

На правах рукописи

РУДАКОВ Юрий Олегович

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦИТОХРОМА P450
2B4 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОКОМПОЗИТНЫХ ЭЛЕКТРОДНЫХ
МАТЕРИАЛОВ: СТЕХИОМЕТРИЯ И ТЕРМОДИНАМИКА**

03.00.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва

2009

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук Научно-исследовательском институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАМН

Научный руководитель: доктор биологических наук
Виктория Васильевна Шумянцева

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ольга Михайловна Ипатова

доктор химических наук, профессор
Аркадий Аркадьевич Карякин

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук
Институт биохимии им. А. Н. Баха
РАН

Защита диссертации состоится __ _____ в __ часов на заседании диссертационного совета Д.001.010.01 при ИБМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБМХ РАМН по адресу: 119121, Москва, ул. Погодинская, 10.

Автореферат разослан «__» _____ 2009 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук

Карпова Елена Анатольевна

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы.

Цитохромы P450 – гемопротеины, характерные почти для всех живых существ. В организме человека они содержатся в различных органах и тканях (Lewis D. F. V., 2001). Цитохромы P450 обладают свойством гидроксилировать неактивные атомы углерода органических молекул, повышая полярность гидрофобных ксенобиотиков, и способствуют их выведению из организма (Archakov A.I. *et al.*, 1990; Ortiz de Montellano P. R., 1995). Цитохромы P450 катализируют около 60 типов химических реакций и метаболизируют примерно 1 миллион различных соединений, участвуют в синтезе стероидных гормонов (Lewis D.F.V., 2001; Archakov A.I. *et al.*, 1990; Zangar R.C. *et al.*, 2004). В последнее время пристальное внимание уделяется персонифицированной медицине и роли цитохромов P450 в метаболизме отдельного организма (Nicholson J.K., 2006; Карузина И.И., 2008). Все это делает цитохромы P450 перспективными объектами в создании биосенсоров для анализа потенциальных лекарственных препаратов (Wang J. *et al.*, 1999) и оценке индивидуальной переносимости пациентами химиотерапии, правильном выборе методов лечения.

Ранее была показана возможность замены доноров электронов NAD(P)H и дополнительных белков редокс-партнеров электрохимическим восстановлением цитохромов P450 (Faulkner K. *et al.*, 1995; Kazlauskaite J. *et al.*, 1996; Rusling J.F., 1998; Lei C. *et al.*, 2000; Joseph S. *et al.*, 2003; Shumyantseva V.V. *et al.*, 2004). Биоэлектрохимические цитохром P450-системы эффективны для анализа фермент-субстратных взаимодействий. Изучение стехиометрии таких систем, моделирующих природный каталитический цикл, особенно важно для последующего конструирования сенсорных устройств, направленных на анализ новых лекарственных форм.

Целью данной работы было изучение стехиометрических соотношений компонентов электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4 (субстратов – бензфетамина и кислорода, образующегося пероксида водорода и формальдегида как продукта N-деметилования субстрата) и определение термодинамических параметров электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Имобилизовать цитохром P450 2B4 на печатный электрод, сохранив каталитическую активность фермента.

2) Разработать метод детекции продуктов электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4, иммобилизованного на печатный электрод, позволяющий регистрировать образование пероксида и поглощение кислорода в кинетическом режиме.

3) На основании полученных количественных данных об образовании пероксида водорода, N-деметиловании субстрата и поглощении кислорода, определить стехиометрические параметры электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4, иммобилизованного на печатный электрод.

4) Определить зависимость окислительно-восстановительного потенциала цитохрома P450 2B4 от температуры в анаэробных условиях, рассчитать термодинамические параметры электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4.

Научная новизна работы.

Впервые был предложен биелектродный метод детекции пероксида водорода, образующегося в результате электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4, иммобилизованного на печатном электроде. В работе впервые определены стехиометрические параметры электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4 в присутствии и отсутствии субстрата (бензфетамина), что позволяет сравнить модельную систему иммобилизованного цитохрома P450 2B4 с природной монооксигеназной системой. Определены термодинамические параметры электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4, сделаны выводы о вкладе термодинамических параметров в электрохимический потенциал.

Научно-практическая ценность работы.

В результате проведенного исследования разработаны методы получения биосенсоров с полимерным покрытием, стабилизирующим фермент, которые могут быть использованы в качестве системы, моделирующей природный цикл цитохрома P450 2B4.

Разработана биелектродная схема, позволяющая при соответствующем выборе измерительного электрода анализировать продукты электрохимических реакций в кинетическом режиме. При использовании в качестве измерительного электрода сенсора с наноразмерным покрытием берлинской лазури или сенсора с иммобилизованным цитохромом *c* были проведены количественные измерения пероксида водорода. Микроэлектрод Кларка использовали для измерения поглощения кислорода в электрокаталитическом цикле цитохрома P450 2B4.

Показана адекватность замены редокс-партнеров и дорогостоящих восстановительных агентов NADH и NADPH цитохрома P450 2B4 электрохимическим восстановлением.

Экспериментально определена зависимость окислительно-восстановительного потенциала от температуры и рассчитаны термодинамические параметры электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4 при иммобилизации на структурированный наночастицами золота графитовый электрод.

Апробация работы.

Основные результаты диссертационной работы были доложены на международной конференции «Биотехнология и медицина» (Москва, 2006), VII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2008» (Уфа, 2008), V Конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» (Москва, 2008), Итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2008 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (Москва, 2008), Первом международном форуме по нанотехнологиям (Москва, 2008). По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 5 публикаций в сборниках докладов научных конференций.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, посвященного материалам и методам наноструктурирования поверхности электродов, используемых в биоэлектрохимии, глав «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», выводов и списка цитируемой литературы, включающего 307 источников. Работа изложена на 138 страницах текста, содержит 33 рисунка и 4 таблицы.

Материалы и методы.

Реактивы: цитохром *c* сердца лошади (Merck), цитохром P450 2B4 (17-18 нмоль/мг, $A_{418}/A_{278} = 1.5$), выделенный из печени кроликов, индуцированных фенобарбиталом, и очищенный, как было описано ранее (Karuzina I.I. *et al.*, 1999), дидодецилдиметиламмоний бромид (ДДАБ) (Sigma-Aldrich), золотохлористоводородная кислота $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоная

кислота), АБТС (Sigma-Aldrich), боргидрид натрия (Acros organics), каталаза (2800 ед/мг, Sigma), ацетилацетон (Aldrich), ацетат аммония (РЕАХИМ), уксусная кислота (РЕАХИМ), 5% раствор нафиона в низкомолекулярных спиртах (Fluka). Все другие использованные в работе вещества были по степени очистки не ниже уровня о. с. ч. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду.

В работе использовались трехконтактные печатные электроды, рабочий (диаметр 2 мм) и вспомогательный электроды – графитовые, электрод сравнения – хлорсеребряный (ООО НПП «ЭЛКОМ», Россия, www.elcom-moscow.ru).

Золотые наночастицы, стабилизированные ДДАБ получали восстановлением водного раствора золотохлористоводородной кислоты боргидридом натрия по методике, описанной ранее (Shumyantseva V.V. *et al.*, 2004).

Приготовление ферментных электродов.

На рабочую поверхность электрода наносили 2 мкл раствора золотых наночастиц, стабилизированных дидодецилдиметиламмоний бромидом (Au/ДДАБ-электрод) в хлороформе и инкубировали в течение 30 минут для испарения хлороформа.

Иммобилизация цитохрома P450 2B4. На модифицированный Au/ДДАБ-электрод наносили 0,2 нмоль (2 мкл 100 мкМ раствора) цитохрома P450 2B4, через 30 минут наносили 1 мкл 5% нафиона. Перед проведением эксперимента электрод выдерживали при +5°C в течение 12 часов.

Иммобилизация цитохрома с. На электроды Би наносили 2 нмоль (2 мкл 1мМ раствора) цитохрома с в 0,1М калий-фосфатном буфере (рН 7,4), через 30 минут наносили 1 мкл 5% раствора нафиона.

Приготовление биферментных электродов.

Перед иммобилизацией фермента на рабочую поверхность электрода наносили 2 мкл раствора золотых наночастиц, стабилизированных дидодецилдиметиламмоний бромидом (ДДАБ) в хлороформе и инкубировали в течение 30 минут.

На электроды Би наносили 2 нмоль цитохрома с (2 мкл 1 мМ раствора в 0,1М калий-фосфатном буфере), 0,2 нмоль цитохрома P450 2B4 (2 мкл 100 мкМ раствора в 0,1М калий-фосфатном буфере), через 30 минут наносили 1 мкл 5% раствора нафиона.

Электрохимические измерения проводились с использованием потенциостата Autolab PGSTAT 10 (Eco Chemie, Нидерланды) с программным обеспечением GPES. Электрохимический сигнал электродов с иммобилизованным цитохромом P450 2B4 регистрировали методом циклической вольтамперометрии. Измерения проводились в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 50 мМ NaCl (электролитный буфер), скорости

сканирования от 5 до 200 мВ/с, в интервале потенциалов $+200 \div -700$ мВ. Значения потенциалов приведены относительно хлорсеребряного электрода (Ag/AgCl) сравнения.

Для регистрации в кинетическом режиме образования пероксида водорода и поглощения кислорода был использован бипотенциостат IPC-Tween (Институт физической химии и электрохимии им. Фрумкина РАН, Россия) с программным обеспечением IPC_Tween. Данный прибор позволяет поддерживать заданное напряжение независимо на каждом из двух рабочих электродов (измерительном и операционном с иммобилизованным цитохромом P450 2B4).

Электрохимическое восстановление цитохрома P450 2B4 проводилось в 0,5 мМ растворе бензфетамина (или без субстрата) в электролитном фосфатном буфере при потенциале на рабочем электроде $E = -450$ мВ.

В качестве датчиков пероксида водорода использовались печатные электроды, модифицированные берлинской лазурью (Puganova E.A. *et al.*, 2005), а также печатные графитовые электроды, модифицированные цитохромом *c* (Krylov A.V. *et al.*, 2004). Потенциал, подаваемый на измерительные электроды, был равен 0 мВ и -50 мВ, соответственно. Определение концентрации пероксида водорода проводили по градуировочному графику. Концентрацию пероксида водорода в исходном растворе определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{240}=43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Krylov A.V. *et al.*, 2004).

Измерение количества кислорода, поглощаемого в ходе ферментативной реакции цитохрома P450 2B4, производили амперометрически с помощью микроэлектрода Кларка (Instech, США) при потенциале -700 мВ (Clark L.C., 1953). Над раствором создавалась атмосфера аргона для предотвращения дополнительного доступа кислорода воздуха в ячейку. Калибровка микроэлектрода Кларка проводилась амперометрически, измерением тока при атмосферном давлении (100% содержания кислорода, 240 мкМ) (Clark L.C., 1953; <http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/solutions/faq/predicting-DO.shtml>) с последующим добавлением дитионита натрия и регистрацией максимального изменения тока, принимаемого за нулевое значение кислорода в буфере. Разность значений этих токов принималась за величину, соответствующую концентрации растворенного в буфере кислорода.

Для определения термодинамических параметров каталитического цикла на электроде с иммобилизованным цитохромом P450 2B4 регистрировались цикловольтамперограммы в анаэробных условиях в диапазоне температур $5 \div 40^\circ\text{C}$ с шагом 5°C . Из цикловольтамперограмм определяли величины окислительно-восстановительного потенциала для каждой температуры как среднее значение соответствующих потенциалов

$E_{p,a}$ и $E_{p,c}$. Термодинамические параметры рассчитывались из зависимостей E^0 от T и E^0/T от $1/T$. В работе использовался термостат ThermoStatPlus (Eppendorf, США).

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Cary 100 (Varian Inc, Нидерланды). Скорость N-деметилования бензфетамина в каталитической реакции цитохрома P450 2B4 определяли по количеству выделившегося формальдегида, дающего окрашенный продукт с реактивом Нэша, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{412} = 4000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Nash T., 1953; Kanaeva I.P. *et al.*, 1999).

Измерение пероксида водорода, образовавшегося в результате электрокаталитической реакции цитохрома P450 2B4, проводили спектрофотометрически с использованием пероксидазы хрена и субстрата АБТС.

Для проведения экспериментов в присутствии каталазы в 1 мл рабочего буфера добавляли каталазу (2800 ед/мг) и проводили электролиз с использованием электродов Би/P450 2B4/нафион в течение 1 часа при контролируемом напряжении -450 мВ (относительно Ag/AgCl). Концентрацию образовавшегося пероксида водорода определяли спектрофотометрически, используя пероксидазу хрена и АБТС, $\epsilon_{405} = 36800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Изображения СЭМ для электродов, модифицированных ДДАБ и Au/ДДАБ получены с помощью S-3400N Hitachi Scanning Electron Microscope. Образцы для СЭМ готовили нанесением на поверхность электрода 2 мкл 0,1М ДДАБ или раствора Au/ДДАБ, полученного по описанной выше методике.

Результаты и обсуждение.

I. Исследование стехиометрии электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4.

1. Электрохимические характеристики ферментных электродов.

Между печатным графитовым электродом, модифицированным золотыми наночастицами, стабилизированными синтетическим поверхностно-активным веществом дидодецилдиметиламмонийбромидом (ДДАБ) и гемом цитохрома P450 2B4, включенного в эту матрицу, наблюдается прямой безмедиаторный перенос электронов (Shumyantseva V.V. *et al.*, 2007).

Золотые наночастицы, иммобилизованные на поверхности электрода, играют роль ансамбля нанoeлектродов, облегчающей электронный транспорт от электрода на гем цитохрома P450 2B4. Это приводит к усилению электрохимического отклика системы, что известно из литературных данных на примере различных белков и нуклеиновых кислот

(Riley D.J., 2002; Ribrioux S. *et al.*, 1996; Penn S.G. *et al.*, 2003; Cheng W. *et al.*, Wang J., 2005; Broun K.R. *et al.*, 1996) и подтверждено в наших исследованиях. Сравнительные цикловольтамперограммы для электродов Au/ДДАБ/Р450 2В4/нафион и ДДАБ/Р450 2В4/нафион приведены на рис. 1.

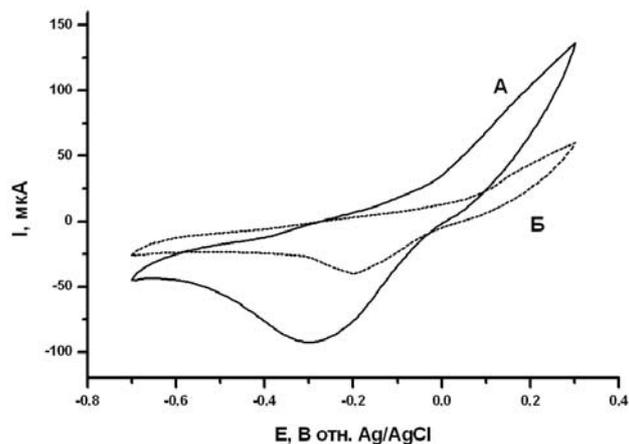


Рис. 1. Влияние золотых наночастиц на величину каталитического тока цитохрома Р450 2В4, иммобилизованного на печатном электроде. Циклические вольтамперограммы электродов: А) Au/ДДАБ/Р450 2В4/нафион, Б) ДДАБ/Р450 2В4/нафион. Скорость сканирования $v=50$ мВ/с. Аэробные условия. 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7.4), содержащий 0,05 мМ NaCl, объем электролита 1 мл.

Золотые наночастицы были охарактеризованы спектрофотометрически ($\lambda_{\max} = 520$ нм) и с помощью сканирующей электронной микроскопии: размер частиц составляет 40-70 нм (рис. 2).

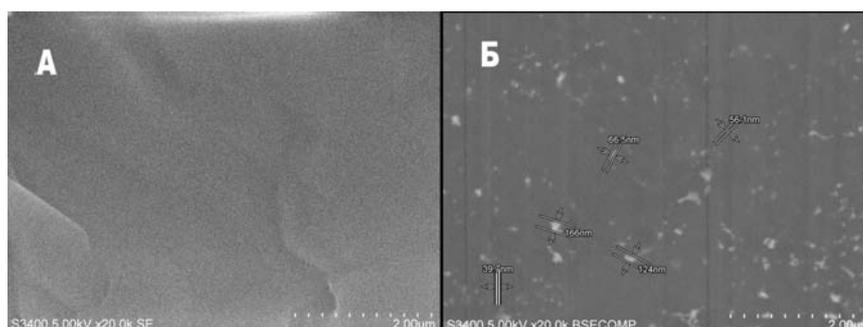


Рис. 2 Данные сканирующей электронной микроскопии для печатных электродов, модифицированных ДДАБ (А), Au/ДДАБ в хлороформе (Б).

При скоростях сканирования от 5 мВ/с до 250 мВ/с зависимости величин катодного и анодного тока от скорости сканирования в анаэробных условиях линейны, что говорит о том, что электрохимические процессы протекают на поверхности электрода (Murray R.W.

et al., 1984; Bard A. J. *et al.*, 1980): регистрируются электрохимические процессы, происходящие на иммобилизованном гемопротеине, а не в растворе.

В аэробных условиях восстановительный катодный пик на цикловольтамперограммах увеличивается, а окислительный пик полностью исчезает. Это говорит об электрокаталитической активности цитохрома P450 2B4 по отношению к кислороду, поскольку восстановленная форма цитохрома (феррицитохром Fe^{2+}) связывает кислород с большей скоростью ($k > 106 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) (Archakov A.I. *et al.*, 1990 Lewis D. F. V., 2001). Отношение каталитического (в присутствии кислорода) и диффузионного тока (в атмосфере аргона) $I(\text{O}_2)/I(\text{Ar})$ равно 1,8. В присутствии органического субстрата (бензфетамина) и кислорода, каталитический ток возрастает. Отношение каталитического (в присутствии 50 мМ бензфетамина) и диффузионного тока (в атмосфере аргона) $I(\text{BF})/I(\text{Ar})$ равно 2,2.

Цитохром *c* является классическим объектом исследования электрохимии гемопротеинов. Были приготовлены биферментные электроды Au/ДДАБ/P450 2B4/цитохром *c* с иммобилизованным цитохромом *c* в качестве внутреннего электрохимического стандарта.

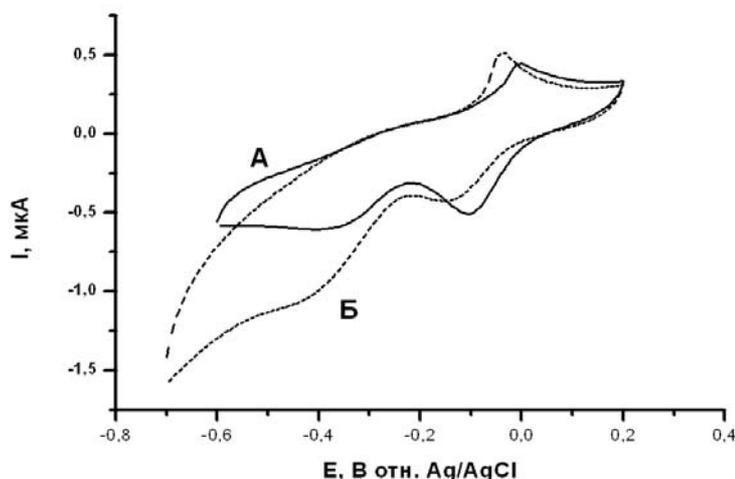


Рис. 3 Цикловольтамперограммы для биферментного электрода Au/ДДАБ/P450 2B4/цит *c*/нафийон в А) анаэробных и Б) аэробных условиях. Скорость сканирования $\nu=50$ мВ/с. 0,1 М калий-фосфатный буфер (рН 7,4), содержащий 0,05 мМ NaCl, объем электролита 1 мл.

Редокс-потенциал цитохрома *c* E_0 равен -51 мВ, ΔE^0 равно 90 мВ как в буфере, содержащем кислород, так и в анаэробных условиях. Также как и в случае электродов с иммобилизованным цитохромом P450 2B4, в присутствии кислорода окислительный пик цитохрома P450 2B4 на цикловольтамперограммах биферментных электродов исчезал, а

восстановительный увеличивался. Это говорит о том, что цитохром *c* является только переносчиком электронов, а в случае цитохрома P450 2B4 происходит восстановление железа гема $\text{Fe}^{+3} + 1\text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{+2}$, а также связывание кислорода его восстановленной формой с последующим восстановлением кислорода.

Поверхностная концентрация электроактивного фермента для электродов Au/ДДАБ/P450 2B4/нафион в тонких пленках рассчитана с помощью закона Фарадея и составила 5-15% (10-30 пмоль/электрод).

2. Методы количественной оценки генерации H_2O_2 в электрохимических реакциях.

Одной из задач исследования было разработать кинетический метод измерения пероксида водорода в режиме реального времени. Для этого была предложена схема с использованием бипотенциостата, позволяющего одновременно подавать различные потенциалы на два рабочих электрода, находящихся в одной измерительной ячейке. Один из электродов является операционным, второй – измерительным.

В качестве операционного электрода использовался графитовый печатный электрод с иммобилизованным цитохромом P450 2B4 (при потенциале $E = -450$ мВ), в качестве измерительного электрода для регистрации пероксида водорода использовались электроды, модифицированные берлинской лазурью ($E=0$) (Puganova E.A. *et al.*, 2005; Ricci F. *et al.*, 2003) или модифицированные цитохромом *c* ($E = -50$ мВ) (Krylov A.V. *et al.*, 2004).

Выбор метода биэлектродной детекции был обусловлен возможностью регистрации в кинетическом режиме поглощения кислорода и образования пероксида водорода. Сенсоры на основе печатных электродов, модифицированных берлинской лазурью или цитохромом *c*, характеризуются достаточной чувствительностью измерений, легкостью калибровки, возможностью неоднократного использования для определения пероксида водорода. Такой подход позволил вести измерения в режиме реального времени, получая истинную картину изменения концентраций продуктов цитохром P450-зависимой электрокаталитической реакции при контролируемом напряжении ($E = -450$ мВ) в течение эксперимента.

Необходимо отметить, что ни один из компонентов, используемых для модификации электрода (исключая фермент), не электроактивен в исследуемой области потенциалов, что подтверждают контрольные эксперименты: цикловольтамперограммы электродов, модифицированных ДДАБ, нафионом, нано-Au в различных комбинациях, и литературные данные.

Для определения стехиометрических параметров каталитического цикла цитохрома P450 2B4 были проведены эксперименты по измерению количества образующегося пероксида водорода в присутствии субстрата цитохрома P450 2B4 – бензфетамина и в его отсутствии. В экспериментах с каталазой (Au/ДДАБ/P450 2B4-электрод, $E = -450$ мВ, 1 час) пероксид водорода не регистрируется как в присутствии, так и в отсутствии органического субстрата.

Электроды с иммобилизованным цитохромом *c* показали чувствительность к пероксиду водорода в диапазоне 1-1000 мкМ. Электроды были откалиброваны пероксидом водорода в диапазоне концентраций 1-100 мкМ.

Как видно из рисунков 4,5, без субстрата – бензфетамина, – количество образующегося пероксида водорода в ходе электрокаталитической реакции растет и достигает максимума примерно к 20-25 минуте (кривая *a* на рис. 4, кривая *a* на рис. 5). В присутствии бензфетамин скорость образования и количество образующегося пероксида водорода существенно меньше (кривая *б* на рис. 4, кривая *б* на рис. 5). Субстрат направляет реакцию по «продуктивному» пути, в сторону большего сопряжения и в направлении монооксигеназной реакции. Нельзя исключить и пероксидазную активность цитохрома P450 2B4, приводящую к изменению стехиометрических соотношений в процессе электрокатализа (Vatsis K.P. *et al.*, 2005).

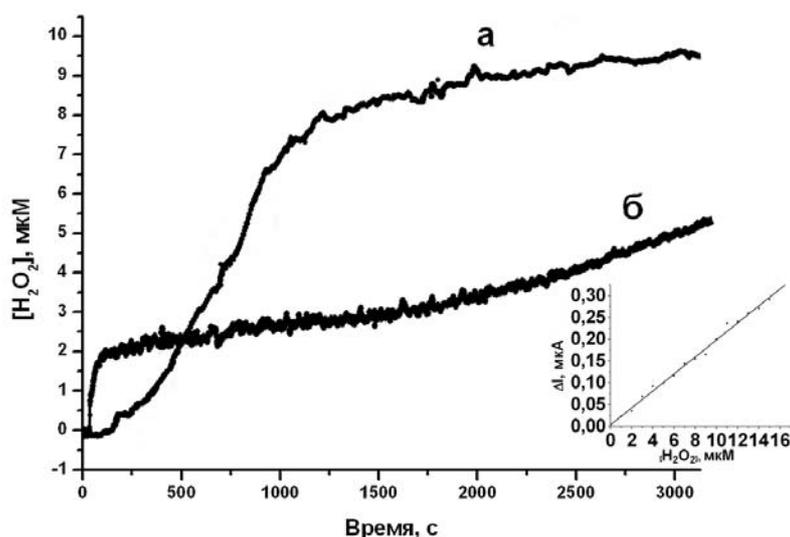


Рис. 4 Кинетические кривые образования пероксида водорода в ходе ферментативной реакции цитохрома P450 2B4, регистрируемые с помощью электрода, модифицированного берлинской лазурью а) без субстрата, б) в присутствии 0,5 мМ раствора бензфетамин. График получен из экспериментальных кривых зависимости тока от времени. Концентрацию пероксида водорода рассчитывали по калибровочной кривой. Врезка – калибровочный график для электрода, модифицированного берлинской лазурью.

В таблице 1 приведены результаты расчета скоростей образования пероксида водорода по данным, полученным с помощью различных методов детекции. Концентрации H_2O_2 , полученные спектрофотометрическим и амперометрическим (электрод, модифицированный берлинской лазурью) методами практически совпадают.

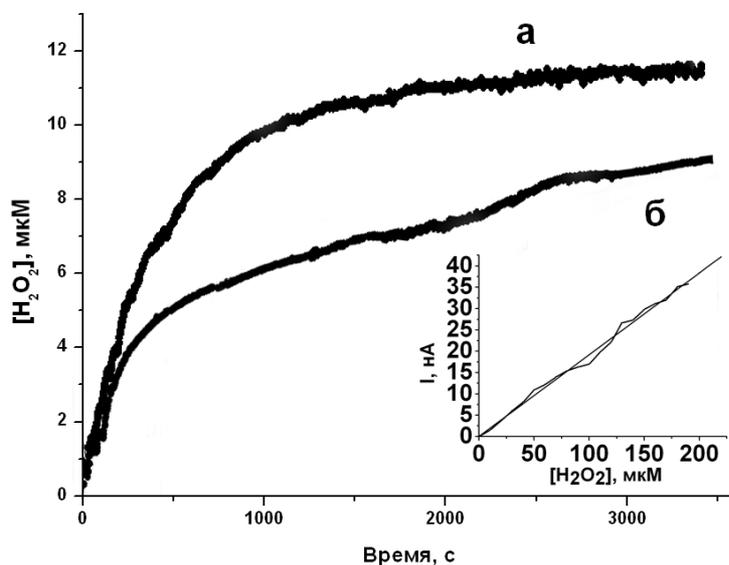


Рис. 5 Кинетические кривые образования пероксида водорода в ходе ферментативной реакции цитохрома P450 2B4, полученные с помощью электрода, модифицированного цитохромом с а) без субстрата, б) в присутствии 0,5 мМ раствора бензфетамина. График получен из экспериментальных кривых зависимости тока от времени. Концентрацию пероксида водорода рассчитывали по калибровочной кривой. Врезка – калибровочный график для электрода, модифицированного цитохромом с.

Скорости электрокаталитического N-деметилирования бензфетамина цитохромом P450 2B4 измеряли спектрофотометрически по накоплению в рабочем растворе продукта ферментативной реакции – формальдегида.

Во время проведения электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4 в присутствии 0,5 мМ раствора бензфетамина в течение 60 мин, скорость N-деметилирования составила $2,5 \pm 0.4 \text{ нмоль} \cdot (\text{нмоль фермента})^{-1} \cdot (\text{мин})^{-1}$. По сравнению с природной микросомальной системой это более низкие скорости. Однако если учесть, что электроактивны только 15 % от общего количества иммобилизованного фермента, то скорости N-деметилирования бензфетамина становятся сопоставимыми со скоростями микросомальной системы ($14,4 \pm 0.5 \text{ нмоль} \cdot (\text{нмоль фермента})^{-1} \cdot (\text{мин})^{-1}$ для микросомальной системы и $17 \pm 3 \text{ нмоль} \cdot (\text{нмоль электроактивного фермента})^{-1} \cdot (\text{мин})^{-1}$ для электролиза при контролируемом напряжении (Табл. 1).

Таблица 1.

Скорости образования H_2O_2 , формальдегида и поглощения кислорода в электрокаталитическом цикле цитохрома P450 2B4 и в условиях микросомального окисления.

	H_2O_2 (нмоль·(нмоль фермента) ⁻¹ ·(мин) ⁻¹)			Поглощение O_2 (нмоль·(нмоль фермента) ⁻¹ ·(мин) ⁻¹)	Продукт реакции (формальдегид) (нмоль·(нмоль фермента) ⁻¹ ·(мин) ⁻¹)
	спектрофотометрия	амперометрия		амперометрия	спектрофотометрия
	пероксидаза хрена/АБТС	Электрод с БЛ	Электрод с цитохромом с	Электрод Кларка	Реактив Нэша
В отсутствии субстрата (E=-450 мВ)	4,3±0,7	4,4±0,7	5,6±0,8	4,8±0,4	-
В присутствии субстрата (E=-450 мВ)	2,6±0,5	3,0±0,5	4,3±0,7	19,4±0,6	17±3
Микросомы* свободное окисление, NADPH	3,14	-	-	3,6±0,2	-
Микросомы* бензфетамин NADPH	2,8	-	-	21,6±0,6	14,4±0,5

Электролиз цитохрома P450 2B4 проводился при потенциале E= -450 мВ в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 0,05 мМ NaCl, объем электролита 1 мл, в течение 1 часа, в качестве субстрата использовали 0,5 мМ раствор бензфетамина.

* Данные (Zhukov A.A. et al., 1985). Авторы проводили измерение пероксида водорода тиоцианатным методом. Содержание цитохрома P450 2B4 в микросомальной фракции принято равным 5 нмоль/мг белка.

3. Определение количества кислорода, участвующего в электрокатализе.

Для исследования стехиометрии электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4 были проведены эксперименты по определению количества поглощаемого в

ходе электрокаталитического цикла кислорода, поскольку последний является косубстратом цитохрома P450.

Для этого использовали биэлектродную схему с операционным электродом Au/ДДАБ/P450 2В4 и электродом Кларка для измерения поглощения кислорода (Clark L.C., 1953).

В присутствии субстрата (кривая б на рис.6) иммобилизованный фермент потребляет значительно больше кислорода, что согласуется с данными, полученными для природной микросомальной системы (Zhukov A.A. *et al.*, 1985).

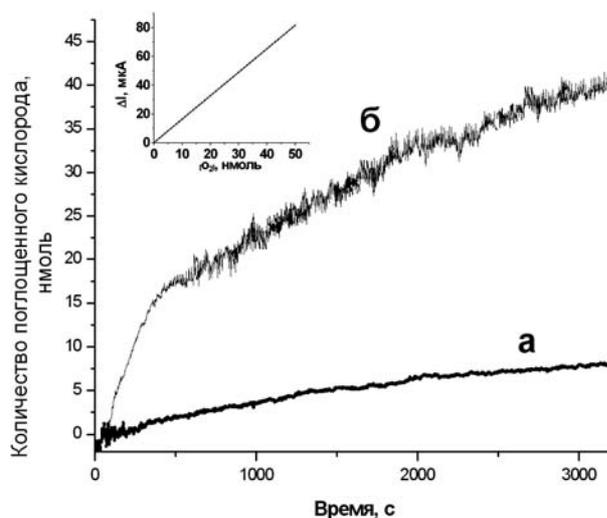


Рис. 6 Кинетические кривые поглощения кислорода в электрокаталитическом цикле цитохрома P450 2В4 а) в отсутствии субстрата и б) в присутствии 0,5 мМ раствора бензфетамин. Кривые получены отнесением экспериментальной зависимости тока от времени к калибровке.

Также был произведен расчет количества кислорода, участвующего в электрокаталитическом цикле, исходя из анализа цикловольтамперограмм. Вольтамперометрия позволяет получить «моментальный снимок» электрокаталитического процесса. Расчет производился исходя из соотношения площадей пиков в анаэробных и аэробных условиях при насыщающих концентрациях кислорода. В анаэробных условиях восстанавливается $3,7 \pm 0,5$ пмоль P450/электрод, а в аэробных — $7,0 \pm 0,5$ пмоль/электрод, из чего следует, что количество восстановленного кислорода составляет 3,3 пмоль/электрод, т.е. соотношение восстановленный фермент (Fe^{+2}): кислород близко к стехиометрическому $3,3:3,7 = 1:1,12$ в соответствии с механизмом катализа цитохрома P450.

Обобщенные результаты измерения стехиометрических параметров электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4 в сопоставлении с данными других авторов представлены в таблице 2.

Таблица 2

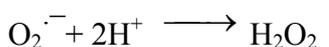
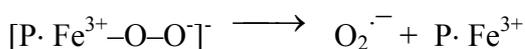
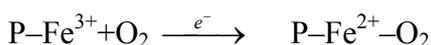
Стехиометрические соотношения компонентов ферментативного превращения веществ в каталитическом цикле цитохрома P450.

система	субстрат	Окисление NADPH	потребление O ₂	образование H ₂ O ₂	образование продукта	ссылка
P450 2B4/электрод	нет	-	1	0,92	-	
	бензфетамин	-	1	0,15	0,8	
микросомы печени кроликов, индуцированных фенобарбиталом	нет (37 ⁰ C, pH=7,8)	1,39	1	0,61	-	Zhukov A.A. <i>et al.</i> , 1985
	бензфетамин (37 ⁰ C, pH=7,6)	1,14	1	0,09	0,67	
P450 2B1 + NADPH P450-редуктаза (реконструированная система)	7-этоксикумарин (25 ⁰ C, 10мин, pH=7,4)	1,25	1	0,55	0,15	Fang X., <i>et al.</i> , 1997

В реакциях NADPH-зависимого восстановления цитохромов P450 2B4 (Zhukov A.A. *et al.*, 1985) и P450 2B1 (Fang X., *et al.*, 1997) регистрируется образование пероксида водорода. В случае цитохрома P450 2B4 субстрат бензфетамин направляет реакцию по монооксигеназному пути.

Полученные нами результаты подтверждают возможность образования пероксида водорода (см. таблицу 2) и воды (8% и 5% в отсутствии и в присутствии субстрата, соответственно) в электрокаталитическом цикле цитохрома P450. Стехиометрические соотношения электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4: ΔO₂:ΔH₂O₂=1:0,92 (без субстрата), ΔO₂:ΔH₂O₂:продукт=1:0,15:0,8.

Стехиометрию оксидазных реакций, катализируемых цитохромом P450 2B4, можно представить следующей схемой:



где P – порфирин

В отсутствие субстрата в ходе каталитического цикла цитохрома P450 2B4 единственным продуктом восстановления кислорода кроме воды является пероксид водорода.

В работе предложен метод регистрации в кинетическом режиме образования пероксида водорода как продукта оксидазных электрохимических реакций цитохрома P450 по биелектродной схеме с помощью различных измерительных электродов. Исходя из полученных скоростей реакций и стехиометрических коэффициентов, можно сделать вывод, что иммобилизованный на электроде цитохром P450 2B4 при электрохимическом восстановлении ведет себя подобно микросомальной системе в растворе.

Полученные стехиометрические соотношения компонентов ферментативной реакции позволяют сделать вывод об адекватности замены природного восстанавливающего агента NADH или NADPH и белков редокс-партнеров электрохимическим восстановлением гемопротейна. Аналогично природной системе (Zhukov A.A. et al., 1985) (микросомальная фракция цитохрома P450 2B4 в растворе), наблюдалось отклонение стехиометрических коэффициентов, полученных экспериментально, от коэффициентов, следующих из уравнения монооксигеназной реакции. Определенная доля кислорода, участвующего в ферментативном цикле, не участвует в превращении субстрата, а расходуется на образование пероксида водорода и воды.

II. Определение термодинамических параметров электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4

Термодинамика электрохимического восстановления гемопротейнов позволяет ответить на вопросы стабильности белка, иммобилизованного на наноструктурированный электрод и судить о вероятности электронного транспорта.

На окислительно-восстановительный потенциал E^0 гемопротейнов оказывают влияние различные факторы: лиганд-связывающие эффекты (Moore G. R. et al., 1977), контакт гема с растворителем (Stellwagen E. et al., 1978) и природа растворителя (Battistuzzi G. et al., 1998; O'Donoghue D. et al., 2003), взаимодействие гема с белковым окружением (Moore G. et al., 1986). Определение E^0 как функции температуры позволяет вычислить величину изменения энтальпии ΔH^0 и энтропии ΔS^0 по уравнению:

$$E^0 = \frac{-\Delta H^0}{nF} + \frac{T\Delta S^0}{nF} \quad (1)$$

Где E^0 – окислительно-восстановительный потенциал белка (В),

$\Delta H^{0'}$ – изменение энтальпии реакции (Дж·моль⁻¹),

$\Delta S^{0'}$ – изменение энтропии реакции (Дж·моль⁻¹·К⁻¹)

n – число электронов, участвующих в реакции

F – число Фарадея (F = 96490,0 Кл/моль)

T – температура (в градусах Кельвина)

Величина изменения энтальпии $\Delta H^{0'}$ окислительно-восстановительного процесса характеризует взаимодействие между ионом железа гемопротейна и лигандами, а также электростатическое взаимодействие на границе иона металла с растворителем и белковым окружением (Gavioly G. *et al.*, 2004).

Изменение энтропии $\Delta S^{0'}$ характеризует изменения в конформационных степенях свободы фермента, связанные с окислительно-восстановительными процессами и реорганизацией молекул растворителя и ионов (Gavioly G. *et al.*, 2004), а также переход гема в более компактную структуру (Scott R.A. *et al.*, 2006).

Для вычисления термодинамических параметров электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4 были проведены измерения редокс-потенциала иммобилизованного цитохрома P450 2B4 в интервале температур 5–30°C с шагом в 5°C.

Были получены зависимости величины редокс-потенциала $E^{0'} = (E_{pa} + E_{pc})/2$ от температуры для электродов Au/ДДАБ/P450 2B4/нафион в анаэробных условиях. Для расчетов термодинамических параметров использовались температурные зависимости потенциалов относительно стандартного водородного электрода (СВЭ). В нашей системе мы использовали хлорсеребряный электрод сравнения, величины потенциалов были приведены к потенциалу стандартного водородного электрода по формуле:

$$E_{СВЭ}^{0'} = E_{Ag|AgCl}^{0'} + 0.204 \text{ (при } 20^\circ\text{C)}$$

Окислительно-восстановительный потенциал связан со своими термодинамическими составляющими согласно уравнению 1.

Из зависимостей $E^{0'}$ от T и $E^{0'}/T$ от $1/T$ были вычислены $\Delta S^{0'}$ и $\Delta H^{0'}$ соответственно:

$$\Delta S^{0'} = nF \frac{dE^{0'}}{dT} \quad (2)$$

$$\Delta H^{0'} = -nF \frac{\partial \left(\frac{E^{0'}}{T} \right)}{\partial \left(\frac{1}{T} \right)} \quad (3)$$

С увеличением температуры наблюдается катодное смещение редокс-потенциала (рис. 7).

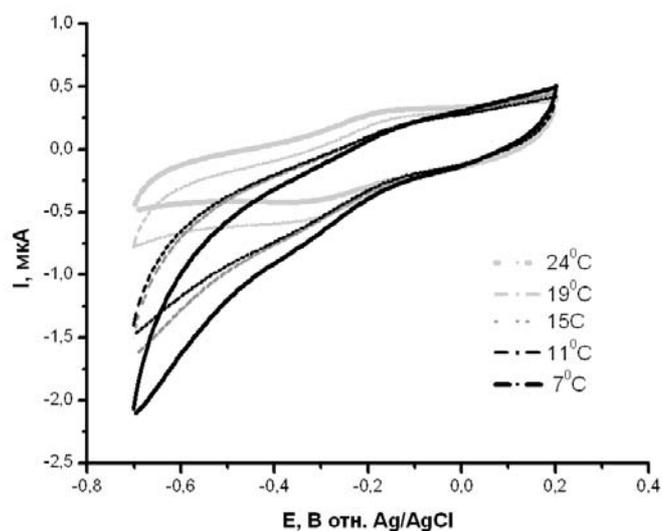


Рис. 7 Циклические вольтамперограммы электродов Au/DDAB/P450 2B4/нафийон в анаэробных условиях. Скорость сканирования $v=50$ мВ/с. Объем электролита 1мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер (рН 7,4), 50 мМ NaCl.

Цикловольтамперограммы цитохрома P450 2B4 для различных температур приведены на рис. 7, зависимость редокс-потенциала от температуры показана на рис. 8.

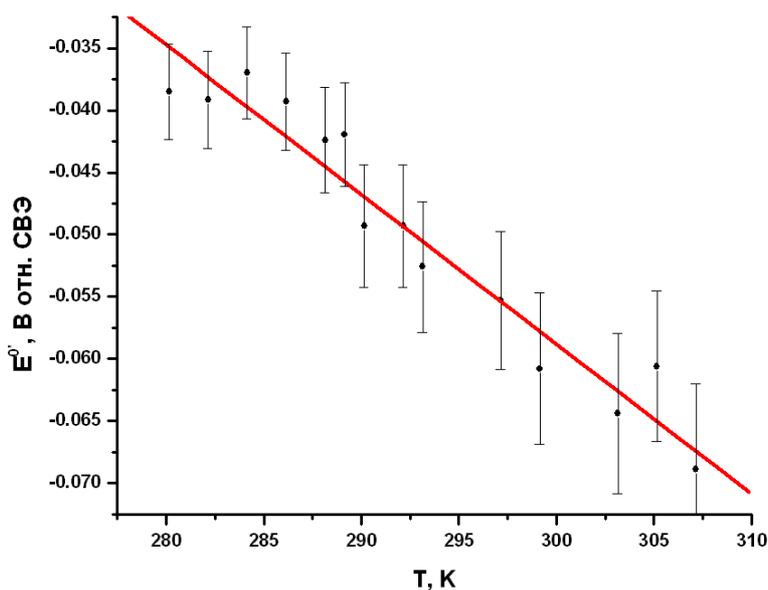


Рис. 8 Зависимость редокс-потенциала цитохрома P450 2B4, иммобилизованного на печатный электрод, от температуры. Данные получены при скоростях сканирования 50 мВ/с.

Выше 40°C линейная зависимость нарушается, что, по-видимому, следует отнести на счет частичной денатурации иммобилизованного белка.

Термодинамические параметры иммобилизованного на наноструктурированный Au/ДДАБ-электрод цитохрома Р450 2В4 определяли из зависимостей (2) и (3), их величины приведены в табл. 3.

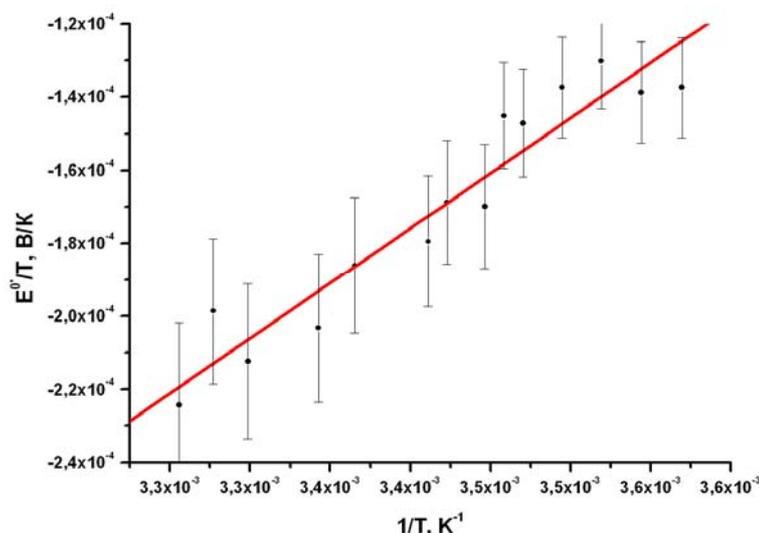


Рис. 9 Зависимость соотношения E^0/T цитохрома Р450 2В4, иммобилизованного на печатный электрод от обратной температуры. Данные получены при скоростях сканирования 50 мВ/с.

Таблица 3

Термодинамические параметры электрохимического восстановления различных белков

Белок \ Параметр	ΔS^0 (Дж·моль ⁻¹ ·К ⁻¹)	ΔH^0 (кДж·моль ⁻¹)	ссылка
Гемоглобин	-349,28	-97,18	(He X. <i>et al.</i> , 2006)
Цитохром <i>c</i>	-44÷-75*	-34÷-43,1	(Gavioli G. <i>et al.</i> , 2004)
Флаводоксин	-80	-1,5	(Heering H.A. <i>et al.</i> , 1996)
Миоглобин	-51,1	-1,3	(Liu X. <i>et al.</i> , 2005)
Голубой медьсодержащий белок	-46	-36	(Battistuzzi G. <i>et al.</i> , 1999)
Цитохром Р450 2В4	-115,69	-29,1	настоящая работа

Восстановление цитохрома Р450 2В4 сопровождается отрицательным изменением как энтальпии, так и энтропии. Уменьшение энтропии можно отнести на счет конформационных изменений цитохрома Р450 2В4 в процессе восстановления, ограниченной гибкости белка в восстановленном состоянии и повышения жесткости структуры вследствие возможного образования дополнительных водородных связей. Уменьшение энтальпии проистекает из стабилизации восстановленной формы

гемопротейна по сравнению с окисленной, а также ограниченной доступности гема молекулам растворителя. Необходимо также отметить возможность вклада в изменение термодинамических параметров перестройку структуры водородных связей или реорганизации молекул растворителя. Энтропийный вклад в изменение величины редокс-потенциала электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4 преобладает над энтальпийным, что говорит о большем участии конформационных изменений, происходящих при восстановлении иммобилизованного гемопротейна, в изменение редокс-потенциала, по сравнению с доступностью гема или стабилизацией восстановленной формы.

Выводы

1. Разработаны методы иммобилизации цитохрома P450 2B4 на графитовых электродах, модифицированных нанокompозитными материалами на основе золотых наночастиц, стабилизированных жидкокристаллической матрицей ДДАБ.

2. Разработана биэлектродная схема, состоящая из операционного (цитохром P450 2B4 электрод) и измерительного электрода (БЛ или цитохром с электрод) для кинетического анализа образования пероксида водорода в ходе электрокаталитической реакции

3. Определены стехиометрические соотношения электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4: $\Delta O_2:\Delta H_2O_2=1:0,92$ (без субстрата), $\Delta O_2:\Delta H_2O_2:\text{продукт}=1:0,15:0,8$. Показано соответствие стехиометрических параметров электрокаталитического цикла цитохром P450 2B4-содержащей электрохимической системы и NADPH-зависимой монооксигеназной системы.

4. Рассчитаны термодинамические параметры электрохимического восстановления цитохрома P450 2B4: $\Delta S^{0'} = -115,69 \text{ Дж}\cdot\text{моль}^{-1}\text{K}^{-1}$, $\Delta H^{0'} = -29,1 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$. Преобладание энтропийного вклада в изменение величины редокс-потенциала свидетельствует о конформационных изменениях, происходящих при восстановлении иммобилизованного гемопротейна. Энтропийный вклад оказывает существенное влияние на процесс переноса электронов в цитохроме P450 2B4.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального Агентства по науке и инновациям Министерства образования и науки РФ (государственный контракт ФЦП № 02.512.11.2105) и Межведомственной Программы «Протеомика в медицине и биотехнологии».

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Рудаков, Ю. О. Стехиометрия электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4 / Ю. О. Рудаков, В. В. Шумянцева // Московская международная конференция «Биотехнология и медицина» – Москва, 2006 – с. 258-259.
2. Шумянцева, В. В. Нанoeлектрохимия цитохромов P450: прямой перенос электронов и электрокатализ / В. В. Шумянцева, Т. В. Булко, Ю. О. Рудаков, Г. П. Кузнецова, Н. Ф. Саменкова, А. В. Лисица, И. И. Карузина, А. И. Арчаков. // Биомедицинская химия. – 2006 – Т. 52, №5. – с. 458-468.
- 2a. Shumyantseva, V. V. Nanoelectrochemistry of Cytochrome P450s: Direct electron transfer and electro catalysis / V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko, Yu. O. Rudakov, G. P. Kuznetsova, N. F. Samenkova, A. V. Lisitsa, I. I. Karuzina, A. I. Archakov. // Biochemistry (Moscow) Supplemented series B: Biomedical Chemistry. – 2007. – V. 1, №4. – p. 327-333.
3. Shumyantseva, V. V. Electrochemical properties of cytochroms P450 using nanostructured electrodes: Direct electron transfer and electro catalysis / V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko, Yu. O. Rudakov, G. P. Kuznetsova, N. F. Samenkova, A. V. Lisitsa, I. I. Karuzina, A. I. Archakov. // J. Inorg. Biochem. – 2007. – V. 101. – p. 859-865.
4. Рудаков, Ю. О. Электрохимическое восстановление цитохрома P450 2B4: стехиометрия и электрокатализ / Ю. О. Рудаков, В. В. Шумянцева, Т. В. Булко, Е. В. Супрун, Г. П. Кузнецова, Н. Ф. Саменкова, А. И. Арчаков // VII Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2008» – Уфа, 2008 – с. 98.
5. Рудаков, Ю. О. Исследование стехиометрии электрокаталитического цикла цитохрома P450 2B4 / Ю. О. Рудаков, В. В. Шумянцева, Т. В. Булко, Е. В. Супрун, Г. П. Кузнецова, Н. Ф. Саменкова, А. И. Арчаков // V Конференция молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины» – Москва, 2008 – с. 372.
6. Rudakov, Yu. O. Stoichiometry of electrocatalytic cycle of cytochrome P450 2B4 / Yu. O. Rudakov, V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko, E. V. Suprun, G. P. Kuznetsova, N. F. Samenkova, A. I. Archakov // J. Inorg. Biochem. – 2008. – V. 102, №11. – P. 2020-2025.
7. Шумянцева, В. В. Микрокантилеверные и электрохимические биосенсоры для исследования белок-белковых взаимодействий / В. В. Шумянцева, Ю. О. Рудаков, П. А. Французов // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2008 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» – Москва, 2008 – с. 161.

8. Рудаков, Ю. О. Нанобиоэлектрохимия цитохрома P450 2B4: стехиометрия и термодинамика / Ю. О. Рудаков, В. В. Шумянцева, Т. В. Булко, Е. В. Супрун, Г. П. Кузнецова, Н. Ф. Саменкова, А. И. Арчаков // Первый международный форум по нанотехнологиям, (http://rusnanotech08.rusnanoforum.ru/sadm_files/disk/Docs/3/8/008.pdf), – Москва, 2008.

Список сокращений

АБТС – 2,1'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)

ДДАБ – дидодецилдиметиламмоний бромид

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

БЛ – берлинская лазурь

СВЭ – стандартный водородный электрод