

Всероссийская конференция «Биомедицинская химия: наука и практика»

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ЦИТОХРОМЫ P450 КАК ИНСТРУМЕНТЫ ЭЛЕКТРОФЕРМЕНТАТИВНОГО СИНТЕЗА

*П.И. Королёва\*, А.А. Гулен, В.В. Шумянцева*

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10; \*e-mail: polinakoroleva1996@gmail.com

Для исследования электрокаталитических свойств цитохрома P450 2C9 и комплексов цитохром P450 2C9/FAD и цитохром P450 2C9/FMN была использована двухэлектродная система, состоящая из ферментативного электрода-катализатора, модифицированного мембраноподобным соединением дидодецилдиметиламмоний бромидом (ПГЭ/ДДАБ), и измерительного электрода, модифицированного углеродными нанотрубками (ПГЭ/УНТ). Для исследования эффективности электроферментативных реакций, катализируемых цитохромом P450 2C9, в качестве субстрата был использован нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат диклофенак. Цитохром P450 2C9 катализирует реакцию стереоспецифического гидроксирования с образованием 4'-гидроксидиклофенака. Метаболит 4'-гидроксидиклофенак регистрировали при потенциале  $E = 0.12$  (отн. Ag/AgCl). Использование FAD и FMN в качестве низкомолекулярного медиатора позволило увеличить эффективность электрокатализа системы ПГЭ/ДДАБ/СУР2C9/FAD до  $148 \pm 10\%$  и ПГЭ/ДДАБ/СУР2C9/FMN до  $113 \pm 6\%$  по сравнению с ПГЭ/ДДАБ/СУР2C9 ( $100 \pm 5\%$ ), а также увеличить скорость ферментативной реакции в 1.5 и 1.13 раза соответственно.

**Ключевые слова:** цитохромы P450; электрокатализ

**DOI:** 10.18097/BMCRM00232

## ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450 — суперсемейство ферментов, относящихся к классу оксидоредуктаз, выполняющих монооксигеназную функцию [1]. Основной функцией данных ферментов является биотрансформация эндогенных и экзогенных липофильных веществ. Цитохромы P450, обнаруженные во всех видах живых существ, катализируют огромное разнообразие регио- и стереоспецифических химических реакций, что делает эти ферменты перспективными для использования в качестве инструментов электроферментативного синтеза, а также для детоксификации ксенобиотиков [2, 3].

Цитохром P450 2C9 (СУР2C9) — один из основных изоферментов цитохрома P450 в организме человека, отвечающий за биотрансформацию лекарственных препаратов. К препаратам, метаболизируемым СУР2C9, относятся такие значимые лекарственные препараты, как диклофенак, S-варфарин, ибупрофен, напроксен и т.д. [4].

В клетке и в реконструированных системах для работы цитохрома P450 необходимы белки редокс-партнёры, поэтому перспективным является исследование свойств цитохрома P450 в электрохимических системах, где источником электронов является электрод. Поскольку каталитический цикл цитохрома P450 является сложным и многостадийным, на первой стадии которого осуществляется присоединение субстрата [5], более длительное взаимодействие фермента и субстрата на электроде способствует увеличению эффективности электрокаталитического процесса.

С целью повышения эффективности электрокаталитических параметров цитохром P450 2C9-систем в данной работе предложен подход, моделирующий микросомальный путь электрон-транспортного механизма переноса электронов и использующий в качестве низкомолекулярной модели редуктазы, как белка редокс-партнёра, флавиновых кофакторов (флавиномононуклеотида (FMN), флавинадениндинуклеотида (FAD)) [6].

## МЕТОДИКА

Электрохимические измерения проводили с использованием потенциостата PGSTAT 12 Autolab, ("Metrohm Autolab Ins.", Нидерланды) с программным обеспечением GPES, (версия 4.9.7) и PGSTAT 312N Autolab с программным обеспечением NOVA (версия 2.0). В работе использовали трёхконтактные электроды, получаемые методом трафаретной печати (ПГЭ) ("КолорЭлектроникс", Россия) с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлоридсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода составлял 0.2 см (площадь 0.0314 см<sup>2</sup>). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (отн. Ag/AgCl).

В работе были использованы следующие реактивы: гидроксид калия, дигидрофосфат калия, хлорид натрия ("Спектр-Хим", Россия); дидодецилдиметиламмония бромид (ДДАБ), диклофенак натрия, хлороформ ("Sigma-Aldrich", США); флавинаденинмононуклеотид (FMN) ("Фармстандарт", Россия); флавинадениндинуклеотид (FAD) ("Fluka", Швейцария);



водную дисперсию 0.2% одностеночных углеродных нанотрубок (диаметр  $1.6 \pm 0.4$  нм, длина  $\geq 5$  мкм, площадь поверхности  $1000 \text{ м}^2/\text{г}$ ), стабилизированных карбоксиметилцеллюлозой TUBALL™ BATT H2O (“OCSIAL”, Россия).

Рекомбинантный CYP2C9 (210 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 [7]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы гемопротейна с монооксидом углерода; коэффициент поглощения  $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [8].

Для модификации ПГЭ на рабочую поверхность электрода наносили 1 мкл 0.1 М ДДАБ в хлороформе, после испарения хлороформа на электрод наносили 1 мкл 210 мкМ CYP2C9.

Для иммобилизации нековалентного комплекса CYP2C9 с FMN или FAD растворы флавиновых нуклеотидов и CYP2C9 смешивали в эквимолярных концентрациях, инкубировали 5 мин и наносили на поверхность ПГЭ, модифицированную ДДАБ (ПГЭ/ДДАБ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Увеличение каталитических параметров взаимодействия цитохрома P450 2C9 и субстрата путём образования эффективного фермент-субстратного комплекса*

Первым шагом к увеличению эффективности электрокатализа цитохромов P450 является взаимодействие фермента с субстратом и образование фермент-субстратного комплекса между иммобилизованным ферментом и субстратом. Ранее нами было установлено, что предварительная инкубация ферментного электрода в буфере, содержащем субстрат, увеличивает эффективность

электрокаталитической реакции в 1.46 раза, а также показана зависимость каталитического тока взаимодействия фермента с субстратом от времени образования фермент-субстратного комплекса на электроде [6]. На рисунке 1А представлены циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9/FMN в присутствии 100 мкМ диклофенака после прединкубации. Сравнительная диаграмма величин каталитического тока от времени прединкубации представлена на рисунке 1Б.

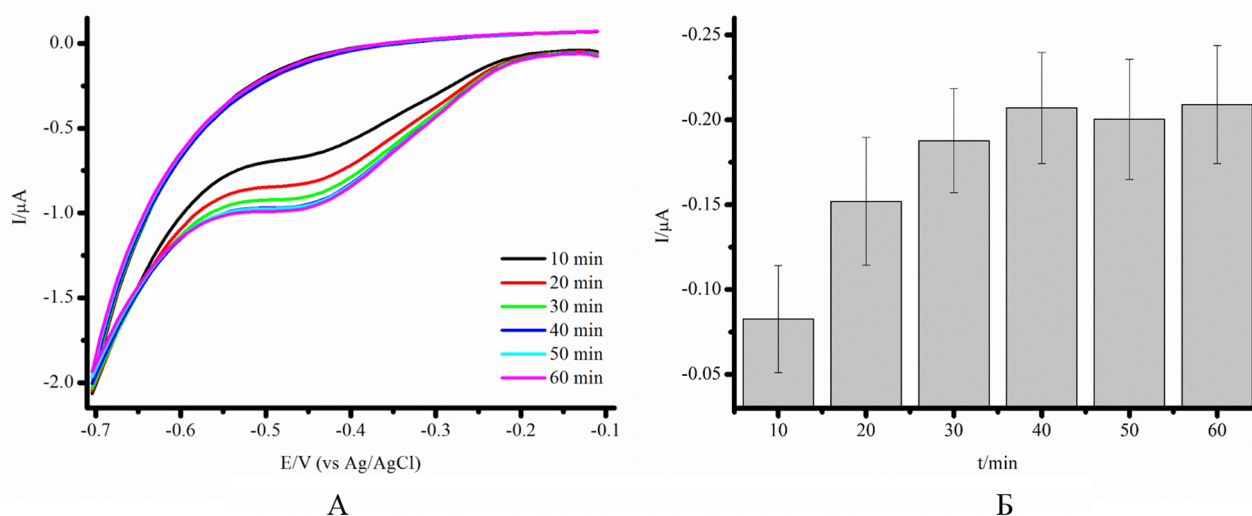
Этап предварительного образования фермент-субстратного комплекса способствует увеличению каталитического тока цитохрома CYP2C9 в присутствии диклофенака, оптимальное время прединкубации — 30 мин.

*Повышение эффективности каталитического процесса путём использования цитохрома P450 2C9 в комплексе с FAD и FMN как низкомолекулярными моделями NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы*

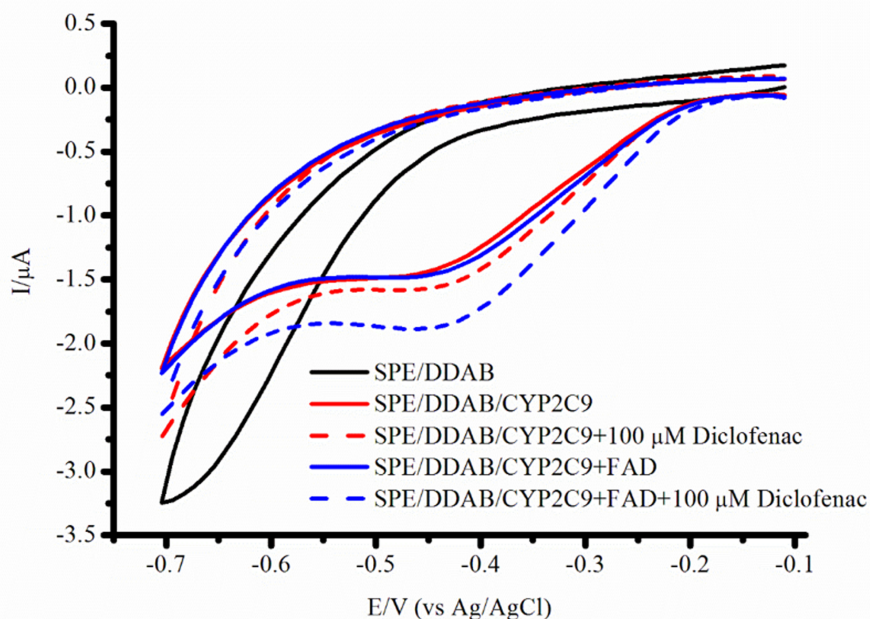
Как было отмечено ранее [6], иммобилизация на электроде нековалентного комплекса цитохрома P450 и флавиновых нуклеотидов способствует увеличению электрохимических параметров взаимодействия. В данной работе был исследован нековалентный комплекс цитохрома P450 2C9 с FAD и FMN.

На рисунке 2 представлены циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9 и ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9/FAD.

Согласно вольтамперограммам были рассчитаны электрохимические параметры для систем ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9, ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9/FAD. Потенциал восстановления в этих системах существенно не отличается и равен  $E_{\text{red}} = -0.425 \pm 0.005 \text{ В}$  и  $E_{\text{red}} = -0.420 \pm 0.008 \text{ В}$  соответственно. При добавлении диклофенака в систему потенциал катализа смещался в положительную область потенциалов и соответствовал значениям  $E_{\text{cat}} = -0.402 \pm 0.017 \text{ В}$



**Рисунок 1.** (А) Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ/CYP2C9/FMN в присутствии 100 мкМ диклофенака после прединкубации в интервале 10–60 мин с шагом 10 мин. Измерения проводили в 0.1 М калий-фосфатном буфере (pH 7.4) в диапазоне потенциалов от -0.1 до -0.7 В. Скорость развёртки потенциала 0.1 В/с. (Б) Зависимость величины каталитического тока взаимодействия CYP2C9 с диклофенаком от времени взаимодействия фермента и субстрата.



**Рисунок 2.** Циклические вольтамперограммы ПГЭ/ДДАБ (чёрный), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9 (красный), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9 в присутствии 100 мкМ диклофенака (красный пунктир), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9/ФАД (синий), ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9/ФАД в присутствии 100 мкМ диклофенака (синий пунктир). Измерения проводили в 0.1 М калий-фосфатном буфере (рН 7.4) в диапазоне потенциалов от -0.1 до -0.7 В. Скорость сканирования 0.1 В/с.

для ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9 и  $E_{cat} = -0.407 \pm 0.007$  для ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9/ФАД. Также было рассчитано соотношение каталитического тока в присутствии диклофенака к току восстановления в присутствии кислорода. Оно составило 1.35 для системы ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9/ФАД и 1.14 для ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9, что также говорит о большей эффективности системы с флавиновым кофактором.

В данной работе для исследования электрокаталитических свойств цитохрома СУР2С9 и комплексов цитохром СУР2С9/ФАД и цитохром СУР2С9/ФМН была использована двухэлектродная система, состоящая из ферментативного электрода-катализатора, модифицированного мембраноподобным соединением дидодецилдиметиламмоний бромидом (ПГЭ/ДДАБ), и измерительного электрода, модифицированного углеродными нанотрубками (ПГЭ/УНТ). Для исследования эффективности электроферментативных реакций, катализируемых цитохромом СУР2С9, в качестве субстрата был использован нестероидный противовоспалительный лекарственный препарат диклофенак. СУР2С9 катализирует реакцию стереоспецифического гидроксирования с образованием 4'-гидроксидиклофенака. Метаболит 4'-гидроксидиклофенак регистрировали с помощью квадратно-волновой вольтамперометрии при потенциале  $E = 0.12$  (отн. Ag/AgCl) [9].

Использование ФАД и ФМН, как низкомолекулярного медиатора, позволило увеличить эффективность электрокатализа системы ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9/ФАД до  $148 \pm 10\%$  и ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9/ФМН до  $113 \pm 6\%$  по сравнению с ПГЭ/ДДАБ/СУР2С9 ( $100 \pm 5\%$ ), а также увеличить скорость ферментативной реакции в 1.5 и 1.13 раза соответственно.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были разработаны электрохимические системы на основе нековалентных комплексов СУР2С9 с флавиновыми кофакторами. Показано, что использование ФАД и ФМН в качестве низкомолекулярных моделей НАДФН-зависимой цитохром Р450 редуктазы способствует увеличению эффективности электрокатализа.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не связана с исследованиями, в которых в качестве объекта выступают люди или животные.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2)

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Guengerich, F.P. (2015) Human cytochrome P450 enzymes. In: Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (de Montellano O.P.R., ed.). Springer, N. Y., pp. 523–785.
2. Zuccarello, L., Barbosa, C., Todorovic, S., Selivera, C.M. (2021) Electrocatalysis by heme enzymes-applications in biosensing. *Catalysts*, **11**(2), 218. DOI:10.3390/catal11020218

3. *Bernhardt, R., Urlacher, V.B.* (2014) Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: Chances and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**(14), 6185–6203. DOI: 10.1007/s00253-014-5767-7
4. *Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Koroleva, P.I., Shikh, E.V., Makhova, A.A., Kisel, M.S., Haidukevich, I.V., Gilep, A.A.* (2022) Human cytochrome P450 2C9 and its polymorphic modifications: Electroanalysis, catalytic properties, and approaches to the regulation of enzymatic activity. *Processes*, **10**, 383. DOI: 10.3390/pr10020383
5. *Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I.* (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem. Rev.*, **105**(6), 2253–2278. DOI: 10.1021/cr0307143
6. *Shumyantseva V.V., Koroleva P.I., Bulko T.V., Shkel T.V., Gilep A.A., Veselovsky A.V.* (2023) Approaches for increasing the electrocatalytic efficiency of cytochrome P450 3A4. *Bioelectrochemistry*, **149**, 108277. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108277
7. *Gilep, A.A., Guryev, O.V., Usanov, S.A., Estabrook, R.W.* (2001) Reconstitution of the enzymatic activities of cytochrome P450s using recombinant flavocytochromes containing rat cytochrome b(5) fused to NADPH-cytochrome P450 reductase with various membrane-binding segments. *Arch. Biochem. Biophys.*, **390**(2), 215–221. DOI: 10.1006/abbi.2001.2372
8. *Omura, T., Sato, R.* (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.*, **239**(7), 2379–2385.
9. *Kuzikov, A.V., Filippova, T.A., Masamrekh, R.A., Shumyantseva, V.V.* (2022) Electroanalysis of 4'-hydroxydiclofenac for CYP2C9 enzymatic assay. *Electrocatalysis*, **13**(5), 630–640. DOI: 10.1007/s12678-022-00753-3

Поступила: 25. 06. 2024.

После доработки 28. 07. 2024.

Принята к публикации: 16. 08. 2024.

## CYTOCHROMES P450 AS TOOLS FOR ELECTROENZYMATIC SYNTHESIS

*P.I. Koroleva\**, *A.A. Gilep*, *V.V. Shumyantseva*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; \*e-mail: polinakoroleva1996@gmail.com

The electrocatalytic properties of cytochrome P450 2C9 and the cytochrome P450 2C9/FAD and cytochrome P450 2C9/FMN complexes have been studied using a two-electrode system. The system consisted of an enzymatic catalyst electrode modified by the membrane-like compound didodecyldimethylammonium bromide (SPE/DDAB) and a measuring electrode, modified with carbon nanotubes (SPE/CNT). To study the effectiveness of electroenzymatic reactions catalyzed by cytochrome P450 2C9, the nonsteroidal anti-inflammatory drug diclofenac was used as a substrate. Cytochrome P450 2C9 catalyzes the stereospecific hydroxylation reaction to form 4'-hydroxydiclofenac. The metabolite 4'-hydroxydiclofenac was recorded at a potential  $E = +0.12$  (relative to Ag/AgCl). The use of FAD and FMN as low-molecular mediators made it possible to increase the efficiency of electrocatalysis of the SPE/DDAB/CYP2C9/FAD system to  $148 \pm 10\%$  and SPE/DDAB/CYP2C9/FMN to  $113 \pm 6\%$  compared to SPE/DDAB/CYP2C9 ( $100 \pm 5\%$ ), and also increase the rate of the enzymatic reaction by 1.5 and 1.13 times, respectively.

**Key words:** cytochrome P450; electrocatalysis

### FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 25.06.2024; revised: 28.07.2024; accepted: 16.08.2024.