

УДК 547.962

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЯВЛЕНИЯ ОБМЕННОЙ ДЕЗАКТИВАЦИИ ТРИПЛЕТНЫХ ВОЗБУЖДЕННЫХ СОСТОЯНИЙ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРОЕНИЯ И ЭЛЕКТРОННОЙ ПРОВОДИМОСТИ БЕЛКОВ

**А. И. КОТЕЛЬНИКОВ, В. Р. ФОГЕЛЬ, Г. И. ЛИХТЕНШТЕИН,
*Г. Б. ПОСТНИКОВА, *Е. А. ШЛЯПНИКОВА**

*Отделение Института химической физики Академии наук СССР,
Черноголовка, Московская область*

**Институт биологической физики Академии наук СССР, Пущино, Московская область*

Методом регистрации кинетики затухания фосфоресценции измерены времена жизни возбужденных триплетных состояний метки эозинизотиоцианата, присоединенной к концевым NH_2 -аминогруппам различных производных гемоглобина и миоглобина. Исследовано влияние на спектры фосфоресценции лизоцима нитроксильной спиновой метки, присоединенной к группе His-15. Анализ собственных и литературных данных по обменным взаимодействиям между центрами, локализованными на белках с известной структурой (гемоглобине, миоглобине, лизоциме, карбоангидразе, бактериальном ферредоксине), позволяет заключить, что в рассмотренных случаях обменное взаимодействие экспоненциально убывает с расстоянием между центрами. Оценка характерного расстояния этого взаимодействия составила $\sim 0,7 \text{ \AA}$.

Среди разнообразных методических задач молекулярной биологии и химической энзимологии в частности нередко встречаются задачи определения расстояния между центрами в биологической матрице и регистрации изменения этого расстояния в процессе функционирования объекта. В последнее время в литературе дискутируется проблема электронного переноса через белковую матрицу на большие расстояния [1—3]. Для решения этих задач представляется весьма перспективным использование квантовомеханического явления обменного взаимодействия. Обменное взаимодействие имеет различные физические проявления: образование химической связи, обменные взаимодействия парамагнитных ионов и радикалов, регистрируемые методами ЭПР и магнитной восприимчивости, тушение возбужденных триплетных состояний хромофоров. Во всех случаях эффективность обменного взаимодействия зависит от степени перекрывания электронных оболочек взаимодействующих центров, что приводит к экспоненциальной зависимости эффективности обмена от расстояния между достаточно удаленными друг от друга центрами. Сильная зависимость обмена от расстояния может позволить по величине обменного взаимодействия определять как расстояние между центрами, так и небольшие изменения этого расстояния.

С точки зрения поставленных задач тушение триплетных состояний представляет особый интерес, поскольку вследствие большого времени жизни возбужденного триплетного состояния ($\leq 10 \text{ сек}$) параметры фосфоресценции чувствительны к очень слабым обменным взаимодействиям, проявляющимся на расстоянии до $17 \text{ \AA}$ [4, 5].

В настоящей работе проанализированы возможности решения перечисленных выше задач с помощью триплетных меток, ковалентно присоединенных к макромолекулам гемоглобина, миоглобина и лизоцима. Результаты, полученные на белковых объектах, сопоставляются с литературными данными по обменным взаимодействиям в модельных системах.

МЕТОДИКА

Способ измерения времени затухания фосфоресценции ($\tau_{\text{фосф}}$) и установка, на которой проводились измерения, описаны нами ранее [6]. В качестве источника возбуждения использовали азотный импульсный лазер ($\lambda=337 \text{ нм}$, $U=3 \cdot 10^{-4} \text{ Дж}$, $\tau=10^{-8} \text{ сек}$). Измерение $\tau_{\text{фосф}}$ эозинизотиоцианата, ковалентно присоединенного к концевой NH_2 -группе гемоглобина и миоглобина, осуществлялось в тонкостенных кварцевых ампулах диаметром 5 мм при 77° К в 50%-ных водно-глицериновых растворах. Спектры фосфоресценции регистрировали в этих же условиях на спектрофлуориметре фирмы «Aminco-Bowman» (США), спектры поглощения — на спектрофотометре «Specord UV-VIS» (ГДР).

В работе использовали эозинизотиоцианат, синтезированный из флуоресцеинизотиоцианата по методике Черри и соавт. [7]. Глицерин марки ч. д. а. очищали путем трехкратной перегонки под вакуумом. Миоглобин выделяли из скелетных мышц кашалота, как описано ранее [8]. Гемоглобин получали из сыворотки крови человека по известной методике [9]. Лизоцим из яиц, изготовленный на Олайнском заводе химреактивов, очищали центрифугированием и двукратной хроматографией на колонке с сефадексом G-100.

Реакцию метмиоглобина (metMb) (30 мг/мл) с эозинизотиоцианатом проводили в присутствии 4-кратного избытка реагента в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7, при 5° . Через 24 час избыток реагента отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25, 0,01 М фосфатный буфер, pH 6,5. Затем реакционную смесь фракционировали на колонке с CM-сефадексом GM-25 ступенчатым градиентом ионной силы от 0,01 до 0,1 М фосфатного буфера, pH 6,5. Основная фракция мономодифицированного metMb элюируется 0,05 М фосфатным буфером, pH 6,5, и представляет собой, как показано ранее [10], продукт присоединения метки к концевой α -аминогруппе (ValNA1). Выход продукта 7%. Количество молекул красителя в растворе эозинизотиоцианата — metMb определяли спектрофотометрически, используя $\epsilon_{518}^{\text{pH } 8} = 8,3 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$, с учетом того, что $\epsilon_{518}^{\text{pH } 6,5}(\text{metMb}) = 8 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \text{ сек}^{-1}$. Ковалентное присоединение метки к концевой NH_2 -группе гемоглобина осуществляли по методике, описанной ранее [9]. В этих условиях присоединяется в среднем одна молекула эозинизотиоцианата на макромолекулу гемоглобина. Предварительное блокирование концевых NH_2 -групп *о*-фталевым альдегидом предотвращало присоединение метки к гемоглобину, что подтверждает специфичность его взаимодействия с концевыми NH_2 -группами белка. Ковалентное присоединение спиновой метки 2,2,6,6-тетраметил-4-иодацетамид-1-оксила к лизоциму (1:1) проводили по методике, описанной в работе Ахмедова и соавт. [11]. В этих условиях метка присоединяется к His-15 лизоцима.

Ферригемоглобин получали из оксигемоглобина путем окисления избытком феррицианида калия с последующим отделением его гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Фтор- и CN-производные гемоглобина и миоглобина получали путем введения в раствор 30-кратного молярного избытка соответственно NaF и NaCN.

Как уже отмечалось, обменные взаимодействия проявляются в различных физических явлениях и соответственно могут быть зарегистрированы различными физическими методами. В случае тушения триплетных состояний различают два обменных механизма: тушение как результат триплет-триплетного переноса энергии и тушение за счет катализа интеркомбинационной конверсии из возбужденного триплетного состояния в основное синглетное под действием внешнего парамагнетика.

Информация, получаемая указанными методами, различна. Однако в каждом конкретном случае можно определить эффективность обмена K_{00} , выражаемую через константу обменного переноса энергии или обменный интеграл J . Так как эффективность обменных взаимодействий определяется перекрыванием электронных оболочек, а на периферии волновые функции убывают экспоненциально, то зависимость K_{00} от расстояния R (Å) между центрами можно выразить в следующем виде:

$$K_{00} = K_0 \exp(-2R/L), \quad (1)$$

где L (Å) — параметр, характеризующий распределение электронной плотности в пространстве.

Таким образом, измеряя параметры, зависящие от обменного взаимодействия, в частности времена жизни триплетных возбужденных состояний, их стационарную концентрацию или интенсивность фосфоресценции, можно оценить расстояние между двумя взаимодействующими центрами и регистрировать небольшие изменения этого расстояния, а также количественно охарактеризовать делокализацию электронной плотности по матрице, в том числе биологической.

Вследствие того, что рассматриваемые обменные процессы, имеющие сходную квантовомеханическую природу, тем не менее различаются конкретными специфическими свойствами, для решения поставленных задач целесообразно использовать сравнительный подход, сопоставляя данные по модельным и исследуемым системам, полученные одним и тем же методом в аналогичных условиях эксперимента. В частности, значение константы скорости триплет-триплетного переноса описывается формулой Декстера [12]

$$K(R) = \frac{2\pi}{\hbar} Y \exp(-2R/L) \int I(\nu) \varepsilon(\nu) d\nu, \quad (2)$$

где Y — коэффициент, не зависящий от R ; $I(\nu)$ — нормированный спектр испускания донора; $\varepsilon(\nu)$ — нормированный спектр поглощения акцептора. При сравнительном исследовании с использованием одних и тех же пар хромофоров — тушитель основное различие в экспериментальных значениях $K(R)$ будет определяться экспоненциальным членом. Это позволяет при фиксированных расстояниях R между центрами определить величину L , которая фактически характеризует делокализацию электрона в данной среде. При известном L можно определить расстояние между центрами.

Обменные взаимодействия в модельных системах. Нами проанализированы данные по обменным взаимодействиям, регистрируемым перечисленными выше методами, в различных системах. Рассматривалось несколько типов систем. В случае первого типа взаимодействующие центры, например два нитроксильных радикала или радикал и парамагнитный ион, находились в составе одной молекулы, но были разделены в пространстве цепочкой ненасыщенных связей. Второй тип систем характеризуется тем, что взаимодействующие центры (фосфоресцирующий и тушащий фосфоресценцию) отделялись друг от друга

молекулами растворителя. Как следует из результатов, полученных ранее [13], структура молекул растворителя, среди которых были как насыщенные (спирты, эфиры), так и ненасыщенные (бензол, толуол, дифенил) соединения, практически не влияла на обменные взаимодействия. Во всех этих случаях триплетные уровни молекул растворителя были значительно выше триплетных уровней донорных и акцепторных центров, между которыми происходил перенос энергии. Данные по эффективности обменных взаимодействий в системах такого типа приведены на рис. 1. Как видно из рисунка, несмотря на различие в физических процессах и методах реги-

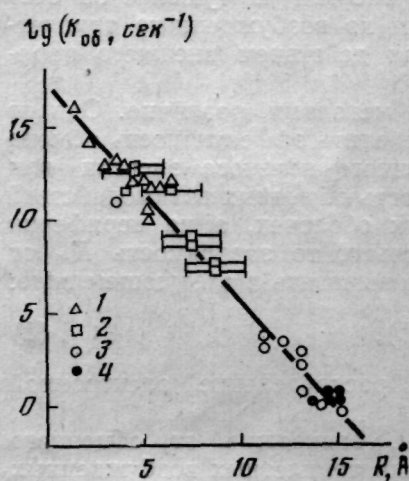


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость эффективной константы обменного взаимодействия K_{06} от расстояния R между различными взаимодействующими центрами. 1 — спиновой обмен между нитроксильными радикалами, находящимися в структуре кристаллической решетки [14, стр. 19, 226, 228]; 2 — спиновой внутримолекулярный обмен между нитроксильными радикалами и парамагнитными ионами [15]; 3 — обменный триплет-триплетный перенос энергии [5, 16, 17]; 4 — обменная дезактивация триплетных возбужденных состояний парамагнитными ионами [4]. В качестве R брались переносовские радиусы тушения триплетных состояний, а в качестве констант тушения — $e/\tau_{\text{фосф}}$

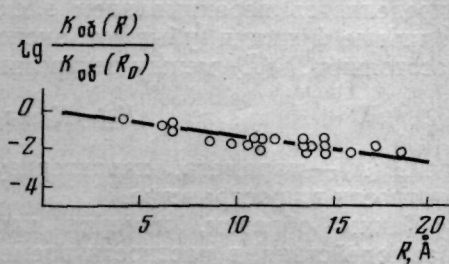
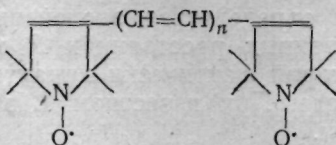


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость величины K_{06} для спинового обмена в бирадикалах от расстояния между неспаренными электронами [18—20]

страции, для всех перечисленных выше систем в пределах всего диапазона измерений в полулогарифмических координатах наблюдается приближенная линейная зависимость, описываемая формулой (1) с параметрами $K_0 = 10^{17} \text{ сек}^{-1}$, $L = 0,7 \text{ Å}$. В дальнейшем матрицу, в которой обменные взаимодействия определяются такими параметрами, будем называть непроводящей.

Однако возможны и другие случаи. Анализ величин обменного интеграла, приведенных в работах [18—20] для бирадикалов типа



показывает, что с увеличением длины ненасыщенной цепочки K_{06} уменьшается гораздо слабее (рис. 2). Экспоненциальная часть этой зависимости описывается уравнением (1) с $L = 6,5 \text{ Å}$. Миграция триплетного возбуждения по ароматическим молекулам растворителя, триплетные уровни которого близки или выше триплетных уровней акцептора, как показано ранее [21], за $\tau = 3 \text{ мсек}$ возможна на расстояние до 40—50 Å. В случае полимеров с ароматическими молекулами в качестве боковых звеньев миграция триплетного возбуждения на аналогичный акцептор

возможна начиная с 500—1000 звеньев, что также указывает на слабую зависимость вероятности переноса от расстояния [22, 23]. В подобных случаях матрицу, в которой осуществляется обменное взаимодействие, будем называть проводящей.

Столь сильное различие эффективности обменного взаимодействия в зависимости от природы среды, разделяющей центры, открывает интересные возможности для применения обменных взаимодействий при исследовании биологических объектов, в частности белков. При этом зависимости (1) с $L=0,7$ и $6,5 \text{ \AA}$ можно использовать в качестве калибровочных соответственно для непроводящей и проводящей матриц. Несомненно, что эти калибровочные зависимости являются весьма грубым приближением. Как уже отмечалось, представленные на рис. 1 и 2 данные относятся к различным физическим процессам и различным методам измерения. При их обработке не учитывались многие факторы, специфичные для каждого явления или метода. Так, например, не учитывались стерические и ориентационные факторы, распределение по расстояниям при переходе от изолированных пар к гомогенному раствору, фактор Франка—Кондона в случае триплет-триплетного переноса. Однако сильная экспоненциальная зависимость эффективности процесса от расстояния, по-видимому, скрадывает имеющийся разброс данных и позволяет оценить параметры K_0 и L , характеризующие эти зависимости, и далее использовать их для относительных измерений.

Исследование обменных взаимодействий в белковой матрице с помощью триплетных меток. Для оценки влияния белковой матрицы на эффективность обменного взаимодействия между центрами, локализованными на белке, использовали явление дезактивации триплетного возбуждения хромофоров. При этом хромофоры и тушащие центры находились на известных расстояниях друг от друга. Изучались следующие системы, содержащие фосфоресцирующие (Ф) и тушащие (Т) центры.

1. Гемоглобин человека; Ф — молекула эозинизотиоцианата, ковалентно присоединенная к концевой NH_2 -группе β -субъединицы, Т — гем белка.

2. Миоглобин кашалота; Ф — молекула эозинтиоизоцианата, ковалентно присоединенная к концевой NH_2 -группе, Т — гем белка.

3. Лизоцим яич; Ф — Trp-62 и Trp-108; Т — спиновая метка, ковалентно присоединенная к His-15.

Кроме того, были использованы литературные данные по эффективности обменного тушения фосфоресценции в карбоангидразе и по спинового обмену между железосерными кластерами в бактериальном ферредоксине.

В случае гемоглобина проведены измерения $\tau_{\text{фосф}}$ метки, присоединенной к NH_2 -концевой группе, в зависимости от электронного состояния гема. Состояние гема изменяли путем изменения степени окисления железа или заменой лигандов в шестом координационном положении. Результаты экспериментов приведены на рис. 3. Как видно из данных рисунка, изменение состояния гема приводит к заметному изменению величины $\tau_{\text{фосф}}$ метки: $\tau_{\text{фосф}}(\text{Hb}^{2+}\text{O}_2) = 3,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ сек}$, $\tau_{\text{фосф}}(\text{Hb}^{3+}\text{CN}) = 2,5 \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ сек}$, $\tau_{\text{фосф}}(\text{Hb}^{3+}\text{F}) = 1,4 \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ сек}$. Это свидетельствует об участии гема в тушении пространственно удаленной метки. При этом кривые затухания фосфоресценции $P(t)$ хорошо спрямляются в полулогарифмических координатах, что указывает на фиксированное пространственное расположение эозинизотиоцианата относительно гема.

В случае присоединения метки к концевой NH_2 -группе миоглобина, пространственная структура молекулы которого в основных чертах сходна со структурой β -субъединицы гемоглобина, изменение состояния гема также приводило к изменению формы кривой затухания $P(t)$, однако при этом зависимости $P(t)$ в полулогарифмических координатах не спрямлялись. Как видно из рис. 4, в данном случае процесс затуха-

ния можно описать набором экспонент с $\tau_{\text{фосф}}$ от $1 \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ до $5 \pm 0,5 \cdot 10^{-3}$ сек. Причем $\tau_{\text{фосф}} = 5 \cdot 10^{-3}$ сек наблюдалось ранее для меток, присоединенных к белкам, не содержащим хромофорных групп [6].

Полученные экспериментальные данные можно объяснить следующим образом: при присоединении эозинизотиоцианата к концевой NH_2 -группе β -субъединицы молекулы гемоглобина молекула метки, имеющая два отрицательных заряда, взаимодействует с положительными зарядами регуляторного центра гемоглобина, находящегося в месте контакта β -субъединиц (His-2, Lys-82 и His-143 каждой из β -субъединиц

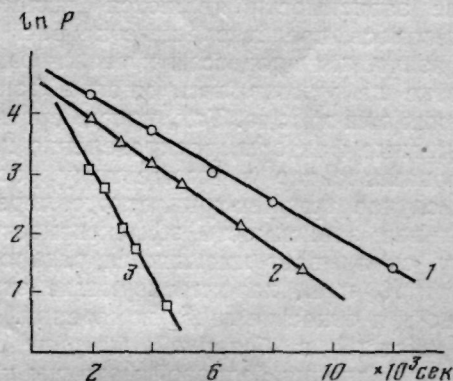


Рис. 3

Рис. 3. Кинетика затухания фосфоресценции эозинизотиоцианата, присоединенного к концевой NH_2 -группе гемоглобина. 1 — Hb^{2+}O_2 ($S=0$), 2 — $\text{Hb}^{3+}\text{CN}^-$ ($S=1/2$), 3 — Hb^{3+}F^- ($S=5/2$)

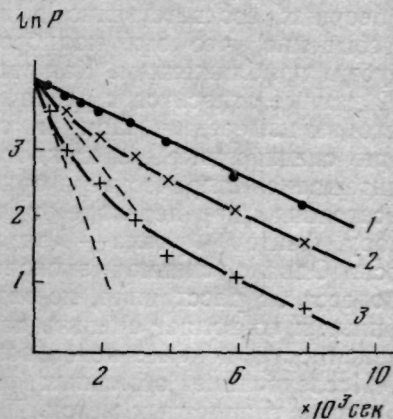


Рис. 4

Рис. 4. Кинетика затухания фосфоресценции эозинизотиоцианата, ковалентно присоединенного к белкам. 1 — сывороточный альбумин человека, 2 — metMbCN , 3 — metMbF

[24]), что фиксирует ее положение в пространстве. При этом резко ухудшается переход оксигемоглобина в дезоксисостояние при продувании раствора белка аргоном. Аналогичный эффект оказывают полифосфаты [25]. В случае миоглобина присоединенная к концевой группе метка не имеет фиксированного положения относительно макромолекулы и может находиться на различных расстояниях от гема, что приводит к различному тушению отдельных молекул гемом.

По построенным на основе рентгеноструктурных исследований пространственным моделям гемоглобина и миоглобина можно оценить расстояние от гема до места связывания эозинизотиоцианата [26]. В случае гемоглобина расстояние до ближайших групп регуляторного центра составляет примерно 15 Å. В случае миоглобина расстояние между краем сопряженной системы гема и концевой NH_2 -группой составляет приблизительно 21 Å; однако, учитывая реальные размеры метки (~ 6 Å), можно полагать, что расстояние при наименьшем сближении также составляет 16—17 Å. Таким образом, экспериментально обнаруживается дезактивация метки гемами белковых макромолекул на расстоянии 15—20 Å. При этом, учитывая возможный вклад других механизмов, можно оценить верхнюю границу констант обменного тушения для изученных препаратов (см. таблицу).

В случае лизоцима изучали влияние на интенсивность фосфоресценции собственных триптофанов белка ($\tau_{\text{фосф}} \sim 2$ сек) спиновой метки, ковалентно присоединенной к His-15 лизоцима. Известно, что стабильные нитрокислородные радикалы эффективно тушат триплетные состояния возбужденных молекул [27, 28]. Однако в нашем случае тушащего действия метки обнаружено не было. Это свидетельствует о том, что

Результаты измерения констант скоростей тушения фосфоресценции на белках

Система	Донор	Акцептор	$R_0, \text{\AA}$	$K_{06}, \text{сек}^{-1}$	$\frac{K_{06}}{K_{05\text{непр}^*}}$	$\frac{K_{06}}{K_{06\text{пр}^{**}}}$	Ссылка
Оксигемоглобин	Эозинизотиоцианат	Гем	~ 15	$< 3 \cdot 10^2$	$< 1,5 \cdot 10^2$	$< 3 \cdot 10^{-13}$	
metHbCN	»	»	~ 15	$< 4 \cdot 10^2$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 4 \cdot 10^{-13}$	
metHbF	»	»	~ 15	$< 7 \cdot 10^2$	$< 4 \cdot 10^2$	$< 7 \cdot 10^{-13}$	
metMb	»	»	$\sim 16 \div 17$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 10^2$	$< 10^{-12}$	
metMbF	»	»	$\sim 16 \div 17$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 10^2$	$< 10^{-12}$	
metMbCN	»	»	$\sim 16 \div 17$	$< 2 \cdot 10^2$	$< 10^2$	$< 10^{-12}$	
Лизоцим	Тгр-108	Спиновая метка	~ 17	$\leq 0,5$	< 50	$< 10^{-15}$	
	Тгр-62						
Карбоангидраза	М-ацетилбензосульфониамид	Тгр	~ 10	$\sim 10^4 \div 10^5$	$\sim 10^{-1} \div 10^{-2}$	$< 4 \cdot 10^{-10}$	[30]
Ферредоксин	Обмен между кластерами		9,5	$3 \cdot 10^9$	$\sim 10^{-2}$	$\sim 10^{-7}$	[31]

* $K_{об}$ непр., — рассчитанная по уравнению (1) с $L = 0,7 \text{ \AA}$.

** $K_{об}$ пр., — рассчитанная по уравнению (1) с $L = 6,5 \text{ \AA}$.

величина $K_{об} \ll 0,5 \text{ сек}^{-1}$. Согласно оценке, приведенной ранее [29], спиновая метка, присоединенная к His-15 лизоцима, отстоит от ближайших к точке присоединения триптофановых остатков Тгр-62 и Тгр-108 на расстоянии $\sim 17 \text{ \AA}$.

Ранее [30] сообщалось об исследовании триплет-триплетного переноса энергии от триплетной метки, введенной в активный центр карбоангидразы, на ближайший к активному центру триптофановый остаток белка. Как показывают авторы, для карбоангидраз, выделенных из различных источников, перенос энергии на триптофан осуществляется с $K = 10^4 - 10^5 \text{ сек}^{-1}$. При этом расстояние переноса составляет $\sim 10 \text{ \AA}$.

Другим примером обменного взаимодействия между центрами, локализованными на белковой матрице, являются данные по исследованию методом ЭПР бактериальных ферредоксинов [31]. Авторами обнаружено различие между спектрами ЭПР ферредоксинов, одни из которых содержат один четырехъядерный кластер в парамагнитном состоянии с $S = 1/2$, другие — два аналогичных парамагнитных кластера. Как отмечают авторы, различие в спектрах невозможно объяснить только наличием диполь-дипольного спин-спинового взаимодействия между кластерами. В работе было сделано предположение о наличии обменного взаимодействия между центрами. Действительно, при расстоянии между краями кластеров $9,5 \text{ \AA}$ (рентгеноструктурные данные) ожидаемые значения диполь-дипольного расщепления ($\sim 30 \text{ гс}$) значительно меньше экспериментального значения (250 гс). Аналогично величина отношения интенсивности разрешенных и запрещенных линий в спектре ЭПР почти на порядок выше величины, рассчитанной для диполь-дипольного взаимодействия. Вклад обменного взаимодействия в величину расщепления составляет, таким образом, $\sim 200 \text{ гс}$. Это соответствует $J = 3 \cdot 10^9 \text{ сек}^{-1}$. Поскольку атомы железа расположены в вершинах кластеров и спиновая плотность существенно делокализована, в качестве расстояния между обменивающимися электронами целесообразно принять $R = 9,5 \text{ \AA}$.

В таблице приведены экспериментальные данные по измерению $K_{об}$ для различных центров на белках, расстояние между центрами, а также ожидаемые значения $K_{об}$, рассчитанные по формуле (1) соответственно для проводящих ($L = 6,5 \text{ \AA}$) и непроводящих ($L = 0,7 \text{ \AA}$) систем. Анализ таблицы показывает, что эти данные лучше соответствуют модельным непроводящим системам и отличаются на 7—15 порядков от значений, предсказываемых для систем с проводящей матрицей.

Приведенные в настоящей работе результаты не позволяют окончательно решить вопрос о способности белковой матрицы оказывать содействие делокализации электронной плотности. Тем не менее они устанавливают определенную границу такого содействия. В случае, когда механизм обмена и расстояние между центрами установлены достаточно достоверно (карбоангидраза, бактериальный ферредоксин), экспериментальные значения K_{06} либо совпадают с ожидаемыми для непроводящих систем, либо отличаются от них не более чем на два порядка. В системах, в которых точные ориентация и механизм переноса в настоящее время не установлены (модифицированные производные гемоглобина, миоглобина и лизоцима), на расстоянии 15—17 Å превышение ожидаемых значений K_{06} для непроводящих сред всегда меньше на 2 порядка, что, согласно уравнению (1), соответствует разницу в расстоянии всего на 2 Å. Совокупность представленных данных, таким образом, свидетельствует в пользу того, что белковые глобулы не обладают способностью проводить обменные взаимодействия с $K_{06} \gg 10-10^{+3}$ сек на расстояния, превышающие 20—22 Å. Уравнение (1) может быть использовано для оценки расстояния между центрами в белках.

ЛИТЕРАТУРА

1. De Vault D., Chance B. (1966) *Biophys. J.*, **6**, 825—829.
2. Атанасов Б. П., Постникова Г. Б., Садыков Ю. Х., Волькенштейн М. В. (1977) *Мол. биол.*, **11**, 537—544.
3. Петров Э. Г., Украинский И. И., Харкянен В. Н. (1978) *Докл. АН СССР*, **241**, 966—969.
4. Ермолаев В. Л., Свешникова Е. Б., Шахвердов Т. А. (1975) *Успехи химии*, **44**, 48—74.
5. Ермолаев В. Л., Бодунов Е. Н., Свешникова Е. Б., Шахвердов Т. А. (1977) Безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения, «Наука», Л.
6. Котельников А. И., Кузнецов С. Н., Фогель В. Р., Лихтенштейн Г. И. (1979) *Мол. биол.*, **13**, 152—159.
7. Cherry R. J., Colodi A., Oppiger M., Schneider G., Semenza G. (1976) *Biochemistry*, **15**, 3653—3656.
8. Napner K. D., Bradshaw R. A., Hartzell C. R., Gurd F. R. N. (1968) *J. Biol. Chem.*, **243**, 683.
9. Giangande M., Kim Y. W., Mizukami H. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **412**, 187—193.
10. Postnikova G. B., Yumakova E. M., Sukhomudrenko A. G., Volkenstein M. V., Atanasov B. P. (1980) *Biophys. Chem.*, **11**, 29—37.
11. Ахмедов Ю. Д., Лихтенштейн Г. И., Иванов Л. В., Коханов Ю. В. (1972) *Докл. АН СССР*, **205**, 372—374.
12. Dexter D. L. (1953) *J. Chem. Phys.*, **21**, 836—850.
13. Siegel S., Judeikis H. (1964) *J. Chem. Phys.*, **38**, 2785—2786.
14. Замараев К. И., Молин Ю. Н., Салихов К. М. (1977) Спиновой обмен, «Наука», Новосибирск.
15. Eaton S. S., Eaton G. R. (1978) *Coord. Chem. Revs.*, **26**, 207—262.
16. Ермолаев В. Л. (1961) *Докл. АН СССР*, **139**, 348—350.
17. Anderson R. W., Hochstrasser R. M., Lutz H., Scott G. W. (1975) *Chem. Phys. Letters*, **32**, 204—209.
18. Шапиро А. Б., Новожилова Г. А., Розанцев Э. Г. (1976) *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **2**, 452—455.
19. Шапиро А. Б., Новожилова Г. А., Домбровский В. А., Володарский Л. Б., Розанцев Э. Г. (1976) *Изв. АН СССР, сер. хим.*, **9**, 2124—2127.
20. Пармон В. Н., Кокорин А. И., Жидомиров Т. М. (1980) Стабильные бирадикалы, «Наука», М.
21. Алфимов М. В., Батеха И. Г., Шекк Ю. Б. (1968) *Химия высоких энергий*, **2**, 215—219.
22. Cozzens R. F., Fox R. B. (1969) *J. Chem. Phys.*, **50**, 1532—1535.
23. Somersall A. C., Guillet J. E. (1973) *Macromolecules*, **6**, 218—223.
24. Arnone A. (1972) *Nature*, **237**, 146—149.
25. Charutin A., Herman E. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.*, **131**, 180—184.
26. Banaszak J. J., Watson H. C., Kendrew J. C. (1965) *J. Mol. Biol.*, **12**, 130—137.
27. Богатырева А. И., Бучаченко А. Л. (1975) *Успехи химии*, **44**, 2171—2204.
28. Татицолов А. С., Кузьмин В. А. (1975) *Докл. АН СССР*, **223**, 403—406.

29. Алфимова Е. Я., Лихтенштейн Г. И. (1976) Молекулярная биология, т. 8, часть II. стр. 127—179, сер. Итоги науки и техники, ВИНТИ, М.
30. Galley W. G., Strambini G. B. (1976) Nature, **261**, 521—522.
31. Mathew R., Charlton S., Sands R. H., Palmer G. (1974) J. Mol. Biol., **249**, 4326.

Поступила в редакцию

20.I.1980

Поступила после переработки

21.VIII.1980

THE USE OF THE TRIPLET STATE EXCHANGE DESACTIVATION PHENOMENON FOR THE STUDY OF STRUCTURE AND ELECTRON CONDUCTIVITY OF PROTEINS

A. I. KOTELNIKOV, V. R. FOGEL, G. I. LIKHTENSTEIN,
G. B. POSTNIKOVA*, E. A. SHLAPNIKOVA*

*Institute of Chemical Physics, Academy of Sciences of the USSR, Chernogolovka,
Moscow Region*

**Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Poustchino, Moscow Region*

A method for studying protein structure and estimating its electron conducting properties is proposed. The method is based on the kinetic recording of exchange quenching triplet labels and probes phosphorescence by chromophores or paramagnetic centres. It is shown that different types of exchange interactions (spin exchange, exchange energy transfer) between centres with distance R are described approximately by an equation ($I=I_0 \exp(-2R/L)$) where L changes from 0.7 Å (absence of electron coupling — system of type I) to 6.5 Å (strong electron coupling — system of type II). I (sec^{-1}) corresponds to exchange energy transfer rate constant or exchange integral in the case of spin exchange. Life-times of excited triplet state eosin-isotiocionate labels connected with the terminal NH_2 -groups of the following preparations were measured by the method of kinetic phosphorescence decay recording: human oxyhemoglobin, methemoglobin, F- and CN-methemoglobin, metmyoglobin, F- and CN-metmyoglobins. The influence of lysozyme of the nitroxyl spin label bound to His-15 group on the phosphorescence spectrum was investigated. The analysis of our and literature data on the exchange interactions between the centres localized on the protein with known structure (hemoglobin, myoglobin, lysozyme, carboanhydrase, bacterial ferredoxin) permit us to conclude that in the examined cases the experimental values correspond to model systems of type I and are different from the dependence in systems of type II by 5—15 order. This allows us to use equation (1) for estimation of the distances between the centres on proteins.