спектров ЭПР мономерной и агрегированной форм и получена зависимость доли мономерных молекул пептида от концентрации пептида в растворе в диапазоне $5 \cdot 10^{-6} - 7 \cdot 10^{-4}$ моль \cdot л⁻¹. Предложена кинетическая схема агрегации, состоящая из двух стадий: димеризации молекул пептида и последующего объединения димеров в агрегаты из четырех молекул. Оценены константы равновесия для обеих стадий и показано, что при концентрации пептида больше 10^{-5} моль \cdot л⁻¹ основная часть молекул пептида находится в растворе в виде агрегатов.

Методом PELDOR исследована⁹⁵ концентрационная зависимость параметров диполь-дипольного взаимодействия спиновых меток в замороженных стеклообразных растворах агрегатов из однократно меченных аналогов трихогина. Показано, что число молекул в агрегатах, а также частота и амплитуда осцилляций сигнала PELDOR из-за дипольных взаимодействий спиновых меток в агрегатах не зависят от концентрации пептида в диапазоне $5 \cdot 10^{-4} - 8 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л⁻¹. Детальное исследование агрегации спин-меченных трихогинов в растворах разной полярности при комнатной температуре путем анализа дипольных уширений линий стационарным методом ЭПР проведено в работе⁹⁶.

Димер трихогина. В качестве примера влияния полярности среды на переход мономер-агрегат приведем данные об изменении функции распределения по расстояниям, полученные для дважды спин-меченного пептида DT-1,19 в смесях метанол-толуол (рис. 17).^{36,97} В чистом метаноле глубина модуляции спада сигнала PELDOR невелика и слабо разрешенный дублет функции $F(r)$ имеет общую ширину ~ 2 нм, а при добавлении толуола глубина модуляции возрастает и $F(r)$ имеет два явно выраженных максимума, соответствующих расстояниям 2.8 и 3.2 нм (α - и 3_{10} -конформации).

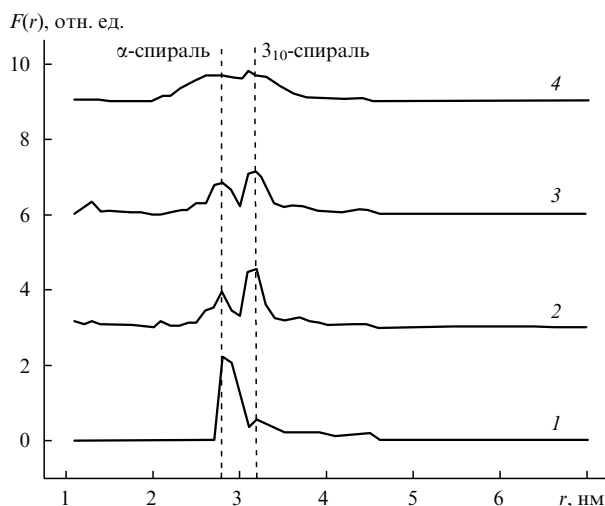


Рис. 17. Изменение функции распределения по расстояниям $F(r)$ для дважды меченного пептида DT-1,19 при изменении полярности среды.^{36,97}
1 — толуол; 2, 3 — смеси толуола и метанола, содержащие 10 и 20% метанола соответственно; 4 — чистый метанол.

В чистом толуоле регистрируется глубокая модуляция спада сигнала PELDOR и основной максимум соответствует α -конформации, что свидетельствует об образовании агрегатов трихогина.

Изучена³⁶ агрегация однократно спин-меченных пептидов DT-1. Из величины V_p для этих агрегатов найдено $N \approx 2$, а расстояние между метками — 3.4 нм. Такое расстояние предполагает антипараллельную ориентацию молекул в агрегате. При построении модели следует принять во внимание дипольный момент пептидной спирали. Оценки показывают, что для α -спирали в DT-1 полный дипольный момент равен 77.0 Д и ориентирован вдоль оси спирали. При этом расстояние между α -спиралями определяется только стерическими факторами и составляет 0.8 нм. Модель структуры агрегатов пептида DT-1 представлена на рис. 18.

В этой же работе³⁶ предпринята, по-видимому, одна из первых попыток обнаружить эффект селективности в относительной ориентации спиновых меток в бирадикальной структуре. Функция $F(r)$ рассчитывалась для набора различных взаимных ориентаций фрагментов >NO в пептиде DT-1,19. Сопоставление с экспериментальными данными продемонстрировало отсутствие корреляции этих ориентаций. Для окончательных заключений необходимы исследования в диапазоне высоких частот, так как остается неясным, насколько $F(r)$ чувствительна к этим эффектам в X-диапазоне.

Зервамицин. Детально изучена⁹⁸ агрегация однократно меченного зервамицина ZT в смесях толуол-метанол. Как и в случае других пептидов, с увеличением содержания метанола в смеси регистрируется распад агрегатов, существующих в чистом толуоле. В отличие от трихогина для зервамицина спад сигналов PELDOR V_{intra} в смесях, содержащих 8.5–16% метанола, не модулирован, но на начальном участке в диапазоне 50–200 нс наблюдается быстрый спад с последующим выходом на постоянное предельное значение V_p . Такая кинетика спада характерна для групп спинов с распределением по расстояниям и числу частиц в группе. Из начального спада в этом случае с помощью соотношения (11) можно оценить расстояние между спинами в группе, которое, как оказалось, зависит от состава смеси и изменяется в пределах 2.5–3.5 нм. Величина N , рассчитанная по соотношению (12), также зависит от состава смеси. Анализ показал, что в агрегатном состоянии с $N_{\text{max}} = 2$ в зависимости от состава смеси находится не менее 44–67% молекул ZT. Таким образом, пока нет достаточной структурной информации для построения конкретной молекулярной модели этого агрегата.

В работе⁴⁵ получена функция распределения по расстояниям для дважды меченного пептида TZT (рис. 19) в замороженных растворах в метаноле и в смесях метанол-толуол и метанол-хлороформ. Основной максимум функции $F(r)$ находится при $r = 3.3$ нм, и его положение слабо зависит от состава смеси. Ширина функции $F(r)$ на полувысоте уменьшается для смесей по сравнению с чистым метанолом от 0.3 до 0.15 нм. Этот эффект объясняется уменьшением возможного набора конформаций концевых групп пептида TZT с метками TEMPO в смесях с низкой полярностью по сравнению с метанолом. С помощью расчетов методом МД показано, что основной конформацией TZT является смешанная $\alpha/3_{10}$ -конформация спирали, что соответствует данным спектроскопии ЯМР. При увеличении гидрофобности среды путем добавления к метанольному раствору толуола или хлороформа в функции распределения $F(r)$ появляются слабые дополнительные линии, соответствующие расстоянию

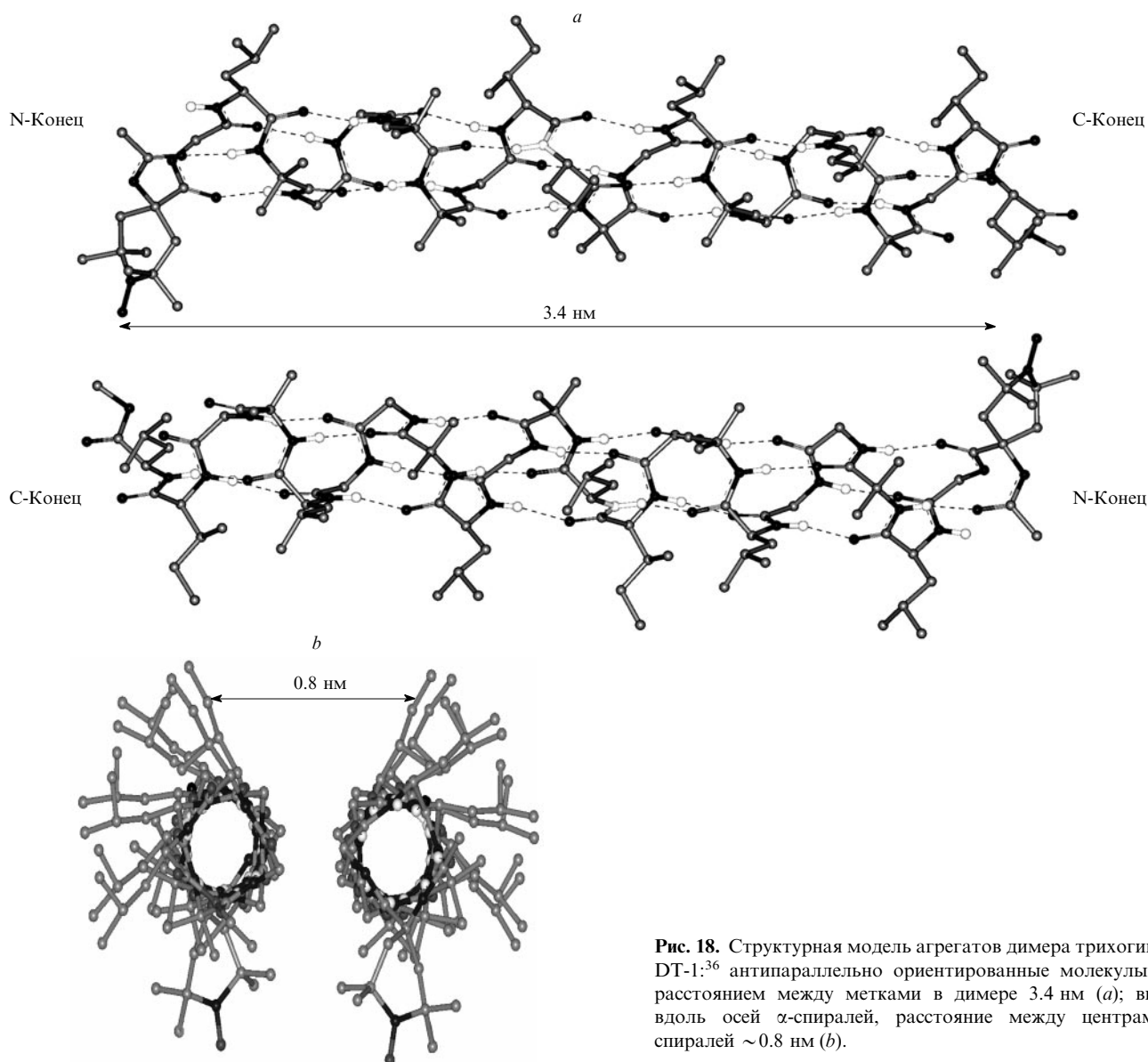


Рис. 18. Структурная модель агрегатов димера трихогина DT-1:³⁶ антипараллельно ориентированные молекулы с расстоянием между метками в димере 3.4 нм (а); вид вдоль осей α -спиралей, расстояние между центрами спиралей ~ 0.8 нм (b).

4.2 нм и отвечающие более растянутой 2₇-конформации спирали TZT.

Аламетицин. Несмотря на то что аламетицин является, по-видимому, наиболее широко изученным пептидом из класса пептаиболов, образующих клеточные каналы, механизм самоагрегации в мембранных средах и структура мембранных каналов для аламетицина до сих пор детально не исследованы.

Методами стационарного ЭПР и PELDOR изучены^{42,44} спин-меченые молекулы аламетицина A-1, A-8, A-16. Причем последний пептид изучен наиболее подробно. Данные спектроскопии PELDOR для растворов в смеси хлороформ–метанол (1:1) при различных концентрациях пептида (10^{-3} – 10^{-4} моль·л⁻¹) показывают, что в этом случае равновесие полностью сдвинуто в сторону свободных молекул аламетицина: наблюдается экспоненциальный спад сигнала PELDOR. Для растворов тех же концентраций в смеси хлороформ–толуол регистрируются спады, характерные для агрегации пептидов: быстрый начальный спад до $T \approx 200$ нс и затянутый модулированный спад в области

$200 \leq T \leq 1500$ нс. Кинетики спада V_{intra} для всех трех спин-меченых пептидов приведены на рис. 20,а; на рис. 20,б показаны функции парного распределения $F(r)$ для перечисленных пептидов. Расчет этих функций с учетом длительности СВЧ-импульсов^{40,48} привел к довольно неожиданным результатам. Все три функции имеют сходный вид и практически одинаковые параметры: для A-1, A-8, A-16 основной острый максимум в распределении находится на расстояниях 3.18, 3.24 и 3.06 нм соответственно, а широкий — в области 7 нм. В область коротких расстояний попадает $\sim 30\%$ спиновых меток, остальные 70% — в область 7 нм. Что касается величины N , то из анализа $F(r)$ следует, что $N \geq 6$. Отметим, что рассчитанные на основе полученных функций $F(r)$ кинетики спада сигнала PELDOR для $N = 6$ и для $N = 8$ практически совпадают.

Для более надежного определения величины N в работе⁴⁴ изучена форма линий спектра ЭПР этих же пептидов в смеси хлороформ–толуол при комнатной температуре. Величину N можно определить из времен корреляции вращательной подвижности, аппроксимируя вращательное движение ради-

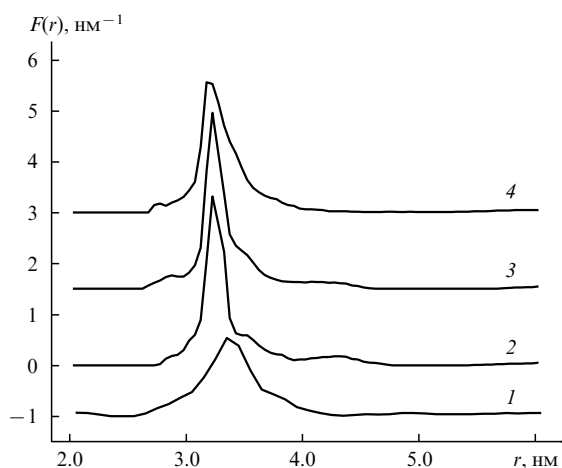


Рис. 19. Изменение функции распределения по расстояниям $F(r)$ для дважды спин-меченного зеррамицина в зависимости от состава среды.⁴⁵
1 — метанол, 2 — метанол–толуол (1:1), 3 — метанол–толуол (3:7), 4 — метанол–хлороформ (1:1).

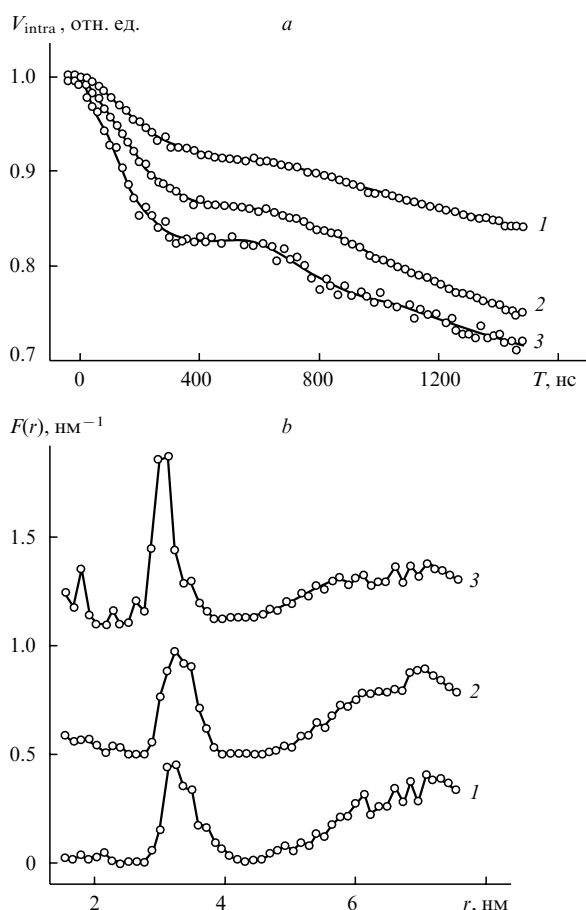


Рис. 20. Нормализованные спады сигналов PELDOR для стеклообразных растворов спин-меченых аламетицинов А-1, А-8, А-16 в смеси хлороформ–толуол (1:1) при 77 К (а) и функции распределения по расстояниям $F(r)$, рассчитанные по этим данным (б).⁴⁴
1 — аламетицин А-1, 2 — аламетицин А-8, 3 — аламетицин А-16.

кала движением сферической частицы в жидкости с известной вязкостью.⁹⁹ Эти оценки показали, что величина $N \approx 6.8 \pm 2.5$. Таким образом, можно утверждать, что в исследуемой системе $6 \leq N \leq 9$.

С помощью метода ESEEM экспериментально показано также, что наблюдаемая модуляция спада сигнала PELDOR вызвана исключительно дипольными взаимодействиями неспаренных электронов в агрегатах аламетицина, а не сверхтонкими или сверхтонкими и квадрупольными взаимодействиями электронов с ядрами окружающих молекул.⁴⁴

На основе полученных результатов предложена следующая модель агрегата аламетицина: два параллельных тетрамера, каждый из которых содержит четыре молекулы аламетицина, построены в линейную систему по принципу «голова к хвосту» (рис. 21,а). Для проверки предложенной модели был проведен ее расчет методом МД. В соответствии с экспериментом, минимальная энергия взаимодействия между пептидами достигается при расстоянии 3.3 нм и для таких конформаций молекул, в которых γ -эфирные группы в положениях 7, 8 и 19 в обоих пептидах взаимодействуют как антипараллельно ориентированные диполи, образуя семь полярных кластеров вдоль агрегата аламетицина. Гистограммы, соответствующие распределению по числу разных расстояний для предложенной модели, как следует из рис. 21,б, качественно хорошо соответствуют экспериментальным функциям $F(r)$ для меченых пептидов А-1, А-8, А-16 (рис. 20,б).

Таким образом, предложенная на основе данных PELDOR супрамолекулярная структура может служить хорошей основой для построения пептид-мембранных комплексов, определяющих биологическое действие аламетицина.

Аланиновые пептиды. В работе¹⁰⁰ исследованы пептиды, имеющие повторяющуюся группу $(\text{AAA}\text{AK})_n\text{A}$ ($n = 4, 7$). Для введения меток замещали различные остатки аланина на остатки цистеина, к которым и присоединяли метки типа MTS и SAT.

Дипольные взаимодействия исследовали на основе анализа формы линий спектров ЭПР (X-диапазон) и четырехимпульсным методом PELDOR (измерения при 50 К в замороженных водных растворах). Полученные результаты сравнивали с расчетными (метод МД) данными в предположении об α -структуре пептидной спирали. Проведено детальное исследование восьми пептидов с $n = 4$ и одного пептида с $n = 7$. Это позволило авторам работы¹⁰⁰ сопоставить данные ЭПР и PELDOR в пограничной для этих методов области измерений 1.5–2 нм. Основным выводом работы состоит в том, что надежные результаты для этой пограничной области при наличии конформационного распределения по расстояниям можно получить только при совместном использовании стационарного метода ЭПР (анализ формы линий) и PELDOR. В этом случае при анализе данных PELDOR необходимо учитывать длительности импульсов на частотах ν_A и ν_B и величину частотного интервала между ними ($\Delta\nu_{AB}$). Авторы работы¹⁰⁰ предлагают метод такой коррекции результатов PELDOR. При этом оказывается, что нижний предел измерений для метода PELDOR лежит вблизи 1.6 нм, а верхний предел для ЭПР — в области 1.5–1.7 нм.

Основные погрешности, появляющиеся при измерениях в этой пограничной области, возникают в результате обменного взаимодействия и неоднородного уширения линий в спектрах ЭПР. Обнаружено также, что расстояния, определяемые с помощью меток SAT, оказываются короче, чем для

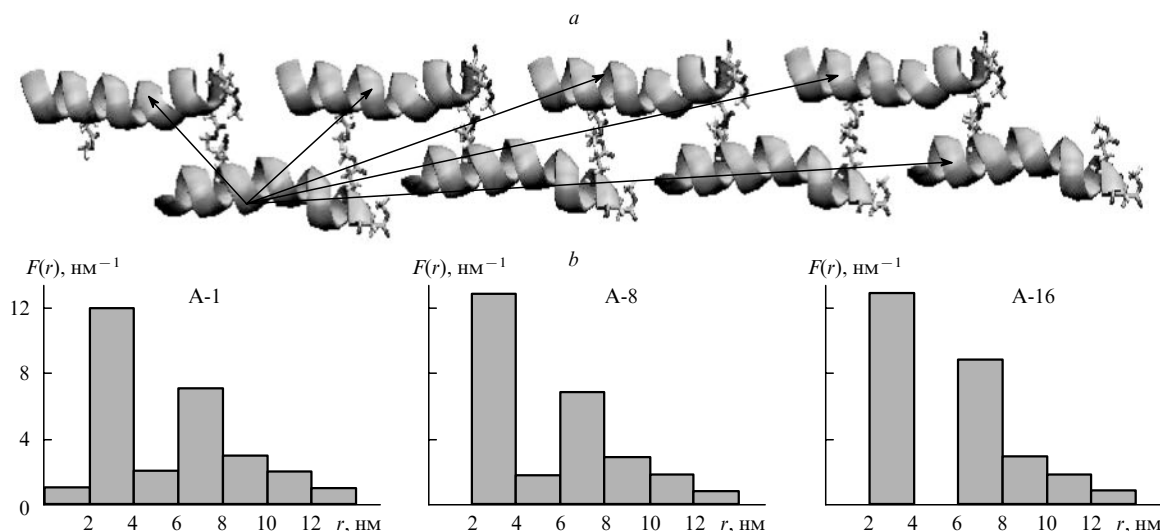


Рис. 21. Структура агрегата аламетицина.⁴⁴ Стрелками показаны некоторые из возможных расстояний между парами спиновых меток (a) и распределение по числу возможных различных расстояний между парами спиновых меток (гистограммы) в агрегатах меченых аламетицинов (b).

меток MTS, причем различие выходит за пределы ошибки измерений. Объяснения этому эффекту пока не найдено. В целом диапазон измеренных методами ЭПР и PELDOR расстояний для изученных аланиновых пептидов составляет от 1.07 до 4.61 нм.

в. Бионаносистемы

После разработки методов направленного введения спиновых меток и импульсных методов ЭПР для исследования свойств и пространственной организации спин-меченых систем, примеры которых приведены выше, одним из главных направлений применения метода PELDOR становится изучение сложных биологических систем, размеры которых лежат в нанодиапазоне.

В качестве одного из примеров приведем работу¹⁰¹ по определению расстояний между аминокислотными остатками натрий-пролинового транспортера (симпортера) PutP бактерии *Escherichia coli* (*E. coli*). Этот сложный мембран-белковый комплекс использует электрохимический градиент ионов Na^+ для транспорта через мембрану различных субстратов (воды, ионов, сахаров, аминокислот, витаминов и др.). Спиновые метки вводили в цистеиновые остатки в петлях полиолигомера, расположенных в периплазме и цитоплазме клеточной мембраны (рис. 22). Приготовлены однократно и дважды спин-меченные образцы (мутанты) и изучены их спектры ЭПР и дипольные взаимодействия с помощью четырехимпульсного метода PELDOR. Анализ стационарных спектров ЭПР для дважды меченных мутантов показал лишь, что спиновые метки расположены на расстояниях > 1.8 нм. В то же время анализ спадов сигнала PELDOR для этих мутантов позволил определить расстояния, показанные на рис. 22. Сделаны оценки вида парной функции распределения между метками. Быстрый спад этой функции при $r > 2.2$ нм свидетельствует, по мнению авторов работы, о широком наборе конформеров в петле полиолигомера, т.е. о ее гибкости.

Спады сигналов PELDOR в этих образцах оказались не экспоненциальными. Это, видимо, отражает пространственное распределение меток на внешней и внутренней поверх-

ностях мембраны (см. ниже). Полученные данные о расстояниях между спин-мечеными остатками указывают на их поверхностную локализацию: лишь одна из четырех меток находится в петле, расположенной в области периплазмы, а три другие — на противоположной стороне мембраны.

В дальнейшем те же авторы исследовали¹⁰² зависимость от pH димеризации Na^+/H^+ -антипортера бактерий *E. coli* с помощью однократно спин-меченных нуклеотидов, образующих димеры.¹⁰² В этом случае оценивали расстояние между взаимодействующими нуклеотидами (4.4 нм), выступающими в качестве димера, и определяли функцию распределения по расстояниям $F(r)$, а также ее изменение в зависимости от pH среды. Полученные методом PELDOR данные послужили основой для уточнения молекулярной модели и механизма биологического действия этого антипортера.¹⁰²

Интересные результаты получены при исследовании слабых (нековалентных) взаимодействий белок-белок для спин-меченого (метками MTS) домена А человеческого фак-

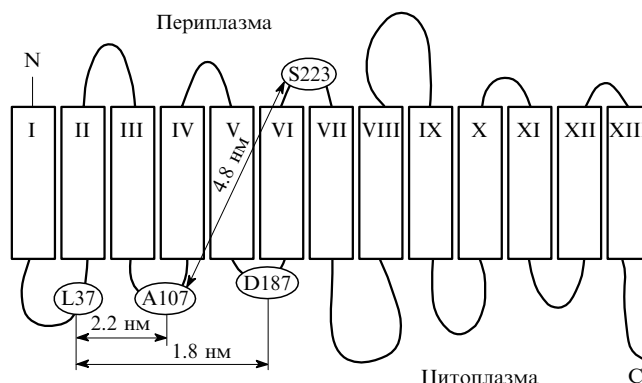


Рис. 22. Структурная модель натрий-пролинового транспортера PutP бактерии *E. coli* с выделенными элементами, содержащими спиновые метки.¹⁰¹

Показаны расстояния между метками, определенные четырехимпульсным методом PELDOR.

тора Виллебранда (vWF-A) из фактора В, входящего в систему комплемента.¹⁰³ Этот комплекс ослабляет межклеточные взаимодействия поверхностных белков и играет важную роль в регуляции внутренней иммунной системы. Использовали замороженные растворы vWF-A в D₂O, чтобы увеличить время фазовой релаксации. Показано, что PELDOR-модуляция обнаруживается на временах ~6 мкс и после соответствующей обработки дает расстояние между метками 6.15 ± 0.14 нм. Это расстояние соответствует белковому агрегату, состоящему из трех молекул. Таким способом установлена тримеризация vWF-A в водных растворах.

Во многих исследованиях сопоставляются возможности стационарных и импульсных методов ЭПР для определения расстояний. В работе¹⁰⁴ с помощью методов стационарного ЭПР и PELDOR исследовали изменение конформации полипептидных фрагментов в ходе рецепторно-каталитической активации G-белка. Отметим, что метод PELDOR в сочетании с направленным введением спиновых меток применялся для изучения взаимодействия белок-белок в цитоплазме клеток эритроцитов¹⁰⁵ и структуры фибриального белка тропонина, регулирующего мышечные сокращения.¹⁰⁶

В работе¹⁰⁷ продемонстрировано эффективное применение трех методик ЭПР в разных диапазонах расстояний: метода, основанного на измерениях интенсивности двухквантовых переходов (использован для определения расстояний в области 0.7–0.8 нм), метода анализа ширины линий в спектрах ЭПР (в области 0.85–2.0 нм) и метода PELDOR (в диапазоне 0.18–2.4 нм). Исследования проведены на человеческой карбоксиангидразе II с метками типа MTS, введенными в цистеиновые остатки.

Исследован миозин — белок, участвующий в мышечном сокращении у высших организмов.¹⁰⁸ Спиновые метки вводились в область, называемую щелью, где, как предполагается, в ходе мышечного сокращения меняется конформация молекул, а следовательно, и расстояние между метками (переход «открытая–закрытая» щель). Исследования проведены стационарным методом ЭПР (изучали ширину линий) и методом PELDOR. Стационарный ЭПР позволил идентифицировать метки на расстояниях от 1.4–1.5 нм, а метод PELDOR — на расстояниях 2.2–2.5 нм. Авторы работы¹⁰⁸ обнаружили, что в пределах ошибки эксперимента среднее расстояние 2.2–2.5 нм не изменяется при переходе от открытого к закрытому состоянию щели, однако положение максимума функции распределения по расстояниям изменяется на ~3%. Аналогичные изменения обнаружены и для спиновых меток на расстояниях ~1.5 нм, исследованных методом ЭПР. Конформационные изменения по этим двум типам меток, расположенным в щели миозина, наблюдались также при взаимодействии белка F-актина с миозином и при фосфорилировании миозина.²⁴ Оба этих процесса имеют отношение к системе мышечного функционирования.

Изучены магнитные дипольные взаимодействия в спин-меченых b-субъединицах белковых комплексов фермента F₀F₁-АТФ-синтетазы. Показано, что возможны две модели структуры этих комплексов с разделенными и связанными субъединицами, адекватно описывающие дипольные взаимодействия между спиновыми метками.¹⁰⁹

При некоторых условиях свободные радикалы, образующиеся в ходе окислительно-восстановительных реакций, стабилизируются в биологических системах в достаточных для измерений методом PELDOR концентрациях. В таких случаях нет необходимости вводить специальные спиновые метки. Метод PELDOR использован для определения рас-

стояния между двумя нейтральными радикалами флавина ($r = 2.61 \pm 0.08$ нм) в ферменте, ускоряющем регенерацию печени.¹¹⁰ В этом случае ширина спектра ЭПР ~3 мТл. Это дает возможность разнести импульсы детектирования и накачки по частоте на 78.4 МГц, что не хуже, чем в экспериментах с нитроксильными метками.

В одном из классов рибонуклеотид-редуктаз (RNR) — ферментов, катализирующих окисление нуклеотидов, — в качестве активного комплекса выступают центры, содержащие антиферромагнитное железо и тирозильные радикалы. При этом сама RNR состоит из четырех белковых субъединиц, две из которых содержат такие центры. В работах^{111,112} с помощью метода PELDOR определено расстояние между радикалами тирозила, локализованными в двух разных субъединицах RNR бактерий *E. coli* и мыши. Измерения проведены в X- (9 ГГц) и Q-диапазонах (34 ГГц) при 30 К. Основные экспериментальные данные, полученные в работе¹¹², представлены на рис. 23. Спектр радикалов

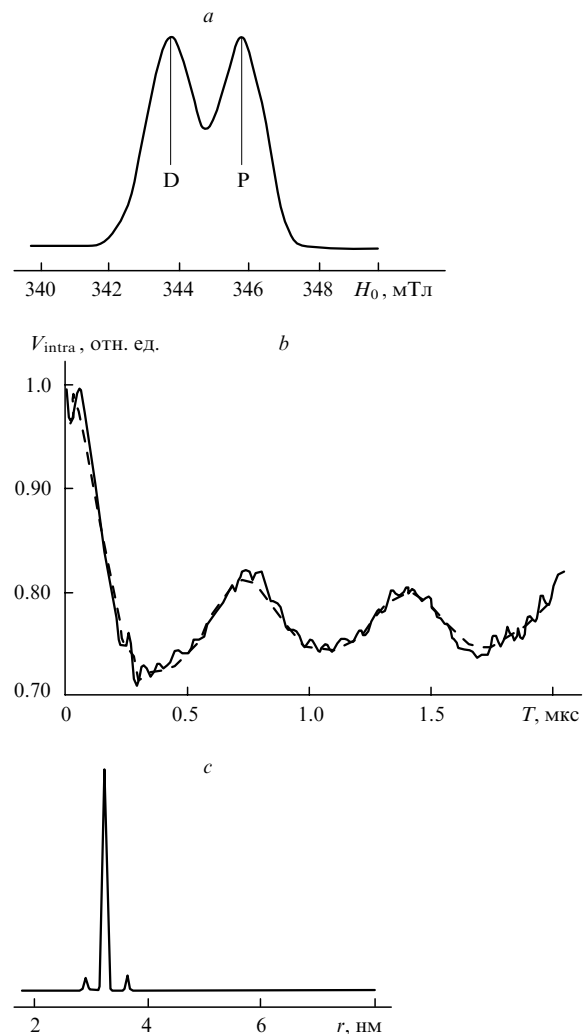


Рис. 23. Результаты измерений расстояний между радикалами тирозила с помощью спектроскопии ЭПР.¹¹²

Показаны точки спектра, возбуждаемые импульсами накачки (P) и детектирования (D) (a), спад сигнала PELDOR (штриховая линия — расчет по $F(r)$) (b), функция распределения по расстояниям $F(r)$ (c).

тирозила достаточно широк (дублет с расщеплением ~ 2 мТл, см. рис. 23,а), так что импульсы накачки и детектирования не перекрываются ($\nu_A - \nu_B = 60$ МГц), кинетика спада сигнала PELDOR типична для пары спинов (см. рис. 23,б), а ее частотный фурье-анализ дает острый пик при 1.39 ± 0.05 МГц, что соответствует $r = 3.25 \pm 0.05$ нм (см. рис. 23,с). Чтобы убедиться, что модуляция спада сигналов PELDOR возникает именно в результате электрон-электронного дипольного взаимодействия, а не электрон-ядерного (эффекты ESEEM), авторы этой работы провели измерения для субъединиц RNR, содержащих не два, а один радикал тирозил; модуляция в этом случае отсутствовала. Полученные результаты хорошо согласуются с кристаллографическими данными о расстояниях между тирозил-радикалами в RNR *E. coli*.¹¹¹ В то же время результаты работы¹¹² являются важным шагом в исследованиях ферментов RNR животных, кристаллографические данные о которых в литературе пока отсутствуют.

Методом PELDOR и одночастотным методом двухкантовой когерентности (DQC)¹² изучен¹¹³ мутант убикитина человека, в котором основания Ser20 и Gly35 замещены на цистеин, а к последнему присоединена спиновая метка MTS (рис. 24). Цель работы — сравнить эти два метода определения расстояний в спин-меченых белках. Найдено, что расстояния, измеренные данными методами, практически совпадают: $r = 3.55$ нм (PELDOR) и $r = 3.58$ нм (DQC). Функции распределения по расстояниям различаются тем, что в случае метода DQC обнаруживается пик в области 1.5 нм, соответствующий частотам модуляции ядер водорода в X-диапазоне. Сравнивая эти методы, авторы исследования¹¹³ отмечают более высокую чувствительность DQC по сравнению с PELDOR. Однако при использовании метода DQC (полное возбуждение всего спектра ЭПР последовательностью из шести импульсов) возникают проблемы, связанные с ядерной модуляцией (эффекты ESEEM) и необходимостью выполнять более жесткие требования к

параметрам импульсной последовательности, чем в методе PELDOR. В целом оказывается, что PELDOR более эффективен при исследовании малых расстояний (до $r \approx 1.5$ нм), а метод DQC — для больших расстояний ($r > 2$ нм). Эффективное совместное применение методов DQC и PELDOR для определения расстояний в широком диапазоне (1.4–7.0 нм) продемонстрировано в работах^{114,115} при исследованиях строения спин-меченых сложных белковых комплексов и мицелл.

Другие примеры приложений метода PELDOR (как правило, в сочетании с анализом формы линии ЭПР спиновых меток) к исследованиям структуры и динамики биомолекул и их комплексов можно найти в обзорах^{22–24,116,117} и недавно опубликованных статьях^{118–121}. Анализ литературы показывает, что исследования сложных биоккомплексов становятся одним из важнейших эффективных применений импульсной спектроскопии ЭПР.

3. Пространственное распределение парамагнитных частиц. Спин-меченые полимеры и пептид-мембранные комплексы

Спектроскопия PELDOR позволяет получить данные не только о расстояниях в радикальных парах или комплексах, но и исследовать пространственную конфигурацию системы спинов. Эти возможности, к сожалению, пока не нашли достаточно широкого применения среди зарубежных исследователей.

Информация о геометрии пространственного распределения парамагнитных центров содержится в законе, описывающем кинетику экспоненциального спада сигнала PELDOR. Например, простой экспоненциальный спад

$$V(T) = V(0) \exp(-\alpha r^q T^q) \quad (20)$$

с $q = 1$ характерен для усреднения выражения (3) по объему. Возможно провести усреднение по любой заданной пространственной конфигурации с хаотически распределенными частицами. Например, для плоскости показатель экспоненты $q = 2/3$, а для линейного распределения $q = 1/3$ (см.^{26,122}). Поскольку метод PELDOR в отличие от метода ЭСЭ дает спад $V(T)$, не осложненный другими механизмами релаксации, появляется возможность для исследований таких пространственных эффектов.

Экспоненциальный спад с показателем $q = 1$ наблюдается для равномерно распределенных в объеме частиц. Поскольку в этом случае

$$\alpha = \Delta\omega_{1/2} = AC,$$

где C — концентрация спинов, логарифм скорости спада сигнала, нормированный на концентрацию, линейно связан с изменением интервала T , как это показано на рис. 25 для замороженных стеклообразных растворов стабильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-илоксила.³¹ Такая ситуация типична для гомогенных растворов парамагнитных центров.

Неожиданный результат получен при исследованиях кинетики спада $V(T)$ в растворах спин-меченых полимеров поли(4-винилпиридина) (П-4ВП) различной степени меченности ($\beta = 0.06$ и 0.09 , β — отношение числа меток в макромолекуле к степени полимеризации).¹²³ Строение звена полимера с меткой можно представить следующим образом:

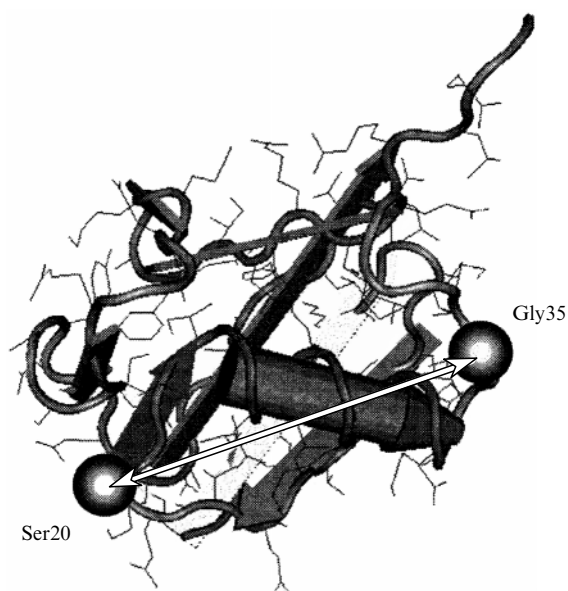


Рис. 24. Структура человеческого убикитина.¹¹³ Стрелкой показано расстояние (3.55 нм) между спиновыми метками в основаниях Ser20 и Gly35, определенное методом PELDOR.

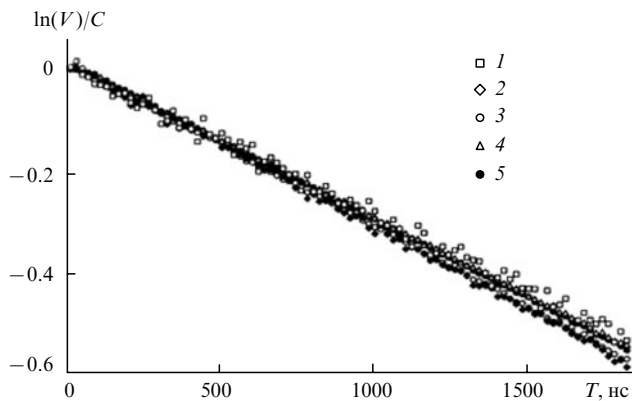
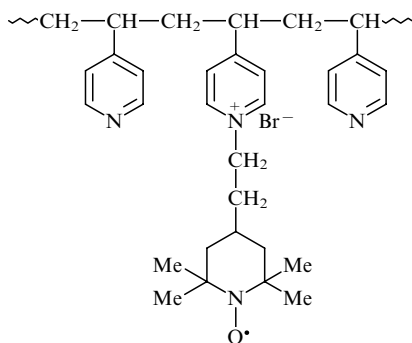


Рис. 25. Экспериментальная зависимость спада сигнала PELDOR от концентрации радикалов 2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-илоксила в замороженных водно-глицериновых растворах (30% H_2O).³¹ Концентрации радикала, см^{-3} : $1.7 \cdot 10^{17}$ (1), $4 \cdot 10^{17}$ (2), $6 \cdot 10^{17}$ (3), $9 \cdot 10^{17}$ (4), $1.4 \cdot 10^{18}$ (5).



Оказалось, что закон спада сигнала PELDOR в этом случае описывается соотношением (20) с $q = 1/3$, что соответствует линейному распределению меток в пространстве. Такой результат нашел свое объяснение в рамках модели, предполагающей взаимное отталкивание заряженных групп полимера. В этом случае можно ожидать линейной конфигурации полимерных цепей в отличие от их свертывания в клубок в отсутствие заряда. Линейность структуры в обсуждаемых экспериментах подтверждается и анализом концентрационной зависимости экспоненциального множителя α в выражении (20). В отличие от зависимости $\alpha \sim C$ при равномерном распределении частиц в объеме для этого полимера найдено, что $\alpha \sim C^2$. Такой закон характерен для пространственного распределения частиц, для которых при расчетах кинетики спада сигнала PELDOR необходимо учесть расстояние наименьшего сближения r_0 и считать, что данная величина превышает сумму ван-дер-ваальсовых радиусов частиц.

Расчет по данным эксперимента для П-4ВП дал $r_0 = 13.5$ нм, что подтверждает гипотезу о линейности этого полимера в условиях эксперимента. Отметим, что вопрос о закономерностях кинетики спада сигнала PELDOR для случая заряженных ион-радикалов детально рассмотрен в работе³¹ с использованием классической теории Дебая–Хюккеля и расчетов $I(T)$ методами Монте-Карло.

Пространственное распределение меток может быть и более сложным. В качестве примера приведем результаты расчета кинетики спада сигнала PELDOR для меток, локализованных на или в поверхностной мембране клетки. В работе¹²⁴ экспериментально исследована дипольная релаксация спиновых меток в замороженных до 77 К стеклообраз-

ных растворах спин-меченого трихогина ТО-4 в клеточных мембранах бактерии *Micrococcus Luteus*. Для интерпретации результатов предложена модель, в которой парамагнитные центры локализованы либо в слое толщиной d сферы с внешним радиусом $R + d$, либо на внешней и внутренней поверхностях этой сферы (рис. 26,а). Такая геометрия моделирует два типа дипольных взаимодействий для центров, локализованных в мембране или на поверхности клеток или везикул. Результаты расчета величины q в соотношении (20) для $R = 500$ нм (средний размер исследованных бактерий) приведены на рис. 26,б. Аналогичные расчеты для других значений R в диапазоне от 250 до 1500 нм и для идеально плоского случая ($R = \infty$) дают кривые, практически совпадающие с зависимостями 1 и 2 на рис. 26,б, полученными для $R = 500$ нм. Горизонтальная прямая 3 соответствует экспериментальному значению $q = 0.71 \pm 0.012$, полученному при исследовании этой системы. Она пересекает обе расчетные кривые (1 и 2). Точки пересечения дают значения величины d для соответствующей модели распределения меток в мембране.

Пересечение линии 3 с расчетной кривой 1 при $d \approx 2.4$ нм означает, что экспериментальные данные не противоречат расположению спиновых меток в объеме слоя такой толщины. Это может означать, что спиновые метки находятся на внешней поверхности мембраны (толщина мембраны ~ 60 нм), причем эта поверхность должна иметь рыхлое строение, при котором спиновые метки практически находятся в объемном слое толщиной 2.4 ± 0.2 нм. Пересечение прямой 3 с кривой 2 на рис. 26,б соответствует, согласно

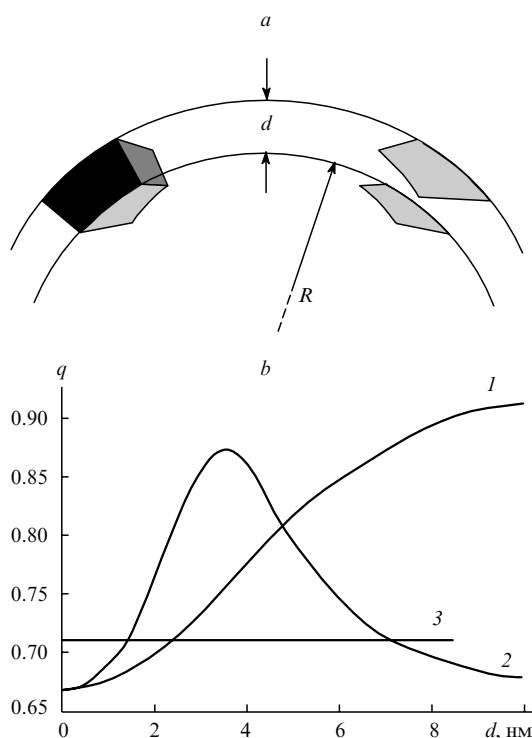


Рис. 26. Схема, поясняющая расчет величины q в зависимости от расположения парамагнитных центров в сферической мембране радиуса R (d — размер оболочки сферы) (а) и рассчитанные величины $q(d)$ для локализации парамагнитных центров внутри оболочки сферы (1), на внутренней и внешней поверхностях сферы (2) (б). (Прямая 3 соответствует экспериментально найденному в работе¹²⁴ значению $q = 0.71$.)

рассмотренной модели, расположению спиновых меток на обеих сторонах мембраны. Решение, отвечающее первому пересечению при $d = 1.5$ нм, не имеет физического смысла, так как получающаяся при этом толщина мембраны ($\sim 1.5 \pm 0.2$ нм) слишком мала. Второе пересечение соответствует расстоянию между поверхностями, на которых расположены спиновые метки, равному 7.0 ± 0.3 нм. Эта величина не противоречит современным представлениям о строении мембран.

Таким образом, сопоставление экспериментальных и расчетных данных показывает, что исследованные спин-меченые пептиды расположены в основном вблизи поверхности мембраны. При этом возможно два варианта расположения пептидов: в виде рыхлого слоя толщиной ~ 2.4 нм на одной из поверхностей мембраны или на обеих поверхностях мембраны с расстоянием между слоями, где находятся спиновые метки, ~ 7 нм. Проведенные оценки показали, что среднее расстояние между спиновыми метками в зависимости от рассматриваемой модели может лежать в диапазоне 4.5–10 нм. Похожие результаты получены при исследованиях пространственного распределения спин-меченых аналогов трихогина в искусственных мембранах.

Исследовано межмолекулярное и внутримолекулярное диполь-дипольное взаимодействие между спиновыми метками для замороженных до 77 К спин-меченых аналогов трихогина (TF-4, TF-1, TO-1,8) в мультиламеллярных мембранах дилапальмитоилфосфатидилхолина (DPPC).¹²⁵ Для однократно меченных пептидов наблюдаемые экспериментальные кинетики спада $V(T)$, изученные при молярных соотношениях пептид: липид (P:L) = 1:300, 1:250 и 1:82, соответствуют неравномерному пространственному распределению молекул трихогина и отражают близкий к планарному характер их расположения в мультиламеллярных слоях DPPC. Для дважды меченного трихогина получена функция распределения по расстояниям между спиновыми метками в молекуле трихогина. Обнаружено, что эта функция имеет два основных максимума, отвечающих расстояниям 1.25 и 1.75 нм; первый из них соответствует геометрии α -спирали, а второй — смешанной структуре из 3_{10} -спирали в комбинации с более вытянутой конформацией трихогина.

Аналогичные результаты получены при исследованиях трихогинов TO-4 и TO-1,8 в мультиламеллярных мембранах яичного фосфатидилхолина (ePC).⁴³ Обнаружено, что добавление холестерина к ePC приводит к существенному увеличению локальных концентраций молекул трихогина без образования компактных агрегатов.

Таким образом, поскольку в работах^{43, 124, 125} не обнаружено агрегации пептидов ни в природных, ни в искусственных мембранах, встал вопрос об условиях образования агрегатов. Ответ удалось найти авторам работы¹²⁶ с помощью методов PELDOR и ESEEM.⁵ Прежде всего было установлено, что агрегаты трихогина в мембране DPPC образуются при высоких относительных концентрациях пептида. При величине P:L < $\sim 1:100$, как в работе¹²⁶, молекулы пептида не агрегированы и расположены параллельно поверхности мембраны. Увеличение мольной доли пептида до P:L = 1:20 приводит к образованию агрегатов с $N = 2$ и с функцией распределения по расстояниям с максимумом при 3.5 нм и шириной 1.4 нм (рис. 27). При этом молекулы пептидов ориентированы по нормали к поверхности мембраны. Образование агрегатов при относительно высоких значениях P:L обнаружено в дальнейшем для аламетицина A-16 в везикулах ePC.¹²⁷

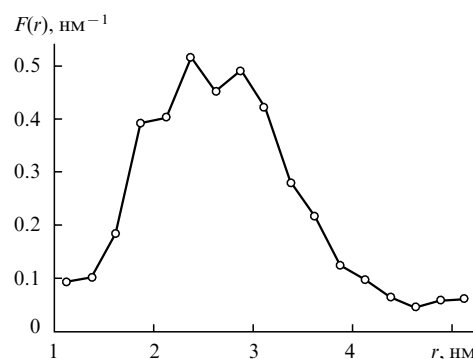


Рис. 27. Функция распределения по расстояниям $F(r)$ для агрегатов спин-меченого трихогина TF-1 в мембранах DPPC.¹²⁶

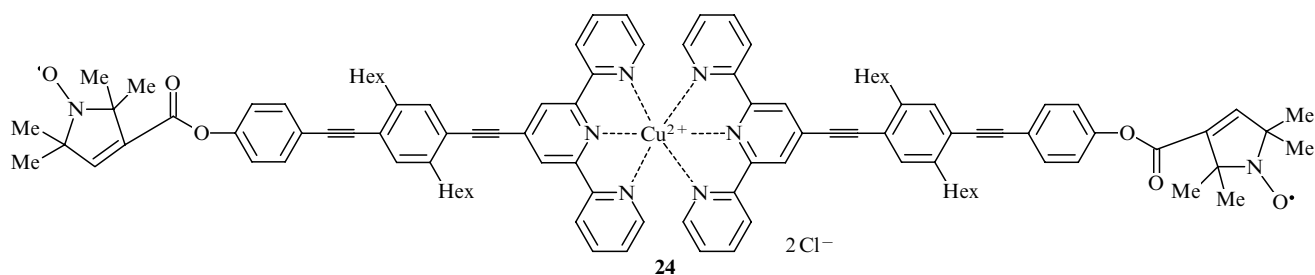
Следует отметить, что с помощью метода ESEEM в работе¹²⁶, по-видимому, впервые удалось детально исследовать ориентацию пептида относительно поверхности мембраны. В этих экспериментах для определения супрамолекулярной структуры системы мембрана–пептид использован эффект модуляции электронного спинового эха (эффект ESEEM) за счет взаимодействия спиновой метки пептида с протонами (дейтронами) молекул воды в поверхностном слое мембраны. Ранее для данной системы проводился калибровочный эксперимент по определению взаимодействия с водой спиновых меток липидов мембраны, расположенных на разных расстояниях вдоль липидной цепи.¹²⁸ Исходя из этой калибровки, определено расстояние до поверхности для трех спин-меченых пептидов, для которых метка располагалась вблизи С-конца (TF-8), N-конца (TO-1, TF-1) и посередине (TO-4, TF-4), что и позволило определить локализацию пептида в мембране.

4. Пары радикал – ион и ион – ион

До настоящего времени лишь в нескольких исследованиях метод PELDOR использовался для изучения парамагнитных ионов.^{129–136} Эти работы представляют интерес не только с точки зрения создания искусственных супрамолекулярных ансамблей с заданными свойствами, но и для синтеза металл-содержащих белков и мембранных комплексов с парамагнитными ионами. В большинстве случаев такие системы обладают специфическими парамагнитными свойствами, обусловленными ионами металлов. Из-за анизотропии g -фактора их спектры ЭПР имеют большую протяженность по сравнению со спектрами радикалов. Поэтому в импульсном эксперименте необходимо учитывать взаимное положение детектирующего импульса и импульса накачки в спектре ЭПР, так называемую ориентационную селективность PELDOR. Парамагнитные ионы, как правило, укорачивают времена фазовой и спин-решеточной релаксации, что приводит к необходимости проводить измерения при возможно низких температурах. В тех случаях, когда метод PELDOR используется для получения структурной информации о ионных кластерах, необходимо учитывать спиновое состояние отдельных ионов металла в самом кластере.

Простейшая система состоит из комплекса парамагнитного иона и нитроксильного радикала. Исследован комплекс **24** гексакоординированного иона Cu^{2+} , в котором лиганды содержат два нитроксильных радикала.¹²⁹

Спектр ЭПР в X-диапазоне такого комплекса состоит из обычного триплетта с $g \approx 2.003$ и широкой анизотропной



линии с шириной около 55 мТл для иона Cu^{2+} ($S = 1/2$) с $g_z = 2.258$. Возбуждение проводили импульсами длительностью 32 нс (измерения выполнены при 15 К) в нескольких вариантах. Если импульс накачки фиксирован на максимуме линии, то импульс регистрации возбуждал спины ионов Cu^{2+} на частотах, сдвинутых относительно импульса накачки на 200 или 1465 МГц. В этом случае анализ модуляции спада сигнала PELDOR дал расстояния $r(\text{>NO}\cdots\text{Cu}^{2+}) = 2.43$ и 2.46 нм соответственно. Если проводился обычный эксперимент с возбуждением и накачкой внутри контура линии ЭПР нитроксильного радикала, то модуляция PELDOR соответствовала $r(\text{>NO}\cdots\text{>NO}\cdot) = 5.2$ нм. Квантово-химический расчет с хорошей точностью подтвердил результаты эксперимента.

В работе¹³⁰ оценено расстояние (2.6 нм) для пар ионов меди в случае димера белка азурина, образующегося за счет взаимодействия цистеиновых остатков на поверхности белкового комплекса. Сделан, однако, вывод, что из-за ориентационной селективности результаты таких измерений зависят от взаимной ориентации g -тензоров ионов Cu^{2+} в димере и от условий возбуждения спектра на частотах ν_A и ν_B (т.е. от $\Delta\nu_{AB}$).

Была предпринята¹³¹ попытка обнаружить ориентационную селективность для полипролинового пептида, содержащего концевые фрагменты $(\text{PHGGGW})\text{Cu}^{2+}$. Измерения в X-диапазоне при 20 К, проведенные при четырех значениях напряженности магнитного поля, не обнаружили различий в спаде сигнала PELDOR, предсказываемых теорией.²⁷ Авторы работы считают, что либо g -тензор для ионов Cu^{2+} ориентирован относительно вектора, соединяющего пару ионов, так, что ориентационная селективность исчезает (такие ориентации теория предсказывает),²⁷ либо эффект не обнаруживается из-за динамической гибкости пептидной молекулы. Вопрос остается открытым, поэтому необходимы дальнейшие исследования.

Получены данные¹³² о расстояниях между ионами Cu^{2+} в трансферрине и лактоферрине, в которых пары ионов Fe^{3+} замещены на ионы Cu^{2+} . Эти полипептиды связывают ионы железа и являются их переносчиками. Замещение ионов железа на другие ионы не изменяет структуру комплексов.¹³³ Благодаря анизотропии g -фактора и СТВ оба комплекса в X-диапазоне имеют широкую линию (~ 3 мТл) в области $g \approx 2.0$. Анализ спадов сигнала PELDOR дал следующие результаты: расстояние между ионами Cu^{2+} в трансферрине составляет 4.16 ± 0.06 нм, а в лактоферрине — 4.26 ± 0.06 нм. Эти расстояния на 2–3% меньше по сравнению с кристаллографическими данными, что может указывать на небольшую разницу в конформациях в замороженных растворах и кристаллах.¹³²

Метод PELDOR применен¹³⁴ для определения расстояния между кластером $[\text{4Fe} - \text{4S}]^+$ ($S = 1/2$ в основном состоянии) и радикалами гидроксиэтилидентиаминопирофосфата, промежуточными продуктами каталитического цикла окис-

ления с участием пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы. Установлено, что расстояние $r = 3.3$ нм соответствует магнитному дипольному взаимодействию между В-кластером и радикалом (в системе существует, по крайней мере, три типа кластеров — А, В, С).

В работе¹³⁵ сделана попытка использовать метод PELDOR для определения расстояния между центром кластера $[\text{NiFe}]$ и кластером $[\text{3Fe} - \text{4S}]^+$, входящими в структуру гидрогеназы — фермента, катализирующего гетеролитический распад водорода ($\text{H}_2 \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{H}^-$). Строение этого фермента достаточно детально изучено рентгеновскими и магнитно-резонансными методами и поэтому представляет интерес и для исследований методом PELDOR. Оказалось, однако, что простейший анализ данных PELDOR (трех- и четырехимпульсные методы при 5 К), основанный на приближении точечных диполей, которые локализованы в центрах кластеров, не дает правильных результатов. Для интерпретации этих результатов авторы работы¹³⁶ считают необходимым учет спин-спиновых взаимодействий внутри кластера $[\text{3Fe} - \text{4S}]^+$. Проведен расчет спада сигналов PELDOR для таких сложных многоядерных систем с учетом взаимодействия спиновых состояний внутри кластера.¹³⁶

Значительные трудности возникают при интерпретации данных PELDOR в системах, содержащих парамагнитные ионы или ионы и ионные кластеры с $S > 1/2$. Попытка измерений расстояния $\text{Mo}\cdots\text{Fe}$ в кластере, содержащем ионы Mo^{5+} и Fe^{3+} , в сульфитоксидазе не привела к положительному результату.¹³⁷ Авторы не обнаружили в данной системе модуляции PELDOR, объясняя это широким распределением по расстояниям в парах и набором конформеров в замороженном водном буфере.

Проведен¹³⁸ теоретический анализ дипольных взаимодействий для парамагнитных частиц с $S > 1/2$. Аналитические соотношения получены для взаимодействующих спинов $S = 1$ и $S = 1/2$. В этом случае удается провести расчет влияния расщепления в нулевом поле зеемановской энергии и температуры на форму линий пейковского дипольного дублета. Можно надеяться, что дальнейший анализ позволит подойти к расчету эффектов в PELDOR для систем с любыми спинами.

Очевидно, что, несмотря на экспериментальные и теоретические трудности, метод PELDOR будет находить все более широкое применение при изучении систем ион–ион и ион–радикал, которые представляют особый интерес в биохимической физике и биокатализе.

5. Радикальные пары, образующиеся при фотолизе

Во многих важных физико-химических процессах парамагнитные центры образуют пары. Например, фотолиз соединений в твердой фазе приводит к образованию электрона, который захватывается акцептором или средой на некотором расстоянии от «материнского» иона. В таких системах

расстояние между парамагнитными центрами может быть описано функцией $F(r)$. Если функция распределения $F(r)$ достаточно широкая, то осцилляция спада сигнала PELDOR не наблюдается. Тем не менее путем анализа спада сигнала PELDOR удается получить сведения о распределении пар частиц.

В работе⁶, в которой был предложен метод PELDOR, исследовались пары атомов водорода или дейтерия и радикалов гидрохинона, стабилизированных в стеклообразных растворах гидрохинона в 8 М водной серной кислоте или D_2SO_4 . Парамагнитные центры в такой системе образуются из гидрохинона $Ar(OH)_2$ при его фотоионизации



Наблюдаемое распределение по расстояниям определяется двумя факторами: длиной свободного пробега электрона до его захвата ионом H_3O^+ и диффузионным путем атомов водорода до их захвата в матрице. Атомы водорода были выбраны в качестве спинов А; накачка осуществлялась на частоте, соответствующей спектру ЭПР ион-радикалов гидрохинона $Ar(OH)_2^{\cdot+}$ (спины В) (рис. 28, врезка). Установлено, что спад сигнала атомов водорода зависит от концентрации ион-радикалов гидрохинона. Это свидетельствует о том, что атомы водорода дипольно взаимодействуют не только с «материнскими» радикалами гидрохинона, но и с радикалами, равномерно распределенными в матрице, т.е. спад сигнала можно представить как $V(T) = V_{intra}V_{inter}$. Дипольное парное взаимодействие, которое определяется членом V_{intra} , было получено путем исследования зависимости амплитуды сигнала $V(T)$ от концентрации радикалов гидрохинона. Функцию $F(r)$ вычисляли по уравнениям (11) и (12) с использованием приближения для $F(r)$ в виде ступенчатой функции. Функция распределения, полученная таким образом, имеет максимум при 4.5 нм (см. рис. 28). Если ее проинтегрировать, то окажется, что 63% пар имеют расстояние до 8.5 нм, остальные расстояния лежат в области 8.5–10 нм. Для этих пар трудно определить вид реальной функции распределения, поскольку их вклад в спад сигнала PELDOR пренебрежимо мал.

Известно, что в углеводородных растворах ароматических соединений под действием УФ-излучения при 77 К образуются захваченные радикалы растворителя. Механизм их образования включает поглощение двух фотонов ароматиче-

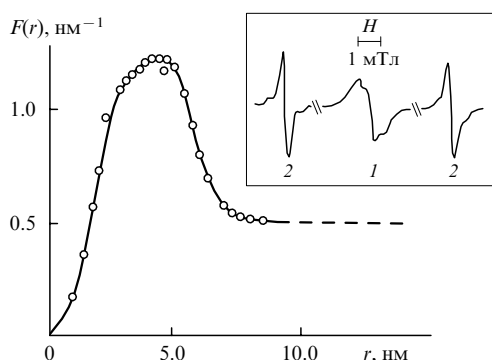


Рис. 28. Функция парного распределения, рассчитанная из данных PELDOR, для замороженных растворов гидрохинона после УФ-облучения.⁶

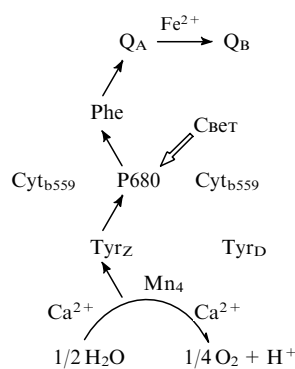
На врезке: спектр ЭПР парамагнитных центров, образующихся в этой системе: 1 — радикалы гидрохинона, спины В; 2 — атомы водорода, спины А.

скими молекулами, передачу энергии или заряда от ароматической молекулы к окружающим молекулам углеводорода с последующим радикальным распадом.¹³⁹ В работе³² исследовалось пространственное распределение углеводородных радикалов, захваченных в этих системах. Фотолиз ($\lambda > 290$ нм) стеклообразных растворов нафталина в декалине при 77 К дает радикалы, спектр ЭПР которых состоит из шести неэквидистантных линий. Этот спектр принадлежит радикалам, возникающим при отщеплении атома водорода от молекулы декалина. Наблюдается быстрый спад сигналов PELDOR при низких концентрациях декалильных радикалов, который переходит в предельное значение V_p , характерное для кластерного распределения радикалов. Изучена зависимость величины V_p от параметра r_b , определяющего степень возбуждения спектра ЭПР декалильного радикала.³² Изменяли положение импульсов накачки в спектре ЭПР, не меняя их амплитуды и длительности. Оказалось, что V_p линейно зависит от r_b , наклон прямой не изменяется в ходе фотолиза и не зависит от концентрации радикалов. Из наклона прямой в соответствии с выражением (12) определено $N = 1.85 \pm 0.2$. Таким образом, установлено, что при низкотемпературном сенсibilизированном фотолизе декалина радикалы декалина образуются и стабилизируются в виде пар. Из величины времени $T^* = 40$ нс по формуле (11) оценена граница расстояний между радикалами в парах ($r = 2.5$ нм).

6. Радикальные пары в системах фотосинтеза

Фотосинтез является наиболее важным физико-химическим процессом превращения солнечной энергии в электрохимическую, необходимую для осуществления жизненных процессов. Фотохимические процессы — перенос энергии, электрона или протона — в большинстве случаев протекают с участием ион-радикалов и радикалов. Информация о расстояниях между этими парамагнитными центрами представляет большой интерес для исследования процессов фотосинтеза. Наибольшее число работ по применению PELDOR связано с фотосистемой II (PSII), представленной на схеме 1.

Схема 1



Составной частью PSII является первичный донор электронов P680 — димер хлорофилла *a*, обладающий максимумом поглощения света на длине волны 680 нм. Возбуждение P680 светом инициирует серию процессов переноса электрона в PSII. Первичным акцептором при переносе электрона с P680 через промежуточный акцептор феофитин (Phe) является хинон Q_A , вторичным — хинон Q_B . В конечном итоге последовательность окислительно-восстановительных реакций под действием света в PSII заканчивается разложением воды и образованием кислорода. Необходимо отме-

тить, что процесс переноса электрона сопровождается образованием серии парамагнитных центров, регистрируемых методом ЭПР. Эти центры вместе с системами, моделирующими строение и отдельные свойства реакционного центра фотосинтеза, интенсивно исследуются различными методами химической радиоспектроскопии.^{140, 141} В том случае, когда возможна регистрация радикальных пар, применяются методы PELDOR или одночастотные импульсные методы.

В составе PSII имеются два окислительно-восстановительных центра на основе тирозиновых остатков (Tyr), осуществляющих функцию вторичных доноров электрона. Один из них — тирозин Z, обозначаемый как Y_Z , при комнатной температуре в окисленном состоянии Y_Z^+ имеет короткое время жизни и его трудно регистрировать методом ЭПР. Другой — тирозин D, обозначаемый как Y_D , в окисленной форме Y_D^+ стабилен в темновых условиях и поддается регистрации методом ЭПР. Спектр ЭПР Y_D^+ представляет собой одиночную узкую линию с $g \approx 2$. Кроме того, в PSII имеется несколько дополнительных редокс-активных комплексов, а именно цитохром b559, хлорофилл Z (ChlZ), а также марганцевый кластер Mn_4 с ионами Ca^{2+} . Этот кластер — важная составляющая в комплексе реакционного центра, окисляющего воду до кислорода.

В работе¹⁴² изучена кислородвыделяющая система PSII и Са-обедненная PSII. В зависимости от степени окисления входящего в PSII марганцевого кластера различают пять его состояний ($S_0 - S_4$). В PSII для состояния S_2 при низких температурах кроме спектра ЭПР Y_D^+ наблюдается хорошо известный многокомпонентный спектр марганцевого кластера с g -фактором 1.96 и полной шириной спектра ~ 20 мТл. Состояние S_2 в Са-обедненной PSII обладает так называемым модифицированным спектром ЭПР марганцевого кластера с большей шириной, большим числом линий и меньшим расщеплением СТВ по сравнению со спектром в кислородвыделяющей PSII. В Са-обедненной PSII кроме спектра Y_D^+ наблюдается также спектр ЭПР, природа которого окончательно не установлена. Спектр ЭПР состояния S_3 имеет существенно большую протяженность, чем спектр Y_D^+ .

Различия в спектрах ЭПР четырехатомного марганцевого кластера в состоянии S_3 и катиона Y_D^+ позволили применить метод PELDOR для измерения дипольного взаимодействия между ними.¹⁴² При этом импульс накачки действовал на спины Y_D^+ , а сигнал спинового эха формировался от Mn_4 в состоянии S_3 . На рис. 29 приведены полученные в работе¹⁴² модулированные спады сигнала PELDOR для указанных выше систем. Точки представляют экспериментальные данные, а сплошные линии — расчет с подобранными параметрами дипольного взаимодействия. Из полученных данных определено расстояние между марганцевым кластером и Y_D^+ , равное 2.7 нм (табл. 2) для состояния S_2 как в кислородвыделяющей PSII, так и в Са-обедненной PSII. Расстояние между спинами, ответственными за спектр ЭПР в состоянии S_3 для Са-обедненной PSII, и радикалами тирозина Y_D^+ оказалось равным 3.0 нм. Сопоставление полученного значения 3.0 нм с другими данными позволило авторам работы¹⁴² сделать предположение о природе спектра ЭПР в состоянии S_3 для PSII.

В работе¹⁴³ приведены данные о марганцевом кластере в состоянии S_0 , полученные методом PELDOR. Автор исследования считает, что разные значения расстояний между катионом Y_D^+ и кластером Mn_4 обусловлены разными валентными и спиновыми состояниями данного кластера. В этой же работе дан обзор сведений о структуре парамаг-

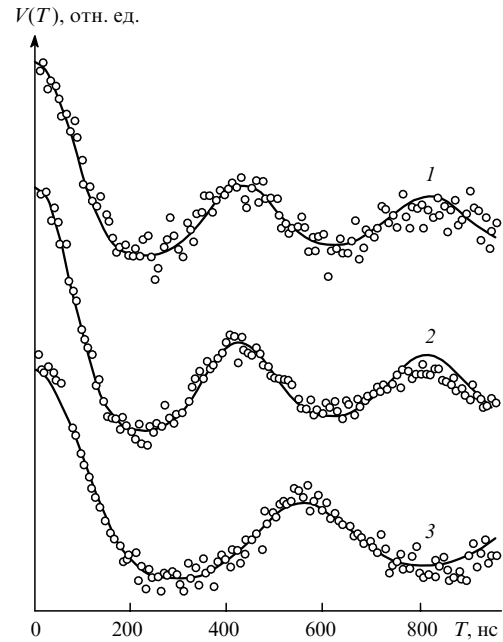


Рис. 29. Модулированные спады сигналов PELDOR для пар парамагнитных центров в фотосистеме PSII.¹⁴² 1 — кислородвыделяющая система PSII с марганцевым кластером Mn_4 в S_2 -состоянии, 2 — Са-обедненная система PSII с кластером Mn_4 в S_2 -состоянии, 3 — Са-обедненная система PSII с кластером Mn_4 в S_3 -состоянии. Точки — эксперимент, кривые — расчет.

нитных центров в системе PSII, полученных в последние годы другими методами импульсной спектроскопии ЭПР.

Сложность экспериментов с радикальными парами в фотосистемах заключается в том, что спектры ЭПР разных центров перекрываются, и необходимо выбрать ν_A и ν_B так, чтобы СВЧ-импульсы избирательно возбуждали определенные центры. Это удалось осуществить в X-диапазоне для центров Y_D , ChlZ и Q_A в работах^{144, 145}. Результаты измерений приведены в табл. 2, где представлены и другие результаты^{146, 147} измерения расстояний в PSII методом PELDOR.

Реакционные центры фотосистем локализованы в специальных мембранных структурах хлоропласта — тилакоидах. Предполагается, что донорная часть PSII расположена на противоположных частях тилакоидной мембраны. С помощью импульсных методов ЭПР, в частности PELDOR, исследовалась ориентация реакционного центра относительно поверхности этой мембраны.¹⁴⁸ Для этого PSII наносилась на синтетическую плоскую майларовую подложку, и исследовался образец, ориентированный относительно внешнего магнитного поля H_0 . Регистрировали

Таблица 2. Расстояния между парамагнитными центрами в PSII, определенные методом PELDOR.

Пара центров	Расстояние, нм	Ссылки
$Y_D - Mn_4(S_2)$	2.71 ± 0.02	142
$Y_D - Mn_4(S_0)$	3.4	143
$Q_A - ChlZ$	3.40 ± 0.10	144
$Y_D - ChlZ$	2.95 ± 0.05	145
$Q_A - Y_Z$	3.40 ± 0.10	146
$Q_A - Cytb_{559}$	4.00 ± 0.30	147

ориентационную зависимость спектров PELDOR радикальной пары тирозинового центра Y_D^+ и марганцевого кластера Mn в S_2 -состоянии. В результате найдено, что угол между вектором, соединяющим эти два центра, и нормалью к поверхности мембраны тилакоида составляет $110 \pm 2^\circ$ — это первые ориентационные измерения для PSII с помощью метода PELDOR.

Радикальные пары возможно создать и искусственно, введя, например, спиновую метку в пептидную цепочку белка в реакционном центре, где стабилизирован один из радикалов или ион-радикалов фотосистемы. Такой подход использовался¹⁴⁹ при исследованиях методом PELDOR строения белковой составляющей светособирающего комплекса ЛНСПб, включающего хлорофилл *a/b* и присутствующего в обеих фотосистемах. Спиновые метки вводились в различные пары точек белка. Определены расстояния между этими точками (рис. 30) и функции парного распределения для каждого из расстояний. Все функции $F(r)$, связанные с точкой 3 вблизи N-конца полипептида (3–160, 3–52, 3–106), оказались бимодальными. Это свидетельствует о том, что область (домен) вблизи N-конца, участвующая в регулировании светового потока в фотосистеме, имеет два конформационных расстояния. Предполагается, что эти два конформера соответствуют двум разным фотосистемам — PSI и PSII.¹⁴⁹

Спиновая метка вводилась в цистеин в позиции 156 субъединицы белкового комплекса в фотосинтетическом реакционном центре, полученном из бактерий *Rhodobacter sphaeroides* R26.¹⁵⁰ Методом четырехимпульсного PELDOR

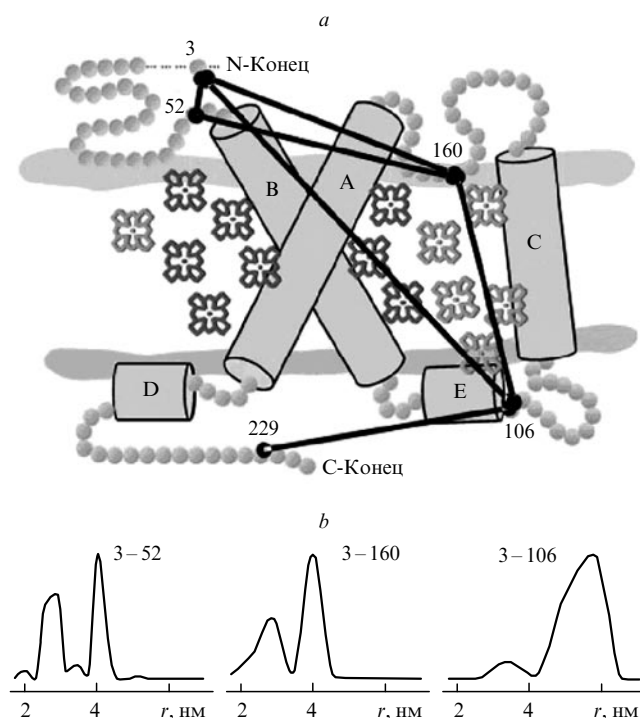


Рис. 30. Расстояния, измеренные методом PELDOR, между пятью спиновыми метками в положениях 3, 52, 106, 160 и 229 в белковом светособирающем комплексе ЛНСПб (A–E — спиральные домены) (a), и три из шести функций парного распределения по расстояниям между точками 3–52, 3–160 и 3–106, рассчитанные из данных PELDOR (b).¹⁴⁹

определено расстояние (3.05 ± 0.05 нм) между этой спиновой меткой и первичным акцептором Q_A^- (ион-радикал семихинона). Показано, что оно становится на 0.2 нм меньше после фотопереноса электрона и стабилизации Q_B^- . Эффект не связан с возможной ориентационной селективностью в этой системе.¹⁴⁷ Авторы работ^{150, 151} полагают, что метод может быть использован для обнаружения конформационных изменений при реакциях фотопереноса в фотосистемах.

В W-диапазоне (95 ГГц) изучены короткоживущие радикальные пары $P_{865}^+ Q_A^-$ (P_{865} — бактериохлорофилл *a*), индуцированные лазерным импульсом в замороженных растворах реакционных центров в фотосинтетических бактериях *Rb. sphaeroides*.^{49, 51} В указанном диапазоне спектры ион-радикалов перекрываются лишь частично, и возможны измерения с регистрацией на частоте ν_A и накачкой на частоте ν_B в разных частях обоих спектров, соответствующих g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} для Q_A^- и P_{865}^+ . Это дает возможность провести селективные эксперименты и определить не только расстояние в паре, но и ее ориентацию. Один из наиболее важных вопросов, который удалось решить авторам исследований, — как изменить ориентацию вектора R , соединяющего пару $P_{865}^+ Q_A^-$, в результате переноса электрона и образования $P_{865}^+ Q_A^-$. Ориентация и величина этого вектора до реакции известна из данных рентгеноструктурного анализа. По результатам измерений методом PELDOR, величина вектора R оказалась равной 2.84 нм, а изменение его ориентации составляет 12.5° . Важно, что в работах^{49, 51} авторы детально описали методику эксперимента и расчета структурных параметров в ориентационно-селективных экспериментах PELDOR.

7. Пространственное распределение радикалов при радиолитизе, радикальные кластеры

Благодаря пространственной локализации поглощения и передачи энергии жесткого излучения (α -, β - и γ -лучи, продукты деления ядер) промежуточные продукты реакций (ионы, электроны, атомы, радикалы) также пространственно локализованы в треках и «шпорах». Такие радикальные треки детально исследованы методом ЭСЭ (см., например, обзоры^{3, 4}).

Как мы уже видели, анализ спада сигнала PELDOR позволяет определить число спинов в группе парамагнитных частиц, когда это число фиксировано, например в случае образования агрегатов с определенной структурой. В том случае, когда имеется распределение по числу спинов в группе, естественно, что описанный выше метод дает лишь эффективное значение числа спинов в группе.^{14, 15} В работах^{33, 34} метод PELDOR использовался для получения информации о статистике числа спинов в группах для γ -облученного циклогексана, полиэтилена и ряда органических кислот.

Исследованы³³ циклогексильные радикалы в γ -облученном при 77 К кристаллическом циклогексане. Спад сигнала PELDOR в этой системе обладает теми же свойствами, что и для бирадикалов с широким распределением по расстояниям. Быстрый спад наблюдается в начале, а затем функция спада приходит к своей предельной величине V_p на временах порядка 0.5 мкс. Исследована зависимость предельной величины спада V_p от параметров p_a и p_b . В отличие от всех предыдущих данных по парному распределению для бирадикалов и радикалов, возникающих при сенсibilизированном фотолизе, оказалось, что среднее значение N зависит от степени возбуждения спектра импульсами на частоте регистрации p_a . Эта зависимость для циклогексильных ра-

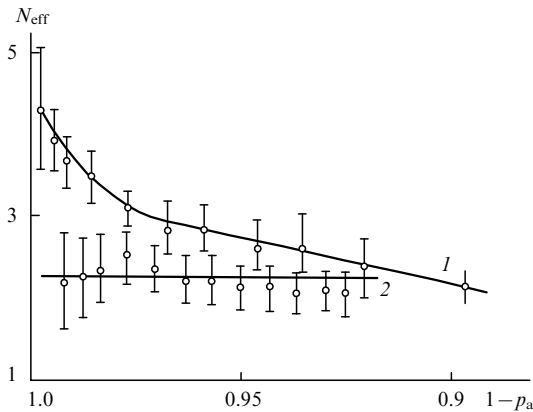


Рис. 31. Зависимости эффективного значения числа частиц (N_{eff}) от степени возбуждения (p_a) спектра импульсами на частоте ν_d для циклогексильных радикалов (1) и для нитроксильных бирадикалов (2).³³

дикалов приведена на рис. 31 (кривая 1), где также показаны в качестве тестового эксперимента результаты для нитроксильных бирадикалов (2) (см. табл. 1). Для нитроксильных бирадикалов найдено, что в пределах экспериментальной ошибки значение N_{eff} не зависит от параметра p_a и равно 2.2 (см. рис. 31, кривая 2).

Было высказано предположение, что зависимость N_{eff} от p_a для циклогексильных радикалов в γ -облученном циклогексане возникает из-за присутствия групп с различным числом радикалов. Разработанными в работе³³ методами был проведен анализ зависимости V_p от p_a , что позволило сделать следующие заключения о функции распределения радикалов по числу в группе. Большинство радикалов (75–90%) распределены равномерно или в виде пар, остальные (10–25%) распределены по группам, в которых есть от трех до нескольких десятков радикалов. Характерный размер группы, определенный из начального спада сигнала PELDOR, составляет ~ 2.5 нм, что соответствует локальной концентрации $\sim 10^{20}$ см⁻³. Заметим, что группы с такими высокими локальными концентрациями не могут быть обнаружены с помощью двухимпульсного метода ЭСЭ из-за мертвого времени спектрометра ЭСЭ. Таким образом, метод PELDOR (по сравнению с ЭСЭ) позволяет получать значительно более детальную информацию о пространственном распределении радикалов в γ -облученных системах.

Аналогичные закономерности были получены в работе³⁴ для алкильных радикалов, возникающих при γ -радиолизе полиэтилена и ряда органических кислот. Как в случае облученного циклогексана, спад сигнала PELDOR в полиэтилене происходит быстро на коротких временах, а затем выходит на предельное значение V_p . Предельное значение зависит от p_a и p_b , и анализ этих зависимостей позволяет определить N_{eff} , а также первый и второй моменты функции группового распределения радикалов, которые для полиэтилена оказались следующие: $K_1 = 2.4$ и $K_2 \leq 6$. Анализ, проведенный в работе³⁴, показал, что алкильные радикалы, образующиеся при низкотемпературном радиолизе полиэтилена, распределены в группах со средним числом радикалов 2.4 и характерным размером группы $r \leq 2.5$ нм.

Метод PELDOR использован¹⁵² для изучения пространственного распределения радикалов в гидратированной ДНК, облученной тяжелыми заряженными частицами. Облучение проводили ионами ⁴⁰Ag с энергией 100 МэВ. В этих

условиях при 77 К в ДНК стабилизируются в основном два типа радикалов — заряженные анион- и катион-радикалы, локализованные на основаниях ДНК, и нейтральные радикалы, локализованные на атомах углерода. Общая ширина спектра ЭПР составляет ~ 4 мТл. Четырехимпульсным методом PELDOR исследовали три типа образцов, облученных дозами 1.7, 15 и 50 кГр. Регистрировали спад сигнала PELDOR в зависимости от степени возбуждения спектра p_b . Величины p_b определяли расчетом по формуле (17) с использованием экспериментального спектра ЭПР и параметров СВЧ-импульса. В эксперименте, меняя амплитуду импульсов накачки, получали различные значения p_b в диапазоне 0.179–0.015. Кинетика спада на всем начальном участке времен до 1.6 мкс, как оказалось, может быть представлена экспоненциальной функцией

$$V(T) \sim \exp(-kp_bCT),$$

где C — концентрация радикалов в кластере. Зависимость кинетики спада сигнала PELDOR от величины p_b в облученных образцах показана на рис. 32.

Для анализа результатов эксперимента в работе¹⁵² использована простейшая модель, в которой предполагается, что радикалы ДНК расположены в кластерах одинакового объема, но число радикалов в этих кластерах различное. Для данной модели получено, что независимо от дозы облучения в среднем радиус кластера составляет 6.8 нм, а число радикалов в нем $N = 17.7 \pm 0.7$; это, в свою очередь, означает, что кластеры при таких дозах не перекрываются. Полученные величины позволяют также оценить важный физический параметр данного излучения — линейную передачу энергии (ЛПЭ). Результаты оценки оказались близки к значению ЛПЭ, измеренному другими физическими методами. К сожалению, в работе¹⁵² не проанализировано влияние параметра p_a на кинетику спада сигнала PELDOR, и это не позволяет судить о возможной статистике распределения по числу радикалов в кластере.

Радикальные кластеры обнаружены и в полимерных системах. В работах^{19, 153, 154} исследовано кластерное распределение радикалов в двухблочных сополимерах стирола и изопрена, содержащих концевые ионные группы. Полимеры (иономеры) образуют кластеры с заряженными группами на поверхности. В качестве спиновой метки также использовали ионное соединение — калиевую соль 4-карбоксизамещенного соединения ТЕМПО. Из кинетики спада сигнала четырех-

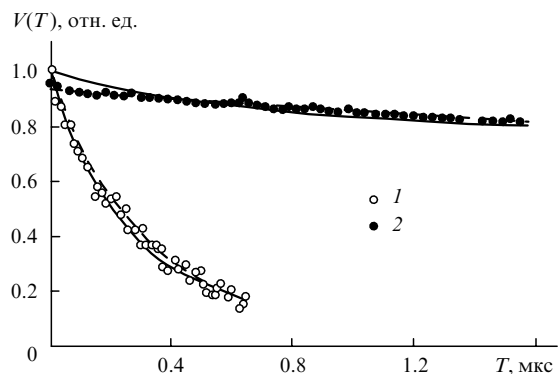


Рис. 32. Спады сигнала PELDOR при разных значениях величины p_b для ДНК, облученной ионами ⁴⁰Ag (100 МэВ) до дозы 15 кГр.¹⁵² $p_b = 0.179$ (1), 0.015 (2).

импульсного PELDOR авторы этих работ определили расстояние между метками (концентрация меток выбрана так, что на каждый кластер приходится две метки) на поверхности кластера (2.2 нм) и расстояние между кластерами (6.6 нм). Расстояние 2.2 нм не зависит от длины цепи полимера (молекулярной массы), а межкластерное расстояние в зависимости от топологии сополимера изменяется в диапазоне 4.5–8.0 нм. Авторы объясняют полученные результаты на основе имеющихся данных других методов и модели, описывающей электростатические взаимодействия кластеров между собой и с поверхностью раздела двухблочных сополимеров стирола и изопрена.

V. Заключение

Представленный в обзоре материал наглядно демонстрирует, что метод ЭПР в его импульсном варианте находит в настоящее время все новые приложения для измерений расстояний между парамагнитными центрами, определения пространственной ориентации радикальных пар, исследования эффектов пространственного распределения, причем эти данные удачно дополняют такие традиционные структурные параметры, как константы сверхтонкого взаимодействия и g -тензор. Среди импульсных методик ЭПР наибольшая эффективность характерна для двухчастотного импульсного метода PELDOR. Значительно меньшее распространение получили одночастотные импульсные методы, такие как «2 + 1» (см.⁶) или SIFTER,¹³ однако следует отметить разработку и целый ряд приложений одночастотного метода DQC,¹² выполненные в Национальном биомедицинском центре современных технологий ЭПР (ACERT) Корнельского университета. Недавно опубликован детальный обзор¹⁵⁵ исследований строения и свойств различных биомолекулярных структур, проведенных в этом центре. Как уже отмечалось, метод DQC оказывается эффективным при измерениях больших расстояний (до $r \approx 7.0$ –8.0 нм) и обладает более высокой чувствительностью благодаря более полному возбуждению спектра импульсами, чем в случае метода PELDOR. Использование метода DQC, как и других импульсных методов, из-за технических трудностей пока, к сожалению, ограничено лишь несколькими лабораториями.

Для определения расстояний с успехом применяются, в особенности для спиновых меток, и наиболее доступные для исследователей методы стационарной спектроскопии ЭПР, основанные на анализе формы линий в спектрах ЭПР или измерениях насыщения сигналов ЭПР. Их недостаток — узкий диапазон доступных расстояний ($r < 2$ нм). Отметим также так называемый метод «1/2 поля», работающий в области малых расстояний. Обычно запрещенные переходы для пары спинов в триплетном состоянии между уровнями с $m_s = -1$ и $m_s = +1$ оказываются возможными для близких спинов ($r \approx 4$ –5 Å) и лежат в полях $1/2 H_0$ ($g \approx 4$), где H_0 — резонансное поле ЭПР для основного перехода. Интенсивность линий за счет этих переходов $I_{\pm 1}$ по сравнению с линиями с $g \approx 2$ мала, но согласно теории,¹⁵⁶

$$\frac{I_{\pm 1}}{I_0} \sim \frac{1}{r_0^6},$$

что позволяет оценить значение r .

Обзор различных стационарных и некоторых импульсных методов ЭПР можно найти в работе¹⁵⁷. На рис. 33 суммированы возможности спектроскопии ЭПР в измерении расстояний между хаотически ориентированными парамаг-

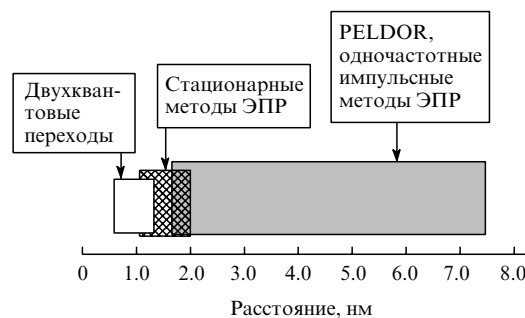


Рис. 33. Шкала расстояний, доступных для определения разными методами ЭПР, в полиориентированных системах.

нитными частицами в твердых образцах. Как видно, оказался доступным для исследований широкий диапазон в нанометровой области расстояний.

Следует еще раз подчеркнуть, что спектроскопия ЭПР, в особенности ее импульсные методы, сейчас не только позволяет с хорошей точностью проводить измерения расстояний в хаотически ориентированных системах, но и исследовать процессы самоорганизации, образование супрамолекулярных комплексов, а также взаимодействие с мембранами различных биологически важных структур. Нет сомнений, что химическая радиоспектроскопия ЭПР высокого разрешения будет находить все более широкое применение в химии и биологии.

Авторы благодарны Г.Ешке, В.Любицу, О.Шиенману и Х.Хара, а также соответствующим издательствам за любезное разрешение использовать иллюстрации из опубликованных ими работ.

Обзор подготовлен при частичной финансовой поддержке Программы «Ведущие научные школы» (проект НШ-551.2008.3), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 06-04-48 021-а), совместного гранта РФФИ-NWO (проекты №№ 06-03-91362, 0.47.017.034), Отделения химии и наук о материалах РАН (программа 7) и Сибирского отделения РАН (интеграционный проект № 51).

Литература

1. К.М.Салихов, А.Г.Семенов, Ю.Д.Цветков. *Электронное спиновое эхо и его применение*. Наука, Новосибирск, 1976
2. Ю.Д.Цветков. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 90 (1976)
3. К.М.Salikhov, Yu.D.Tsvetkov. In *Time Domain Electron Spin Resonance*. (Eds L.Kevan, R.Schwartz). Wiley, New York, 1979. P. 231
4. Ю.Д.Цветков. *Успехи химии*, **52**, 1514 (1983)
5. S.A.Dikanov, Yu.D.Tsvetkov. *Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1992
6. А.Д.Милов, К.М.Салихов, М.Д.Щиров. *Физика тв. тела*, **23**, 975 (1981)
7. А.Б.Пономарев, А.Д.Милов, Ю.Д.Цветков. *Журн. структ. химии*, **25**, 51 (1984)
8. D.E.Kaplan, E.L.Hahn. *J. Phys. Radium*, **19**, 821 (1958)
9. R.Graf, D.E.Demco, J.Gottwald, S.Hafner, H.W.Spiess. *J. Chem. Phys.*, **106**, 885 (1997)
10. M.Pannier, S.Veit, A.Godt, G.Jeschke, H.W.Spiess. *J. Magn. Reson.*, **142**, 331 (2000)
11. P.P.Borbat, J.H.Freed. *Chem. Phys. Lett.*, **313**, 145 (1999)
12. G.Jeschke, M.Pannier, A.Godt, H.W.Spiess. *Chem. Phys. Lett.*, **331**, 243 (2000)

13. V.V.Kurshev, A.M.Raitsimring, Yu.D.Tsvetkov. *J. Magn. Reson.*, **81**, 441 (1989)
14. A.D.Milov, A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **15**, 107 (1998)
15. Yu.D.Tsvetkov. In *Pulsed EPR: a New Field of Applications*. (Eds C.P.Keijzers, E.J.Reijerse, J.Schmidt). North Holland, Amsterdam, 1989. P. 206
16. G.Jeschke, M.Pannier, H.W.Spiess. In *Biological Magnetic Resonance. Vol. 19. (Distance Measurements in Biological Systems by EPR)*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer; Plenum, New York, 2000. P. 493
17. T.Prisner, M.Rohrer, F.MacMillan. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **52**, 279 (2001)
18. Yu.D.Tsvetkov. In *Biological Magnetic Resonance. Vol. 21. (EPR: Instrumental Methods)*. (Eds C.J.Bender, L.J.Berliner). Springer-Verlag, New York, 2004. P. 385
19. G.Jeschke. *Macromol. Rapid Commun.*, **23**, 227 (2002)
20. G.Jeschke. *ChemPhysChem*, **3**, 927 (2002)
21. С.А.Дзюба. *Успехи химии*, **76**, 752 (2007)
22. O.Schiemann, T.F.Prisner. *Q. Rev. Biophys.*, **40**, 1 (2007)
23. G.Jeschke, Y.Polyhach. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 1895 (2007)
24. P.G.Fajer, L.Brown, L.Song. In *Biological Magnetic Resonance. Vol. 27. (ESR Spectroscopy in Membrane Biophysics)*. (Eds M.Hemminga, L.J.Berliner). Springer-Verlag, Berlin, 2006. P. 95
25. A.Abragam. *Principles of Nuclear Magnetism. Ch. 4*. Clarendon Press, Oxford, 1961
26. A.M.Raitsimring, K.M.Salikhov. *Bull. Magn. Reson.*, **7**, 184 (1985)
27. A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov, J.Raap. *Appl. Magn. Reson.*, **14**, 101 (1998)
28. В.Н.Пармон, А.И.Кокорин, Г.М.Жидомиров. *Стабильные биорадикалы*. Наука, Москва, 1980
29. M.K.Bowman, A.G.Maryasov, N.Kim, V.J.DeRose. *Appl. Magn. Reson.*, **26**, 23 (2004)
30. A.D.Milov, A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov, J.Raap. *Chem. Phys. Lett.*, **303**, 135 (1999)
31. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **18**, 217 (2000)
32. A.D.Milov, A.B.Ponomarev, Yu.D.Tsvetkov. *Chem. Phys. Lett.*, **110**, 67 (1984)
33. А.Б.Пономарев, А.Д.Милов, Ю.Д.Цветков. *Хим. физика*, **8**, 1673 (1988)
34. А.Б.Пономарев, А.Д.Милов, Ю.Д.Цветков. *Хим. физика*, **9**, 498 (1990)
35. G.Jeschke, A.Koch, U.Jonas, A.Godt. *J. Magn. Reson.*, **155**, 72 (2002)
36. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, S.Oancea, C.Toniolo, J.Raap. *J. Phys. Chem. B*, **107**, 13719 (2003)
37. G.Jeschke, G.Panek, A.Godt, A.Bender, H.Paulsen. *Appl. Magn. Reson.*, **26**, 223 (2004)
38. Y.-W.Chiang, P.P.Borbat, J.H.Freed. *J. Magn. Reson.*, **172**, 279 (2005)
39. A.N.Tikhonov, V.Y.Arsenin. *Solutions of Ill-Posed Problems*. Wiley, New York, 1977
40. A.D.Milov, B.D.Naumov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **26**, 587 (2004)
41. A.D.Milov, D.A.Erilo, E.S.Salnikov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, C.Toniolo, J.Raap. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**, 1794 (2005)
42. А.Д.Милов, Р.И.Самойлова, Ю.Д.Цветков, К.Пегнион, Ф.Формаджио, К.Тониоло, Я.Раап. *Докл. АН*, **406**, 341 (2006)
43. A.D.Milov, M.I.Samoilova, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, C.Toniolo, J.Raap. *Appl. Magn. Reson.*, **29**, 703 (2005)
44. A.D.Milov, M.I.Samoilova, Yu.D.Tsvetkov, M.Jost, C.Peggion, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.-W.Handgraaf, J.Raap. *Chem. Biodiversity*, **4**, 1275 (2007)
45. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, E.Yu.Gorbunova, L.G.Mustaeva, T.V.Ovchinnikova, J.-W.Handgraaf, J.Raap. *Chem. Biodiversity*, **4**, 1243 (2007)
46. G.Jeschke, V.Chechik, P.Ionita, A.Godt, H.Zimmermann, J.Bbanham, C.R.Timmel, D.Hilger, H.Jung. *Appl. Magn. Reson.*, **30**, 473 (2006)
47. R.G.Larsen, D.J.Singel. *J. Chem. Phys.*, **98**, 5134 (1993)
48. A.G.Maryasov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **18**, 583 (2000)
49. A.Schnegg, A.A.Dubinskii, M.R.Fuchs, Yu.A.Grishin, E.P.Kirilina, W.Lubitz, M.Plato, A.Savitsky, K.Möbius. *Appl. Magn. Reson.*, **31**, 59 (2007)
50. Ye.Polyhach, A.Godt, C.Bauer, G.Jeschke. *J. Magn. Reson.*, **185**, 118 (2007)
51. A.Savitsky, A.A.Dubinskii, M.Flores, W.Lubitz, K.Möbius. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 6245 (2007)
52. V.P.Denysenkov, T.F.Prisner, J.Stubbe, M.Bennati. *Appl. Magn. Reson.*, **29**, 375 (2005)
53. M.M.Hertel, V.P.Denysenkov, M.Bennati, T.F.Prisner. *Magn. Reson. Chem.*, **43**, S248 (2005)
54. V.P.Denysenkov, T.F.Prisner, J.Stubbe, M.Bennati. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13386 (2006)
55. А.Г.Семенов, М.Д.Широв, В.Л.Жидков, В.Е.Хмельницкий, Е.В.Дворников. *Когерентный спектрометр электронного спинового эха. Препринт 3. ИХКГ СО АН СССР*, Новосибирск, 1980
56. P.Höfer, A.Kamlowski. *Bruker Spin Report*, **149**, 16 (2001)
57. P.Höfer, R.Heilig, D.C.Maier, I.Prisecaru, D.Schmalbein. *Bruker Spin Report*, **152**, 37 (2003)
58. P.Carl, R.Heilig, D.C.Maier, P.Höfer, D.Schmalbein. *Bruker Spin Report*, **154–155**, 35 (2004)
59. K.Holczer. In *Pulsed EPR: a New Field of Application*. (Eds C.P.Keijzers, E.J.Reijerse, J.Schmidt). North Holland, Amsterdam, 1989. P. 43
60. J.Hyde, J.C.W.Chien, J.H.Freed. *J. Chem. Phys.*, **48**, 4211 (1968)
61. G.Jeschke, H.Zimmermann, A.Godt. *J. Magn. Reson.*, **180**, 137 (2006)
62. G.Jeschke, A.Bender, H.Paulsen, H.Zimmermann, A.Godt. *J. Magn. Reson.*, **169**, 1 (2004)
63. W.B.Mims. *Rev. Sci. Instrum.*, **36**, 1472 (1965)
64. В.А.Родионов, Э.Г.Розанцев. *Долгоживущие радикалы*. Наука, Москва, 1972
65. А.Л.Бучаченко, А.М.Вассерман. *Стабильные радикалы*. Химия, Москва, 1973
66. L.V.Kulik, Yu.A.Grishin, S.A.Dzuba, I.A.Grigoryev, S.V.Klyatskaya, S.F.Vasilevsky, Yu.D.Tsvetkov. *J. Magn. Reson.*, **157**, 61 (2002)
67. A.Weber, O.Schiemann, B.Bode, T.F.Prisner. *J. Magn. Reson.*, **157**, 277 (2002)
68. V.Pfannebecker, H.Klos, M.Hubrich, T.Volkmer, A.Heuer, U.Wiesner, H.W.Spiess. *J. Phys. Chem.*, **100**, 13428 (1996)
69. R.E.Martin, M.Pannier, F.Diederich, V.Gramlich, M.Hubrich, H.W.Spiess. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 2834 (1998)
70. S.Pornsuwan, G.Bird, C.E.Schafmeister, S.Saxena. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3876 (2006)
71. B.D.Bode, D.Margraf, J.Plackmeyer, G.Dürner, T.F.Prisner, O.Schiemann. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 6736 (2007)
72. A.Godt, M.Schulte, H.Zimmermann, G.Jeschke. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 7560 (2006)
73. G.Jeschke, A.Godt. *ChemPhysChem*, **4**, 1328 (2003)
74. *Biological Magnetic Resonance. Vol. 14. (Spin Labeling: The Next Millenim)*. (Ed. L.J.Berliner). Plenum, New York, 1998
75. *Biological Magnetic Resonance. Vol. 21. (EPR: Instrumental Methods)*. (Eds C.Bender, L.J.Berlinger). Springer-Verlag; Plenum, New York, 2004
76. W.L.Hubbell, C.Altenbach. In *Membrane Protein Structure. Experimental Approaches*. (Ed. S.H.White). Oxford University Press, New York, 1994

77. W.L.Hubbell, A.Gross, R.Langgen, M.A.Lietzow. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 649 (1998)
78. L.J.Berliner, J.Grunwald, H.O.Hankovszky, K.Hideg. *Anal. Biochem.*, **119**, 450 (1982)
79. A.Spaltenstein, B.Robinson, P.B.Hopkins. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1299 (1988)
80. R.Rossi, A.Carpita, F.Bellina. *Org. Prep. Proced. Int.*, **27**, 127 (1995)
81. K.Sale, L.Song, Y.-S.Liu, E.Perozo, P.Fajer. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9334 (2005)
82. O.Schiemann, N.Piton, J.Plackmeyer, B.E.Bode, T.F.Prisner, J.W.Engels. *Nature Protocols*, **2**, 904 (2007)
83. O.Schiemann, A.Weber, T.E.Edwards, T.F.Prisner, S.T.Sigurdsson. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3434 (2003)
84. O.Schiemann, N.Piton, Y.Mu, G.Stock, J.W.Engels, T.F.Prisner. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 5722 (2004)
85. N.Piton, O.Schiemann, Y.Mu, G.Stock, T.F.Prisner, J.W.Engels. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, **24**, 771 (2005)
86. N.Piton, Y.Mu, G.Stock, T.F.Prisner, O.Schiemann, J.W.Engels. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3128 (2007)
87. Q.Cai, A.K.Kusnetzow, W.L.Hubbell, I.S.Haworth, G.C.Gacho, N.V.Eps, K.Hideg, E.J.Chambers, P.Z.Qin. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 4722 (2006)
88. R.Ward, D.J.Keeble, H.El-Mkami, D.G.Norman. *ChemBioChem*, **8**, 1957 (2007)
89. А.Д.Милов, А.Г.Марьясов, Р.И.Самойлова, Ю.Д.Цветков, Я.Раап, В.Монако, Ф.Формаджио, М.Крисма, К.Тониоло. *Докл. АН*, **370**, 265 (2000)
90. V.Monaco, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, P.Hanson, G.Millhauser, C.George, J.Deschamps, J.Flippen-Anderson. *Bioorg. Med. Chem.*, **7**, 119 (1999)
91. D.J.Anderson, P.Hanson, J.McNulty, G.Millhauser, V.Monaco, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 6919 (1999)
92. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 3843 (2000)
93. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 3784 (2001)
94. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, J.Raap. *Appl. Magn. Reson.*, **19**, 215 (2000)
95. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *J. Peptide Sci.*, **9**, 690 (2003)
96. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, M.Krisma, C.Toniolo, G.L.Millhauser, J.Raap. *J. Phys. Chem. B*, **105**, 11206 (2001)
97. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, S.Oancea, C.Toniolo, J.Raap. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 3596 (2004)
98. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, E.Yu.Gorbunova, L.G.Mustaeva, T.V.Ovchinnikova, J.Raap. *Biopolymers*, **64**, 326 (2002)
99. D.Marsh. In *Biological Magnetic Resonance*. (Eds L.J.Berliner, J.Reuben). Plenum, New York, 1989. P. 255
100. J.E.Bahman, C.M.Baker, S.Ceola, I.J.Day, G.H.Grant, E.J.J.Groenen, C.T.Rodgers, G.Jeschke, C.R.Timmel. *J. Magn. Reson.*, **191**, 202 (2008)
101. G.Jeschke, C.Wegeher, M.Nietschke, H.Jung, H.-J.Steinhoff. *Biophys. J.*, **86**, 2551 (2004)
102. D.Hilger, H.Jung, E.Padan, C.Wegeher, K.-P.Vogel, H.-J.Steinhoff, G.Jeschke. *Biophys. J.*, **89**, 1328 (2005)
103. J.E.Banham, C.R.Timmel, R.J.M.Abbott, S.M.Lea, G.Jeschke. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **45**, 1058 (2006)
104. W.M.Oldham, N.Van Eps, A.M.Preininger, W.L.Hubbell, H.E.Hamm. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 772 (2006)
105. Z.Zhou, S.C.DeSensi, R.A.Stein, S.Brandon, M.Dixit, E.J.McArdle, E.M.Warren, H.K.Kroh, L.K.Song, C.E.Cobb, E.J.Hustedt, A.H.Beth. *Biochemistry*, **44**, 15115 (2005)
106. M.Nakamura, S.Ueki, H.Hara, T.Arata. *J. Mol. Biol.*, **348**, 127 (2005)
107. M.Persson, J.R.Harbridge, P.Hammarstrom, R.Mitri, L.-G.Martensson, U.Carlsson, G.R.Eaton, S.S.Eaton. *Biophys. J.*, **80**, 2886 (2001)
108. P.G.Fajer, M.Gyimesi, A.Malnasi-Cszmadia, C.R.Bagshaw, K.I.Sen, L.Song. *J. Phys.: Condens. Matter*, **19**, 285208 (2007)
109. S.Steigmiller, M.Borsch, P.Graber, M.Huber. *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 143 (2005)
110. C.W.M.Kay, C.Elsässer, R.Bittl, S.R.Farrell, C.Thorpe. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 76 (2006)
111. M.Bennati, A.Weber, J.Antonic, D.L.Pearlstein, J.Robblee, J.Stubbe. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14988 (2003)
112. D.Biglino, P.P.Schmidt, E.J.Reijerse, W.Lubitz. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8**, 58 (2006)
113. H.Hara, T.Tenno, M.Shirakawa. *J. Magn. Reson.*, **184**, 78 (2007)
114. S.-Y.Park, P.P.Borbat, G.Gonzalez-Bonet, J.Bhatnagar, A.M.Pollard, J.H.Freed, A.M.Bilwes, B.R.Crane. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 400 (2006)
115. P.P.Borbat, T.F.Ramlall, J.H.Freed, D.Elizeer. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10004 (2006)
116. H.-J.Steinhoff. *Biol. Chem.*, **385**, 913 (2004)
117. P.G.Fajer. *J. Phys.: Condens. Matter*, **17**, S1459 (2005)
118. L.Galino, M.Bonora, G.E.Fanucci. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 11004 (2007)
119. K.I.Sen, T.M.Logan, P.G.Fajer. *Biochemistry*, **46**, 11639 (2007)
120. Z.Zhou, S.C.DeSensi, R.A.Stein, S.Brandon, L.Song, C.E.Cobb, E.J.Hustedt, A.N.Beth. *Biochemistry*, **46**, 10248 (2007)
121. O.Xu, J.F.Ellena, M.Kim, D.S.Cafiso. *Biochemistry*, **45**, 10847 (2006)
122. Y.E.Kutsovsky, A.G.Maryasov, Y.I.Aristov, V.N.Parmon. *React. Kinet. Catal. Lett.*, **42**, 19 (1990)
123. A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **12**, 495 (1997)
124. A.D.Milov, R.I.Samoilova, Yu.D.Tsvetkov, V.A.Gusev, F.Formaggio, M.Crisma, C.Toniolo, J.Raap. *Appl. Magn. Reson.*, **23**, 81 (2002)
125. A.D.Milov, D.A.Erlov, E.S.Salnikov, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, C.Toniolo, J.Raap. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **7**, 1794 (2005)
126. E.S.Salnikov, D.A.Erlov, A.D.Milov, Yu.D.Tsvetkov, C.Peggion, F.Formaggio, C.Toniolo, J.Raap, S.A.Dzuba. *Biophys. J.*, **91**, 1532 (2006)
127. A.D.Milov, R.I.Samoilova, Yu.D.Tsvetkov, F.Formaggio, C.Toniolo, J.Raap. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 9260 (2007)
128. D.A.Erlov, R.Bartucci, R.Guzzi, A.A.Shubin, A.G.Maryasov, D.Marsh, S.A.Dzuba, L.Sportelli. *J. Phys. Chem. B*, **109**, 12003 (2005)
129. E.Narr, A.Godt, G.Jeschke. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **41**, 3907 (2002)
130. I.M.C.van Amsterdam, M.Ubbink, G.W.Canter, M.Huber. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**, 62 (2003)
131. Z.Yang, J.Becker, S.Saxena. *J. Magn. Reson.*, **188**, 337 (2007)
132. C.W.M.Kay, H.El-Mkami, R.Cammack, R.W.Evans. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 4868 (2007)
133. H.M.Baker, C.J.Baker, C.A.Smith, E.N.Baker. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **5**, 692 (2000)
134. A.V.Astashkin, J.Seravalli, S.O.Mansoorabadi, G.H.Reed, S.W.Ragsdale. *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3888 (2006)
135. C.Elsässer, M.Brecht, R.Bittl. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12606 (2002)
136. C.Elsässer, M.Brecht, R.Bittl. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 15 (2005)
137. R.Codd, A.V.Astashkin, A.Pacheco, A.M.Raitsimring, J.H.Enemark. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **7**, 338 (2002)
138. A.G.Maryasov, M.K.Bowman, Yu.D.Tsvetkov. *Appl. Magn. Reson.*, **30**, 683 (2006)
139. Х.С.Багдасарьян. *Кинетика и катализ*, **8**, 1073 (1967)
140. *Advanced EPR. Applications in Biology and Biochemistry*. (Ed. A.J.Hoff). Elsevier, Amsterdam, 1989

141. A.Kawamori, H.Mino, H.Hara, A.V.Astashkin, Yu.D.Tsvetkov. *Kwansei Gakuin Univ. Annu. Stud.*, **64**, 221 (1995)
142. H.Hara, A.Kawamori, A.V.Astashkin, T.-A.Ono. *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 140 (1996)
143. A.Kawamori. *Appl. Magn. Reson.*, **31**, 205 (2007)
144. A.Kawamori, N.Katsuta, H.Hara. *Appl. Magn. Reson.*, **23**, 557 (2003)
145. A.Kawamori, T.-A.Ono, A.Ishii, S.Nakazawa, H.Hara, T.Tomo, J.Minagawa, R.Bittl, S.A.Dzuba. *Photosynth. Res.*, **84**, 187 (2005)
146. A.Kawamori, N.Katsuta, H.Mino, A.Ishii, J.Minagawa, T.-A.Ono. *J. Biol. Phys.*, **28**, 413 (2002)
147. S.Kuroiwa, M.Tonaka, A.Kawamori, K.Akabori. *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 330 (2000)
148. A.V.Astashkin, H.Hara, A.Kawamori. *J. Chem. Phys.*, **108**, 3805 (1998)
149. G.Jeschke, A.Bender, T.Schweikardt, G.Panek, H.Decker, H.Paulsen. *J. Biol. Chem.*, **280**, 18623 (2005)
150. I.V.Borovykh, S.Ceola, P.Gajula, P.Gast, H.-J.Steinhoff, M.Huber. *J. Magn. Reson.*, **180**, 178 (2006)
151. P.Gajula, S.Milikisyants, H.-J.Steinhoff, M.Huber. *Appl. Magn. Reson.*, **31**, 99 (2007)
152. M.K.Bowman, D.Becker, M.D.Sevilla, J.D.Zimbrick. *Radiat. Res.*, **163**, 447 (2005)
153. M.Pannier, V.Schädler, M.Schöps, U.Wiesner, G.Jeschke, H.W.Spiess. *Macromolecules*, **33**, 7812 (2000)
154. M.Pannier, M.Schöps, V.Schädler, U.Wiesner, G.Jeschke, H.W.Spiess. *Macromolecules*, **34**, 5555 (2001)
155. P.P.Borbat, J.H.Freed. *EPR Newslett.*, **17**, 21 (2007)
156. M.S.de Groot, J.H.van der Waals. *Mol. Phys.*, **3**, 190 (1960)
157. *Biological Magnetic Resonance. Vol. 19. (Distance Measurements in Biological Systems by EPR)*. (Eds G.R.Eaton, S.S.Eaton, L.J.Berliner). Kluwer; Plenum, New York, 2000

PULSE ELECTRON-ELECTRON DOUBLE RESONANCE (PELDOR) AS NANOMETRE RANGE EPR SPECTROSCOPY

Yu.D.Tsvetkov, A.D.Milov, A.G.Maryasov

*Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences
3, Ul. Institutskaya, 630090 Novosibirsk, Russian Federation, Fax +7(383)330-7350*

The results of development of pulse electron-electron double resonance (PELDOR) technique and its applications in structural studies are generalised and described systematically. The foundations of the theory of the method are outlined, some procedural features and applications are considered, in particular, determination of the distances between spin labels in the nanometre range for iminoxyl biradicals, spin-labeled biomacromolecules, radical ion pairs and peptide-membrane complexes. The attention is focused on radical systems arising upon self-assembly of nano-sized complexes (in particular, from peptides), spatial effects, and radical pairs in photolysis and photosynthesis. The position of PELDOR among other structural EPR techniques is analysed.

Bibliography — 157 references.

Received 11th February 2008