

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ИСТОЧНИКОВ ЭЛЕКТРОНОВ В МОНООКСИГЕНАЗНЫХ РЕАКЦИЯХ, КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ЦИТОХРОМАМИ P450.**

### **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КАК ФАКТОРЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ.**

**В. В. ШУМЯНЦЕВА, Т. Л. МОСКВИТИНА, Т. В. БУЛКО, А. И. АРЧАКОВ**

НИИ Биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., 10  
Факс 245-08-57, Ел. почта: victoria@ibmh.msk.su

В обзоре рассмотрены физико-химические факторы, влияющие на каталитическую активность ферментов. Основное внимание уделено гемопротеинам, в частности, цитохромам P450. В обзоре приведены также данные авторов по получению полусинтетических гемопротеинов на основе цитохрома P450 2B4 и редуктазы. Обсуждаются альтернативные источники электронов для проведения окислительно-восстановительного цикла гемопротеинов: применение принципов электролиза для редокс-ферментов, фотоактивация фоточувствительных молекул. Кроме того, в обзоре проанализировано влияние температуры, давления, химической модификации, использование органических растворителей вместо традиционных водно-солевых растворов для повышения эффективности ферментативных реакций.

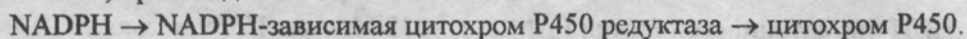
**Ключевые слова:** гемопротеины, цитохром P450, флавоцитохром, физико-химические воздействия, биоэлектрохимия, органические растворители, фотовосстановление.

**ВВЕДЕНИЕ.** Цитохромы P450 являются монооксигеназами, уникальное свойство которых заключается в способности гидроксилировать неактивированные атомы углерода. Цитохромы метаболизируют около 200000 различных соединений, катализируя примерно 60 типов химических реакций (гидроксилирование, N-, O- или S-деметилирование, деалкилирование, эпоксилирование и т. д.). Эта особенность цитохромов P450 делает их перспективными в использовании для анализа содержания лекарственных препаратов, ксенобиотиков, а также для стереонаправленного синтеза стероидов. Повышение эффективности ферментативного катализа гемопротеинов является важной практической задачей. Данный обзор посвящен анализу ряда физико-химических методов, влияющих на различные стадии ферментативных процессов, в частности, использованию вместо традиционных доноров электронов, которыми являются NADH или NADPH, альтернативных источников электронов. В данном обзоре не будут обсуждены "шунтированные реакции" цитохромов P450, в которых используются пероксид водорода и органические пероксиды. В этом случае нет стадии восстановления железа гема и используются окислители, содержащие уже восстановленный двумя электронами кислород.

**Использование принципов электролиза в исследовании окислительно-восстановительных биохимических систем.**

Электронный транспорт в биологических системах осуществляется, как правило, в присутствии молекул - доноров электронов, например, NADPH, NADH, и молекул-медиаторов переноса электронов, например, флавиновых нуклеотидов. Использование электрохимических систем для окислительно-восстановительных (редокс) ферментов, и в особенности металлоферментов, является в настоящее время бурно развивающейся областью [1]. Возможен как прямой электрохимический перенос, без использования веществ-переносчиков или медиаторов, между редокс - центром белка и электродом, так и перенос в присутствии молекул медиаторов. В этих исследованиях используются разные типы электродов: графитовые (стеклографит, пирографит), золотые, платиновые, графитовые с добавлением катализаторов окислительно-восстановительных процессов (например, родия как катализатора восстановления кислорода до пероксида водорода или воды [2,3]).

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



*Таблица 1. Сравнение скоростей электрохимических и NADPH-зависимых реакций метаболизма субстратов, катализируемых рекомбинантными белками [4].*

Белок слияния (редуктаза+цитохром P450) и субстрат	Тип реакции	Скорость, нмоль/мин/нмоль P450	
		электролиз	NADPH
rF450(mBov17A/ mRatOR)L1 Прогестерон Прегненолон	17- $\alpha$ - гидроксирование	20 5	28 5
rF450(mHum3A4/ mRatOR)L1 Тестостерон	6 $\beta$ -гидроксирование	2,6	10,0
Эритромицин	N-деметилирование	1,2	2,2
Бензфетамин	N-деметилирование	2,0	4,6
rF450(mHum 1A2/mRatOR)L1 Кофеин	N-деметилирование	0,75	1,5
Имипрамин	N-деметилирование	1,2	2,0
CYP102-BM3 Лауриновая кислота	$\omega$ -гидроксирование	110	900

Донором электронов является NADPH, электрон-транспортным белком для переноса электронов от NADPH к гемопротеину цитохрому P450 являются или микросомальный флавопротеин NADPH-P450-редуктаза или митохондриальная система, состоящая из флавопротеина и белка, содержащего железо-серный кластер. Использование вместо NADPH катодного электрического тока для восстановления флавинов как медиаторов в оксигеназных реакциях позволило получить электрохимические системы с высокой эффективностью (Табл.1) [3, 4]. Авторы [3,4] использовали в качестве рабочего электрода золотой или платиновый электрод и систему, состоящую из очищенного рекомбинантного белка, содержащего P450 4A1 и NADPH-зависимую цитохром P450 редуктазу [3,4,5]. Кроме рекомбинантного белка P4504A1Fl



электрохимическая система содержала в качестве медиатора координационное соединение кобальта (III) - (S)-1,3,6,8,10,13,16,19 - октаазабицикло-[6,6,6]эйкозан) кобальт (III). Окислительно-восстановительный потенциал этого соединения  $U = -350\text{ мВ}$  (относительно нормального водородного электрода). Авторы предполагают, что на катоде в первую очередь происходит восстановление иона кобальта (III)  $\text{Co}^{3+}$  по схеме  $\text{Co}^{3+} + 1\text{e} \rightarrow \text{Co}^{2+}$  в составе координационного соединения. Так как при проведении электролиза в системе, содержащей только флавопротеин - редуктазу или гемопротейн - цитохром P450, не происходит гидроксирования субстрата - лауриновой кислоты, - можно сделать вывод, что ион кобальта  $\text{Co}^{2+}$  восстанавливает флавиновые нуклеотиды в составе редуктазы, которые, в свою очередь, восстанавливают железо гема цитохрома P450. Активация кислорода происходит на восстановленном железе гема в тройном комплексе  $\text{RH-Fe}^{+2}\text{-O}_2$ , обеспечивая возможность окисления различных субстратов (RH) в физиологических условиях с высокими скоростями [6]. При электрохимическом восстановлении рекомбинантного белка генерируется перекись водорода, разрушающая ферментативную систему. Прибавление каталазы повышает эффективность системы при гидроксировании субстрата. Авторы показали, что наибольшая скорость гидроксирования лауриновой кислоты наблюдается при напряжении  $-450\text{ мВ}$  (относительно стандартного водородного электрода).

Ранее в нашей лаборатории был получен полуискусственный флавогемопротейн, обладающий редуктазной и оксигеназной активностью - флавоцитохром P450 2B4 [7]. При использовании электрохимической системы, состоящей из флавоцитохрома 2B4 или 1A2, и родий-графитовых микроэлектродов нам удалось провести реакции *n*-гидроксирования анилина, N-деметилирования аминопирин и O-деалкилирования 7-этокси- и 7-пентоксирезорфуина. Восстановление проводили при потенциале  $U = -450\text{ мВ}$  (относительно хлорсеребряного электрода) [8]. Каталитические константы NAD(P)H-зависимых и электрохимических реакций, катализируемых флавоцитохромами 1A2 и 2B4 были сравнимы.

Для повышения эффективности функционирования электрохимических ферментативных систем предложено несколько подходов: 1) Иммобилизация гемопротейнов. При иммобилизации редокс-белков на поверхности электродов [8, 9, 10] повышается эффективность переноса электронов к простетической группе. Среди методов иммобилизации ферментов на поверхности электродов используется абсорбция, включение в полимерную матрицу, ковалентное связывание белка с поверхностью электродов. 2) Ковалентное связывание с электродами веществ, имитирующих фосфолипидные мембраны. Жидкокристаллические пленки додецилдиметиламмонийбромид на графитовых электродах могут быть использованы как такие мембраны [11]. 3) Электроды с иммобилизованными пептидами [12] или двухспиральной ДНК [13] эффективны для исследования электронного транспорта гемопротейнов. Органические тиолы или дисульфиды обладают способностью абсорбироваться на поверхности золотых электродов с образованием связи золото-сера. Такая хемисорбция дает возможность получить стабильный слой для последующего ковалентного связывания с поверхностью электрода ферментов. Пленки двухспиральной ДНК на пирографите могут экстрагировать гемопротейны из раствора. Например, миоглобин диффундирует в пленки ДНК гораздо быстрее, чем гемоглобин [13]. 4) Химически модифицированные электроды, содержащие ковалентно связанные медиаторы электронного транспорта, например, рибофлавин, метилвиологен, также используются в биоэлектрохимических исследованиях [8,14,15]. 5) Восстановление гемопротейнов, включенных в пленки, имитирующие фосфолипидные мембраны. Например, при включении цитохрома P450кам в жидкокристаллические пленки, образуемые димиристоил-L- $\alpha$ -фосфатидилхолином или дидодецилдиметиламмоний бромидом происходит прямой обратимый электронный транспорт между электродом и железом

гема фермента [16], подтвержденный циклическими вольтамограммами. В присутствии субстрата - трихлоруксусной кислоты - происходит ее восстановление, регистрируемое по возрастанию катодного тока.

В работе [17] исследовалось электрохимическое восстановление метмиоглобина. Авторы считают миоглобин хорошей функциональной моделью цитохрома P450. Электровосстановление проводилось на электродах из пирографита при потенциале  $U = -400$  мВ (относительно насыщенного каломельного электрода) в водных буферных растворах или в микроэмульсиях углеводов, воды и катионных детергентов. В этих условиях происходит восстановление метмиоглобина, комплекс метмиоглобина с кислородом восстанавливается с образованием пероксида водорода на электроде, пероксид водорода окисляет миоглобин с образованием феррилмиоглобина - промежуточного соединения в цикле цитохрома P450 и пероксидазы. В присутствии стирола образуется оксид стирола и бензальдегид.

Таким образом, результаты по использованию принципов электролиза для повышения ферментативной активности окислительно-восстановительных ферментов положительны. В настоящее время делаются попытки создания биореакторов и биосенсоров с привлечением биоэлектрохимии [4].

**Использование неорганических полупроводников как источников электронов в окислительно-восстановительных системах.**

В работах ряда лабораторий показана возможность сопряженного действия неорганических полупроводников ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{CdS}$ ) и ферментов (гидрогеназ, дегидрогеназ) при фотообразовании водорода, фотовосстановлении  $\text{NAD(P)}^+$ , фотосинтезе органических кислот и аминокислот [18-22]. Система "неорганический полупроводник-фермент" способна преобразовывать энергию света в результате фотосенсибилизированного полупроводником окисления донора электрона и катализируемого ферментом восстановления субстратов - акцепторов электронов ( $\text{H}^+$ ,  $\text{NAD(P)}^+$ ) с использованием электронов, фотогенерируемых в частицах полупроводника. Сопряжение неорганического полупроводника и фермента обычно достигается с помощью переносчиков электронов: метилвиологена, бипиридинного комплекса родия и других соединений, способных к обратимому окислению - восстановлению. Описан также и прямой безмедиаторный перенос электронов, фотогенерируемых в зоне проводимости полупроводника к реакционному центру фермента [20]. Авторы считают, что возможен прямой фотоиндуцированный перенос электрона из зоны проводимости полупроводника к реакционному центру фермента.

**Конструирование ферментативной "гальванической пары" для осуществления окислительно-восстановительных реакций.**

Принцип работы гальванического элемента основан на разнице в электродных потенциалах редокс-пары. Восстановителем (донором электронов) является система с более электроотрицательным значением стандартного электродного потенциала. Стандартный электродный потенциал цинка  $E_0 \text{ Zn/Zn}^{+2} = -0,763$  В, а гемопротейны имеют, как правило, более положительный электродный потенциал. Поэтому в паре цинк гемопротейн цинк может быть восстановителем. При использовании в качестве донора электронов металлического цинка, а в качестве искусственного гемопротейна - комплекс гемина с альбумином, нам удалось провести реакции N-деметилования ароматических аминов [23]. Скорости этих реакций были сравнимы с аналогичными для NADH-зависимых реакций, проводимых в присутствии флавиновых нуклеотидов как медиаторов переноса электронов. В работе [24] в качестве субстрата - восстановителя в системе  $\text{NAD}^+$  - гидрогеназа был использован металлический кадмий. Стандартный электродный потенциал  $E_0$  пары  $\text{Cd/Cd}^{2+} = -0,403$  В, а  $E_0 \text{ NAD}^+/\text{NADH} = -0,34$  В. Следовательно, и в этом случае осуществляется принцип работы "гальванической пары".



### Фотоиндуцированный электронный транспорт.

Использование световой энергии находит применение не только в традиционных реакциях фотосинтеза, но и для индукции электронного транспорта в окислительно-восстановительных системах. Прямое фотовосстановление гемопротеинов без доноров электронов описано в работе [25]. Метмиоглобин, цитохром с, цитохром  $b_5$ , комплексы гема с октапептидами и цитохром P450 были фотовосстановлены при использовании лазерного излучения с длиной волн от 430 до 254 нм. Фотоокисление также наблюдалось и преобладало при длинах волн ультрафиолетового диапазона. Авторы показали, что лиганды гема играют важную роль в процессах фотовосстановления. Продукты фотовосстановления были охарактеризованы спектрами поглощения и рамановскими спектрами в сравнении с химически восстановленными образцами. 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 [25]. Исследование модельных комплексов (гемин - октапептиды) подтвердило точку зрения, что ароматические аминокислоты не являются первичными донорами электронов, так как в модельных пептидах не было ароматических остатков. В присутствии органических растворителей (глицерина и других спиртов), скорость фотовосстановления возрастает [25]. При облучении несфокусированным лазером,  $\lambda = 457,9$  нм (мощностью 40 мВт) комплекса рибофлавин - гемин - альбумин протекает фотовосстановление рибофлавина, тестируемое по изменению спектра поглощения комплекса. В присутствии субстратов - N-замещенных аминов или анилина регистрируется образование продуктов реакции. Например, каталитические константы  $k_{cat}$  реакций N-деметилирования диметиланилина  $0,54 \text{ мин}^{-1}$ ,  $k_{cat}$  п-гидроксилирования анилина  $0,13 \text{ мин}^{-1}$  [23]. В работе [26] описано фотоокисление флавоцитохрома  $b_2$  *Saccharomyces cerevisiae* (лактат дегидрогеназы) с помощью лазера при 400 нм. При этой длине волны окисленная форма 5-деазарибофлавина переходит в возбужденное триплетное состояние. Полностью восстановленный флавоцитохром (полученный титрованием окисленной формы фермента 1,5-кратным избытком L-лактата) и деазарибофлавин облучали лазером. При этом наблюдалось окисление восстановленного гема. Скорость межмолекулярного электронного транспорта составляла  $2200 \text{ сек}^{-1}$ . Медленное восстановление гема также происходит со скоростью  $10 \text{ сек}^{-1}$  вследствие межсубъединичного переноса электронов от восстановленного FMN к гему. Серия работ [27-30] посвящена исследованию электронного транспорта гемопротеинов (в частности, цитохрому с и цитохрому  $b_5$ ), ковалентно 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  $b_5$ , быстро восстанавливал цитохром с по схеме  $Ru^{+2} \rightarrow \text{cyt } b_5$ ,  $\text{cyt } b_5 \rightarrow \text{cyt } c$  [27]. Перенос электронов в этих системах исследовался как при прямом фотовосстановлении комплексов рутения, так и при использовании техники флеш-фотолиза. Таким образом, фотоиндуцированный электронный транспорт при наличии fotocувствительных простетических групп белка или их аналогов может служить альтернативным источником электронов в редокс-системах.

### Изменение микроокружения белка и его активного центра.

Большое влияние на работу фермента в живых организмах оказывают окружающие структуры. Среди подобных взаимосвязей одной из важнейших является взаимодействие белка с клеточной мембраной. Очевидно, создание искусственного мембраноподобного окружения может существенно повысить эффективность работы фермента.

#### *Моделирование мембранного окружения.*

Среди использовавшихся синтетических мембран [31] активирующий эффект был обнаружен у синтетического мембраноподобного фосфатного бислоя. Цитохром *c*, помещенный в такую мембрану, повышает скорость реакции пероксид-зависимого N-деметилирования N,N-диметиланилина в 10,6 раза. При определении кинетических параметров реакции обнаружилось, что происходит двадцатикратное уменьшение константы Михаэлиса для  $H_2O_2$ , что свидетельствует о повышении сродства фермента к косубстрату - пероксиду водорода. Однако, изменение спектральных характеристик цитохрома *c*, помещенного в фосфолипидный бислой, свидетельствует о существенных структурно-функциональных изменениях, произошедших при встраивании белка. Для окисленной формы 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 [31]. Встраивание миоглобина в мембраноподобные пленки приводит к снижению энергии активации при электрохимическом восстановлении субстратов - этилен дибромид и трихлоруксусной кислоты. Отмечено также повышение скорости электронного транспорта в 1000 раз [11]. Ацетилхолинэстераза, холинэстераза, пероксидаза хрена, иммобилизованные на полимерных пленках, на основе поливинилпиридина и полиэтиленгликоля могут быть использованы в качестве амперометрических сенсоров для обнаружения ацетилхолина, холина, и пероксида водорода [18].

#### *Ферментативный катализ в органических растворителях.*

Ряд ферментов, суспензированных в органических растворителях, приобретает новые свойства, причем изменения затрагивают практически все аспекты работы фермента: каталитическую активность, субстратную специфичность, стереоселективность, термостабильность и пр. [32].

В безводных органических растворителях кроме обычных ферментативных реакций протекают процессы, не характерные для фермента в водной среде. Для каждого фермента причины изменения субстратной специфичности индивидуальны. Так, липазы проводят не характерные для них реакции аминолизиса, этерификации, трансэтерификации, подавляемые гидролизом в водной среде. Многие ферменты, например, химотрипсин и другие гидролазы связывают субстраты в основном благодаря гидрофобным взаимодействиям, а так как подобные связи возможны только в водном растворе, в органических растворителях значительно увеличивается активность ферментов в отношении гидрофильных субстратов [32].

В работе [33] выявлены зависимости активности субтилизина Карлсберга и химотрипсина в органических растворителях от концентрации хлорида калия в лиофилизированном ферменте. При увеличении концентрации соли от 0 до 94-98 % каталитическая константа реакции трансэтерификации 2-хлорэтилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина пропанолом-1 увеличивалась в 385 и 52 раза для субтилизина и химотрипсина соответственно. Авторы объясняют это явление возможным защитным эффектом хлорида калия от непосредственной инактивации фермента растворителем и сохранением с помощью соли естественной структуры белка при лиофилизации.

В органических растворителях ферменты обладают большей термостабильностью. Исследованием кристаллической структуры химотрипсина в гексане [34] было показано, что увеличение термостабильности ферментов в органических растворителях по сравнению с водной средой связано с повышением жесткости молекулы белка. Определение температурного фактора, являющегося характеристикой подвижности молекулы, показало, что повышенное его значение для химотрипсина в гексане характеризует более жесткую структуру фермента в безводной среде.



По отношению к воде органические растворители условно можно разделить на три группы: гидрофобные растворители, не содержащие воду, растворители, ограниченно растворимые в воде и, поэтому, содержащие незначительные ее количества и гидрофильные растворители. В первой группе растворителей активность фермента выше чем в водном растворе, во второй - активность такая же или снижена, в третьей - активность невелика или отсутствует [35]. При проведении реакций в водосодержащих органических растворителях максимальная активность фермента достигается при определенном содержании воды в растворителе, при увеличении или уменьшении содержания воды каталитическая активность значительно снижается. Так для субтилизина Карлсберга максимальная скорость реакции трансэтерификации 2-хлорэтилового эфира N-ацетил-L-фенилаланина пропанолом-1 наблюдается при прибавлении 5-7 мкмоль воды на 1 мл тетрагидрофурана [36]. Увеличение каталитической активности коррелирует с увеличением полярности активного центра и его окружения в результате увеличения содержания воды в белке [37].

Высокую активность ферментов в неполярных растворителях можно объяснить несколькими причинами. В гидрофобной среде связанная с белком вода не переходит в объем растворителя, таким образом полностью оставаясь в распоряжении молекулы фермента. Перераспределение воды между молекулами белка и растворителя в пользу растворителя оказывает ингибирующее действие на работу фермента, таким образом, чем выше гидрофильность растворителя, тем меньше гидратируется белок, что уменьшает его активность. Активный центр фермента обычно представляет собой полярную структуру, и, следовательно, может эффективно связывать полярные растворители, которые оказывают таким образом ингибирующий эффект. В менее полярном окружении, уменьшается возможность связывания активным центром молекул растворителя и соответственно снижения активности белка [38].

Исследованием кристаллической структуры субтилизина Карлсберга в водном растворе и в растворе ацетонитрила были установлены места связывания молекул ацетонитрила и воды ферментом. Установлено, что при кристаллизации субтилизина из водного раствора молекула белка содержит 119 молекул воды, в структуре же фермента из ацетонитрила 99 молекул воды и 12 ацетонитрила. Причем 54 из 99 расположены также как и в "водном" субтилизине, из 12 ацетонитрилов один замещает воду, образуя водородную связь с  $\text{NH}_2$ -группой, три, замещая воду, вступают в иные взаимодействия с белком, восемь молекул растворителя локализованы в не связанных водой участках "водного" субтилизина.

При работе с ферментами в органических растворителях было открыто явление "памяти ферментов", состоящее в том, что фермент, лиофилизированный из водного раствора, содержащего определенный лиганд, впоследствии суспензированный в органическом растворителе, в несколько десятков раз эффективнее связывает этот субстрат или ингибитор. При повторном же растворении в воде описанное свойство исчезает. Возможное объяснение этого явления заключается в том, что фермент в результате частичной денатурации при лиофилизации [39] сохраняет "отпечаток" лиганда даже после его удаления, а попадая в безводную среду, где конформация белковой молекулы становится более жесткой, фермент проявляет большее сродство по отношению к этому лиганду [32, 40, 41].

Влияние органических растворителей на свойства гемопротеинов изучено в меньшей степени. Органические растворители способствуют переходу цитохрома P450 в неактивную форму P420 [42]. Этот переход связан с изменением проксимального лигандирования железа с серой. Аналогичный переход происходит и с хлорпероксидазой [42]. Однако цитохром c, суспензированный в тетрагидрофуране, содержащем 1 %  $\text{D}_2\text{O}$  полностью сохраняет свою третичную структуру [43]. Такие выводы были сделаны на

основе исследования третичной структуры цитохрома с методом двумерной ЯМР-спектроскопии.

#### Химические модификации.

Среди способов изменения активности ферментов широко распространено изменение первичной, вторичной и третичной структур белка путем различных химических модификаций. Большое количество химических модификаций проводится с целью идентификации участков белковой молекулы, выполняющих ту или иную функцию. Такие работы представляют большой интерес с точки зрения изучения особенностей функционирования ферментов. Объектами же данного обзора являются модификации, направленные на приобретение белком новых свойств и повышение ферментативной активности путем введения в молекулу белка новых каталитически активных групп.

В состав большого числа ферментов - оксидоредуктаз входят флавиновые нуклеотиды. Выполняя функции переносчиков электронов, флавины позволяют окислительно-восстановительным ферментам участвовать в транспорте электронов. Введение флавиновых аналогов в состав белков позволяет созданным полусинтетическим ферментам принимать участие в окислительно-восстановительных процессах.

Ковалентное связывание флавиновых аналогов (7 $\alpha$ -бромацетил-10-метилизоаллоксазина, 7 $\alpha$ -ацетил-10-метилизоаллоксазина и 7 $\alpha$ -(S-глутатинил)-10-метилизоаллоксазина) с цистеином-25 активного центра папаина [44] позволяет полученному полусинтетическому ферменту катализировать окисление дигидроникотинамидных субстратов (1-пропил-1,4-дигидроникотинамида, 1-бензил-1,4-дигидроникотинамида и NADH). Скорости реакций флавопапаина в среднем на два порядка ниже, чем скорости аналогичных реакций природных оксидоредуктаз.

В работах [45, 46] исследованы свойства флавогемоглобина, полученного при ковалентном присоединении производного флавина - 7-цианоизоаллоксазина к  $\beta$ -субъединице гемоглобина в соотношении 2:1 соответственно. Сам гемоглобин способен катализировать монооксигеназные реакции в цитохром P450 подобной системе, содержащей помимо гемопротейна NADPH, кислород и NADPH-цитохром P450 редуктазу. Ковалентное связывание гемоглобина с флавином позволяет проводить подобные реакции в отсутствие редуктазы. Каталитическая константа реакции гидроксирования анилина для флавогемоглобина сравнима с  $k_{cat}$  для цитохрома P450. По сравнению с системами гемоглобин и гемоглобин + редуктаза скорость гидроксирования анилина флавогемоглобином увеличилась в 7,7 и 1,3 раза соответственно.

В работе [47] исследована каталитическая активность ковалентного комплекса цитохром P450 - флавин (FAD или FMN). Наиболее каталитически активной оказалась модель, где цитохром был связан ковалентно с ФМН в соотношении 1:3. Каталитические константы реакций N-деметилирования диметиланилина, аминопирина и пара-гидроксирования анилина составили от 53 до 66 % от микросомальных для комплекса P450-FMN. Скорости реакций ковалентных и нековалентных комплексов P450-FAD составляли не более 10% от микросомальных. В этой же работе описана еще одна мономолекулярная монооксигеназная система, образованная путем ковалентного связывания акцептора электронов - блеомицина с NADPH-зависимой-P450-редуктазой. Скорости реакций комплекса редуктаза-блеомицин составили около 10% от микросомальных.

Полусинтетическая геморедуктаза [48], представляющая собой ковалентный комплекс гема и NADPH-зависимой-P450-редуктазы, была исследована в нашей лаборатории. Редуктазная активность полученного полусинтетического фермента не отличается от активности исходной редуктазы. Редуктаза не обладает собственной



каталитической активностью в монооксигеназных реакциях. Однако при введении в молекулу редуктазы от 1 до 10 остатков гемина, полусинтетическая геморедуктаза проявляла активность в реакциях NADPH-зависимого N-деметилования амидопирина с  $k_{cat} = 0,7 \text{ мин}^{-1}$  ( $k_{cat}$  для аналогичных реакций, катализируемых микросомами –  $2,4 \text{ мин}^{-1}$ , а полусинтетическим флавоцитохромом 2B4 –  $0,98 \text{ мин}^{-1}$  [7]).

При ковалентном связывании флаводоксина с ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазой [49] в соотношении 1:1 получен искусственный фермент, способный катализировать с высокой эффективностью восстановление цитохрома *c*. Обработка флаводоксина карбодиимидом в присутствии этилового эфира глицина позволяет флаводоксину связываться с редуктазой подобно ее субстрату – ферредоксину. Цепь переноса электронов в этой системе аналогична существующей в NADPH-цитохром P-450-редуктазе:  $\text{NADPH} \rightarrow \text{FAD}$  (из ферредоксин-NADP<sup>+</sup>-редуктазы)  $\rightarrow \text{FMN}$  (флаводоксин)  $\rightarrow$  цитохром *c*.

Ферредоксин-NADP<sup>+</sup>-редуктаза, модифицированная виологеном в присутствии карбодиимида, обнаруживает оксидазную активность, отсутствующую в нативном ферменте. В работе [50] были исследованы каталитические свойства модифицированного фермента. Показано, что в отношении таких акцепторов электронов, как 2,6-дихлороиндофенол и феррицианид при модификации активность модифицированного фермента уменьшается на 50%, в то время как скорость цитохром *c*-редуктазных реакций увеличивается в 30 раз. Схема электронного транспорта не модифицированного фермента в этой реакции выглядит следующим образом:

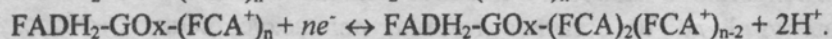
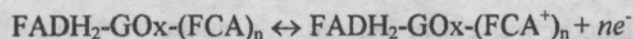
$\text{NADH} \rightarrow \text{редуктаза} \rightarrow \text{ферредоксин} \rightarrow \text{цитохром } c$ .

В отсутствие ферредоксина редуктаза не восстанавливает напрямую цитохром *c*, тогда как модифицированный фермент показывает такую высокую активность даже в отсутствие ферредоксина. Проведением реакций в присутствии супероксиддисмутазы показано, что конечным акцептором электронов для виологен-редуктазы является молекула кислорода, которая восстанавливается до супероксиданионрадикала. Продукцией активных форм кислорода можно объяснить появление оксидазной активности у модифицированного фермента. Титрованием восстановленной виологен-редуктазы было показано, что перенос электронов к виологену осуществляется через флавиновую группу (FAD), имеющуюся в составе редуктазы. Стандартный электродный потенциал ковалентно связанного с ферредоксин-NADP<sup>+</sup>-редуктазой виологена составляет -365 мВ, свободного – -420 мВ, потенциалы других участников процесса составляют: NADPH – -320 мВ, редуктаза – -344 мВ, ферредоксин – -420 мВ. Для получения NADPH электрохимически с помощью нативного фермента требуется донор электронов, способный восстановить ферредоксин, так как схема электронного транспорта в этом случае выглядит следующим образом:

$\text{ферредоксин} \rightarrow \text{редуктаза} \rightarrow \text{NADP}^+$ .

В электрохимической системе виологен-редуктаза в присутствии NADP<sup>+</sup> регистрируется электрический ток, что свидетельствует о существовании переноса электронов между электродами и виологен-редуктазой. Этот факт дает возможность использовать систему для регенерации NADPH.

Ферроцен и его производные являются эффективными переносчиками электронов. В работе [51] описана модификация глюкозооксидазы ферроценкарбоновыми кислотами. Введение в молекулу фермента дополнительных переносчиков электронов, помимо имеющихся в его составе двух молекул FAD, позволило глюкозооксидазе участвовать в электрохимическом процессе. В нативной глюкозооксидазе восстановленный FADH<sub>2</sub> окисляется кислородом воздуха, а в модифицированной роль кислорода выполняют ферроценкарбоновые кислоты, осуществляя таким образом “внутренний” электронный транспорт. В ферроценглюкозооксидазе осуществляются следующие электрохимические превращения на электродах:



Расположение присоединенных остатков ферроценкарбоновых кислот по отношению к молекуле FAD играет большую роль в электронном транспорте, чем их количество. Оптимальное его значение составляет 13 остатков ферроценкарбоновой кислоты на одну молекулу глюкозооксидазы. Электронный потенциал пары  $\text{FADH}_2/\text{FADH}^+$  составляет -219 мВ, а присоединенной к лизину ферроценкарбоновой кислоты – +773 мВ, таким образом движущая сила электронного транспорта в данной системе составляет порядка 1 В. В работах [52, 53] описана ковалентная модификация цитохрома Р450кам и  $\beta$ -лактамазы N-(2-ферроцен-этил)малеимидом и показана электрохимическая активность этих ферментов. Фотоактивация глутатион редуктазы, ковалентно связанной с эозином в соотношении 1:2 описана в работе [54]. Эозин-модифицированная глутатион редуктаза сохранила 50 % активности нативного фермента. Полученная фотосистема в 1000 раз менее активна в отношении восстановления глутатиона, чем глутатионредуктаза, использующая в качестве источника электронов NADPH.

#### Влияние температуры на реакции, катализируемые гемопротенинами.

При исследовании реакций, катализируемых цитохромом Р450 2В4, было показано, что повышение температуры приводит к возрастанию скорости метаболизма субстратов. Например, при повышении температуры от 20° до 37°С каталитическая константа  $k_{\text{cat}}$  пероксид-зависимой реакции О-деалкилирования *n*-нитроанизола, рассчитанная по образованию продукта реакции, возрастает примерно в 2 раза [55].

Каталитический цикл цитохрома Р450 сложен и включает по крайней мере, семь стадий [6, 56]. Наиболее подробно исследовано влияние температуры на стадию связывания субстратов с цитохромом Р450 и на спиновое равновесие между низкоспиновой и высокоспиновой формами гемопротейна. В работе [57] было показано, что изменение температуры от 12° до 27° С не влияет на спектры поглощения цитохрома Р450 2В4 В присутствии насыщающих концентраций субстрата (0,8 М бензфетамин) – абсолютные спектры также не изменяются. Константы диссоциации фермент-субстратных комплексов, полученные при 0,3 мкМ концентрации цитохрома Р450 были следующими в зависимости от температуры:

$$13,8^\circ \text{ С } K_d = 189 \pm 5 \text{ мкМ} \quad [\text{ES}]_{\text{макс}} \text{ мкМ } 0,085 \pm 0,002$$

$$23,8^\circ \text{ С } K_d = 86 \pm 2 \text{ мкМ} \quad [\text{ES}]_{\text{макс}} \text{ мкМ } 0,087 \pm 0,004$$

Концентрация фермент-субстратных комплексов  $[\text{ES}]_{\text{макс}}$  при разной температуре 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, что в присутствии бензфетамина происходит увеличение абсорбции при 390 нм и уменьшение абсорбции при 417 нм при температуре от 23° до 25°С. Эти данные, по мнению авторов, отражают усиление связывания субстрата с ферментом. Субстратиндуцированное спиновое равновесие следует бимолекулярному механизму  $\text{P450 (н.с.)} + \text{S} \leftrightarrow \text{P450 (в.с.)} - \text{S}$ , где н.с. – концентрация низкоспиновой, в.с. – концентрация высокоспиновой формы фермента. Каталитическая константа для этой модели  $k_{\text{obs}} = 1/\tau_f = k_1 ([\text{E}]_{\text{eq}} + [\text{S}]_{\text{eq}}) + k_{-1}$  где  $\tau_f$  – быстрое время релаксации, т.е. время, в течение которого система переходит в новое состояние. В отсутствии субстрата не наблюдается релаксации, что находится в соответствии с экспериментами по влиянию температуры на спектры поглощения цитохрома Р450, не связанного с субстратом.

Температура влияет на электродный потенциал окислительно-восстановительной системы. Согласно уравнению Нернста  $E = RT/nF \ln (C_{\text{ок}} / C_{\text{ред}})$ , где R-универсальная газовая постоянная, T-температура,  $C_{\text{ок}}$  и  $C_{\text{ред}}$  концентрации окисленной и восстановленной формы, соответственно. Исследование зависимости от температуры (в



интервале от 4 до 36 °C) электрохимического восстановления белка слияния редуктаза и цитохром P450 4A1 [3] показало, что максимальная скорость наблюдается при температуре 22° C. Это связано с тем, что в электрохимической системе протекают несколько параллельных реакций, влияние температуры на которые различно.

#### **Влияние давления на ферментативную каталитическую активность гемопротеннов.**

Различные методы, связанные с воздействием давления, были использованы для исследования кинетики и динамики конформации белков [58]. Высокое давление используется для смещения химического и биохимического равновесия, изменения скоростей отдельных стадий ферментативных реакций. Изменения реакционного и активационного ( $\Delta V^*$  и  $\Delta V^{**}$ ) объемов, рассчитанные из экспериментов по воздействию высокого давления, могут быть использованы при исследовании механизмов действия ферментов и переходных состояний при образовании новых связей. Если  $\Delta V^*$  и  $\Delta V^{**}$  отрицательны, то в соответствии с принципом Ле-Шателье увеличение давления приводит к смещению равновесия в сторону продуктов ферментативной реакции [58,59]. Подробно исследовано влияние высокого давления на бактериальный цитохром P450кам, метаболизирующий камфору. Давление влияет на равновесие между низкоспиновым и высокоспиновым состоянием [60,61]. Повышение давления до 2,2 кбар вызывает переход цитохрома P450кам в неактивную P420 форму [42]. Хлорпероксидаза под воздействием высокого давления также переходит в форму C420. В работе [62] было исследовано влияние сжатия под воздействием высокого давления на окислительно-восстановительный потенциал цитохрома с из сердца лошади. Измеряя изменение стандартного потенциала как функции давления, можно рассчитать реакционный объем  $\Delta V^\circ$   $(\partial E^\circ/\partial P)_T = -(1/nF)\Delta V^\circ$ , где  $\Delta V^\circ$  равен сумме стандартных мольных объемов продуктов минус сумма стандартных мольных объемов реагирующих веществ,  $\Delta V^\circ = \sum V_p^\circ - \sum V_r^\circ$ . При увеличении давления предпочтительным будет процесс, сопровождающийся уменьшением объема ( $\Delta V^\circ < 0$ ). Если рассматривать восстановительный процесс, подобный эффект вызывает сдвиг окислительно-восстановительного потенциала в положительном направлении. По данным авторов, при увеличении давления от 0° кбар до 5 кбар происходит изменение потенциала от -5 мВ (при давлении 0 кбар) до +76 мВ (при давлении 5 кбар). Кроме того, происходит изменение мольного объема между окисленной и восстановленной формой цитохрома с:  $V(\text{Fe}^{2+}) - V(\text{Fe}^{3+}) = -24$  мл/моль. Эти результаты находятся в соответствии с результатами по структурным и физико-химическим исследованиям: ферроцитохром с ( $\text{Fe}^{2+}$ ) имеет более компактную структуру, чем феррицитохром с ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Таким образом, изменяя давление, оказываемое на ферментативную систему, можно смещать химическое равновесие в редокс-гемопротейнах в направлении реакции, сопровождающейся уменьшением объема, т.е. в сторону восстановленной формы. Большинство ферментов, в том числе и гемопротейны достаточно чувствительны к различным физическим и химическим воздействиям, которые могут вызвать полную или частичную потерю активности. Следовательно, возникает необходимость создания искусственных ферментов на основе белков, обладающих большей стабильностью по отношению к такого рода воздействиям. В ряде работ искусственные гемопротейны получены путем образования гемином [63, 64] и его аналогами: октаэтил-бис-порфирином кобальта, октапиридинометил-фталоцианином кобальта и дифталоцианином лютеция [65] нековалентных специфических комплексов с сывороточным альбумином человека или бычьим сывороточным альбумином. Полученные соединения проявляют оксигеназную каталитическую активность в реакциях N-деметилирования аминопирина и паргидроксилирования анилина. Активно развивается и другое направление – дизайн и получение методами белковой инженерии искусственных белков *de novo*, обладающих заданной структурой и функциональными свойствами [66].

### Заключение.

В данном обзоре была сделана попытка обобщить данные по целенаправленному воздействию различных физико-химических факторов на отдельные стадии ферментативных процессов. Рациональная комбинация физико-химических приемов применительно к природным или искусственным ферментативным системам позволит сконструировать новое поколение биосенсоров, тест-систем и биореакторов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Hill H.A.O., Hunt N.I. (1993) *Meth. Enzymol.*, **227**, 501-522.
2. Мюр П., Шеллер Ф., Кюн М., (1982) *Прикл. биохим. микробиол.*, **18**, 481-488.
3. Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher Ch.W., Estabrook R.W., (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 7705-7709.
4. Estabrook R.W., Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher C.W., (1996) *Meth. Enzymol.*, **272** (B), 44-51.
5. Estabrook R.W., Shet M.S., Fisher Ch.W., Jenkins Ch.M., Waterman M.R., (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, **333**, 308-315.
6. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) *Cytochrome P450 and Active Oxygen*. London, N.-Y., Philadelphia: Taylor and Francis.
7. Shumyantseva V.V., Uvarov V.Yu., Byakova O.E., Archakov A.I. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 829-838.
8. Шумянцева В.В., Арчаков А.И., Шмидт Р.Д. (1997) II Съезд Биохимического общества РАН, 544.
9. Cruz Vieira I., Fatibello-Filho O. (1997) *Anal. Lett.*, **30**, 895-907.
10. Jin W., Bier F. (1995) *Biosensors and Bioelectronics*, **10**, 823-829.
11. Rustling J.F., Nassar A.E.F. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11891-11897.
12. Barker P.D., Di Gleria K., Hill H.A., Lowe V.J. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **190**, 171-175.
13. Nassar A-E.F., Rusling J.F. (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3043-3044.
14. Sun W., Kong J., Deng J. (1996), *Anal. Lett.*, **29**, 2425-2439.
15. Somasundrum M., Tanticharoen M., Kirtikara J. (1996) *J. Electroanal. Chem.*, **407**, 247-251.
16. Zhung Z., Nassar A.E.F., Lu Z., Schenkman J.B., Rusling J.F. (1997) *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **93**, 1769-1774.
17. Onuoha A.C., Zu X., Rusling J.F. (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3979-3986.
18. Bowden E.F., Hawkridge F.M. (1984) *J. Electroanal. Chem.*, **161**, 355-376.
19. М.А. Шлык, Никандров В.В., Зорин Н.А., Красновский А.А. (1989) *Биохимия*, **54**, 1598-1606.
20. Никандров В.В., Аристархов А.И., Шлык М.А., Красновский А.А. (1991) *Докл. Акад. Наук СССР*, **319**, 242-245.
21. Cuendet P., Rao K.K., Gratel M., Hall D.O. (1986) *Biochemie*, **68**, 217-221.
22. Shumilin I.A., Nikandrov V.V., Popov V.O., Krasnovsky A. A. (1992) *FEBS Lett.*, **306**, 125-128.
23. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Zimin A.G., Uvarov V.Yu., Archakov A.I. (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **39**, 503-510.



24. Shumilin I.A., Nikandrov A.A., Krasnovsky A.A., Popov V.O. (1993) *FEBS Lett.*, **328**, 189-192.
25. Gu Y., Li P., Sage T., Champion P. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4993-5004.
26. Hazzard J.T., McDonough C.A., Tollin G. (1994) *Biochemistry*, **33**, 13445-13454
27. Willie A., Stayton P.S., Sligar S.G., Durham B., Millett F. (1992) *Biochemistry*, **31**, 7237-7242.
28. Yonemoto E., Riley R.L., Kim Y. II., Atherton S.,J., Schmehl R.H., Mallouk T. E. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 8081-8087.
29. Wuttke D., Gray H.B. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8455-8456.
30. Conrad D.W., Zhang H., Stewart D.E., Scott R.A. (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9909-9915.
31. Hamachi I., Fujita A. & Kunitake T. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 8811-8812.
32. Klibanov A.M. (1989) *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 141-144.
33. Khmelnitsky U.L., Welch S.H., Clark D.S., Dordick J.S. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 2647-2648.
34. Yennawar P., Yennawar N.H., Farber G.K. (1994) *Biochemistry*, **33**, 7326-7336.
35. Mionetto N., Marty J-L. & Karube I. (1994) *Biosensor and Bioelectronics*, **9**, 463-470.
36. Affleck R., Zu- Feng Xu, Suzawa V., Focht K., Clark D.S., Dordick J.S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1100-1104.
37. Affleck R., Haynes C.A., Clark D.S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5167-5170.
38. Dong A., Meyer G.D., Kendrick B.S., Mannind M.C. & Carpenter J.F. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, **334**, 406-414.
39. Klibanov A.M. (1995) *Nature*, **374**, 596.
40. Desai U.R., Osterhout J.J. Klibanov A.M. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 9420-9422
41. Yennawar H.P., Yennawar N.H., Farber G.K. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 574-585.
42. Martins S., Blanke S., Hager L.P., Sliger S. G. (1996) *Biochemistry*, **35**, 14530-14536.
43. Wu J., Gorenstein D.G. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6843-6850.
44. Levine H.L., Kaiser E.T. (1978) *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 7670-7677.
45. Kokubo T., Sassa S., Kaiser E.T., (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 606-607.
46. Kuriyan J., Simon R.J., Kokubo T., Kaiser E.T., Pahler A. (1988) *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 6261-6263.
47. Uvarov V.Yu., Shumyantseva V.V., Bukovskaya E.A., Kolyada L.N., Archakov A.I. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**, 722-755.
48. Shumyantseva V.V., Moskvitina T.L., Bulko T.V., Archakov A.I. (1997) *FASEB J., Abstracts*, **11**, 288.
49. Pirola M.C., Monti F., Aliverti A. & Zanetti G. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 480-486.
50. Bes M.T., De Lacey A.L., Peleato M.L., Fernandes V.M., Gomez-Moreno C., (1995) *Eur. J. Biochem*, **233**, 593-599.
51. Badia A., Carlini R., Fernandes A., Battaglini F., Mikkelsen S.R., English A.M. (1993) *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7051-7061.
52. Di Gleria, Hill H.A.O., Wong L.L. (1996) *FEBS Lett.*, **390**, 142-144.
53. Di Gleria, Halliwell C.M., Jacob C., Hill H.A.O. (1997) *FEBS Lett.*, **400**, 155-157.
54. Willner I. & Zahavy E. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*, **33**, 581-583.
55. Uvarov V.Yu., Tretiakov V.E., Leschenko A.V., Dzuzenova C.S., Tretiakova L.Z., Rukavishnikov I.G., Archakov A.I. (1989) *Eur. J. Biochem*, **181**, 391-396.

56. Fang X., Kobayashi Y., Halpert J.R. (1997) FEBS Lett., **416**, 77-80.
57. Narasimhulu Sh. (1993) Biochemistry, **32**, 10344-10350.
58. Morild E. (1981) Adv. in Prot. Chem., **34**, 93-167.
59. Herenamans K. (1982) Anual. Rev. Biophys. Bioeng., **11**, 1-21.
60. Hui Bon Hoa G., Di Primo C., Dondaine I., Sligar S. G., Gunsalus I. C., Douzon P. (1989) Biochemistry, **28**, 651-656.
61. Hui Bon Hoa G., Di Primo C., Deprez E. (1991) Proc. 7th Int. Conf. on Biochemistry and Biophysics of P450: Structure and Function, Biotechnological and Ecological Aspects, Moscow, Russia, 21-26.
62. Cruanes M.T., Rodgers K.K., Sligar S.G. (1992) J. Am. Chem. Soc., **114**, 9660-9661.
63. Rus O.B., Puchkaev A.V., Metelitz D.I. (1996) Биохимия, **61**, 1283-1290.
64. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Zimin A.G., Uvarov V.Yu., Archakov A.I. (1996) Biochem. Mol. Biol. Int., **39**, 503-510.
65. Shumyantseva V.V., Moskvitina T.L., Tomilova L.G., Novodanova G.N., Uvarov V.Yu., Ponomarev G.V. and Archakov A.I. (1996) Proc. 11th Int. Symp. on Microsomes and Drug Oxidations, Los Angeles, USA, 198.
66. Долгих Д. А., Куртичников М.П., Птицын О.Б., Чемерис В.В. (1996) Мол. биол., **30**, 261-272.

#### ALTERNATIVE ELECTRON SOURCES IN CYTOCHROME P450-CATALYZED REACTIONS.

V. V. SHUMYANTSEVA, T.L. MOSKVITINA, T.V. BULKO, A.I. ARCHAKOV

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya str., 10,  
119832 Moscow, Russia Fax: 7 095 245-08-57,  
E.mail: victoria@ibmh. msk.su

Influence of physico-chemical methods on catalytic activities of enzymes, (cytochrome P450 in particular), has been reviewed. Authors discussed the properties of semisynthetic flavohemoproteins based on cytochrome P450. With emppasis on recovery of alternative electron sources for redox enzymes. As alternative electron sources we have discussed electrochemical methods which allow electrons to be used as a reagent for redox system and photoreduction of photosensitive molecules. The effects of the chemical modification, high pressure, temperature, organic solvents on enzyme activity have also been analysed.

**Key words:** hemoproteins, cytochrome P450, flavocytochromes, physico-chemical methods, bioelectrochemisrty, organic solvents, photoreduction.