

УДК 535.375+543.424+577.322.2

*А. А. КВАСЮК,¹ Я. В. ДИЧЕНКО,² Н. Н. ШЕРЕШОВЕЦ,³ С. Н. ТЕРЕХОВ,³
Г. К. ЖАВНЕРКО,¹ А. В. ЯНЦЕВИЧ²*

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ СЕРЕБРА НА СПЕКТРЫ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ ЦИТОХРОМА P450 7B1

¹ *Институт химии новых материалов НАН Беларуси,*

² *Институт биоорганической химии НАН Беларуси,*

³ *Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси*

(Поступила в редакцию 27.12.2013)

Введение. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) является высокочувствительным информативным методом, который широко используется в аналитической химии и биомедицине [1]. С помощью ГКР проводятся структурно-функциональные исследования биологических молекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки и их комплексы [2], при предельно низких концентрациях (вплоть до 10^{-18} М). Для получения спектров ГКР биологических соединений исключительно важным представляется вопрос о сохранении нативной структуры взаимодействующих молекул при адсорбции их на наноструктурированной поверхности благородных металлов Au, Ag (ГКР-активных субстратов) [3]. Одним из способов решения данной проблемы является функционализация металлической поверхности биосовместимым подслоем из бифункциональных тиолов.

В настоящей работе нами исследовались спектры ГКР модельного белка цитохрома P450 7B1 (CYP7B1, EC 1.14.13.100), который относится к семейству гемсодержащих ферментов, участвующих в метаболизме различных эндогенных и экзогенных соединений [4]. Важность реакций, катализируемых цитохромом CYP7B1, заключается, прежде всего, в том, что данный фермент способен гидроксигировать нейростероиды – специфические соединения, опосредующие различные процессы высшей нервной деятельности. Однако до настоящего времени об особенностях функционирования CYP7B1 известно сравнительно мало. В связи с этим исследования механизмов связывания различных субстратов с данным белком представляют большой интерес с точки зрения разработки лекарственных препаратов и белковой инженерии.

Наиболее известным субстратом для CYP7B1 является дегидроэпиандростерон (ДГЭА) – нейроактивный стероид, обладающий нейропротекторными свойствами и способный влиять на процессы запоминания [5]. В данной статье указанное соединение используется в качестве модельного лиганда.

Цель настоящей работы – получение и изучение спектров ГКР комплекса гемопротейна CYP7B1 с ДГЭА при различных способах его иммобилизации на посеребренной поверхности пористого кремния (Ag-PSi).

Методика эксперимента. *Осаждение серебра на поверхность пористого кремния.* Наноструктурированные пленки серебра на поверхности PSi формировались путем иммерсионного осаждения из водного раствора (10^{-2} М) нитрата серебра. Пористые слои кремния получали методом анодного травления пластин кремния *p*-типа проводимости, ориентации (100) в смеси этилового спирта и плавиковой кислоты (2 : 1) в течение 10 мин при плотности тока 10 мА/см^2 .

Модификация пленок серебра бифункциональными тиолами. Для получения заряженных самоорганизующихся монослоев (СОМ) на поверхности Ag-PSi подложки выдерживали в 10^{-3} М

спиртовых растворах тиогликолевой кислоты (ТГК) (1), меркаптоундекановой кислоты (МУК) (2) и меркаптоэтиламина (2-МЭА) (3) в течение 24 ч. После чего поверхность промывали дистиллированной водой и этанолом, а затем высушивали.

Иммобилизация CYP7B1/ДГЭА на образцах Ag-PSi-COM. Осуществляли 3 способами: 1) ковалентным связыванием Ag-PSi-ТГК/ Ag-PSi-МУК с CYP7B1 с помощью 10%-ного раствора N-этил-N-(3-диметил аминопропил) карбодиимида (ЭДАК); 2) за счет электростатической адсорбции CYP7B1 на поверхности подложки, предварительно модифицированной 2-МЭА; 3) осаждением непосредственно CYP7B1 на пленку из наночастиц серебра. Образцы Ag-PSi выдерживали в $6,5 \cdot 10^{-6}$ М растворе белка в течение 2 ч, промывали дистиллированной водой и высушивали. Затем на поверхность серебра, активированного CYP7B1, наносили 10^{-2} М раствор ДГЭА, через 30 мин промывали дистиллированной водой и высушивали.

Спектры комбинационного рассеяния образцов получали на спектрометре Solar ТП, оснащенном CCD-камерой. Источником возбуждения служил He-Cd-лазер Liconix ($\lambda_{\text{возб}} = 441,6$ нм).

Результаты эксперимента и их обсуждение. Из представленных данных (рис. 1) следует, что во всех трех случаях иммобилизации CYP7B1 на поверхности Ag-PSi регистрируются спектры ГКР. При этом полоса-маркер состояния окисления наблюдается при 1373 см^{-1} , что соответствует шестикоординированному низкоспиновому феррипорфиру, где гемовое железо находится в состоянии окисления + 3.

Наиболее интенсивные спектры получены для белка, осажденного непосредственно на наноструктурированную поверхность серебра. Их интенсивность оказалась почти в 5 раз выше (рис. 1, 1), чем в случаях предварительной модификации подложек ТГК, МУК и 2-МЭА. Это может быть связано с большей удаленностью порфиринового макроцикла за счет монослоя молекул-линкеров от серебряной поверхности, где реализуется наиболее сильное локальное поле. Следует отметить, что в отличие от других цитохромов класса P450, при адсорбции которых на немодифицированную поверхность Ag имеет место деструкция белка, в случае цитохрома CYP7B1 нативность структуры сохраняется и наблюдается интенсивный спектр гемопорфирина.

Спектр ГКР цитохрома CYP7B1, адсорбированного на серебряной поверхности Ag-PSi, а также иммобилизованного на ней посредством 2-МЭА и ТГК при добавлении ДГЭА, не меняется.

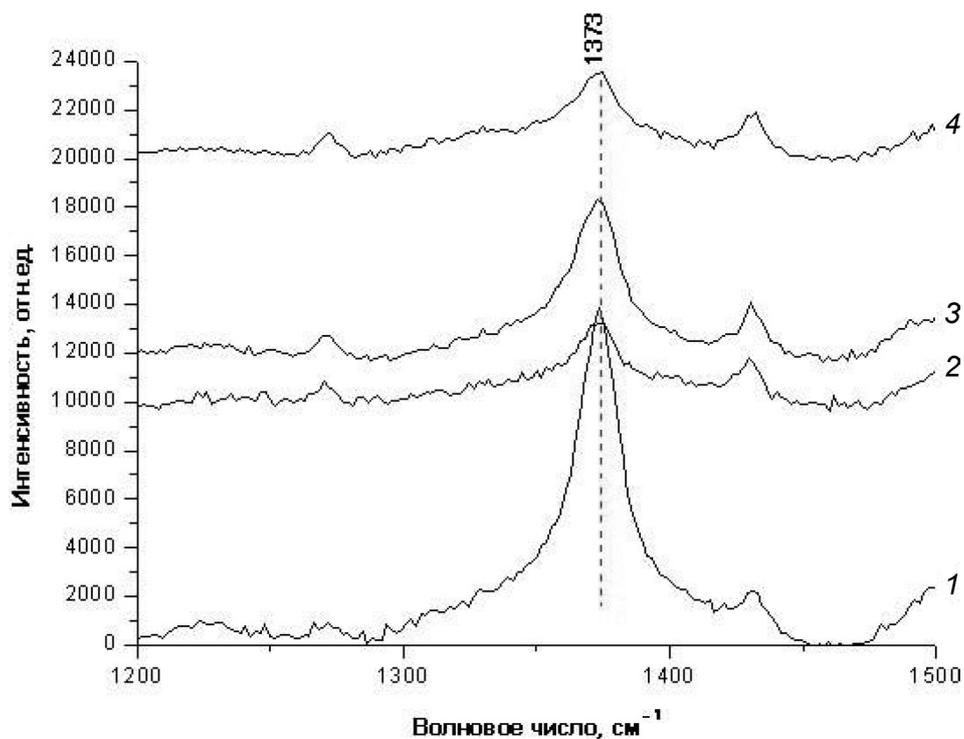


Рис. 1. Спектры ГКР цитохрома CYP7B1: 1 – на немодифицированной поверхности Ag-PSi, 2 – на Ag-PSi-ТГК, 3 – на Ag-PSi 2-МЭА, 4 – на Ag-PSi-МУК

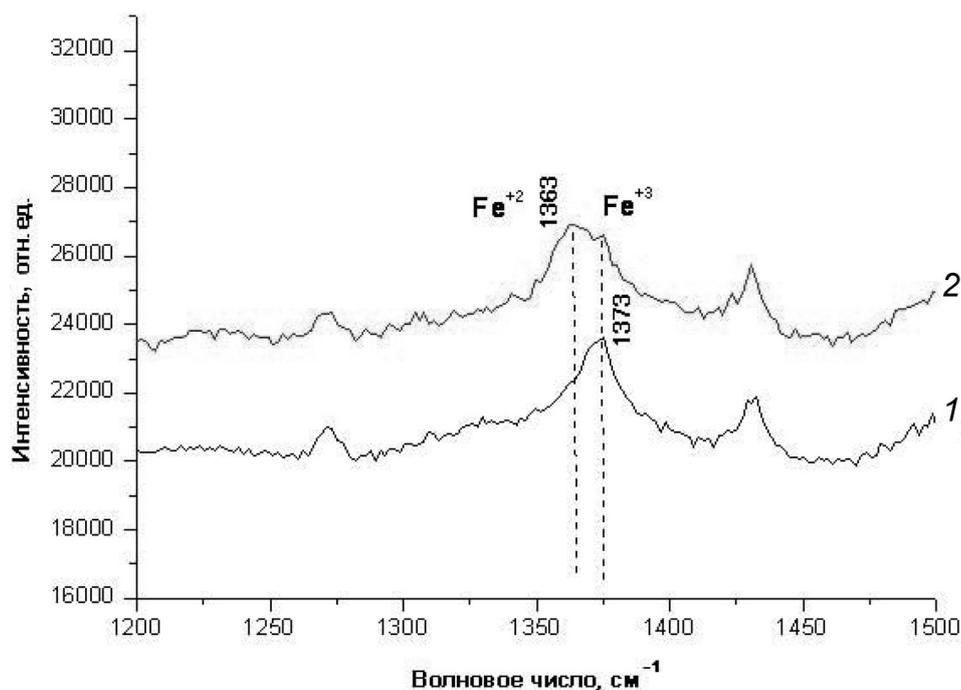


Рис. 2. Восстановление CYP7B1 на поверхности Ag-PSi-МУК: 1 – спектры ГКР CYP7B1, 2 – спектры ГКР CYP7B1/ДГЭ

Отсюда следует, что CYP7B1 необратимо связывается с серебром. В то же время при добавлении ДГЭА к CYP7B1, связанному с Ag-PSi через МУК, происходит восстановление атома железа в порфириновом цикле CYP7B1, что проявляется в характерном смещении полосы при 1373 см^{-1} в низкочастотную область (рис. 2). Детальный механизм восстановления гемпорфирина в составе белка цитохрома CYP7B1, индуцированного присутствием ДГЭА, требует дальнейших исследований.

Заключение. Из анализа спектров ГКР CYP7B1 следует, что гемопротейн необратимо адсорбируется на поверхности Ag-PSi-ТГК, Ag-PSi-2-МЭА, является низкоспиновым комплексом, который имеет состояние окисления + 3. В случае с Ag-PSi-МУК комплексообразование CYP7B1 с ДГЭА приводит к восстановлению железа.

Литература

1. Barnes M. D., Whitten W. B., Ramsey J. M. // *Anal. Chem.* 1995. Vol. 67. P. 418–420.
2. Cotton T. M. // *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers.* 1985. Vol. 2. P. 161–166.
3. Smulevich G. // *J. Phys. Chem.* 1985. Vol. 24. P. 5168–5173.
4. Guengerich F. P // *Chem Res Toxicol.* 2008. Vol. 21. P. 70–83.
5. Martin C. // *J. Biochem.* 2000. Vol. 35. P. 509–515.

A. A. KVASIUK, Y. V. DICHENKO, N. N. SHERESHOVETS, S. N. TEREKHOV, G. K. ZHAVNERKO, A. V. YANTSEVICH

EFFECT OF SURFACE FUNCTIONALIZATION OF SILVER ON SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING SPECTRA OF CYTOCHROME P450 7B1

Summary

Analysis of the surface-enhanced Raman spectra (SERS) of cytochrome P450 7B1 (CYP7B1) shows, that CYP7B1 is adsorbed irreversibly on silver surface, functionalized by TGA, 2-AET. It was concluded that CYP7B1 with DHEA, modified by MUA, is a suitable system to analyze by SERS the structure of protein without denaturation.