Письма в ЖЭТФ, том 116, вып. 5, с. 330 – 337

Низкочастотное комбинационное рассеяние транспортной и рибосомной РНК

А. Ю. Сосорев[+*1)], *О. Д. Паращук*[*], *О. Г. Харланов*[*], *И. В. Чичерин*[*], *А. А. Трубицын*[*], *П. А. Каменский*[*], *Д. Ю. Паращук*[*]

[+] *Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия*

[*] *Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 28 июня 2022 г.
После переработки 16 июля 2022 г.
Принята к публикации 16 июля 2022 г.

ДНК и РНК играют важнейшую роль в жизнедеятельности всех организмов, обеспечивая хранение и передачу наследственной информации и использование ее для построения белков. Кроме того, некоторые некодирующие РНК являются частью различных молекулярных машин, например, рибосомы. Для нормального протекания процессов с участием ДНК и РНК, в том числе репликации, транскрипции и трансляции, крайне важна третичная структура этих макромолекул, информацию о которой можно получить из спектров комбинационного рассеяния (КР) в низкочастотном (НЧ) диапазоне (до 200 см$^{-1}$). В настоящей работе впервые получены спектры КР двух некодирующих РНК – транспортной и рибосомной (последней – в составе рибосомы), – а также проведено их сравнение со спектром ДНК. Обнаружено, что в области до 100 см$^{-1}$ спектры двух РНК весьма похожи, а в области 100–200 см$^{-1}$ значительно различаются после вычитания характерного широкополосного НЧ сигнала. Кроме того, выявлено значительное различие между спектрами РНК и ДНК: для первых интенсивность НЧ КР заметно меньше, чем для вторых. Это различие, подтвержденное также численным моделированием транспортной РНК и ДНК методом молекулярной динамики, объяснено большей упорядоченностью образцов РНК по сравнению с ДНК за счет более сильного взаимодействия между отдельными участками биомолекул. Таким образом, исследование НЧ спектров КР нуклеиновых кислот может предоставить необходимую для молекулярной и клеточной биологии информацию о состоянии этих биомолекул, определяющем протекание важнейших внутриклеточных процессов с их участием.

DOI: 10.31857/S1234567822170116, EDN: jtgsaa

1. Введение. Нуклеиновые кислоты – ДНК и РНК – играют важнейшую роль в хранении и реализации наследственной информации, а также участвуют в различных клеточных процессах. Все они состоят из сахаро-фосфатного остова и азотистых оснований, которые могут образовывать пары за счет водородных связей, однако третичная структура этих биомолекул может существенно различаться. ДНК обычно имеет вид длинной двухцепочечной спирали (см. рис. 1a), кодирующая белок матричная РНК (мРНК) – одиночной цепочки. Некодирующие РНК (нРНК) сворачиваются в разнообразные структуры: в частности, транспортная (тРНК) имеет характерную L-образную форму, а рибосомная (рРНК) упаковывается в компактные квазисферические субъединицы, состоящие из нескольких сложно организованных доменов [1] (см. рис. 1b, c). В последних двух структурах часто присутствуют двойные спирали разной длины; в них пары нуклеотидов, связанных водородными связями, образуют π-стеки. В частности, РНК в рибосоме можно представить как набор спиралей, соединенных между собой короткими гибкими участками [1]. Связь различных участков рРНК друг с другом поддерживается широким спектром разнообразных взаимодействий, таких как комплементарные взаимодействия, коаксиальный стекинг спиралей, боковые спираль-спиральные взаимодействия, ортогональные спираль-петлевые взаимодействия, A-минорные взаимодействия, водородные связи и взаимодействия с участием магниевых кластеров [2].

Слаженная работа молекулярных машин, состоящих из нуклеиновых кислот и белков, совершенно необходима для жизнедеятельности клетки. Для правильной работы этих машин крайне важна третичная структура макромолекул – трехмерная укладка биополимерной цепи, во многом

1) e-mail: sosorev@physics.msu.ru

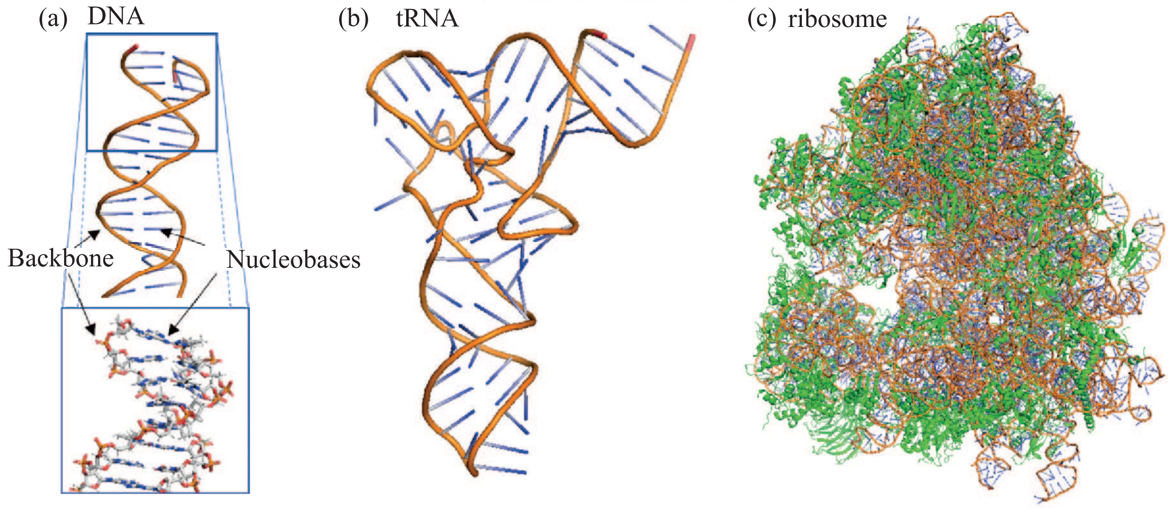

Рис. 1. (Цветной онлайн) Структура ДНК (a), тРНК (b) и рибосомы (c). Оранжевым цветом показан сахаро-фосфатный остов (backbone), бело-синим – азотистые основания (nucleobases). На панели (c) зеленым обозначены рибосомные белки

определяемая взаимодействием между звеньями (аминокислотами, нуклеотидами). Соответственно, знание этой структуры и ее изменения под действием различных факторов может помочь в понимании внутриклеточных процессов и в разработке новых методов лечения различных заболеваний, в том числе наследственных и онкологических. Информацию об этих взаимодействиях и о конформации биополимера позволяет получить низкочастотная (НЧ) колебательная спектроскопия, регистрирующая колебания с частотами $\omega < 200\,\text{см}^{-1}$, соответствующими коллективным движениям участков макромолекулы и колебаниям слабых межцепных связей. Различные вариации колебательной спектроскопии – инфракрасная, терагерцовая, комбинационного рассеяния (КР), неупругого нейтронного рассеяния – позволяют регистрировать различные колебания и дополняют друг друга. Однако, несмотря на более чем 50-летнюю историю использования, НЧ колебательная спектроскопия остается относительно редким инструментом исследования биомолекул. Причина состоит в том, что полосы НЧ колебательного спектра биомолекул часто накладываются друг на друга и оказываются трудно разрешимыми, вследствие чего анализ такого спектра оказывается трудоемким и малонадежным. Также, регистрация НЧ колебаний более сложна с экспериментальной точки зрения; наиболее перспективной в этом плане представляется НЧ спектроскопия КР [3].

НЧ спектры КР ДНК изучаются на протяжении более 50 лет. В большинстве работ в спектре КР сухой ДНК наблюдался широкополосный НЧ сигнал (примерно до $150\,\text{см}^{-1}$), а поверх него – достаточно широкая полоса с центром в районе $20–30\,\text{см}^{-1}$, интенсивность которой на порядок превышала интенсивность КР в высокочастотной (ВЧ, $\omega > 200\,\text{см}^{-1}$) области [4–6]. Более детальный анализ позволил выделить слабые полосы на $\sim 60\,\text{см}^{-1}$ и $\sim 100\,\text{см}^{-1}$, которые были подтверждены более поздними экспериментами [7]. Интересно, что НЧ колебания ДНК (а, возможно, и РНК) не только отражают информацию о структуре, но и могут иметь важную биологическую роль [8]: поскольку их частоты близки к таковым для белков, резонанс между колебаниями двух структур может влиять на взаимодействие между ними [9, 10]. Наконец, по ДНК [11–13] и РНК [14–16] возможен транспорт заряда, и НЧ колебания могут иметь на него существенное влияние [14, 16, 17].

В отличие от ДНК, для РНК НЧ спектры КР практически не были исследованы; нам известно лишь о двух работах [18, 19]. В них показано, что спектр двойных спиралей комплементарных мРНК напоминает спектр ДНК, но наиболее НЧ полоса сдвинута в область более высоких частот, что объяснено более жесткой структурой спирали РНК по сравнению с ДНК за счет меньшего расстояния между основаниями. Зависимость спектров НЧ КР РНК от последовательности нуклеотидов, а также от внешних условий (температуры, влажности и т. д.) не была исследована; более того, НЧ спектры КР нРНК (например, тРНК и рРНК) измерены не были. В то же время, поскольку нРНК имеют достаточно стабильную третичную структуру, естественно предполагать, что их спектр будет отличаться от спектров ДНК и мРНК. Поэтому, а также в силу упомянутой выше важности этой структуры для функционирования нРНК, исследование НЧ спектров КР биомолекул представляется интересным и перспективным.

В настоящей работе впервые измерены спектры КР тРНК и рибосомы (основную долю которой составляет рРНК, см. рис. 1c), играющих чрезвычайно важную роль в синтезе белка – трансляции; в качестве контрольного образца выбрана ДНК. Спектры измерены в широком диапазоне, включающем НЧ и ВЧ области. ВЧ спектры всех трех объектов изучения крайне схожи между собой. Напротив, НЧ спектры различаются положением отдельных полос, однако имеют сходную структуру – наиболее интенсивная полоса с наименьшей частотой и две менее интенсивные полосы с более высокими частотами. Обнаружено, что интенсивность КР тРНК и рибосомы в НЧ области заметно ниже, чем для ДНК. К такому же выводу о спектрах и суммарной интенсивности НЧ КР приводит проведенное нами моделирование тРНК и ДНК методом классической молекулярной динамики (МД): как интенсивность НЧ КР, так и величина динамического беспорядка в ДНК оказываются выше, чем в тРНК. На основании данных результатов предложено объяснение слабого НЧ КР от тРНК и рРНК более жесткой структурой этих биомолекул и межмолекулярными взаимодействиями, уменьшающими динамический беспорядок. Таким образом, НЧ спектроскопия КР может быть использована для оценки жесткости структуры биомолекул, что должно существенно способствовать развитию молекулярной биологии.

2. Результаты и обсуждение. На рисунке 2 представлены полученные спектры КР тРНК и рибосомы, включающие НЧ и ВЧ области, а также, для сравнения, – спектр КР ДНК. В исходных спектрах всех трех биомолекул (вставка на рис. 2) присутствует широкополосный НЧ сигнал (примерно до $150\,\text{см}^{-1}$), связанный с большим числом степеней свободы, их мягкостью, а также низкой степенью симметрии, что находится в согласии с предшествующими работами [4, 6, 18–20]. Этот сигнал связан с модуляцией поляризуемости НЧ колебаниями [20] и, следовательно, может говорить о беспорядке в образце (что подтверждается моделированием методом МД, см. ниже), однако на рис. 2 этот сигнал вычтен для удобства анализа характерных полос (см. раздел 4). Как видно из этого рисунка, ВЧ спектры всех трех исследуемых биомолекул очень близки, несмотря на некоторые отличия в нуклеотидном составе и сахаро-фосфатном остове (между ДНК и РНК). В этих спектрах хорошо видны наиболее интенсивные характеристические полосы нуклеиновых кислот [21, 22], в том числе пик с центром в диапазоне $783–785\,\text{см}^{-1}$, соответствующий колебанию O–P–O составляющей сахаро-фосфатного остова и сжатию и растяжению кольца цитозина; пики на 500 и $1100\,\text{см}^{-1}$ (колебания PO_2^- составляющей сахаро-фосфатного остова), пики на 1314, 1482 и $1592\,\text{см}^{-1}$, соответствующие внутренним колебаниям аденина и гуанина, а также широкая полоса на $1241\,\text{см}^{-1}$, соответствующая внутренним колебаниям цитозина и тимина/урацила.

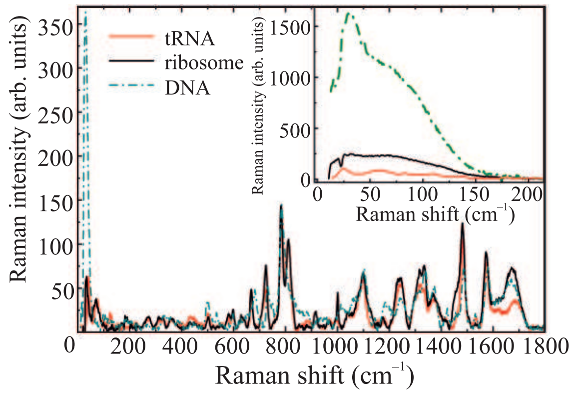

Рис. 2. (Цветной онлайн) Спектры КР тРНК, рибосомы и ДНК с вычтенным широкополосным НЧ сигналом, нормированные на максимум интенсивности полосы с центром на отстройке в диапазоне $783–785\,\text{см}^{-1}$. Вставка: те же спектры без вычитания указанного сигнала

В то же время, ВЧ спектры трех биомолекул имеют и ряд отличий. В частности, для РНК ножничное колебание PO_2^- группы на $\sim 500\,\text{см}^{-1}$ имеет более высокую частоту, чем для ДНК, а симметричное сжатие/растяжение связей этой группы на $\sim 1100\,\text{см}^{-1}$ – более низкую частоту. Растяжение кольца аденина в РНК отмечается на $725\,\text{см}^{-1}$, а в ДНК – на $731\,\text{см}^{-1}$. Аналогично смещаются частоты для внутренних колебаний азотистых оснований в районе 1180, 1481 и $1572\,\text{см}^{-1}$ пики в спектре ДНК сдвигаются на $5–7\,\text{см}^{-1}$ в сторону больших частот. Стоит также отметить, что в целом интенсивность колебаний сахаро-фосфатного остова (относительно интенсивности внутренних колебаний азотистых оснований) больше в ДНК, чем в РНК. Наконец, в рибосоме также проявляются линии аминокислот рибосомных белков (например, фенилаланина на $1000\,\text{см}^{-1}$). Однако эти линии значительно сла-

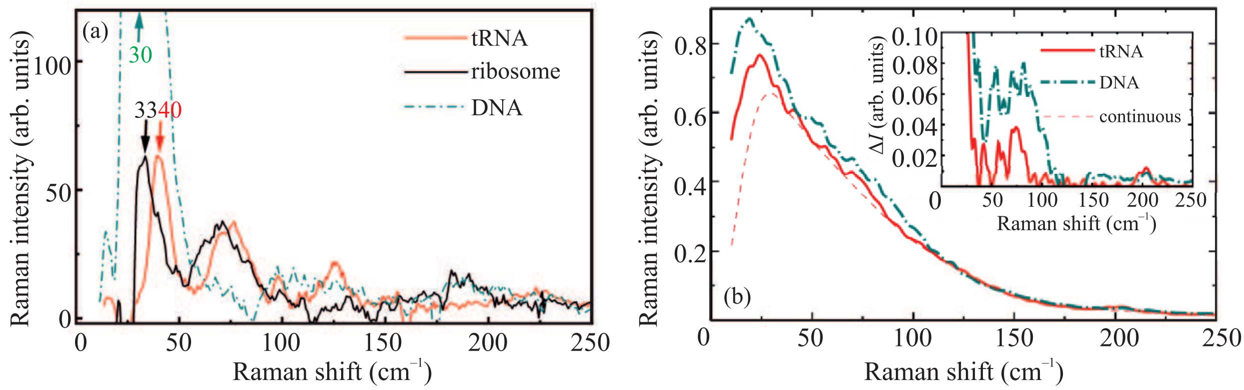

Рис. 3. (Цветной онлайн) (a) – НЧ часть экспериментального спектра КР исследуемых биомолекул (нормировка на максимум наиболее интенсивной полосы в ВЧ области – с центром на отстройке в диапазоне 783–785 см$^{-1}$, см. рис. 2). Стрелками отмечено положение максимума наиболее интенсивной НЧ полосы. (b) – Предсказанные с помощью МД КР спектры тРНК и ДНК (нормировка на число нуклеотидов); пунктир обозначает непрерывную компоненту спектра, а врезка демонстрирует спектры после ее вычитания

бее по интенсивности, чем линии РНК, что связано с небольшой массовой долей белков (менее 1/3) в рибосоме и, следовательно, малым числом ароматических аминокислот, которые могли бы вносить значительный вклад в КР. Таким образом, можно утверждать, что подавляющая часть сигнала КР рибосомы обусловлена рРНК.

На рисунке 3а крупным планом представлены НЧ области указанных спектров КР после вычитания широкополосного НЧ сигнала. Спектры тРНК и рибосомы в области до 100 см$^{-1}$ очень похожи и имеют две отдельных полосы с центрами на 33–40 см$^{-1}$ и 70–80 см$^{-1}$, несмотря на отличие в нуклеотидном составе биомолекул. В диапазоне 100–150 см$^{-1}$ для тРНК наблюдается полоса на ~ 125 см$^{-1}$; для рибосомы наблюдается некоторая особенность в той же области (~ 130 см$^{-1}$), которая из-за недостаточного соотношения сигнал-шум не позволяет однозначно отнести ее полосе КР. В диапазоне 150–250 см$^{-1}$ спектры двух биомолекул различаются: тРНК имеет полосу на 225 см$^{-1}$, а рибосома – на 185 см$^{-1}$. Полученные спектры в целом согласуются с данными более ранних работ по НЧ КР РНК [18, 19], однако позволяют различить отдельные моды в отличие от предыдущих данных. Спектр ДНК крайне близок к представленному в работах [4, 6, 7]; его отличительной особенностью является крайне интенсивная полоса на ~ 30 см$^{-1}$ (с плечом около 60–70 см$^{-1}$), а также две значительно более слабые полосы на ~ 100 и 185 см$^{-1}$.

Для понимания природы описанных полос полезно сравнить полученные спектры РНК и ДНК, поскольку для последней отнесение НЧ полос КР к тем или иным колебаниям было выполнено ранее [23, 24]. Наиболее низкочастотную полосу в ДНК приписывают колебанию π-стека нуклеозидов относительно сахаро-фосфатного остова (*pendulums-nucleoside vibrations*) [23, 24]. Вторую из описанных полос, а также плечо первой моды можно отнести к колебаниям водородных связей между комплементарными основаниями [23]. Полосу около 200 см$^{-1}$ можно отнести к колебаниям связанных с фосфатами противоионов [23] и молекул воды [24]. Из спектров, представленных на рис. 3а, видно, что наиболее НЧ полоса спектров РНК близка по частоте к таковой для ДНК, но немного сдвинута в область более высоких частот, что находится в согласии с данными предшествующих работ [18]; увеличение частоты этой полосы в РНК можно объяснить меньшим расстоянием и, следовательно, более сильным взаимодействием между нуклеозидами по сравнению с ДНК. НЧ полосы РНК на ~ 70 см^{1} и 120 см$^{-1}$, по-видимому, соответствуют колебаниям водородных связей в ДНК на 60 см$^{-1}$ (плечо первой моды) и 100 см$^{-1}$, таким образом, они также сдвинуты в область более высоких частот по сравнению с ДНК, в согласии с предположениями предыдущих работ [19]. Увеличение частоты этих мод по сравнению с ДНК также можно объяснить увеличением жесткости структуры, как за счет изменения характера самой спирали, так и за счет взаимодействия между соседними спиралями (в пределах одной рибосомы или соседних молекул тРНК). Отличие положения моды около 200 см$^{-1}$ в исследованных биомолекулах можно объяснить различием буферного раствора и конформации биомолекул, и, следовательно, локальной концентрации противоионов вблизи фосфатных групп.

Важной особенностью спектров КР исследованных образцов тРНК и рибосомы является то, что после вычитания широкополосного НЧ сигнала их интенсивность в НЧ области значительно меньше, чем интенсивность в ВЧ области (см. рис. 2). Это заметно отличается от данных для ДНК (как полученных в данной работе, так и опубликованных ранее [4, 6]), где интенсивность НЧ КР была существенно выше, чем в ВЧ области. Более того, даже без вычитания широкополосного НЧ сигнала, НЧ сигнал КР ДНК примерно в 6 раз выше, чем РНК. Согласно работам по НЧ КР органических полупроводников [25–28], интенсивное НЧ КР свидетельствует о сильном динамическом беспорядке в системе – флуктуациях положений атомов и ориентаций молекулярных фрагментов. Мы предполагаем, что сделанные в вышеупомянутых работах выводы применимы и к нуклеиновым кислотам, поскольку основной вклад в интенсивность КР в них, как и в органических полупроводниках, дают изменения ориентации π-сопряженных фрагментов молекул (азотистых оснований), одновременно приводящие к модуляции интегралов переноса между ними. В рамках такого подхода, для ДНК интенсивный сигнал НЧ КР можно объяснить относительной мягкостью ее структуры и большой длиной цепей: даже при высыхании в образце остается некоторая часть растворителя (например, связанной воды), вследствие чего должны быть "свободные" участки ДНК, не контактирующие с соседними цепями, а имеющие возможность совершать колебания большой амплитуды. Менее интенсивный НЧ спектр КР для РНК, наблюдаемый в настоящей работе, таким образом, свидетельствует о меньшем динамическом беспорядке в образцах этих биомолекул. Для рибосомы это можно объяснить сильным взаимодействием между ее плотно упакованными спиралями рРНК (с участием ионов магния и калия [2]), которое делает последнюю достаточно жесткой структурой (см. рис. 1c и, например, [1]). Для тРНК малый динамический беспорядок можно объяснить взаимодействием соседних молекул при высыхании пленки: в отличие от ДНК, эти молекулы достаточно коротки, что способствует их более плотной упаковке, поскольку олигомеры кристаллизуются обычно в более упорядоченную фазу, чем полимеры [29]. Изменения интенсивности НЧ КР коррелируют с вышеописанными различиями в частотах ВЧ колебаний сжатия-растяжения (например, на $1100\,\text{см}^{-1}$) между более компактно упакованными тРНК и рРНК и менее компактной ДНК. Также более интенсивный НЧ спектр КР ДНК по сравнению с РНК коррелирует с бóльшими интенсивностями тех ВЧ линий КР, которые соответствуют колебаниям сахаро-фосфатного остова (500, 784, $1100\,\text{см}^{-1}$), по сравнению с внутренними колебаниями азотистых оснований. Это может свидетельствовать о большей подвижности остова в ДНК.

Выводы о меньшем динамическом беспорядке в РНК по сравнению с ДНК также независимо подтверждаются моделированием методом МД молекул тРНК и ДНК в воде (подробности – в разделе 4). А именно, после нормировки на число нуклеотидов (соответствующей нормировке на интенсивность КР от более локализованных ВЧ колебательных мод) НЧ КР спектры двух биомолекул (рис. 3b) представлены непрерывными компонентами, совпадающими выше примерно $120\,\text{см}^{-1}$, и набором полос поверх них. Прежде всего, выделяются интенсивная полоса на $20–30\,\text{см}^{-1}$, пик которой действительно сдвинут в РНК в область более высоких частот, группа полос в районе $50–100\,\text{см}^{-1}$ и менее интенсивная полоса в районе $200\,\text{см}^{-1}$ (см. также вставку на рис. 3b), что вполне согласуется с экспериментальными результатами. Важно, что независимо от наличия или отсутствия вычитания широкополосного НЧ сигнала из полученного спектра, ДНК демонстрирует более мощный сигнал НЧ КР; в то же время, на интенсивность НЧ КР практически не влияют другие параметры МД-расчета, такие как размеры пространственной области моделирования. Наконец, динамический беспорядок в РНК действительно оказывается более низким, чем в ДНК: например, нормированная дисперсия тензора поляризуемости молекулы (характеризующая интенсивность теплового движения азотистых оснований и пропорциональная нормированной интегральной интенсивности НЧ КР, см. раздел 4), для РНК меньше, чем для ДНК.

Полученные результаты указывают на возможность оценки динамического беспорядка/компактности упаковки биомолекул с помощью НЧ спектроскопии КР. В этом смысле, данная работа является развитием предложенного нами ранее в работах [25–28] подхода для оценки динамического беспорядка в кристаллических органических полупроводниках. Подчеркнем, что для биомолекул такая оценка очень важна, поскольку компактность структуры часто связана с функциями биомолекул [30]. Например, в большом количестве исследований продемонстрирована корреляция между плотностью упаковки хроматина и его транскрипционной активностью: наиболее компактно упакованные участки генома содержат меньше генов, обладают слабо выраженной экспрессией генов и находятся ближе к периферии ядра. Напротив, транскрипционно активными являются открытые участки ДНК, которые упакованы менее плотно и обладают некоторой свободой флуктуаций (а следовательно, динамическим беспорядком), что делает их доступными для факторов транскрипции [31]. Таким образом, указанный подход к оценке беспорядка с помощью НЧ КР может быть использован для мониторинга жесткости/транскрипционной активности различных областей клеточного ядра, что крайне важно для понимания функционирования клетки. Возможность оценки динамического беспорядка в биомолекулах также важна для нанобиоэлектроники – направления органической электроники, ориентированного на создание электронных устройств на основе биологических или подобных им молекул [13].

3. Заключение. Таким образом, в настоящей работе впервые представлены спектры КР транспортной и рибосомной РНК в широком диапазоне, включающем НЧ и ВЧ области, которые сопоставлены с экспериментальными КР спектрами ДНК и расчетными КР спектрами РНК и ДНК. В НЧ спектрах ниже 100 см$^{-1}$ выявлены две отдельные полосы, практически совпадающие для обеих биомолекул. Одна из этих полос, по-видимому, соответствует колебанию π-стека нуклеотидов, а другая – сжатию сжатию/растяжению водородных связей между комплементарными нуклеотидами. Важно, что интенсивность НЧ спектра КР тРНК и рибосомы (по отношению к ВЧ области) существенно ниже, чем для ДНК. Это отличие объяснено меньшим динамическим беспорядком в образцах рибосомы и тРНК по сравнению с ДНК за счет более сильного межцепного взаимодействия внутри рибосомы и между соседними молекулами тРНК. Полученные результаты указывают на то, что исследование НЧ спектров КР нуклеиновых кислот, в том числе интенсивностей полос, может предоставить информацию о компактности упаковки и межцепных взаимодействиях этих биомолекул – факторах, определяющих многие биологические процессы на микроуровне, в том числе транскрипцию, репликацию и трансляцию, – а значит, существенно способствовать развитию молекулярной и клеточной биологии.

4. Методы. Для экспериментов использовались векторные конструкции pEGFP-N1 (Clontech, https://www.addgene.org/vector-database/2491/) и pTag-RFP-N (Евроген, cat. # FP142). Выделение плазмидной ДНК проводилось с помощью набора реактивов Plasmid Midiprep kit 2.0 (Евроген, кат. # BC124) по протоколу производителя. Полученный раствор плазмиды высушивался на вакуумном испарителе Concentrator Plus (Eppendorf) в течение 2 ч при 60 °C.

Рибосомы были выделены из штамма E. Coli MRE600 по протоколу, описанному в статье [32]. Клетки бактерий из 1 л культуры с оптической плотностью 0.6 (600 нм) собирали центрифугированием, суспендировали в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-HCl pH 7.4, 100 мМ хлорида калия и 5 мМ ацетата магния. Клетки лизировали ультразвуком, лизаты осветляли центрифугированием при 20000 g в течение 15 минут. Супернатанты наносили поверх 10 % раствора сахарозы в аналогичном буфере и центрифугировали 18 часов при 80000 g на центрифуге Optima XPN (Beckman) в роторе SW40Ti (Beckman). Осадки растворяли в минимальном объеме (500–700 мкл) буферного раствора (10 мМ Tris–HCl pH 7.0; 60 мМ хлорида калия, 60 мМ хлорида аммония, 7 мМ ацетата магния, 7 мМ β-меркаптоэтанола и 0.25 мМ ЭДТА). Растворы наносили на линейные сахарозные градиенты (15–40 %) и центрифугировали 18 часов при 80000 g на центрифуге Optima XPN (Beckman) в роторе SW40Ti (Beckman). Градиент разделяли на фракции по 300 мкл, измеряли поглощение при 260 нм, и фракции, содержащие пик рибосом, смешивали. Рибосомы собирали центрифугированием в течение 18 ч при 80000 g.

Образец тРНК (E. Coli MRE600, фенилаланиновая) был получен испарением раствора порошка, приобретенного в компании Merck.

Для исследования спектров КР образцов использовался КР-микроскоп inVia (Renishaw). В качестве источника возбуждения использовался He-Ne лазер (633 нм, максимальная мощность 20 мВт). Деградация образцов при использовании 100 % мощности лазера не наблюдалась, поэтому все эксперименты проводились с использованием максимальной мощности. Количество накоплений выбиралось в зависимости от интенсивности сигнала КР. НЧ спектры были получены из измерений КР в диапазоне 10–450 см$^{-1}$ (далее – “первая серия измерений”), ВЧ спектры – из измерений КР в диапазоне 100–1800 см$^{-1}$ (далее – “вторая серия измерений”). Для регистрации ВЧ спектров использовались краевые фильтры рэлеевского излучения, для измерения НЧ спектров – двойной монохроматор NExT. Поскольку с помощью NExT фильтра необходимо пространственно отфильтровать лазерную линию, при каждом его использовании проверялась юстировка зеркал, щелей и линз, входящих в NExT фильтр, и контролировалась форма лазерного пучка, поступающего с образца. Провалы в НЧ спектрах на 18, 25 и 160 см$^{-1}$ являются артефактами измерений, связанными с наличием пылинок на зеркалах NExT фильтра. Обработка спектров, в частности вычитание фона, осуществлялась в программе WiRE 3.4 с помощью встроенного метода интерполяции кубическими полиномами. Из всех спектров в диапазоне 10–1800 см$^{-1}$ вычитался непрерывный широкополосный фон. Все спектры, помимо широкополосного непрерывного фона содержали в диапазоне 10–200 см$^{-1}$ широкополосный НЧ сигнал, вследствие чего процедура вычитания фона в ВЧ и НЧ области несколько различалась: в диапазоне 200–1800 см$^{-1}$ производилась интерполяция непрерывного широкополосного фона набором кубических полиномов; полученная таким образом интерполяционная функция далее экстраполировалась в диапазон 10–200 см$^{-1}$. Спектры в диапазоне 10–200 см$^{-1}$ были проанализированы как при наличии НЧ широкополосного сигнала, так и после его вычитания (также методом интерполяции кубическими полиномами) с целью анализа отдельных КР полос в НЧ области, см. раздел 2. Для сшивания НЧ и ВЧ спектров в области перекрытия диапазонов двух серий измерений, 100–450 см$^{-1}$, выбирались наиболее интенсивные полосы (для тРНК и рибосомы выбрана полоса на отстройке 270 см$^{-1}$, а для ДНК – на отстройке 335 см$^{-1}$). Спектры, измеренные в диапазоне 10–450 см$^{-1}$, умножались на такой коэффициент, чтобы интенсивности полос стали равны интенсивностям в максимуме этих же полос, измеренных в диапазоне 100–1800 см$^{-1}$; при этом, вся область перекрытия хорошо согласовалась между двумя сериями измерений спектров КР. Спектр КР, сшитый таким образом из двух серий измерений и содержащий НЧ и ВЧ области, далее нормировался на интенсивность в максимуме наиболее яркой ВЧ полосы (783–785 см$^{-1}$), а также на время и число накоплений. Интенсивности полос (270, 335 и 783–785 см$^{-1}$) определялись с помощью аппроксимации последних гауссовыми профилями: для тРНК и рибосомы для полосы 783–785 см$^{-1}$ были взяты два гауссовых профиля вследствие перекрывания с полосой на 810 см$^{-1}$, для остальных полос – один гауссов профиль.

Для предсказания спектров КР в тРНК и ДНК использовалось многомасштабное моделирование, сочетающее квантовохимические расчеты методом теории функционала плотности (DFT) с классической МД. А именно, к исходным структурам тРНК и ДНК из E. Coli (структуры 3L0U и 6LXN в базе данных RCSB PDB) добавлялись недостающие атомы водорода, а также противоионы Na^+ и растворитель – вода, – после чего проводились расчеты МД с использованием силового поля AMBER в пакете AmberTools [33]. После прогрева до 300 K и дальнейшего уравновешивания системы в течение 4 нс проводился финальный расчет МД в NpT-ансамбле в течение 10 нс, из которого каждые 50 фс брались координаты $\mathbf{x}_{b,i}(t)$ всех атомов i всех азотистых оснований b. Для обработки сформированной таким образом МД-траектории для метилзамещенных аденина, гуанина, тимина/урацила и цитозина были вычислены равновесные геометрии $\mathbf{x}_{b,i}^{(0)}$, тензоры поляризуемости $\alpha_b^{(0)}$ и их производные по координатам атомов $\mathrm{d}\alpha_b^{(0)}/\mathrm{d}\mathbf{x}_{b,i}$; данные вычисления были проведены на уровне B3LYP/6-31G(d,p) в пакете GAMESS US [34, 35] только единожды, не требуя пересчета для каждого запуска МД. Поляризуемости азотистых оснований в момент времени t вычислялись по формуле $\alpha_b(t) = R_b(t)(\alpha^{(0)} + \mathrm{d}\alpha_b^{(0)}/\mathrm{d}\mathbf{x}_{b,i} \cdot \mathbf{r}_{b,i}(t))R_b^{\mathrm{T}}(t)$, где R_b – ортогональное преобразование, вместе со сдвигом $\mathbf{\Delta}_b$ приближенно переводящее геометрию DFT-расчета основания в мгновенную его геометрию из МД, а $\mathbf{r}_{b,i}$ – остаточные смещения (деформации): $\mathbf{x}_{b,i}(t) = R_b(t)(\mathbf{x}_{b,i}^{(0)} + \mathbf{r}_{b,i}(t)) + \mathbf{\Delta}_b(t)$. Расчетный НЧ КР спектр был получен из выражения $I(\omega) \propto C(\omega) \cdot (\hbar\omega/k_BT)(1 - e^{-\hbar\omega/k_BT})^{-1}$, содержащего фурье-образ $C(\omega)$ автокоррелятора $\langle \mathrm{tr}(\Delta\alpha(t)\Delta\alpha(t+\tau)) \rangle$ суммарной поляризуемости всех азотистых оснований, умноженный на классическо-квантовую поправку для частот в районе 200 см$^{-1}$ ($\hbar$ – постоянная Планка, k_B – постоянная Больцмана) [36].

Авторы выражают благодарность А. Ю. Чикишеву за ценные обсуждения и С. А. Гончаруку за предоставленные образцы тРНК. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант # 19-32-60081 Перспектива).

Экспериментальная часть работы выполнена с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития Московского университета.

1. B. S. Schuwirth, M. A. Borovinskaya, C. W. Hau, W. Zhang, A. Vila-Sanjurjo, J. M. Holton, and J. H. Cate, Science **310**, 827 (2005).
2. А. С. Спирин, *Молекулярная биология: рибосомы и биосинтез белка*, Издательский центр "Академия", М. (2011).
3. A. Yu. Sosorev, D. R. Maslennikov, O. G. Kharlanov, I. Yu. Chernyshov, V. V. Bruevich, and D. Yu. Paraschuk, Phys. Status Solidi Rapid Research Letters **13**, 1800485 (2019).
4. H. Urabe and Y. Tominaga, Biopolymers **21**, 2477 (1982).

5. H. Urabe, Y. Sugawara, M. Ataka, and A. Rupprecht, Biophys. J. **74**, 1533 (1998).
6. V. S. Gorelik and A. Yu. Pyatyshev, Phys. Wave Phenom. **22**, 252 (2014).
7. B. S. Kalanoor, M. Ronen, Z. Oren, D. Gerber, and Y. R. Tischler, ACS Omega **2**, 1232 (2017).
8. B. S. Alexandrov, V. Gelev, S. W. Yoo, L. B. Alexandrov, Y. Fukuyo, A. R. Bishop, K. Rasmussen, and A. Usheva, Nucleic Acids Res. **38**(6), 1790 (2010).
9. V. S. Gorelik, L. I. Zlobina, A. S. Krylov, V. P. Sverbil, and P. P. Sverbil, Phys. Wave Phenom. **24**, 272 (2016).
10. K.-C. Chou, Biophys. J. **45**, 881 (1984).
11. E. O'Brien, M. E. Holt, M. K. Thompson, L. E. Salay, A. C. Ehlinger, W. J. Chazin, and J. K. Barton, Science **355**, eaag1789 (2017).
12. K. J. McDonnell, J. A. Chemler, P. L. Bartels, E. O'Brien, M. L. Marvin, J. Ortega, R. H. Stern, L. Raskin, G. M. Li, D. H. Sherman, J. K. Barton, and S. B. Gruber, Nat. Chem. **10**, 873 (2018).
13. V. D. Lakhno, Int. J. Quant. Chem. **108**, 1970 (2008).
14. A. Yu. Sosorev and O. G. Kharlanov, Phys. Chem. Chem. Phys. **23**, 7037 (2021).
15. A. Yu. Sosorev, Molecules **26**, 5479 (2021).
16. А. Сосорев, Биоорг. химия **48**, 223 (2022).
17. J. C. Genereux and J. K. Barton, Chem. Rev. **110**, 1642 (2010).
18. G. Edwards and C. Liu, Phys. Rev. A **44**, 2709 (1991).
19. T. Weidlich and S. Lindsday, J. Phys. Chem. **92**, 6479 (1988).
20. M. González-Jiménez, G. Ramakrishnan, N. V. Tukachev, H. M. Senn, and K. Wynne, Phys. Chem. Chem. Phys. **23**, 13250 (2021).
21. J. M. Benevides, S. A. Overman, and G. J. Thomas Jr., J. Raman Spectrosc. **36**, 279 (2005).
22. G. J. Thomas Jr., J. M. Benevides, S. A. Overman, T. Ueda, K. Ushizawa, M. Saitoh, and M. Tsuboi, Biophys J. **68**, 1073 (1995).
23. S. M. Perepelytsya and S. N. Volkov, Eur. Phys. J. E **31**, 201 (2010).
24. T. L. Bubon and S. M. Perepelytsya, Eur. Phys. J. E **44**, 84 (2021).
25. M. V. Vener, O. D. Parashchuk, O. G. Kharlanov, D. R. Maslennikov, D. I. Dominskiy, I. Yu. Chernyshov, D. Yu. Paraschuk, and A. Yu. Sosorev, Adv. Electron. Mater. **7**, 2001281 (2021).
26. O. G. Kharlanov, D. R. Maslennikov, E. V. Feldman, G. G. Abashev, O. V. Borshchev, S. A. Ponomarenko, M. V. Vener, D. Yu. Paraschuk, and A. Yu. Sosorev, Adv. Electron. Mater. **7**, 2100579 (2021).
27. A. Yu. Sosorev, O. D. Parashchuk, N. V. Tukachev, D. R. Maslennikov, D. I. Dominskiy, O. V. Borshchev, M. S. Polinskaya, M. S. Skorotetcky, O. G. Kharlanov, and D. Yu. Paraschuk, Phys. Chem. Chem. Phys. **23**, 15485 (2021).
28. V. A. Trukhanov, D. I. Dominskiy, O. D. Parashchuk, E. V. Feldman, N. M. Surin, E. A. Svidchenko, M. S. Skorotetcky, O. V. Borshchev, D. Yu. Paraschuk, and A. Yu. Sosorev, RSC Adv. **10**, 28128 (2020).
29. B. Chitturi, S. Shi, L. N. Kinch, and N. V. Grishin, J. Mol. Biol. **428**, 4392 (2016).
30. C. Liu, K. Huang, W.-T. Park, M. Li, T. Yang, X. Liu, L. Liang, T. Minaric, and Y.-Y. Noh, Mater. Horiz. **4**, 608 (2017).
31. N. Gilbert and B. Ramsahoye, Brief. Funct. Genomics Proteomics **4**, 129 (2005).
32. S. Levitskii, K. Derbikova, M. V. Baleva, A. Kuzmenko, A. V. Golovin, I. Chicherin, I. A. Krasheninnikov, and P. Kamenski, PeerJ **6**, e5620 (2018).
33. A. Pérez, I. Marchán, D. Svozil, J. Sponer, T. E. Cheatham 3rd, C. A. Laughton, and M. Orozco, Biophys. J. **92**, 3817 (2007).
34. M. W. Schmidt, K. K. Baldridge, J. A. Boatz, S. T. Elbert, M. S. Gordon, J. H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K. A. Nguyen, S. Su, T. L. Windus, M. Dupuis, and J. A. Montgomery Jr., J. Comput. Chem. **14**, 1347 (1993).
35. M. S. Gordon and M. W. Schmidt, *Theory and applications of computational chemistry: the first forty years*, ed. by C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim, and G. E. Scuseria, Elsevier, Amsterdam (2005).
36. S. Luber, M. Iannuzzi, and J. Hutter, J. Chem. Phys. **141**, 094503 (2014).