

<https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-37-41>



РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ЦИТОХРОМА P450 3A4 И РИБОФЛАВИНА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА

П.И. Королёва*, В.В. Шумянцева

*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»
119121, Российская Федерация, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8*

Цитохромы P450 (CYP) — обширный класс ферментов, активным центром которых является гем типа b. Основная функция цитохромов P450 заключается в биотрансформации эндогенных и экзогенных соединений в организме.

Цитохром P450 3A4 метаболизирует порядка 50% всех лекарственных соединений, поэтому изучение его каталитических свойств представляет большой интерес. Эффективным инструментом в исследовании цитохромов P450 является создание электрохимических систем, где на твёрдом носителе — электроде — с помощью модификатора иммобилизуется фермент. Электроны в таком случае поступают с электрода, заменяющего природный донор электронов НАД (Ф)Н и ограничивающего необходимость использования редокс-партнёрных белков. Задача модификатора электрода — сохранение каталитической активности фермента, а также повышение эффективности электронного транспорта при включении наночастиц благородных металлов или углеродных материалов.

Цель работы — создание более эффективных цитохром P450 электрохимических систем для увеличения выхода метаболитов ферментативных электрокаталитических реакций.

Ключевые слова: цитохром P450, биоэлектрохимия, рибофлавин, электрокатализ

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 гг.).

Для цитирования: Королёва П.И., Шумянцева В.В. Разработка модельных систем на основе комплексов цитохрома P450 3A4 и рибофлавина для повышения эффективности электрокатализа. *Биомедицина*. 2021;17(3E):37–41. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-37-41>

Поступила 15.04.2021

Принята после доработки 13.05.2021

Опубликована 20.10.2021

DESIGN OF MODEL SYSTEMS BASED ON CYTOCHROME P450 3A4 AND RIBOFLAVIN COMPLEXES FOR INCREASING THE ELECTROCATALYSIS EFFICIENCY

Polina I. Koroleva*, Victoria V. Shumyantseva

*Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich
119121, Russian Federation, Moscow, Pogodinskaya Str., 10, Building 8*

Cytochromes P450 (CYP) are a large class of enzymes, whose active site is type b heme. The main function of cytochromes P450 is biotransformation of endogenous and exogenous compounds in the organism. The cytochrome P450 3A4 metabolizes about 50% of all modern medications; therefore, its catalytic properties present significant research interest. P450 cytochromes can be effectively investigated using

electrochemical systems that consist of a solid base (electrode) and a modifier facilitating enzyme immobilization. In this case, the electron donor is an electrode substituting a natural electron donor NAD(P)H and eliminating the need to use redox-partner proteins. The electrode modifier maintains the catalytic enzyme activity and enhances the efficiency of electron transfer when noble metals and carbon materials nanoparticles are included. This work is aimed at creating more effective cytochrome P450 electrochemical systems to increase the yield of metabolites of enzymatic electrocatalytic reactions.

Keywords: cytochrome P450, bioelectrochemistry, riboflavin, electrocatalysis

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was performed under the Russian Federation fundamental research program for the long-term period of 2021–2030.

For citation: Koroleva P.I., Shumyantseva V.V. Design of Model Systems Based on Cytochrome P450 3A4 and Riboflavin Complexes for Increasing the Electrocatalysis Efficiency. *Journal Biomed.* 2021;17(3E):37–41. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-17-3E-37-41>

Submitted 15.04.2021

Revised 13.05.2021

Published 20.10.2021

Введение

Перенос электронов в цитохром P450-системах осуществляется в соответствии со схемой: НАД(Ф)Н → НАД(Ф)Н-зависимая цитохром P450 редуктаза (CPR) (ФАД (флавинадениндинуклеотида), ФМН (флавинаденинмононуклеотид)) → цитохром P450 (Fe^{3+}). Особенностью катализа цитохромов P450 является образование не только метаболита органического субстрата (гидроксилирование или N-деметилирование), но и генерация активных форм кислорода.

Цитохромы P450 для проявления каталитических свойств нуждаются в реконструкции системы передачи электронов, в которую входят редокс-партнёрные белки, эту необходимость устраняют электрохимические ферментные системы, в которых донором электронов является непосредственно электрод.

Разработка электрохимических систем для исследования свойств цитохромов P450 ставит перед собой такие проблемы, как использование минимального количества белка, сохранение нативной конформации и каталитической активности фермента. Для повышения эффективности цитохром P450-зависимого электрокатализа разработаны следующие подходы.

Обоснованный выбор модификации электродов является одним из основных факторов успешного электрокатализа. В качестве модификаторов могут использоваться такие материалы, как углеродные нанотрубки, наночастицы благородных металлов и мембраноподобные вещества [1]. Так, нами было показано, что использование для модификации электродов углеродных нанотрубок увеличивает количество электроактивного фермента с 5% для ДДАБ/ПГЭ до 45% для УНТ/ПГЭ, (ПГЭ — печатный графитовый электрод; ДДАБ — дидодецилдиметиламмоний бромид, УНТ — углеродные нанотрубки), что может быть использовано для идентификации этих гемопротеинов в биологическом материале. Однако для проявления каталитических свойств цитохромов P450 более эффективны модификации липидоподобными соединениями (например, ДДАБ) [1].

Другим подходом является увеличение количества иммобилизируемого белка или создание комплексов белка и электроактивных кофакторов в роли переносчиков электронов, например рибофлавина [8], ФМН и ФАД или создание сложных белковых комплексов с CPR и цитохромом b5 [2], создание «химерных» конструкций с совмещением гемового и флавинового доменов [7, 5].

Материалы и методы

В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлор-серебряным электродом сравнения (ПГЭ) («КолорЭлектроникс», Россия). Диаметр рабочего электрода — 0,2 см (площадь — 0,0314 см²). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl). Рекомбинантный цитохром P450 3A4 человека (142 мкМ) в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин (по объёму), получен и выделен по методике, представленной в работе [6]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы с монооксидом углерода; коэффициент поглощения $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$. В работе были использованы следующие реактивы: ацетат аммония, ацетилацетон, дидодецилдиметиламмония бромид, хлороформ, эритромицин, рибофлавин («Sigma-Aldrich», США); гидроксид калия, дигидрофосфат калия, хлорид натрия («Спектр-Хим», Россия); уксусная кислота («Fisher Scientific», США).

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата Autolab302N («Metrohm Autolab», Нидерланды), снабжённого программным обеспечением NOVA (версия 2.0).

Спектральные исследования проводили с помощью спектрофотометра Cary 100 Scan UV-Vis («Agilent», Нидерланды) и программного обеспечения Cary Win UV.

Для модификации поверхности электрода на ПГЭ наносили 1 мкл 0,1 М ДДАБ в хлороформе (10 мин, 20°C). В работе были использованы нековалентные комплексы цитохром P450 3A4: рибофлавин в соотношении 1:1 и 1:10. Ферментные электроды выдерживали при температуре 4°C 12 ч во влажной камере.

Перед началом всех электрохимических измерений электроды инкубировали в электролитном буфере (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,05 М NaCl) в течение 10 мин, 20°C. Параметры регистрации циклических вольтамперограмм (ЦВА): диапазон потенциалов — от 0 до -0,6 В (отн. Ag/AgCl), скорость развёртки потенциала — 100 мВ/с.

Для сравнения влияния различных условий модификаций фермента на N-деметилазную активность цитохрома P450 3A4 по отношению к эритромицину электрокаталитические реакции проводили в электролитном буфере с помощью ферментного электрода в присутствии 100 мкМ эритромицина при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,5 В (отн. Ag/AgCl) в течение 20 мин. Анализ скорости реакции N-деметилирования эритромицина проводили путём регистрации образования формальдегида [4].

Результаты и их обсуждение

Для исследования влияния рибофлавина на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 была выбрана система, в которой цитохром P450 3A4 и рибофлавин находились в соотношениях 1:1 и 1:10 соответственно. Соотношение 1:1 моделирует микросомальную систему с эквимольными количествами P450 3A4 и CPR [3]. Было исследовано также соотношение цитохром P450 3A4:рибофлавин 1:10.

Электрохимические параметры цитохрома P450 3A4 и комплексов цитохром P450 3A4 рибофлавин (1:1 и 1:10) приведены в таблице.

В результате цитохром P450-зависимой реакции N-деметилирования антибиотика из группы макролидов эритромицина образуется формальдегид, концентрацию которого определяли спектрофотометрически

[1]. Сравнительная каталитическая активность систем приведена в таблице.

Можно предположить, что рибофлавин стабилизирует цитохром P450 3A4 за счёт образования комплекса, моделирующего микросомальную монооксигеназную систему. Кроме того, рибофлавин может служить диффузионным медиатором электронного транспорта в электрохимической цитохром P450-системе. Возможна также роль рибофлавина, способствующая увеличению индекса сопряжения и повышению эффективности собственно реакции N-деметилирования эритромицина.

Выводы

Нековалентный комплекс цитохрома P450 3A4 и рибофлавина проявляет боль-

шую каталитическую активность по сравнению с цитохромом P450 3A4.

Соотношение цитохром P450 3A4 : рибофлавин 1:10 является более эффективным по сравнению с соотношением 1:1.

Комплексы цитохром P450 3A4 : рибофлавин моделируют цитохром P450-зависимую микросомальную монооксигеназную систему, которая позволяет повысить эффективность электрокатализа.

В дальнейшем будет исследована каталитическая активность комплексов цитохрома P450 и рибофлавина по отношению к широкому спектру субстратов и реакциям, характерным для цитохрома P450, а также роль рибофлавина в генерации активных форм кислорода в электрохимических системах с участием цитохромов P450.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Кузиков А.В., Булко Т.В., Королева П.И., Масамрех Р.А., Бабкина С.С., Гилеп А.А., Шумянцева В.В. Цитохром P450 3A4 как фермент биотрансформации лекарств: роль модификаций сенсорных систем в электрокатализе и электроанализе. *Биомедицинская химия*. 2020;66(1):64–70. [Kuzikov A.V., Bulko T.V., Koroleva P.I., Masamrekh R.A., Babkina S.S., Gilep A.A., Shumyantseva V.V. Tsitokhrom P450 3A4 kak ferment biotransformatsii lekarstv: rol' modifikatsiy sensorykh sistem v elektrokatalize i elektroanalize [Electroanalytical and electrocatalytic characteristics of cytochrome P450 3A4 using electrodes modified with nanocomposite carbon nanomaterials]. *Biomeditsinskaya khimiya [Biomedical chemistry]*. 2020;66(1):64–70. (In Russian)]. DOI: 10.18097/PBMC20206601064.
2. Bhatt M.R., Khatri Y., Rodgers R.J., Martin L.L. Role of cytochrome b5 in the modulation of the enzymatic activities of cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450 17A1). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016;170:2–18. DOI: 10.1016/J.SJBMB.2016.02.033.
3. Ducharme J., Auclair K. Use of bioconjugation with cytochrome P450 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Proteins and Proteomics*. 2018;1866(1):32–51. DOI: 10.1016/J.BBAPAP.2017.06.007.
4. Nash T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 1953;55:416–421. DOI: 10.1042/bj0550416.
5. Panico P., Castrignanò S., Sadeghi S.J., Di Nardo G., Gilardi G. Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response. *Bioelectrochemistry* 2021;138:107729. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107729.
6. Pechurskaya T.A., Lukashevich O.P., Gilep A.A., Usanov S.A. Engineering, expression, and purification of “soluble” human cytochrome P45017 α and its functional characterization. *Biochemistry (Moscow)*. 2008;73(7):806–811. DOI: 10.1134/S0006297908070092.
7. Shumyantseva V.V., Uvarov V.Y., Byakova O.E., Archakov A.I., Semisynthetic flavocytochromes based on cytochrome P450 2B4: Reductase and oxygenase activities. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;377(1):133–138. DOI: 10.1006/abbi.1998.0628.
8. Zhang C., Lu M., Lin L., Huang Z., Zhang R., Wu X., Chen Y. Riboflavin is directly involved in the N-dealkylation catalyzed by bacterial cytochrome P450 monooxygenases. *ChemBioChem*. 2020;21:2297–2305. DOI: 10.1002/cbic.202000071.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Королёва Полина Игоревна*, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»;
e-mail: 11126699@mail.ru

Polina I. Koroleva*, Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich;
e-mail: 11126699@mail.ru

Шумянцева Виктория Васильевна, д.б.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»;
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Victoria V. Shumyantseva, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Research Institute of Biomedical Chemistry named after V.N. Orekhovich;
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author