

Регуляция активности цитохромов Р450 с помощью физико-химических воздействий

В.В.Шумянцева, Т.В.Булко, А.И.Арчаков

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии

Российской академии медицинских наук

119832 Москва, Погодинская ул., 10, факс (095) 245–0857

Рассмотрены физико-химические факторы, влияющие на каталитическую активность гемопротеинов, в частности цитохромов Р450, используемых в биосенсорах и биореакторах. Приведены данные авторов по получению полусинтетических гемопротеинов на основе цитохрома Р450 2В4 и NADPH-зависимой цитохром Р450-редуктазы. Обсуждено использование альтернативных источников электронов (электрохимическое и фотовосстановление) для проведения окислительно-восстановительного цикла гемопротеинов. Проанализировано влияние температуры, давления, органических растворителей, химической модификации белков на эффективность ферментативных реакций, катализируемых гемопротеинами.

Библиография — 86 ссылок.

Оглавление

I. Введение	967
II. Использование электрохимических методов в исследовании гемопротеинов	968
III. Фотоиндуцированный электронный транспорт	970
IV. Изменение микроокружения белка и его активного центра	970
V. Химическая модификация белков с целью включения новых каталитических функций	971
VI. Влияние температуры на реакции, катализируемые гемопротеинами	972
VII. Влияние давления на каталитическую активность гемопротеинов	973
VIII. Заключение	973

I. Введение

Цитохромы Р450 обладают уникальным свойством — способностью гидроксिलировать субстраты по неактивированным атомам углерода. Цитохромы метаболизируют ~ 200 000 различных соединений, катализируя примерно 60 типов химических реакций (гидроксילирование, N-, O- или S-деметилирование, дезалкилирование, эпексидирование и т.д.).¹ Эта особенность цитохромов Р450 может быть использована для анализа содержания в различных средах лекарственных препаратов и/или их метаболитов, ксенобиотиков,

а также для стереонаправленного синтеза производных стероидов или других классов биологически активных соединений. Повышение эффективности ферментативного катализа с использованием гемопротеинов является важной практической задачей. Принципы биоэлектрокатализа подробно изложены в работах^{2,3}.

В данном обзоре анализируется влияние различных физико-химических факторов на разные стадии ферментативных процессов. Отмечается эффективность использования альтернативных источников электронов (электрохимическое и фотовосстановление) вместо традиционных восстановителей (NADH или NADPH). Восстановление с помощью пиридиновых нуклеотидов не является непрерывным процессом, так как происходит быстрое истощение NADH или NADPH. Для поддержания необходимой концентрации восстановителей в биохимическую систему вводят дополнительно NADPH-регенерирующие ферментативные добавки, что усложняет биологическую систему. Использование вместо NADH или NADPH катодного электрического тока позволяет сделать процесс восстановления более продолжительным и контролируемым с помощью физико-химических параметров — напряжения, электрического тока. Контроль за процессом фотовосстановления осуществляют с помощью регистрации возникающего при этом фототока. Управлять процессом можно, изменяя длину волны возбуждения. В обзоре представлены литературные данные по исследованию цитохромов Р450, опубликованные за последние 10 лет.

В.В.Шумянцева. Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микросомального окисления НИИ БМХ РАМН. Область научных интересов: химическая модификация цитохромов Р450 и других гемопротеинов, синтез полусинтетических гемопротеинов, активные формы кислорода, электрохимическое восстановление флавогемопротеинов.
Телефон: (095) 246–5072, e-mail: victoria@ibmh.msk.su
Т.В.Булко. Младший научный сотрудник той же лаборатории. Область научных интересов: цитохром Р450, активные формы кислорода.
А.И.Арчаков. Академик РАМН, директор НИИ БМХ РАМН. Телефон: (095) 246–6980.
Область научных интересов: биологическое окисление, цитохром Р450, белок-белковые взаимодействия.

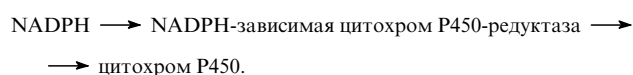
Дата поступления 20 апреля 1998 г.

II. Использование электрохимических методов в исследовании гемопротеинов

1. Применение электролиза для восстановления гемопротеинов

Электронный транспорт в биологических системах осуществляется, как правило, в присутствии доноров электронов, например NADPH и NADH, и переносчиков электронов, например флавиновых нуклеотидов. В последнее время для окислительно-восстановительных превращений ферментов, и в особенности металлоферментов, все чаще применяют электрические системы.⁴ Возможен как прямой электрохимический перенос электрона с редокс-центра белка на электрод, так и перенос в присутствии молекул-медиаторов.⁵ При этом использовали разные типы электродов: графитовые (стеклографит, пирографит), золотые, платиновые, полупроводниковые (оксид индия, оксид олова), химически модифицированные графитовые с добавлением катализаторов окислительно-восстановительных процессов (например, родия как катализатора восстановления кислорода до пероксида водорода или воды, металлокомплексов как эффективных медиаторов электронного транспорта и т.д.).^{6–8}

Перенос электронов в ферментативных системах, содержащих гемопротеин цитохром P450, происходит по схеме



Здесь донором электронов является NADPH, а транспортным белком для переноса электронов от NADPH к гемопротеину (цитохрому P450) — микросомальный флавопротеин (NADPH-зависимая цитохром P450-редуктаза) или митохондриальная система, состоящая из флавопротеина и белка, содержащего железо-серный кластер.

Использование для восстановления флавинов — медиаторов в оксигеназных реакциях — катодного электрического тока вместо NADPH позволило получить электрохимические системы с высокой эффективностью (табл. 1).⁹ В работах^{6,9,10} изучено гидроксирование лауриновой кислоты в присутствии электрохимической системы, состоящей из золотого или платинового электрода, очищенного рекомбинантного белка, содержащего P450 4A1, и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы. Кроме рекомбинантного белка электрохимическая система содержала в качестве медиатора координационное соединение Co(III) — (S)-1,3,6,8,10,13,16,19-октаазабицикло[6.6.6]эйкозанокобальт(III). Стандартный окислительно-восстановительный потенциал этого соединения $U = -350$ мВ (относительно нормального водородного электрода). Авторы предполагают, что на

катоде в первую очередь происходит восстановление иона кобальта(III) по схеме $\text{Co}^{3+} + e \rightarrow \text{Co}^{2+}$ в составе координационного соединения. Так как при проведении электролиза в системе, содержащей только флавопротеин (редуктазу) или гемопротеин (цитохром P450), не происходит гидроксирования лауриновой кислоты, можно сделать вывод, что ион Co^{2+} выполняет роль медиатора. Он восстанавливает флавиновые нуклеотиды в составе редуктазы, которые, в свою очередь, восстанавливают железо гема цитохрома P450. Активация кислорода осуществляется на восстановленном железе гема в тройном комплексе субстрат– Fe^{2+} – O_2 , при этом окисление различных субстратов в физиологических условиях происходит с высокими скоростями.¹ При электрохимическом восстановлении рекомбинантного белка генерируется пероксид водорода, разрушающий ферментативную систему. Добавление каталазы повышает эффективность системы в реакции гидроксирования субстрата. Авторы работ^{6,9,10} показали, что наибольшая скорость гидроксирования лауриновой кислоты наблюдается при напряжении -450 мВ (относительно стандартного водородного электрода).

В нашей лаборатории получен полуискусственный флавогемопротеин — флавоцитохром P450 2B4, обладающий редуктазной и оксигеназной активностью.^{11,12} При использовании электрохимической системы, состоящей из флавоцитохрома 2B4 или 1A2 и родий-графитовых микроэлектродов, нам удалось осуществить гидроксирование анилина, N-деметилирование аминопирина и O-деалкилирование 7-этокси- и 7-пентоксирезорфурина. Восстановление проводили при напряжении $U = -450$ мВ (относительно хлорсеребряного электрода).¹³ Каталитические константы NADPH-зависимых и электрохимических реакций, катализируемых флавоцитохромами 1A2 и 2B4, были сравнимы.

Следует отметить, что прямой перенос электронов от электрода к белку затруднен из-за недоступности электроактивных простетических групп, которые погружены в молекулу белка, а также из-за неупорядоченной ориентации и денатурации (адсорбционная денатурация) белков при их адсорбции на электродах. Для преодоления этих затруднений предложено использовать следующие подходы.

Так, с целью повышения эффективности переноса электронов от электрода к электроактивной простетической группе белка осуществляют иммобилизацию ферментов на поверхности электродов.^{14–16} Иммобилизация ферментов происходит за счет адсорбции, ковалентного связывания и включения их в полимерные пленки, нанесенные на электроды. Например, для иммобилизации белков, имеющих положительный заряд, используют их адсорбцию на пирографитовых электродах, содержащих отрицательно заряженные карбоксильные группы, а для иммобилизации гемопротеинов на графитовых электродах применяют кова-

Таблица 1. Сравнение скоростей электрохимических и NADPH-зависимых реакций метаболизма субстратов, катализируемых рекомбинантными белками.⁹

Белок (редуктаза + цитохром P450)	Субстрат	Тип реакции	Скорость реакции, нмоль · мин ^{–1} · (нмоль P450) ^{–1}	
			электрохимической	NADPH-зависимой
rF450(mBov17 α /mRatOR)L1 (редуктаза + P450 17 α)	Прогестерон	17 α -Гидроксирование	20	28
	Прегненолон	»	5	5
rF450(mHum3A4/mRatOR)L1 (редуктаза + P450 3A4)	Тестостерон	6 β -Гидроксирование	2.6	10.0
	Эритромицин	N-Деметилирование	1.2	2.2
	Бензфетамин	»	2.0	4.6
rF450(mHum1A2/mRatOR)L1 (редуктаза + P450 1A2)	Кофеин	»	0.75	1.5
	Имипрамин	»	1.2	2.0
CYP102-BM3 (P450 BM3)	Лауриновая кислота	ω -Гидроксирование	110	900

лентное связывание в присутствии сшивающего бифункционального реагента (глутарового альдегида) и альбумина.¹⁷ В последнем случае альбумин эффективно адсорбируется на поверхности графитовых электродов, а глутаровый альдегид сшивает редокс-белок и альбумин по аминок группам, фиксируя редокс-белок на электроде.

Другой подход заключается в использовании молекул-промоторов, которые облегчают электронный транспорт, соответствующим образом ориентируя белки на электроде и блокируя их адсорбционную денатурацию. В качестве таких промоторов применяют, в частности, алкантиолы, содержащие на конце функциональные группы (например меркаптоундекановую кислоту).¹⁸ Так, при хемосорбции меркаптоундекановой кислоты на поверхности золотых электродов образуется стабильный монослой, который облегчает последующее связывание белков (как ковалентное, так и ионное) с поверхностью электрода.

$\text{Au(электрод)}-\text{S}(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^- (\text{NH}_3)^+ \text{-гемопротейн,}$

$\text{Au(электрод)}-\text{S}(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^- (\text{NH}_3)^+ (\text{CH}_2)_n (\text{NH}_3)^+ \text{-OOC-гемопротейн.}$

Молекулой-промотором может служить также двухспиральная ДНК, которая эффективно адсорбируется на пирографитовых электродах.¹⁹ Такие ДНК-содержащие электроды легко экстрагируют гемопротейны из раствора.

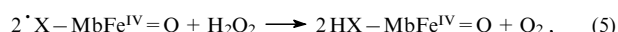
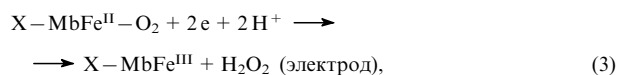
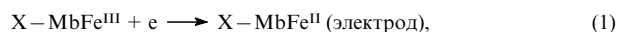
Для повышения скорости переноса электронов от электрода к редокс-белку проводят также химическую модификацию электродов (например используют электроды, содержащие ковалентно связанные или адсорбированные медиаторы электронного транспорта, такие как рибофлавин или метилвиологен),^{20, 21} а для повышения стабильности гемопротейнов в электрохимических системах их включают в фосфолипидные пленки, нанесенные на электроды.^{22–24} В качестве таких пленок, имитирующих природные биомембраны, используют поверхностно-активные вещества с заряженной или полярной группой и гидрофобным фрагментом, такие как дидодецилдиметиламмонийбромид, полистиролсульфонат, дигексадецилфосфат, димиристоилфосфат-идиллин.

Следует отметить, что электрохимические процессы с участием редокс-белков обратимы только в жидкокристаллических пленках.²² При включении цитохрома P450_{cam} в жидкокристаллические пленки, образуемые димиристоил-L- α -фосфатидилхолином или дидодецилдиметиламмонийбромидом, происходит прямой обратимый перенос электронов между электродом и железом гема фермента, подтвержденный циклическими вольтамперограммами.^{22–24} Так, восстановление миоглобина в жидкокристаллических пленках дидодецилдиметилдиаммонийбромида на пирографитовых электродах происходит обратимо, в отличие от его восстановления на электродах без мембраноимитирующих пленок.²⁴ При добавлении субстрата (например, трихлоруксусной кислоты) происходит восстановление последнего, регистрируемое по возрастанию катодного тока. При включении цитохрома P450_{cam} в пленки ДНК, адсорбированные на золотых электродах, было зарегистрировано прямое восстановление железа гема, а также каталитическое эпоксирирование стирола.²⁵

В работе²⁴ исследовалось электрохимическое восстановление метмиоглобина ($\text{X}-\text{MbFe}^{\text{III}}$), который является хорошей функциональной моделью цитохрома P450 (каталитическая активность миоглобина близка к активности цитохрома P450). Электровосстановление осуществляли на электродах из пирографита при потенциале разложения $U = -400$ мВ (относительно насыщенного каломельного электрода) в водных буферных растворах или в микроэмульсиях углеводов, воды и катионных детергентов. В этих условиях на электроде происходит восстановление метмиоглобина (реакция (1) на схеме 1). Восстановленный метмио-

глобин быстро реагирует с кислородом с образованием комплекса $\text{X}-\text{MbFe}^{\text{II}}-\text{O}_2$, который восстанавливается с выделением на электроде пероксида водорода. Выделяющийся пероксид водорода ступенчато окисляет метмиоглобин ($\text{X}-\text{MbFe}^{\text{III}}$) до феррилмиоглобина ($\text{HX}-\text{MbFe}^{\text{IV}}=\text{O}$) — активной окисленной формы миоглобина (реакции (4) и (5) на схеме 1).

Схема 1



где X — аминокислотный остаток, например тирозин-130. При добавлении в систему стирола последний окисляется пероксидом водорода до оксида стирола и бензальдегида.

Из рассмотренных выше работ следует, что применение электролиза для восстановления гемопротейнов сравнимо по эффективности с традиционным восстановлением пиридиновыми нуклеотидами. В табл. 1 представлены результаты по электрохимическим и NADPH-зависимым реакциям для нескольких изоформ цитохрома P450.

В настоящее время предпринимаются попытки создания цитохром P450-содержащих биореакторов и биосенсоров на основе электрохимических систем.^{9, 22, 26}

2. Использование неорганических полупроводников в окислительно-восстановительных системах

В ряде работ была показана эффективность совместного использования неорганических полупроводников (TiO_2 , ZnO, CdS) и ферментов (гидрогеназ, дегидрогеназ) в реакциях фотообразования водорода, фотовосстановления NADP^+ , фотосинтеза органических кислот и аминокислот.^{27–31} Система неорганический полупроводник — фермент способна преобразовывать энергию света в результате фотосенсибилизированного полупроводником окисления органических доноров электрона и катализируемого ферментом восстановления субстратов (H^+ , NADP^+ , органических кислот и аминокислот) с помощью электронов, фотогенерируемых в частицах полупроводника. Сопряжение неорганического полупроводника с ферментом обычно достигается с помощью переносчиков электронов (медиаторов): метилвиологена, бипиридинового комплекса родия и других соединений, способных к обратимому окислению-восстановлению. Описан также прямой безмедиаторный перенос электронов, фотогенерируемых в зоне проводимости полупроводника, к реакционному центру фермента.²⁸ При этом необходимым условием сопряженного действия полупроводника и фермента в отсутствие переносчика электронов является сорбция фермента на поверхности полупроводника.

3. Конструирование ферментативной «гальванической пары» для окислительно-восстановительных реакций

Принцип работы гальванического элемента основан на разнице в электродных потенциалах окислителя и восстановителя. В качестве восстановителя чаще всего используют активные металлы (например, цинк), а в качестве окислителя — гемопротейн. Гемопротейны имеют, как правило, более положительный стандартный электродный потенциал по сравнению с цинком ($E_0(\text{Zn}^0/\text{Zn}^{2+}) = -763$ мВ), поэтому в паре цинк-гемопротейн цинк служит восстановителем. При использовании в качестве донора электронов металлического цинка, а в качестве искусственного гемопротейна

комплекса гема с альбумином из человеческой сыворотки, нам удалось провести реакции N-деметилования ароматических аминов.³² Скорости этих реакций были сравнимы со скоростями NADH-зависимых реакций, проводимых в присутствии флавиновых нуклеотидов или рибофлавина как медиаторов переноса электронов.

В работе³³ в качестве восстановителя в системе, содержащей NAD⁺-гидрогеназу, был использован металлический кадмий ($E_0(\text{Cd}^0/\text{Cd}^{2+}) = -403 \text{ мВ}$, $E_0(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = -340 \text{ мВ}$). В этом случае также осуществляется принцип работы «гальванической пары».

III. Фотоиндуцированный электронный транспорт

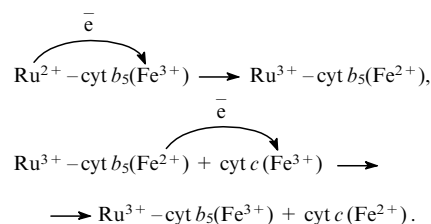
Световая энергия применяется не только в традиционных реакциях фотосинтеза или фотоиндукции полупроводников, но и для индукции электронного транспорта в окислительно-восстановительных системах. Прямое фотовосстановление гемопротеинов в отсутствие доноров электронов описано в работе³⁴. Метмиоглобин, цитохром *c*, цитохром *b₅*, комплексы гема с октапептидами и цитохромом P450 были фотовосстановлены при помощи лазерного излучения с длиной волны от 430 до 254 нм. Фотоокисление наблюдалось при длинах волн УФ-диапазона. Авторы работы³⁴ показали, что лиганды гема играют важную роль в процессах фотовосстановления. Продукты фотовосстановления были охарактеризованы спектрами поглощения и рамановскими спектрами. Проведено их сравнение с продуктами, образующимися при химическом восстановлении образцов.

Фотовосстановление гема в гемопротеинах может иметь практическое значение для «запуска» окислительно-восстановительных реакций, таких как активация кислорода цитохромом P450 или связывание лигандов (O_2) с миоглобином или гемоглобином. Исследование модельных комплексов (гемин – октапептиды) подтвердило точку зрения, что ароматические аминокислоты не являются первичными донорами электронов, так как в модельных пептидах ароматических остатков не было. В присутствии органических растворителей (глицерина и других спиртов) скорость фотовосстановления возрастала.³⁴ При облучении несфокусированным лазером с $\lambda = 457.9 \text{ нм}$ (мощность 40 мВт) комплекса рибофлавин – гемин – альбумин имеет место фотовосстановление рибофлавина, регистрируемое по изменению спектра поглощения комплекса. В присутствии N-замещенных аминов или анилина зарегистрировано образование продуктов деметилирования аминов и гидроксирования анилина (константы скорости реакций (k_{cat}) N-деметилования диметиланилина и гидроксирования анилина равны 0.5 и 0.13 мин⁻¹ соответственно, что сравнимо со скоростями NADPH-зависимых реакций).³²

В работе³⁵ описано фотоокисление восстановленного флавоцитохрома b_2^+ *Saccharomyces cerevisiae* (лактатдегидрогеназы) при облучении лазером с $\lambda = 400 \text{ нм}$. При этой длине волны окисленная форма 5-деазарибофлавина переходит в возбужденное триплетное состояние, которое и участвует в окислении восстановленного гема. Скорость межмолекулярного электронного транспорта составляла 2200 с⁻¹.

Серия работ^{36–40} посвящена исследованию электронного транспорта в гемопротеинах (в частности, в цитохроме *c* и цитохроме *b₅*), модифицированных различными комплексными соединениями рутения или кобальта. Особенностью соединений рутения является их способность обратимо фотовосстанавливаться и переносить электроны на другие акцепторы. Так, комплекс рутения, ковалентно связанный с

цистеином-65 цитохрома *b₅*, быстро восстанавливал цитохром *c* по схеме³⁶



Перенос электронов в этих системах исследован как при прямом фотовосстановлении комплексов рутения, так и при использовании техники флеш-фотолиза. Фотовосстановление флавопротеина — цитохром P450-редуктазы — в присутствии акцепторов электронов (феррицианида, красителя тетразолия нитроголубого) удалось провести в отсутствие NADPH.⁴⁰

Таким образом, при наличии в белке фоточувствительных простетических групп или их аналогов фотоиндуцированный электронный транспорт может служить альтернативным источником электронов в окислительно-восстановительных реакциях.

IV. Изменение микроокружения белка и его активного центра

1. Моделирование мембранного окружения

Большое влияние на работу ферментов в живых организмах оказывают окружающие структуры, среди которых важнейшей является клеточная мембрана. Создание искусственного мембраноподобного окружения может существенно повысить эффективность работы фермента. Среди использовавшихся синтетических мембран активирующий эффект был обнаружен у синтетического мембраноподобного фосфолипидного бислоя.⁴¹ Цитохром *c*, помещенный в такую мембрану, повышает скорость реакции N-деметилования N,N-диметиланилина под действием H_2O_2 в 10.6 раза. Кроме того, наблюдается 20-кратное уменьшение константы Михаэлиса для H_2O_2 , что свидетельствует о повышении сродства фермента к пероксиду водорода. Изменение спектральных характеристик цитохрома *c*, помещенного в фосфолипидный бислой, свидетельствует о существенных структурно-функциональных изменениях, произошедших при встраивании белка в мембрану. Для окисленной формы белка характерно смещение максимума оптической плотности в коротковолновую область (с 408 до 406 нм), максимум поглощения восстановленной формы сдвигается с 416 до 426 нм, а вместо двух максимумов при 520 и 550 нм появляется один при 550 нм.

Встраивание миоглобина в мембраноподобные пленки приводит к снижению энергии активации электрохимического восстановления дибромэтилена и трихлоруксусной кислоты. Отмечено также повышение скорости электронного транспорта в 1000 раз.¹⁶ Ацетилхолинэстераза, холинэстераза и пероксидаза хрена, включенные в полимерные пленки на основе поливинилпирридина и полиэтиленгликоля, могут использоваться в качестве амперометрических сенсоров для обнаружения ацетилхолина, холина и пероксида водорода.⁸

2. Ферментативный катализ в обращенных мицеллах и органических растворителях

Многие свойства биологических мембран эффективно имитируются обращенными мицеллами поверхностно-активных

† Восстановленный флавоцитохром получали титрованием окисленной формы фермента 1.5-кратным избытком L-лактата.

веществ (ПАВ) в органических растворителях, которые можно рассматривать как модели биомембран.

В 1977 г. было обнаружено, что ферменты, солюбилизованные в органических растворителях с помощью обращенных мицелл синтетических ПАВ, способны сохранять свою каталитическую активность.⁴² Некоторые гемопротейны, например цитохром *c* и метгемоглобин, индуцируют образование обращенных мицелл, встраиваясь в бислойную мембрану. Их ферментативная активность при этом сохраняется.^{43–45} Пероксидаза хрена, солюбилизованная в системе аэрозоль натриевой соли диизооктилового эфира сульфоянтарной кислоты–вода–октан, катализирует реакцию окисления пирогаллола пероксидом водорода значительно более эффективно, чем растворенная в воде.⁴⁶

Эффективный катализ окислительно-восстановительных реакций гемопротейнами, включенными в обращенные мицеллы ПАВ, был использован для повышения операционной стабильности каталазы, супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы.⁴⁷ В обращенные мицеллы включались и системы, моделирующие гемопротейны — комплексы альбумина с геминном и ферритин.⁴⁸

Цитохром P450 (изоформа 1B1) в комплексе с цитохром P450-редуктазой был включен в макроэмульсии масла в воде (содержание внутренней органической фазы > 0.74). Эффективность такой иммобилизации превышала 85%; активность фермента по отношению к таким субстратам, как эритромицин и хлортолурон, сохранялась в течение 24 ч при 15°C.⁴⁹

Для уменьшения содержания воды в коллоидной среде было предложено заменить воду, окружающую фермент в обращенной мицелле ПАВ, на водно-органическую смесь.⁵⁰ Исследовано окисление дибензотиофена, катализируемое гемоглобином в различных водно-органических средах.⁵¹ Другой способ исключения воды — получение суспензий лиофилизированных ферментов в органических растворителях. Ферменты, суспендированные в органических растворителях, приобретают новые свойства, причем изменения затрагивают практически все аспекты работы фермента: каталитическую активность, субстратную специфичность, стереоселективность, термостабильность.^{52, 53}

В безводных органических растворителях или органических растворителях с содержанием воды 0.01 об.% кроме обычных ферментативных реакций могут протекать процессы, не характерные для фермента в водной среде. Для каждого фермента причины изменения субстратной специфичности индивидуальны. Тем не менее, ферментативный катализ в органических растворителях следует кинетическим законам Михаэлиса–Ментен, что свидетельствует об образовании в неводных растворах классического фермент-субстратного комплекса.

При работе с ферментами, суспендированными в органических растворителях, было открыто явление «памяти ферментов». Фермент, лиофилизированный из водного раствора, содержащего определенный лиганд, и впоследствии суспендированный в органическом растворителе, в несколько десятков раз эффективнее связывает этот лиганд. При повторном растворении в воде это свойство исчезает. Возможное объяснение данного явления заключается в том, что фермент при лиофилизации сохраняет «отпечаток» этого лиганда даже после его удаления; попадая в безводную среду, где конформация белковой молекулы становится более жесткой, фермент проявляет по отношению к этому лиганду большее сродство.^{54, 55} Способность ферментов сохранять «отпечатки» лигандов имеет практическое значение для синтеза хиральных фармакологических интермедиатов.

Влияние органических растворителей на свойства цитохрома P450 изучено в меньшей степени. Найдено, что органические растворители способствуют переходу цитохрома P450 в неактивную форму P420.⁵⁶ Этот переход связан с изменением ближайшей координационной сферы (из атомов S) у атома железа. Аналогичный переход наблюдается и в

случае хлорпероксидазы.⁵⁶ В то же время цитохром *c*, суспендированный в тетрагидрофуране, содержащем 1% D₂O, полностью сохраняет свою третичную структуру.⁵⁷ Такие выводы были сделаны на основе исследования третичной структуры цитохрома *c* методом двумерной спектроскопии ЯМР.

V. Химическая модификация белков с целью включения новых каталитических функций

В этом разделе рассматриваются методы повышения ферментативной активности путем введения в молекулу белка новых каталитически активных групп.

Так, цитохром P450 проявляет монооксигеназную активность только в комплексе с флавопротеином — редуктазой. Здесь флавиновые нуклеотиды выполняют функцию переносчиков электронов, восстанавливая железо гема цитохрома P450. Введение флавиновых нуклеотидов или их аналогов в цитохром P450 превращает его в самодостаточный фермент, при этом не требуется участие в каталитическом цикле белков-партнеров.

Полусинтетический флавогемоглобин был получен присоединением активированных производных флавинов⁵⁸ к β-субъединице гемоглобина, взятых в соотношении 2 : 1.^{59, 60} Гемоглобин способен катализировать монооксигеназные реакции, протекающие в системе, содержащей гемопротейн, кислород, NADPH и флавопротеин (NADPH-зависимую цитохром P450-редуктазу). Связывание гемоглобина с флавином позволяет проводить подобные реакции без флавопротеина редуктазы. Скорости каталитической реакции гидроксирования анилина в присутствии флавогемоглобина и микросомальной монооксигеназной системы сравнимы. Скорость гидроксирования анилина в присутствии полусинтетического флавогемоглобина увеличилась по сравнению со скоростями гидроксирования в присутствии гемоглобина и системы гемоглобин–редуктаза в 7.7 и 1.3 раза соответственно.

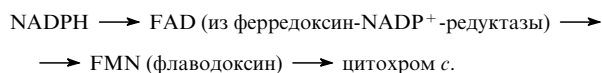
В работе⁶¹ исследована каталитическая активность ковалентных комплексов цитохром P450–флавинаденидин-нуклеотид (FAD) и цитохром P450–флавиномононуклеотид (FMN). Более активным оказался комплекс, в котором цитохром P450 ковалентно связан с FMN в соотношении 1 : 3. Каталитические константы скоростей реакций N-деметилирования диметиланилина и аминопирина и реакции гидроксирования анилина примерно в 2 раза меньше, чем константы скоростей аналогичных реакций, катализируемых микросомами — природными комплексами цитохрома P450 и редуктазы. Скорости реакций, катализируемых ковалентными и нековалентными комплексами P450–FAD в 10 раз меньше скоростей реакций, катализируемых микросомами.

В работе⁶¹ описана также мономолекулярная монооксигеназная система, образованная путем ковалентного связывания акцептора электронов — антибиотика блеомицина — с флавопротеином (NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазой). Скорости реакций с участием комплекса редуктаза–блеомицин в 10 раз меньше скоростей микросомальных реакций.

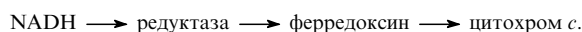
Редуктаза не обладает собственной каталитической активностью в монооксигеназных реакциях, однако при введении в молекулу редуктазы от 1 до 10 остатков гемаина полусинтетическая геморедуктаза проявляет активность в реакциях NADPH-зависимого N-деметилирования аминопирина ($k_{\text{cat}} = 0.7 \text{ мин}^{-1}$). Значения k_{cat} для аналогичных реакций, катализируемых микросомальной монооксигеназной системой и полусинтетическим флавоцитохромом 2B4, составляют 2.4 и 0.98 мин^{-1} соответственно.^{11, 12} Полусинтетическая геморедуктаза,⁶² представляющая собой ковалентный комплекс гемаина и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы, проявляла редуктазную активность по отноше-

нию к таким акцепторам электронов, как феррицианид калия, цитохром *c*, гемин.

При ковалентном связывании флаводоксина с ферредоксин-NADP⁺-редуктазой⁶³ в соотношении 1 : 1 получен искусственный фермент, способный катализировать с высокой эффективностью восстановление цитохрома *c*. Перенос электронов в этой системе происходит по той же схеме, что и в NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазе.



Ферредоксин-NADP⁺-редуктаза, модифицированная виологеном в присутствии карбодиимида, обнаруживает оксидазную активность, отсутствующую в нативном ферменте.⁶⁴ В отсутствие ферредоксина редуктаза не восстанавливает цитохром *c*, тогда как модифицированный фермент показывает высокую активность даже без ферредоксина. В отношении таких акцепторов электронов, как 2,6-дихлориндофенол и феррицианид, активность модифицированного фермента уменьшается в 2 раза, в то время как скорость цитохром *c*-редуктазных реакций увеличивается в 30 раз. Электронный транспорт в системе с немодифицированным ферментом происходит по следующей схеме:



При проведении реакций в присутствии супероксиддисмутазы конечным акцептором электронов для систем виологен-редуктаза является молекула кислорода, которая восстанавливается до супероксид-анион-радикала. Именно присутствием активных форм кислорода можно объяснить появление оксидазной активности у модифицированного фермента. При титровании восстановленной системы виологен-редуктаза было найдено, что перенос электронов к виологену осуществляется через флавиновую группу FAD, имеющуюся в составе редуктазы. Стандартный электродный потенциал виологена, ковалентно связанного с ферредоксин-NADP⁺-редуктазой, составляет –365 мВ, а виологена в растворе — –420 мВ. Потенциалы других участников процесса равны –320 (NADPH), –344 (редуктаза) и –420 мВ (ферредоксин). Для получения NADPH электрохимическим путем с помощью нативного фермента требуется донор электронов, способный восстановить ферредоксин, так как схема электронного транспорта в этом случае выглядит следующим образом:



В электрохимической системе виологен-редуктаза в присутствии NADP⁺ регистрируется электрический ток, что свидетельствует о существовании переноса электронов между электродами и системой виологен-редуктаза. Таким образом, данную систему можно использовать для регенерации NADPH.

Известно, что ферроцен и его производные являются эффективными переносчиками электронов. В работе⁶⁵ описана модификация глюкозооксидазы (GOx) ферроценкарбоновыми кислотами (FCA). Введение в молекулу GOx, содержащую две группы FAD, дополнительных групп — переносчиков электронов — делает ее способной участвовать в электрохимическом процессе. Оптимальное количество FCA-групп составляет 13 остатков на одну молекулу GOx. В нативной GOx восстановленный FADH₂ окисляется кислородом воздуха, а в ферроценглюкозооксидазе роль кислорода выполняют FCA, осуществляющие «внутренний» электронный транспорт. Ферроценглюкозооксидаза претерпевает следующие электрохимические превращения на электродах:



Расположение присоединенных остатков FCA по отношению к молекуле FAD играет более важную роль в электронном транспорте, чем их количество. Электронный потенциал пары FADH₂/FADH[•] составляет –219 мВ, а пары FCA⁺/FCA — +773 мВ; таким образом, движущая сила электронного транспорта в данной системе составляет ~1 В.

В работах^{66–68} описано модифицирование цитохрома P450_{cam} и β-лактамазы с помощью *N*-(2-ферроценил-этил)малеимида — нового электроактивного реагента — и показана электрохимическая активность модифицированных ферментов. Авторы считают перспективным использование *N*-(2-ферроценил-этил)малеимида для превращения электропассивных ферментов в электроактивные, а также для конструирования электрохимических сенсоров и исследования механизмов внутрибелкового электронного транспорта.

При ковалентном связывании глутатион-редуктазы с фоточувствительным красителем эозином в соотношении 1 : 2 получена фотоактивируемая система, которая может быть использована для восстановления глутатиона.⁶⁹ Эозин-модифицированная глутатион-редуктаза сохраняет 50% активности нативного фермента в NADPH-зависимой реакции. Однако полученная фотосистема оказалась в 1000 раз менее активной в отношении восстановления глутатиона, чем глутатион-редуктаза, использующая в качестве источника электронов NADPH.

VI. Влияние температуры на реакции, катализируемые гемопротейнами

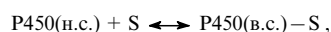
При исследовании реакций, катализируемых цитохромом P450 2B4, было показано, что повышение температуры приводит к возрастанию скорости гидроксирования субстратов. Например, при повышении температуры от 20 до 37°C каталитическая константа k_{cat} пероксид-зависимой реакции О-деалкилирования *n*-нитроанизола возрастает в 2 раза.⁷⁰

Каталитический цикл цитохрома P450 сложен и включает по крайней мере семь стадий.^{1,71} Наиболее подробно исследовано влияние температуры на стадию связывания субстратов (например, бензфетамина) с цитохромом P450 и на спиновое равновесие между низкоспиновой и высокоспиновой формами гемопротейна. В работе⁷² показано, что изменение температуры от 12 до 27°C не влияет на спектры поглощения цитохрома P450 2B4. Спектры не меняются и при добавлении бензфетамин (0.8 моль · л^{–1}). Константы диссоциации (K_d) и концентрации $[\text{ES}]_{\text{max}}$ фермент-субстратных комплексов зависят от температуры:

Температура, °C	K_d , мкмоль · л ^{–1}	$[\text{ES}]_{\text{max}}$, мкмоль · л ^{–1}
13.8	189 ± 5	0.085 ± 0.002
23.8	86 ± 5	0.087 ± 0.004

Как видно, концентрация фермент-субстратных комплексов при разных температурах остается практически постоянной. Однако эксперименты с использованием метода температурного скачка, суть которого заключается в том, что с помощью мощного электрического разряда достигается мгновенное повышение температуры в реакционной ячейке, показали усиление связывания субстрата с ферментом.⁷²

Субстрат-индуцированное спиновое равновесие следует бимолекулярному механизму



где н.с. и в.с. — концентрации низкоспиновой и высокоспиновой форм фермента. Каталитическую константу этой реакции можно записать в виде

$$k_{\text{cat}} = \frac{1}{\tau_f} = k_1([\text{E}]_{\text{eq}} + [\text{S}]_{\text{eq}}) + k_{-1},$$

где τ_f — быстрое время релаксации, т.е. время, в течение которого система переходит в новое состояние, $[E]_{eq}$ и $[S]_{eq}$ — равновесные концентрации фермента и субстрата. В отсутствие субстрата не наблюдается релаксации, что находится в соответствии с экспериментальными данными по влиянию температуры на спектры поглощения цитохрома P450, не связанного с субстратом.

Исследование электрохимического восстановления белка слияния[‡] редуктазы и цитохрома P450 4A1 в зависимости от температуры (в интервале от 4 до 36°C) показало, что максимальная скорость восстановления наблюдается при 22°C.⁶ Это связано с тем, что в электрохимической системе протекает несколько параллельных реакций, влияние температуры на которые различно.

VII. Влияние давления на каталитическую активность гемопротеинов

В работе⁷³ изучено влияние давления на кинетику и динамику конформационных превращений белков. Высокое давление используют для смещения химического и биохимического равновесия и изменения скоростей отдельных стадий ферментативных реакций.

Изменения реакционного и активационного (ΔV^* и ΔV^{**}) объемов, рассчитанные из экспериментов по воздействию высокого давления, могут быть использованы при исследовании механизмов действия ферментов и переходных состояний при образовании новых связей. Если ΔV^* и ΔV^{**} отрицательны, то в соответствии с принципом Ле-Шателье увеличение давления приводит к смещению равновесия в сторону образования продуктов ферментативной реакции.^{74, 75}

Подробно исследовано влияние высокого давления на бактериальный цитохром P450_{cam}, метаболизирующий камфору.^{76–79} Показано, что давление влияет на равновесие между низкоспиновым и высокоспиновым состояниями. Повышение давления до 2.2 кбар вызывает переход цитохрома P450_{cam} в неактивную форму P420. Хлорпероксидаза под воздействием высокого давления также переходит в форму C420.⁷⁵ В работе⁸⁰ было исследовано влияние сжатия под воздействием высокого давления на окислительно-восстановительный потенциал цитохрома *c*. Измеряя изменение стандартного потенциала (E^0) как функции давления (P), можно рассчитать реакционный объем ΔV^0

$$\left(\frac{\partial E^0}{\partial P}\right)_T = \frac{\Delta V^0}{nF},$$

где F — число Фарадея, $\Delta V^0 = \sum V_p^0 - \sum V_r^0$ ($\sum V_p^0$ и $\sum V_r^0$ — суммы стандартных мольных объемов продуктов и реагирующих веществ соответственно). При увеличении давления предпочтительным будет процесс, сопровождающийся уменьшением объема. Если рассматривать восстановительный процесс, то такой эффект будет вызывать сдвиг окислительно-восстановительного потенциала в положительном направлении. По данным авторов работы⁸⁰, при увеличении давления до 5 кбар происходит изменение потенциала от -5 мВ до $+76$ мВ. Кроме того, имеет место изменение мольного объема при переходе от окисленной к восстановленной форме цитохрома *c*:

$$I(\text{cyt } c(\text{Fe}^{2+})) - I(\text{cyt } c(\text{Fe}^{3+})) = -24 \text{ мл} \cdot \text{моль}^{-1}.$$

Эти результаты находятся в соответствии с данными структурных и физико-химических исследований: ферроцитохром *c* имеет более компактную структуру, чем феррицитохром *c*. Таким образом, изменяя давление, оказываемое на ферментативную систему, можно смещать химическое

равновесие в редокс-гемопротеинах в направлении образования восстановленной формы.

VIII. Заключение

Большинство ферментов, в том числе и гемопротеины, достаточно чувствительны к различным физическим и химическим воздействиям, которые могут вызвать полную или частичную потерю активности. Поэтому возникает необходимость создания искусственных ферментов на основе белков, обладающих большей стабильностью по отношению к такого рода воздействиям. В ряде работ искусственные гемопротеины получены в результате образования геминном^{32, 81} или его аналогами (октаэтилбиспорфиринатом кобальта, октапиридинометилфталоцианином кобальта и дифталоцианином лютеция)⁸² нековалентных специфических комплексов с сывороточным альбумином человека, бычьим сывороточным альбумином или с синтетическими пептидами.^{83, 84} Полученные соединения проявляют оксигеназную каталитическую активность в реакциях N-деметилирования аминопиррина и гидроксирования анилина. Активно развивается и другое направление — дизайн и получение методами белковой инженерии искусственных белков *de novo*, обладающих заданными структурой и функциональными свойствами.^{85, 86}

В настоящем обзоре обобщены данные по целенаправленному воздействию различных физико-химических факторов на отдельные стадии ферментативных процессов, катализируемых гемопротеинами. Рациональная комбинация физико-химических приемов применительно к природным, полусинтетическим или искусственным ферментативным системам может способствовать конструированию новых эффективных биосенсоров, тест-систем и биореакторов.

Литература

1. A.I. Archakov, G.I. Bachmanova. *Cytochrome P450 and Active Oxygen*. Taylor and Francis, London; New York; Philadelphia, 1990. P. 105
2. I.V. Berezin, S.D. Varfolomeev. In *Frontiers in Bioorganic Chemistry and Molecular Biology*. IUPAC, Pergamon Press, Oxford, 1980. P. 467
3. S.D. Varfolomeev, I.N. Kurochkin, A.I. Yaropolov. *Biosens. Bioelectr.*, **11**, 863 (1990)
4. H.A. Hill, N.I. Hunt. *Methods Enzymol.*, **227**, 501 (1993)
5. П.Мюр, Ф.Шеллер, М.Кюн. *Прикл. биохимия и микробиология*, **18**, 481 (1982)
6. K.M. Faulkner, M.S. Shet, C.W. Fisher, R.W. Estabrook. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7705 (1995)
7. S.A. Wring. *Analyst*, **117**, 1281 (1992)
8. E.F. Bowden, F.M. Hawkrig. *J. Electroanal. Chem.*, **161**, 355 (1984)
9. R.W. Estabrook, K.M. Faulkner, M.S. Shet, C.W. Fisher. *Methods Enzymol. (Cytochrome P450, Part B)*, **272**, 44 (1996)
10. R.W. Estabrook, M.S. Shet, C.W. Fisher, C.M. Jenkins, M.R. Waterman. *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 308 (1996)
11. V.V. Shumyantseva, V.Yu. Uvarov, O.E. Byakova, A.I. Archakov. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 829 (1996)
12. V.V. Shumyantseva, V.Yu. Uvarov, O.E. Byakova, A.I. Archakov. *Arch. Biochem. Biophys.*, **354**, 133 (1998)
13. В.В. Шумянцева, А.И. Арчаков, Р.Д. Шмидт. В кн. *II Съезд Биохимического общества РАН. (Тез. докл.)*. Москва, 1997. С. 544
14. I. Cruz Vieira, O. Fatibello-Filho. *Anal. Lett.*, **30**, 895 (1997)
15. W. Jin, F. Bier. *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 823 (1995)
16. J.F. Rusling, A.-E.F. Nassar. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11891 (1993)
17. E.I. Iwuoha, S. Joseph, Z. Lung, M.R. Smyth, U. Fuhr, P.R.O. Demontellano. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **17**, 1101 (1998)
18. W. Jin, U. Wollenberger, R. Bernhardt, W.F. M. Stocklein, F.W. Scheller. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **47**, 75 (1998)

‡ Белок слияния — белок, полученный генноинженерными методами и содержащий в одной полипептидной цепи и редуктазу, и цитохром P450 4A1.

19. A.-E.F.Nassar, J.F.Rusling. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3043 (1996)
20. W.Sun, J.Kong, J.Deng. *Anal. Lett.*, **29**, 2425 (1996)
21. M.Somasundrum, M.Tanticharoen, J.Kirtikara. *J. Electroanal. Chem.*, **407**, 247 (1996)
22. J.F.Rusling. *Acc. Chem. Res.*, **31**, 363 (1998)
23. Z.Zhang, A.-E.F.Nassar, Z.Lu, J.B.Schenkman, J.F.Rusling. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **93**, 1769 (1997)
24. A.C.Onuoha, X.Zu, J.F.Rusling. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3979 (1997)
25. R.W.Estabrook, M.S.Shet, K.M.Faulker, C.W.Fisher. *Endocrin. Res.*, **22**, 665 (1996)
26. Y.M.Lvov, Z.Lu, J.B.Schenkman, X.Zu, J.F.Rusling. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 4073 (1998)
27. М.А.Шлык, В.В.Никандров, Н.А.Зорин, А.А.Красновский. *Биохимия*, **54**, 1598 (1989)
28. В.В.Никандров, А.И.Аристархов, М.А.Шлык, А.А.Красновский. *Докл. АН СССР*, **319**, 242 (1991)
29. P.Cuendet, K.K.Rao, M.Gratrel, D.O.Hall. *Biochimie*, **68**, 217 (1986)
30. I.A.Shumilin, V.V.Nikandrov, V.O.Popov, A.A.Krasnovsky. *FEBS Lett.*, **306**, 125 (1992)
31. В.В.Никандров. *Биол. мембраны*, **15**, 598 (1998)
32. V.V.Shumyantseva, T.V.Bulko, A.G.Zimin, V.Yu.Uvarov, A.I.Archakov. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **39**, 503 (1996)
33. I.A.Shumilin, V.V.Nikandrov, A.A.Krasnovsky, V.O.Popov. *FEBS Lett.*, **328**, 189 (1993)
34. Y.Gu, P.Li, J.T.Sage, P.M.Champion. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4993 (1993)
35. J.T.Hazzard, C.A.McDonough, G.Tollin. *Biochemistry*, **33**, 13445 (1994)
36. A.Willie, P.S.Stayton, S.G.Sligar, B.Durham, F.Millett. *Biochemistry*, **31**, 7237 (1992)
37. E.H.Yonemoto, R.L.Riley, Y.II.Kim, S.J.Atherton, R.H.Schmehl, T.E.Mallouk. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8081 (1992)
38. D.S.Wuttke, H.B.Gray. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8455 (1993)
39. D.W.Conrad, H.Zhang, D.E.Stewart, R.A.Scott. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9909 (1992)
40. A.V.Hodgson, H.W.Strobel. *Anal. Biochem.*, **243**, 154 (1996)
41. I.Hamachi, A.Fujita, T.Kunitake. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8811 (1994)
42. К.Мартинек, А.В.Левашов, Н.Л.Клячко, И.В.Березин. *Докл. АН СССР*, **236**, 920 (1977)
43. Н.Л.Клячко, А.В.Левашов, К.Мартинек. *Молекуляр. биология*, **18**, 1019 (1984)
44. A.V.Kabanov, A.V.Levashov, N.L.Klyachko, K.Martinek. *J. Theor. Biol.*, **133**, 327, (1988)
45. А.В.Левашов. *Биотехнология. (Итоги науки и техники)*. Изд-во ВИНТИ, Москва, 1987. С. 112
46. Д.И.Метелица. *Успехи соврем. биологии*, **28**, 145 (1988)
47. А.Н.Еремин, А.В.Литвинчук, Д.И.Метелица. *Биохимия*, **61**, 664 (1996)
48. Г.С.Арапова, А.Н.Еремин, Д.И.Метелица. *Биохимия*, **63**, 1400 (1998)
49. S.B.Lamb, D.C.Lamb, S.L.Kelly, D.S.Stuckley. *FEBS Lett.*, **431**, 343 (1998)
50. Н.Л.Клячко, Н.Г.Богданова, А.В.Левашов, А.В.Кабанов, А.В.Пшежецкий, Ю.Л.Хмельницкий, К.Мартинек, И.В.Березин. *Докл. АН СССР*, **297**, 483 (1987)
51. N.L.Klyachko, A.M.Klibanov. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **37**, 53 (1992)
52. A.M.Klibanov. *Trends Biochem.*, **14**, 141 (1989)
53. К.Ху, К.Grebenow, A.M.Klibanov. *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 485 (1997)
54. A.M.Klibanov. *Nature (London)*, **374**, 596 (1995)
55. U.R.Desai, J.J.Osterhout, A.M.Klibanov. *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 9420 (1994)
56. S.A.Martins, S.R.Blanke, L.P.Hager, S.G.Sligar. *Biochemistry*, **35**, 14530 (1996)
57. J.Wu, D.G.Gorenstein. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6843 (1993)
58. H.L.Levine, E.T.Kaiser. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 7670 (1978)
59. T.Kokubo, S.Sassa, E.T.Kaiser. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 606 (1987)
60. J.Kuriyan, R.J.Simon, T.Kokubo, E.T.Kaiser, A.Pahler. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6261 (1988)
61. V.Yu.Uvarov, V.V.Shumyantseva, E.A.Bukovskaya, L.N.Kolyada, A.I.Archakov. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 722 (1994)
62. V.V.Shumyantseva, T.L.Moskvitina, T.V.Bulko, A.I.Archakov. *FASEB J. Abstr.*, **11**, 288 (1997)
63. M.C.Pirola, F.Monti, A.Aliverti, G.Zanetti. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 480 (1994)
64. M.T.Bes, A.L.de Lacey, M.L.Peteato, V.M.Fernandez, C.Gomez-Moreno. *Eur. J. Biochem.*, **233**, 593 (1995)
65. A.Badia, R.Carlini, A.Fernandez, F.Battaglini, S.R.Mikkelsen, A.M.English. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7053 (1993)
66. K.Di Gleria, H.A.O.Hill, L.L.Wong. *FEBS Lett.*, **390**, 142 (1996)
67. K.Di Gleria, C.M.Halliwell, C.Jacob, H.A.O.Hill. *FEBS Lett.*, **400**, 155 (1997)
68. K.Di Gleria, D.P.Nickerson, H.A.O.Hill, L.-L.Wong, V.Fülöp. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 46 (1998)
69. I.Willner, E.Zahavy. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **33**, 581 (1994)
70. V.Yu.Uvarov, V.E.Tretiakov, A.V.Leschenko, C.S.Dzuzenova, L.Z.Tretiakova, I.G.Rukavishnikov, A.I.Archakov. *Eur. J. Biochem.*, **181**, 391 (1989)
71. X.Fang, Y.Kobayashi, J.R.Halpert. *FEBS Lett.*, **416**, 77 (1997)
72. Sh.Narasimhulu. *Biochemistry*, **32**, 10344 (1993)
73. E.Morild. *Adv. Protein Chem.*, **34**, 93 (1981)
74. K.Herenamans. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **11**, 1 (1982)
75. G.Hui Bon Hoa, C.Di Primo, I.Dondaine, S.G.Sligar, I.Gunsalus, P.Douzon. *Biochemistry*, **28**, 651 (1989)
76. G.Hui Bon Hoa, C.Di Primo, E.Deprez. In *Proceedings of the 7th International Conference on Biochemistry and Biophysics of P450. Structure and Function, Biotechnological and Ecological Aspects*. Moscow, 1992. P. 21
77. M.T.Cruanes, K.K.Rodgers, S.G.Sligar. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9660 (1992)
78. D.R.Davydov, E.Deprez, G.Hui Bon Hoa, T.V.Khyushko, G.P.Kuznetsova, Ya.M.Koen, A.I.Archakov. *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**, 330 (1995)
79. D.R.Davydov, G.Hui Bon Hoa, J.Peterson. *Biochemistry*, **38**, 751 (1999)
80. R.A.Tschirret-Guth, G.Hui Bon Hoa, P.R.Ortiz de Montellano. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 3590 (1998)
81. О.Б.Русь, А.В.Пучкаев, Д.И.Метелица. *Биохимия*, **61**, 1813 (1996)
82. V.V.Shumyantseva, T.L.Moskvitina, L.G.Tomilova, G.N.Novodaroova, V.Yu.Uvarov, G.V.Ponomarev, A.I.Archakov. In *XI-th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations. (Abstracts of Reports)*. Los Angeles, 1996. P. 198
83. R.E.Sharp, C.C.Moser, F.Rabanal, P.L.Dutton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10465 (1998)
84. M.W.Mutz, M.A.Case, J.F.Wishart, M.R.Ghadiri, G.L.McLendon. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 858 (1999)
85. Д.А.Долгих, М.П.Кирпичников, О.Б.Птицын, В.В.Чемерис. *Молекуляр. биология*, **30**, 261 (1996)
86. D.A.Dolgikh, V.N.Uversky, A.E.Gabrielian, V.V.Checheris, A.N.Fedorov, E.V.Navolotskaya, V.A.Zav'yalov, M.P.Kirpichnikov. *Protein Eng.*, **2**, 195 (1996)

REGULATION OF CYTOCHROME P450S CATALYTIC ACTIVITIES BY MEANS OF PHYSICO-CHEMICAL METHODS**V.V.Shumyantseva, T.V.Bulko, A.I.Archakov***Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences**10, Pogodinskaya ul., 119832 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)245-0857*

Physico-chemical factors influencing the catalytic activity of hemoproteins, in particular, cytochromes P450, used in biosensors and bioreactors, are considered. The author's data on the preparation of semisynthetic hemoproteins based on cytochrome P450 2B4 and NADP-dependent cytochrome P450 reductase are presented. The use of alternative electron sources (electrochemical and photochemical reduction) for the redox cycle of hemoproteins is discussed. The influence of temperature, pressure, organic solvents and chemical modification of proteins on the efficiency of enzymic reactions catalysed by hemoproteins is analysed.

Bibliography — 86 references.

Received 20th April 1998