

## Создание донорно-акцепторной пары для изучения внутрибелкового переноса электрона при участии аминокислотных производных фуллерена C<sub>60</sub>

© Р.А. Котельникова, Г.Н. Богданов, Г.В. Зотина, В.С. Романова\*, З.Н. Парнес\*

Институт проблем химической физики Российской академии наук,  
142432 Черноголовка, Московская обл., Россия  
E-mail: kotel@icpr.ac.ru

\* Институт элементоорганических соединений Российской академии наук,  
117813 Москва, Россия

Эффективное тушение фосфоресценции эозина аминокислотными производными фуллерена C<sub>60</sub>-аланин и C<sub>60</sub>-глицин в водных растворах указывает на возможность переноса электрона с эозина на фуллерен при столкновении или в эксиплексе. Для исследования переноса электрона в структуре белка изучался процесс встраивания C<sub>60</sub>-аланина и C<sub>60</sub>-глицина в гемовый "карман" миоглобина методом регистрации ферстеровского тушения, оценена константа диссоциации комплекса аминокислотные производные фуллерена-белок.

Исследования поддержаны Научно-технической программой "Фуллерены и атомные кластеры" (грант № 3К-2001) и Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 00-04-48392).

Уникальные физические и химические свойства фуллеренов вызывают значительный интерес у исследователей. В последнее время особое внимание уделяется изучению их влияния на биологические объекты. Обнаружены цитотоксическая активность фуллеренов [1], их влияние на избирательное расщепление ДНК [2] и антивирусная активность, в частности против ВИЧ [3]. Многие биоэнергетические процессы и процессы биосинтеза включают окислительно-восстановительные ферментативные реакции со стадиями дистанционного переноса электронов, в которых электрон туннелирует на 5–20 Å от донора к акцептору через белок. Фуллерены благодаря окислительно-восстановительным свойствам могут быть использованы как эффективные партнеры в таких реакциях. Недавно были описаны исследования азурина с ковалентно присоединенным к нему фуллереном, при этом был обнаружен эффективный электронный обмен между медьсодержащим центром азурина и фуллереном [4]. В ряде исследований переноса электрона в белках, в частности в миоглобине, в качестве фотостимулированного донора электронов использовался эозин [5,6]. С этой точки зрения эозин и фуллерен могут быть использованы как эффективная донорно-акцепторная пара для исследования реакций переноса электрона в белках и мембранах. Такие исследования могут быть выполнены с использованием водорастворимых аминокислотных производных фуллеренов [6,7].

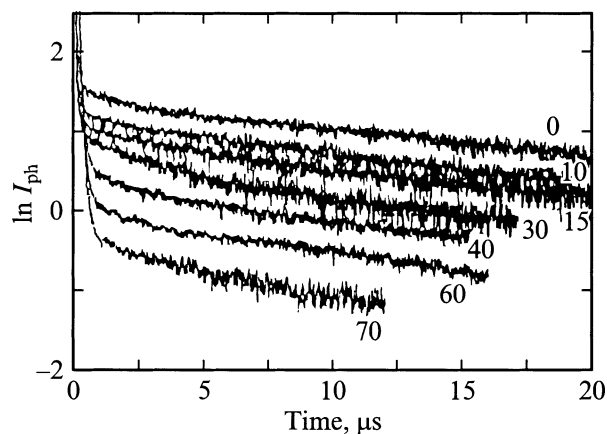
В предлагаемой работе изучались фотостимулированный перенос электрона между триплетно-возбужденным эозином и аминокислотными производными фуллерена C<sub>60</sub> (АПФ) в растворе и взаимодействие этих соединений с апомиоглобином для дальнейшего анализа реакций дистанционного переноса электрона в белке.

Для создания донорно-акцепторной пары исследовалась возможность переноса электрона между триплетно-возбужденным эозином (донором) и аминокислотными

производными фуллерена C<sub>60</sub> (акцепторами) в водных растворах по изменению кинетики тушения фосфоресценции эозина различными концентрациями C<sub>60</sub>-аланина и C<sub>60</sub>-глицина. Образцы возбуждались импульсными лазерами с  $\lambda_{\text{ex}} = 337$  и 532 nm. Энергия лазерного импульса составляла 70 mJ, что достаточно для полного возбуждения хромофоров в образце.

Обнаружено, что при  $\lambda_{\text{ex}} = 337$  nm интенсивность и время жизни фосфоресценции хромофора уменьшаются при повышении концентрации АПФ. В случае эозина константа скорости тушения фосфоресценции составляет  $K_q = 0.4 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , что близко к величине, характерной для процесса тушения триплетного возбужденного состояния эритрозина по механизму, описанному в работе [7]. В другом эксперименте при  $\lambda_{\text{ex}} = 532$  nm падает только интенсивность фосфоресценции эозина без изменения времени жизни возбужденного хромофора (см. рисунок). Такое различие можно объяснить тем, что при 377 nm происходит одновременное возбуждение эозина и производных фуллерена. Возбужденные производные фуллерена являются эффективными окислительными агентами, и тушение зонда может происходить по механизму переноса электрона при диффузионных столкновениях. При облучении образцов лазером с  $\lambda = 532$  nm возбуждается только эозин, АПФ при 532 nm практически не поглощают. В этом случае, вероятно, тушение фосфоресценции эозина происходит в результате образования эксиплекса.

Важнейшей задачей при решении проблемы переноса электрона в белках является создание донорно-акцепторной пары в структуре белка. В настоящей работе изучалась возможность встраивания C<sub>60</sub>-аланина и C<sub>60</sub>-глицина в гемовый "карман" миоглобина (вместо удаленного гема) с целью дальнейшего осуществления переноса электрона с эозина, присоединенного к концевой аминокислоте миоглобина. Для решения этой задачи



Влияние различных концентраций  $C_{60}$ -аланина (в  $\mu M$ ) на кинетику затухания флуоресценции эозина в растворе трис-HCl (0.1 M, pH 7.2),  $\lambda_{ex} = 532$  nm.

необходимо было встроить  $C_{60}$ -аланин и  $C_{60}$ -глицин в апомиоглобин. Для этой цели из миоглобина удаляли гем по методике, описанной в [8]. Затем в раствор апомиоглобина добавляли  $C_{60}$ -аланин и  $C_{60}$ -глицин. Процесс их встраивания в апомиоглобин контролировали по изменению интенсивности флуоресценции триптофанового остатка миоглобина. Известно, что триптофановый остаток миоглобина расположен в непосредственной близости от гема, а спектр поглощения производных  $C_{60}$  и спектр флуоресценции триптофанового остатка перекрываются. В результате возможно тушение флуоресценции триптофанового остатка по механизму диполь-дипольного резонансного переноса возбуждения на расстоянии, не превышающем ферстеровский радиус тушения, который для пары триптофан-фуллерен составляет  $10 \text{ \AA}$ . Было показано, что  $C_{60}$ -аланин и  $C_{60}$ -глицин тушат флуоресценцию триптофана при добавлении их к апомиоглобину в эквимольных концентрациях более чем наполовину. Это позволяет оценить константу диссоциации комплекса аминокислотных производных  $C_{60}$  с апомиоглобином:  $K \sim 10^{-5} M$ .

Таким образом, в настоящей работе показано, что в водных растворах происходит перенос электрона с фотовозбужденного эозина на  $C_{60}$ -аланин и  $C_{60}$ -глицин. Осуществлен процесс встраивания АПФ  $C_{60}$  в гемовый "карман" апомиоглобина и оценена константа равновесия этого комплекса.

## Список литературы

- [1] H. Tokuyama, S. Yamago, E. Nakamura. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7918 (1993).
- [2] A.S. Boutorine, H. Tokuyama, M. Takasugi, H. Isobe, E. Nakamura, C. Helene. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **33**, 2462 (1994).
- [3] S.H. Friedman, D.L. DeCaamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G.L. Kenyon. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6506 (1993).

- [4] A. Kurz, C.M. Halliwell, J.J. Davis, H.A. Hill, G. Canters. *Chem. Commun.* 433 (1998).
- [5] V.R. Fogel, A.V. Pastukhov, B.L. Psikha, A.I. Kotelnikov. *Biophysics* **42**, 1019 (1997); E. Zagavy, I. Willner. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12 499 (1996).
- [6] R.A. Kotelnikova, A.I. Kotelnikov, G.N. Bogdanov, V.S. Romanova, E.F. Kuleshova, Z.N. Parnes, M.E. Vol'pin. *FEBS Lett.* **389**, 111 (1996).
- [7] A. Bianco, T. Da Ros, M. Prato, C. Toniolo. *J. Peptide Sci.* **7**, 208 (2001).
- [8] F.W. Teale. *J. Biochim. Biophys. Acta* **35**, 543 (1959).