

ЦИТОХРОМЫ P450: ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМОВ КАТАЛИЗА И ЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРОВ И БИОРЕАКТОРОВ

Обзор

© 2023 П.И. Королева¹, Т.В. Булко¹, Л.Е. Агафонова¹, В.В. Шумянцева^{1,2*}

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 22.06.2023

После доработки 23.08.2023

Принята к публикации 25.08.2023

Цитохромы P450 – уникальное семейство ферментов, обнаруженное во всех царствах живых существ (у животных, бактерий, растений, грибов, архей). Основной функциональной ролью цитохромов P450 является биотрансформация экзогенных и эндогенных соединений. Данный обзор посвящен проблеме повышения эффективности электрокатализа цитохромами P450, которые обладают уникальными возможностями как для создания биосенсоров, так и для биотехнологического применения. В работе рассмотрены основные способы создания реконструированных и электрохимических каталитических систем на основе цитохромов P450, а также современные тенденции и подходы к практическому применению цитохромов P450.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром P450, каталитический механизм, биоэлектрохимия, электрокатализ.

DOI: 10.31857/S0320972523100172, **EDN:** OVNWSI

ВВЕДЕНИЕ. РОЛЬ ЦИТОХРОМОВ P450 В БИОТРАНСФОРМАЦИИ ЭКЗОГЕННЫХ И ЭНДОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Цитохромы P450 являются гемопротеинами, относящимися к цитохромам типа *b*. Они представлены в бактериях, грибах, растениях, дрожжах, беспозвоночных и позвоночных животных. У млекопитающих цитохромы P450 обнаруживаются в различных органах. Их наибольшая концентрация наблюдается в тканях печени, эпителии кишечника, мозга, легких, и почек. У человека выявлено 57 генов различных цитохромов P450. Они подразделяются на 18 семейств и 43 подсемейства. Цитохромы P450 метаболизируют большое разнообразие как эндогенных, так и экзогенных субстратов. Цитохромы P450 1A1, 2B6, 2C9, 3A4 играют важную роль в катаболизме эндогенных сте-

роидов, таких как тестостерон, прогестерон, андростендион, кортизол и желчные кислоты, подвергая их реакции гидроксирования. Цитохромы P450 11A1, 17A1, 19A1, 21A2 участвуют в биосинтезе стероидных гормонов (прегненолон, прогестерон, андростендион, эстрон, тестостерон, эстрадиол, кортизол и альдостерон) и холестерина [1, 2]. Кроме того, цитохромы P450 участвуют в метаболизме витамина D3, арахидоновой кислоты, жирных кислот [3, 4]. Крайне важным свойством цитохромов P450 является обезвреживание токсинов, попадающих в организм, а также биотрансформация лекарственных средств. Наиболее экспрессируемые в организме человека цитохромы P450 3A4, 2C9, 2E1, 1A2 участвуют в 90% реакций I фазы метаболических превращений всех применяемых лекарств [2, 5].

Цитохромы P450 катализируют стерео- и региоспецифичные реакции в отношении

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДДАБ – дидодецилдиметиламмоний бромид; CPR – NADPH-зависимая цитохром P450 редуктаза.

* Адресат для корреспонденции.

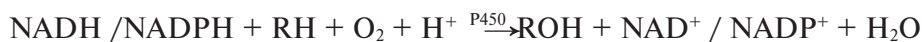


Схема 1. Обобщенный механизм реакции, катализируемой цитохромом P450

насыщенных и ненасыщенных углеводородов, ароматических соединений и стероидов. Под действием цитохромов P450 возможны следующие реакции: окисление спиртов, N-, O-, S-деалкилирование, расщепление насыщенной углерод-углеродной (C–C) и углерод-водородной (C–H) связи с участием молекулярного кислорода при атмосферном давлении, приводящее к образованию более полярного, по сравнению с субстратом, продукта реакции, способствуя тем самым II фазе метаболизма с участием N-ацетилтрансферазы, глутатион-S-трансферазы, глюкуронозилтрансферазы, эпоксидгидролазы и метилтрансферазы [6]. Это приводит к большому разнообразию метаболических путей биотрансформации экзогенных и эндогенных соединений [7]. Окисление лекарственного препарата, осуществляемое при участии изоферментов цитохрома P450, может приводить к снижению, инаktivации или изменению его фармакологических свойств или, наоборот, повышать его фармакологическую активность. Например, изоформы CYP2D6 и CYP3A4 участвуют в метаболизме противоопухолевого препарата — тамоксифена, и образовании эндоксифена, обладающего большей, по сравнению с тамоксифеном, противоопухолевой активностью.

Благодаря разнообразию не только среди цитохромов P450, но и многообразию субстратов, метаболизируемых данными ферментами, а также типов катализируемых реакций, исследование каталитических свойств цитохромов P450 важно для решения медицинских и фармакологических задач. В связи с этим разработка систем для моделирования цитохром P450-зависимых путей биотрансформации и специфических химических реакций является актуальной задачей современной биотехнологии, биохимии, биоэлектрохимии, персонализированной медицины и энзимологии.

В последние годы был опубликован ряд обзоров, посвященных созданию биосенсоров на основе ферментов, в том числе цитохромов P450 и других гемопротеинов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков [8–11]. Основная цель данных обзоров — показать разнообразие электрохимических биосенсоров и их комбинации с другими методами, такими как масс-спектрометрия, газовая и жидкостная хроматография, для исследования метаболитов реакций. Цель данного обзора — рассмотреть

различные подходы, способствующие повышению эффективности цитохром P450-ферментативных систем, и, в перспективе, созданию биореакторов.

МЕХАНИЗМ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМ P450-СИСТЕМ

Особенностью каталитического механизма цитохромов P450 является бисубстратная схема — с использованием двух субстратов, молекулярного кислорода и органической молекулы, при этом один из атомов кислорода присоединяется к молекуле субстрата, а другой протонируется с образованием воды (схема 1).

Для цитохромов P450 существуют различные варианты электрон-транспортной цепи [12–14], характерные для различных организмов или различной клеточной локализации. Для цитохромов P450 выделяют 10 классов электрон-транспортных систем. В более общем виде их можно классифицировать на три типа: митохондриальные, микросомальные и самодостаточные (рис. 1) [12–15].

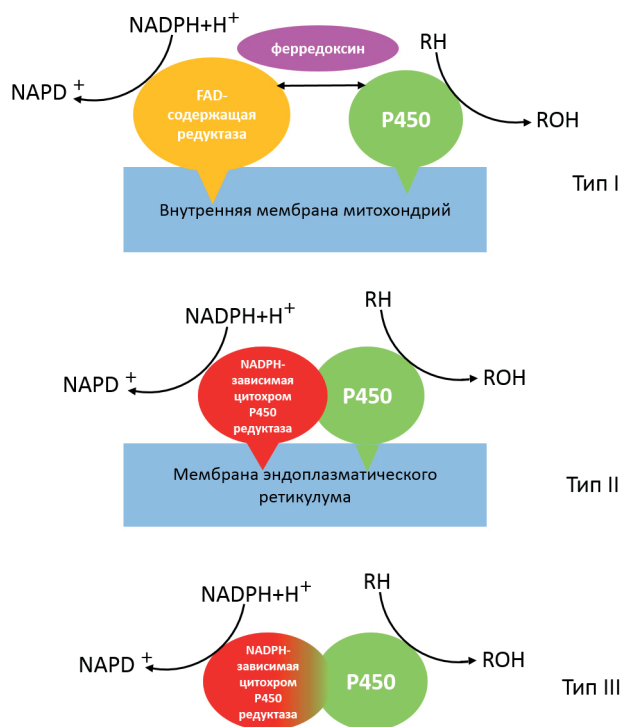


Рис. 1. Структурная организация цитохром P450-систем [12–15]

NADH/NADPH → редуктаза (FAD → FMN) → Цитохром P450

Схема 2. Электронный транспорт в микросомальных системах

К первому типу относятся как некоторые бактериальные изоформы цитохрома P450, так и локализованные в митохондриях эукариот. Электрон-транспортная цепь таких цитохромов P450 состоит из трех отдельных белков: FAD-содержащей редуктазы, переносящей восстановительные эквиваленты на ферредоксин, который передает восстановительные эквиваленты непосредственно на цитохром P450. В бактериальных системах все перечисленные белки растворимы, а в эукариотических клетках только ферредоксин является растворимым и локализован в матриксе митохондрий, а редуктаза и цитохром P450 закреплены на внутренней мембране митохондрий. Примером цитохрома P450 млекопитающих митохондриального типа может служить семейство CYP11, локализованное в надпочечниках и отвечающее за биосинтез стероидных гормонов [16]. Примером бактериальных цитохромов P450 является фермент P450_{cam}, относящийся к семейству CYP101 из *Pseudomonas putida*, отвечающих за биотрансформацию D-камфоры [17].

Второй тип электрон-транспортной цепи характерен для большинства изоформ цитохрома P450 эукариот, обладающих наибольшим разнообразием каталитических реакций. Микросомальная система состоит из двух белков, интегрально закрепленных на поверхности эндоплазматического ретикула: NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы (CPR) и цитохрома P450. Цитохром *b*₅ участвует в независимом от CPR переносе электронов от NADH-зависимой цитохром *b*₅-редуктазы, а также в аллостерической регуляции цитохрома P450 [15].

Некоторые бактериальные цитохромы P450 принадлежат к самодостаточным ферментам. В таких системах белок редокс-партнер находится на одной полипептидной цепи с цитохромом P450. Для таких белков существуют различные комбинации доменов, участвующих в электрон-транспортной цепи цитохромов P450. Наиболее изученным из флавогемопротеинов является CYP102A1 (P450 BM3) из *Bacillus megaterium*, используемый в качестве модели эукариотических цитохромов P450 благодаря идентичной электрон-транспортной цепи, состоящей из редуктазы и цитохрома P450. В молекуле CYP102A1 гемовый домен цитохрома P450 связан через N-конец с CPR [18] (рис. 1).

Электронный транспорт в микросомальных системах происходит в соответствии со схемой 2, где FAD — флавинадениндинуклеотид и FMN — флавинмоноклеотид, входящие в состав флавопротеина CPR [12].

На рис. 2 представлен каталитический цикл цитохрома P450 [2, 13, 19]. Впервые последовательное двухэлектронное восстановление цитохрома P450 и существование нескольких интермедиатов было открыто для бактериального цитохрома P450 101 (CYP101) [20–22] и микросомальных систем [23] в конце 60-х — начале 70-х гг. Связывание субстрата с ферментом в низко-спиновом Fe^{III}-состоянии (I) приводит к образованию фермент-субстратного комплекса и изменению низко-спинового состояния (нередко частично, и иногда с вытеснением координированной воды из активного центра фермента) в высоко-спиновый субстрат-связывающий комплекс (II). Высоко-спиновый ион Fe^{III} имеет более положительный потенциал восстановления и, таким образом, ион железа гема активного центра цитохрома P450 принимает электрон и переходит в Fe^{II}-состояние (III): Fe^{III} + 1 e[−] → Fe^{II}. Среди различных изоферментов цитохрома P450 возможны вариации в каталитическом цикле и сдвиг спина не всегда осуществляется [24].

Связывание кислорода приводит к образованию окси-P450 (IV), который является последним относительно устойчивым интермедиатом в этом цикле. Далее следует восстановление комплекса окси-P450, последовательное образование интермедиата пероксо-Fe^{III} (Va), его протонирование в интермедиат гидропероксо-Fe^{III} (Vb), второе протонирование дистального атома кислорода с частичным гетеролизом связи O—O и образованием высоковалентной феррильной формы Fe^{IV} (VI) и воды; оксигенация субстрата с формированием комплекса (VII) протекает при высокой скорости, без накопления промежуточных интермедиатов, что затрудняет кинетические исследования данного каскада реакций.

В дополнение к нескольким отдельным промежуточным состояниям, каждое из которых имеет свои собственные уникальные свойства, каталитический цикл цитохрома P450 содержит по меньшей мере 3 разветвляющиеся точки, где возможны дополнительные реакции [25].

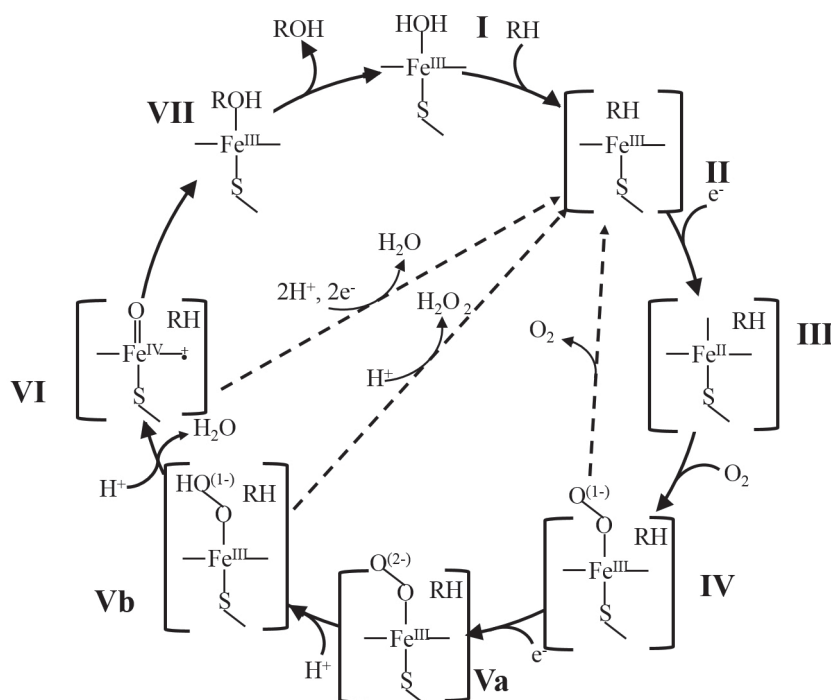


Рис. 2. Каталитический цикл цитохрома Р450. Первым этапом каталитического цикла цитохрома Р450 является образование фермент-субстратного комплекса, и все последующие превращения происходят в этом комплексе [2, 13, 19, 23, 24]

К основным побочным путям протекания реакции относятся [19]:

- автоокисление фермента окси- Fe^{II} (IV) с образованием супероксидного аниона и возвращения фермента к его основному состоянию (II);
- пероксидное направление, когда координированный пероксид или гидропероксидный анион (Va и Vb) отщепляются от иона железа, образуя пероксид водорода, таким образом, завершая непродуктивное (с точки зрения превращения субстрата) двух-электронное восстановление кислорода;
- оксидазное расщепление, где интермедиат оксо- Fe^{IV} (VI) окисляется до воды вместо оксигенации субстрата, что приводит к четырехэлектронному восстановлению молекулы кислорода с последующим образованием двух молекул воды.

Неполная сопряженность каталитического цикла, т.е. нарушение стехиометрии реакции, является одним из затруднений, возникающим при катализе цитохромами Р450. В результате перечисленных выше реакций накапливаются активные формы кислорода (АФК), которые могут повреждать активный центр, что приводит к самоинаktivации фермента, а также участвовать в реакциях неспецифического окисления субстрата [26].

В связи с широкой субстратной специфичностью, большим разнообразием катализируе-

мых химических реакций и метаболической активностью по отношению к лекарственным препаратам разработка биосенсоров и биореакторов на основе цитохромов Р450 представляет важную и перспективную задачу для фармакологии и для персонализированной медицины (поиск новых субстратов и ингибиторов этого класса гемопротеинов в режиме биосенсорного анализа), для биотехнологии в режиме биореакторов (получение прекурсоров, сложных по строению и синтезу химических соединений), для медицины (анализ межлекарственных взаимодействий) (рис. 3) [27–31].

ПЕРСПЕКТИВЫ ЦИТОХРОМ Р450-БИОРЕАКТОРОВ

Цитохромы Р450 являются наиболее универсальными природными катализаторами благодаря следующим характеристикам:

- цитохромы Р450 — функционально разнообразные ферменты;
- цитохромы Р450 катализируют регио- и стереоспецифичное окисление неактивированных углеводов, которое трудно провести с помощью химического синтеза;
- цитохромы Р450 — уникальные хемо- и энантиоселективные ферменты, которые могут быть вовлечены в производство высокоценных продуктов.

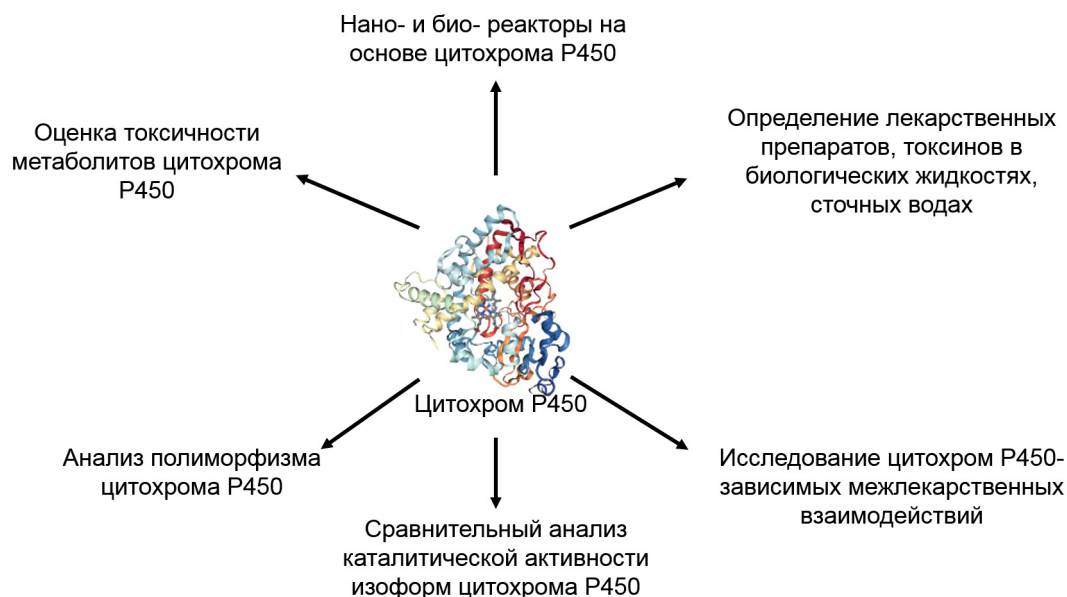


Рис. 3. Потенциальное применение цитохром P450-систем

Особенностью цитохромов P450 является широкая субстратная специфичность. Кроме того, субстраты одного изофермента могут существенно отличаться между собой по структуре и подвергаться ферментативному превращению по различным механизмам. С другой стороны, одно и то же химическое соединение может по-разному метаболизироваться разными изоформами цитохромов P450. Эти причины делают цитохромы P450 крайне перспективными в качестве биореакторов.

Многие биологически активные соединения растительного происхождения, проявляющие разнообразные терапевтические эффекты, могут быть получены биотехнологически с помощью цитохромов P450, найденных в растениях [32]. Например, дитерпеноидный таксол (паклитаксел), один из компонентов коры тихоокеанского тиса (*Taxus brevifolia*), эффективного антимитотического вещества, применяемого как противораковое лекарство, может быть получен с помощью биосинтеза, одной из стадий которого является цитохром P450-зависимое гидроксилирование в положении С-5 с последующей перегруппировкой [33]. Получение аутокаидов, физиологически важных энантиоселективных производных арахидоновой и линоленовой кислот, реализовано с помощью бактериального цитохрома P450 BM3 и его мутантной формы F87V [34].

Одним из примеров применения цитохромов P450 на промышленном уровне является синтез правастатина, который входит в состав статинов, разработанных для снижения уровня холестерина и уменьшения риска сердечно-

сосудистых заболеваний. Они действуют в качестве ингибиторов 3β -гидрокси-3-метилглютарил-KoA (HMG-CoA) редуктазы, которая является ферментом, контролирующим скорость биосинтеза холестерина. Правастатин синтезируется из соединения компактина через стереоселективное гидроксилирование. Гидроксилирование в положении С-6 осуществляется с использованием бактериальных ферментов CYP105A3 (P450_{sca2}) из *Streptomyces carbophilus* в процессе, разработанном компанией «Daiichi-Sankyo». Такие биореакторы разработаны с использованием дополнительных NADPH-зависимых белков редокс-партнеров. Концентрация NADPH поддерживается постоянной при помощи ферментативной регенерирующей системы [27, 35–37].

СЛОЖНОСТИ В СОЗДАНИИ ЦИТОХРОМ P450-БИОРЕАКТОРОВ И ПУТИ ИХ ПРЕОДОЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Потенциал применения цитохромов P450 в биотехнологии крайне широк, однако имеет ряд ограничений, сдерживающих развитие этого направления [27, 29, 38–40]. Основным затруднением в использовании цитохромов P450 в качестве биореакторов является сложность и многостадийность каталитического цикла, требующая для функционирования фермента дополнительных белков, выполняющих функцию редокс-партнеров, а также кофактор NADPH как источник электронов.

Ниже перечислены сложности, возникающие при работе с цитохром P450-системами. По сравнению с другими классами ферментов цитохромы P450 демонстрируют достаточно низкую скорость превращения субстрата. Это можно объяснить сложностью каталитического цикла цитохромов P450 и большим количеством энергии, затрачиваемым на диссоциацию фермент-субстратного комплекса [38]. Для каталитической реакции необходимы электроны, получаемые от NADH или NADPH. Кроме источника электронов, для цитохромов P450 необходима эффективная электрон-транспортная цепь, состоящая из белков редокс-партнеров. Скорость реакции в этом случае может лимитироваться скоростью передачи электронов от белка к белку, а также эффективностью белок-белкового взаимодействия. Исключения составляют самодостаточные флавогемопротейны, в которых на одной полипептидной цепи содержатся гемовый и редуктазный домены. Примером является цитохром P450 102A1 (BM3), выделенный из *B. megaterium* [41, 42].

Разработаны методы экспрессии слитных конструкций, содержащих гемовый и редуктазный домены [43]. В процессе каталитического цикла цитохрома P450 может возникать разобщение между окислением NADH или NADPH и образованием продукта, что приводит к накоплению АФК, которые могут приводить к деградации как гемовой части, так и апопротеина.

При использовании цельноклеточных систем, решающих проблему необходимости добавления и регенерации кофактора, существуют проблемы низкого потребления субстрата и сниженного вывода продукта во внеклеточное пространство. Также существует проблема токсичности субстрата или продукта для клетки.

Для преодоления сложностей каталитического цикла цитохром P450-зависимых реакций разработаны различные подходы. Применение альтернативных доноров электронов на основе физико-химических методов может быть использовано для прямого восстановления фермент-субстратного комплекса без необходимости в CPR, цитохроме b_5 и NADPH. Один из таких подходов использует протекание реакции по пути «пероксидазного шунта» (пути $\text{VI} \rightarrow \text{II}$ и $\text{Vb} \rightarrow \text{II}$; рис. 2, пунктирные линии) с использованием пероксида водорода и органических пероксидов (например, гидропероксида кумола). Однако пероксид-зависимые реакции, несмотря на высокие каталитические константы, приводят в быстрой необратимой

инактивации гемопротейнов и низкой операционной стабильности системы [28, 44–46].

Неполная сопряженность каталитического цикла цитохромов P450, представленная на рис. 2, может приводить к образованию АФК. Накопление АФК может приводить к окислительному стрессу и ряду заболеваний, а также повреждению и самоинактивации цитохрома P450 [46, 47]. Бактериальные цитохромы P450 более стабильны по сравнению с ферментами из других источников [25, 48, 49]. Для бактериальных цитохромов P450, катализирующих реакции гидроксилирования, в качестве косубстрата может выступать пероксид водорода. При таком механизме реакции с помощью «пероксидазного шунта» происходит превращение соединения II (см. рис. 2) в соединение VI с превращением пероксида водорода в воду. Кроме того, для протекания реакции по данному механизму могут использоваться другие пероксиды, например пероксид кумола или трет-бутилгидропероксид [25, 48]. В такой системе не требуются дорогостоящие кофакторы (NADH или NADPH) в качестве доноров электронов. Данный подход уже был реализован в ряде работ. Например, в работе Chen et al. [49] использовали цитохром P450_{BSB} для реакций гидроксилирования жирных кислот в β -положении. Продукты такого метаболического превращения представляют большой интерес вследствие их биологической активности. Перспективным путем для получения биотоплива является реакция декарбонирования жирных кислот с образованием алкенов с двойной связью в положении C-1. Это превращение катализируется ферментом OleT, представителем семейства CYP152 [50].

Для моделирования цитохром P450-зависимых реакций были разработаны методы реконструкции каталитической активности этого класса гемопротейнов. Реконструированные системы содержат соответствующую изоформу цитохрома P450, CPR, цитохром b_5 , фосфолипиды в соотношении, оптимальном для моделирования и создания мембранного окружения, а также NADPH в качестве источника электронов [51–53]. Разработаны подходы для повышения каталитической активности ферментов в реконструированных системах. В работе Shangguan et al. [53] была создана биферментная система, состоящая из цитохрома P450 1A1 и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, ковалентно иммобилизованных на наночастицах золота, выращенных на внутренних стенках мембраны из пористого оксида алюминия. Проведение каскада реакций в мембране из пористого оксида

алюминия позволило увеличить скорость и выход продуктов в обеих реакциях. Каталитическая константа скорости CYP1A1-зависимой реакции увеличивалась в 11 раз по сравнению с ферментативной реакцией, проводимой в растворе [53].

Для создания биореакторов на основе изоформ цитохрома P450 использовали магнитные бусины, на которых были ковалентно иммобилизованы фракции микросом печени крысы и человека, содержащие цитохромы P450 3A4, 2C9 и 2D6. Авторы также использовали реконструированную систему, где глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, регенерирующая NADPH, также была иммобилизована на магнитных бусинах. Помимо каталитической эффективности данной системы, авторы отметили ее стабильность, используя ее в трех циклах [54]. Использование микросом печени крысы и человека имеет этические проблемы, а также проблемы с воспроизводимостью каталитических параметров. Поэтому такой подход не может рассматриваться как эффективный и надежный метод создания биосенсоров и биореакторов.

Для функционализации полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и их N- и O-содержащих производных использовали цитохром P450 3A4 как фермент с широкой субстратной специфичностью [55, 56]. В качестве биокатализаторов был использован штамм дрожжей *Komagataella phaffii*, экспрессирующих цитохром P450 3A4. Целью работы, по мнению авторов, было получение в препаративных количествах функционализированных ПАУ, что было реализовано на производных флуорена, флуореноле и флуореноне [57]. Авторам удалось масштабировать реакцию до объема 6 литров и получить выход 47,6% — для флуоренола и 9,7% — для флуоренона.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БИОРЕАКТОРОВ

Использование в качестве биореакторов реконструированных систем не является оптимальным по причине необходимости использования белков редокс-партнеров. Поэтому применение физико-химических методов с альтернативными источниками электронов крайне актуально. Среди таких подходов для создания биореакторов можно выделить фотовосстановление и электровосстановление.

Фотовосстановление. Применение фотосенсибилизирующих веществ для восстановления железа гема цитохрома P450 с помощью

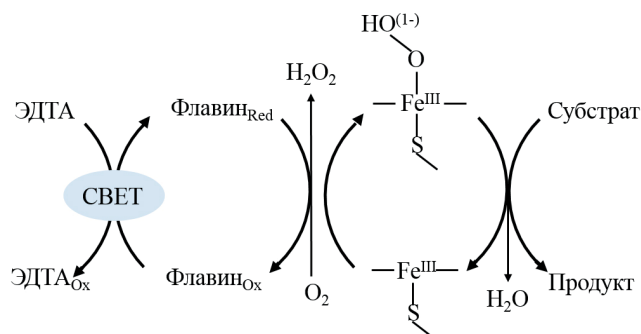


Рис. 4. Схема каталитического превращения субстрата цитохромом P450 под действием света на фотосенсибилизирующие вещества

света в видимом диапазоне может использоваться как альтернативный путь создания биореакторов [58]. В таких системах у рибофлавина, FAD или FMN под действием света и в присутствии ЭДТА (рис. 4), как донора электронов, происходит восстановление изоаллоксазинового цикла либо с последующим переносом электронов на активный центр цитохрома P450, либо с образованием пероксида водорода и катализом по механизму пероксидазного шунта [45]. Использование данного подхода было изучено на реакциях гидроксирования 4-нитрофенола и лауриновой кислоты под действием бактериального цитохрома P450 102A1 [59]. В качестве фотосенсибилизирующего вещества в ряде систем с бактериальными и человеческими цитохромами P450 был использован эозин Y [60].

Электрохимические подходы. Электрохимические системы являются эффективными альтернативными донорами электронов, в которых именно электрод играет роль источника электронов. Используя количественные закономерности электроанализа, обладающие многопараметричностью, можно рассчитать кинетические, каталитические и термодинамические параметры функционирования ферментов [61]. Такой подход для количественного и сравнительного анализа каталитической активности цитохромов P450 используется для поиска новых субстратов, ингибиторов, активаторов, эффекторов цитохромов P450, а также для исследования межлекарственных взаимодействий (рис. 5) [28, 36, 62, 63]. Для эффективной иммобилизации цитохромов P450 на поверхности электродов разработаны различные подходы, использующие наноматериалы для модификации рабочей поверхности электрода, а также модификаторы электродной поверхности, обеспечивающие сохранение нативной конформации и каталитических свойств фермента [61–63].



Рис. 5. Возможности применения электрохимических систем на основе цитохрома Р450

Благодаря высокой эффективности цитохром Р450-электрохимических систем, с точки зрения аналитических характеристик, их применение реализовано в режиме биосенсоров для поиска новых лекарственных препаратов в качестве субстратов или ингибиторов, для анализа токсичных соединений в различных средах (сточные воды, биологические жидкости) [64–66].

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОВ Р450 В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Образование продуктивного фермент-субстратного комплекса. Электрохимические процессы цитохром Р450-зависимых реакций характеризуются режимом тонкой пленки белка (сорбционный режим) на поверхности электрода. Эти процессы не являются диффузионно-контролируемыми, что проявляется в линейной зависимости максимальной амплитуды анодного и катодного тока от скорости сканирования, как было показано ранее [1, 61, 67]. Количественные закономерности электрохимических методов позволяют оценить количество электроактивного фермента на электроде для адекватного расчета кинетических параметров электроферментативной реакции [61, 62, 67].

Особенностью каталитического цикла цитохромов Р450 является многостадийность процесса. Первая стадия в катализе этого класса гемопroteинов — образование комплекса ферри-формы Fe^{III} с субстратом ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-RH}$). Далее, происходит перенос первого электрона с образованием комплекса восстановленной ферро-формы Fe^{II} с субстратом, а затем и с кислородом в качестве второго субстрата [8, 19, 68–70] (рис. 2). Для фермента, иммобилизованного (ковалентно или нековалентно) на электроде или включенного в матрицу моди-

фикатора, образование фермент-субстратного комплекса может потребовать большее время за счет диффузии субстрата к активному центру фермента. Нами был предложен подход, при котором предварительная инкубация цитохрома Р450 3A4 (CYP3A4), нековалентно иммобилизованного на электроде за счет включения в матрицу ДДАБ с субстратом (антибиотиком группы макролидов, эритромицином) до стадии получения электронов, положительно влияла на выход продукта в электрокаталитической реакции [71]. Выход метаболита (формальдегида) возрос в 1,46 раза, а максимальная скорость реакции увеличилась с $9,21 \times 10^{-11}$ М/мин до $1,40 \times 10^{-10}$ М/мин.

Флавиновые нуклеотиды в качестве участников цепи переноса электронов на электроде. Флавиновые нуклеотиды являются кофакторами редуктаз — белков редокс-партнеров цитохрома Р450, и, соответственно, посредниками в передаче электронов между восстановительным эквивалентом NADPH и цитохромом Р450, согласно схеме 2 [72]. Для моделирования классической электрон-транспортной схемы на электроде были использованы различные подходы, основанные на образовании комплексов или на включении флавиновых кофакторов или флавин-содержащих доменов в структуру цитохрома Р450. Методами генной инженерии к полипептидной последовательности цитохрома Р450 2C9 была присоединена последовательность флаводоксина (FLD) *Desulfovibrio vulgaris*, выбранная за высокую схожесть с последовательностью домена CPR, связывающей FMN. Авторы отмечают, что использование модифицированного белка CYP2C9–FLD, иммобилизованного на стеклоуглеродном электроде, модифицированном ДДАБ, способствует более эффективному переносу электронов, а каталитическая активность в отношении субстрата S-варфарина возрастает в 4 раза по сравнению с цитохромом Р450 2C9 (CYP2C9) [73].

Рибофлавин, как медиатор электронного транспорта, был использован ранее при исследовании полусинтетических флавогемопротеинов на основе цитохрома P450 2B4 [58] и на основе бактериальных цитохромов CYP106A2, CYP107DY1, CYP107DY1, HmtS, HmtT, HmtN [74]. В качестве донора электронов был использован электрод [58] и NADPH [74]. Была исследована электрохимическая система, в которой нековалентный комплекс цитохрома P450 3A4 с рибофлавином, FMN или FAD был иммобилизован на электроде [71]. Флавиновые нуклеотиды, как низкомолекулярные модели редуктазы, являются медиаторами электронного транспорта, способствуя эффективному восстановлению иона железа гема. При использовании флавиновых нуклеотидов в качестве низкомолекулярных моделей редуктазы удалось достичь улучшения электрохимических характеристик системы, таких как электроактивная концентрация фермента, а также рост такого параметра, как каталитический ток в присутствии субстрата, который является одной из важнейших характеристик эффективности электрокатализа. Кроме того, удалось увеличить эффективность цитохром P450 3A4-зависимого электрокатализа реакции N-деметилирования эритромицина в 1,3, 1,7 и 2,1 раза в системе с рибофлавином, FAD и FMN соответственно. Также была рассчитана такая каталитическая характеристика системы, как максимальная скорость реакции для системы без флавинов, равная $9,21 \times 10^{-11}$ М/мин, $1,24 \times 10^{-10}$ М/мин – в случае рибофлавина, $1,57 \times 10^{-10}$ М/мин и $1,87 \times 10^{-10}$ М/мин – для FAD и FMN соответственно [71]. Такое увеличение максимальной скорости реакции можно считать существенным, что позволяет рассматривать метод с использованием нековалентных комплексов цитохрома P450 с флавинами как весьма эффективный.

Модификация поверхности электродов трехмерными структурами для перехода от 2D- к 3D-режиму. Электроды, применяемые в биоэлектрохимии, как правило, представляют собой плоские структуры. Для эффективного электронного транспорта к активному центру фермента требуется иммобилизация белка на рабочей поверхности электрода. При этом существует проблема взаимодействия белка с «твердыми» 2D-поверхностями [75], что может приводить к изменению третичной и четвертичной структуры белка, влияющих на каталитическую активность. Для преодоления плоскостной структуры электродов был предложен подход модификации поверхности

электрода нанопористыми покрытиями на основе таких материалов, как мезопористый оксид кремния, оксид алюминия, оксид титана, мезопористый графен, индий, допированный оксидом олова (ITO) [53, 76–79]. Применение нанопористых материалов для электрохимического изучения ферментативных реакций обеспечивает переход электродной поверхности от 2D- к 3D-режиму, способствует более упорядоченному расположению белка на электроде, что выражается в увеличении эффективности электрокаталитических реакций [64, 77, 80]. В качестве нанопористых материалов могут использоваться материалы, обладающие следующими свойствами: химическая инертность, биосовместимость, электрохимическая нейтральность при сохранении электронтранспортных и проводящих свойств электрода. Проведение ферментативных реакций в «замкнутых» пространствах (нанопорах, наноканалах, мицеллах, обращенных мицеллах) позволяет смоделировать микроокружение ферментов и их молекулярную скученность («краудинг») в биологических системах, где ферменты находятся в высоких концентрациях в ограниченных объемах [81].

Для реализации данного подхода Mie et al. [76] использовали золотой дисковый электрод, который подвергали процедуре анодирования. В результате этой процедуры поверхность электрода становилась развитой и приобретала углубления размером 20 нм. Авторами была показана эффективная иммобилизация цитохрома P450 3A4 на поверхности полученного электрода, модифицированного нафталинтиолом. Для бактериального цитохрома P450 BM3 была разработана электрохимическая система на основе стеклоуглеродного электрода, где для иммобилизации фермента использованы наночастицы кремния с разветвленными порами, модифицированные OH- или NH₂-группами. При этом для закрепления наночастиц с иммобилизованным цитохромом P450 BM3 использовали хитозан. Такая система демонстрировала улучшение электрохимических параметров, таких как гетерогенная константа скорости переноса электронов, каталитический ток, количество электроактивного фермента, по сравнению с системой, в которой цитохром P450 BM3 был иммобилизован непосредственно на поверхности электрода [76]. Кроме того, наблюдались различия в свойствах систем, модифицированных наночастицами кремния с разветвленными порами, содержащими гидроксильные или аминогруппы. При модификации NH₂-группами, заряженными положительно

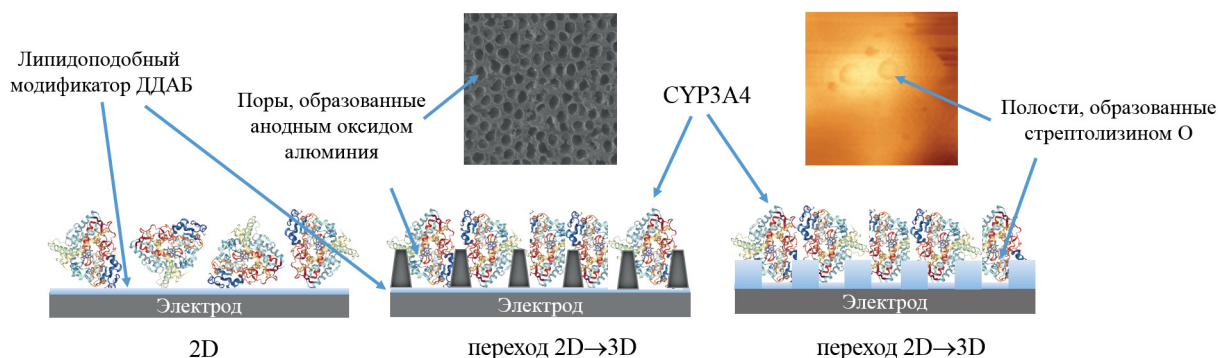


Рис. 6. Схема иммобилизации цитохрома P450 3A4 по стратегии перехода от 2D-поверхности к 3D

в условиях проведения эксперимента, молекулы фермента ориентировались отрицательно заряженным доменом редуктазы к поверхности кремниевой наночастицы. Такой эффект вносил дополнительное упорядочивание и приводил к увеличению сродства к субстрату тестостерону по сравнению с наночастицами с ОН-группами [76, 77].

Для исследования кинетических параметров цитохрома P450 3A4 была разработана система нанореактора на основе сложного композита из сфер оксида кремния, нанопористых графеновых пен и полидофамина [78]. Авторы показали, что кинетические параметры реакций метаболизма стероидных гормонов цитохромом P450 3A4 зависят от размеров образованных пор наноструктур. При меньшем размере пор наблюдались наиболее благоприятные параметры реакции. Для пор размером 65, 120 и 260 нм были получены следующие значения кажущейся константы Михаэлиса (K_M^{app}) для реакции гидроксирования тестостерона: 110 ± 18 мкМ, 276 ± 28 мкМ и 333 ± 25 мкМ соответственно в сравнении с композитом без пор (430 ± 30 мкМ). Изменение данного параметра свидетельствует об увеличении сродства фермента к субстрату и повышении эффективности каталитического процесса почти в 4 раза для наименьшего диаметра пор (65 нм).

Нами была разработана система, в которой в качестве нанопористого материала использовались пластины из анодного оксида алюминия для модификации поверхности электрода (рис. 4). Такой подход позволил значительно увеличить выход продукта реакции N-деметилирования эритромицина цитохромом P450 3A4. При использовании пор размером 100 нм выход продукта увеличивался в 2,32 раза, а при размере пор 200 нм — в 1,32 раза. Такое различие может быть обусловлено более упорядоченной ориентацией молекулы фермента в порах меньшего размера [82]. Для сравнительной

оценки эффективности каталитического цитохромом P450 3A4-зависимого процесса была рассчитана максимальная скорость реакции. Для цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на электроде без нанопористого материала, скорость реакции составила $(4,3 \pm 0,4) \times 10^{-11}$ М/мин; для пор с диаметром 100 нм — $(1,01 \pm 0,04) \times 10^{-10}$ М/мин; а для пор с диаметром 200 нм — $(5,7 \pm 0,3) \times 10^{-11}$ М/мин.

Совмещение двух подходов — создание мембраноподобного покрытия и иммобилизация цитохрома P450 3A4 в замкнутом пространстве, моделирующим краудинг-эффект, — было реализовано нами в работе Koroleva et al. [83]. Для этого был использован липидоподобный модификатор электрода ДДАБ и мембранный белок стрептолизин О (рис. 6). При послойном нанесении на электрод ДДАБ, а затем стрептолизина О в мембранной пленке, образованной ДДАБ, наблюдалось появление полостей, визуализируемых на изображениях, полученных с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Данный подход позволил зарегистрировать увеличение каталитического тока цитохрома P450 3A4 в присутствии субстрата эритромицина в 2 раза (с 0,6 мкА до 1,2 мкА) и повысить эффективность электрокатализа реакции N-деметилирования эритромицина в 2,97 раза.

Иммобилизация микросом. Микросомы — это морфологически замкнутые везикулы, содержащие компоненты цитохром P450-монооксигеназной системы, которые образуются из эндоплазматического ретикулума при гомогенизации ткани [84]. Микросомы печени используются как удобный источник ферментов цитохрома P450 для анализа токсичности *in vitro* и разработки новых лекарственных препаратов. Микросомы печени — лабораторно приготовленные субклеточные фракции мембраны печени, содержащие метаболизирующие лекарства, цитохромы P450 и их редокс-партнеры (CPR и цитохром b_5). Основным

преимуществом использования микросом является сохранение стабильности структуры фермента и каталитической активности за счет микроокружения, которое не изменяется после выделения микросомальной фракции. Кроме того, белки редокс-партнеры также способствуют ускорению переноса электронов от электрода к активному центру цитохрома P450.

Микросомы клеток насекомых, содержащие цитохромы P450 1A2 и 3A4, экспрессированные при помощи бакуловируса, были иммобилизованы на электроде из пиролитического графита, модифицированного самоорганизующимися слоями полиэтиленimina [85, 86]. Nerimetla и Krishnan [87] использовали микросомы печени крысы, содержащие цитохромы P450 3A, 2C, 2E1, 1A и 4A. Послойную иммобилизацию методом капельного нанесения проводили на электроде из пиролитического графита, модифицированного поли (диаллилдиметиламмоний хлоридом). Микросомы клеток насекомых, содержащие цитохромы P450, экспрессированные при помощи бакуловируса (бактосомы, бакулосомы), используются для иммобилизации на электродах, модифицированных различными методами, направленными на увеличение эффективности электрокаталитических свойств [85–90]. Среди публикаций, посвященных созданию биосенсоров на основе микросом, можно выделить основные тенденции: создание биосенсоров для анализа лекарственных веществ и разработка биореакторов для получения функционально значимых метаболитов.

Углеродные наноматериалы также нашли свое применение в создании биосенсоров на основе микросом благодаря более развитой площади поверхности, что способствует улучшению электрохимических характеристик системы [86]. Нанокompозитные материалы на основе благородных металлов и углеродных наноматериалов также применялись для иммобилизации микросом [85].

В работе Nerimetla et al. [89] был предложен метод иммобилизации, основанный на электростатическом взаимодействии. Микросомы, заряженные отрицательно благодаря фосфолипидам, смешивали с магнитными наночастицами, модифицированными аминокислотными группами, которые затем адсорбировались на электродах из пиролитического графита. Такой подход позволяет увеличить количество микросом на электроде за счет увеличения площади поверхности, доступной для иммобилизации, и, таким образом, повы-

сить чувствительность сенсора к лекарственным препаратам по сравнению с сенсорами, где не были использованы магнитные наночастицы.

Описаны методы иммобилизации микросом непосредственно на электроде без использования модификаторов или медиаторов электронного транспорта. В таких системах роль модификатора, защищающего фермент от денатурации на поверхности электрода, выполняют фосфолипиды оболочки микросом. Впервые такой подход был реализован в работе Walgama et al. [90], где авторы использовали электроды, изготовленные из различных материалов: пиролитического графита, стеклоуглерода или графита высокой степени очистки, при этом обладающих различной неоднородностью поверхности. Авторы установили, что различная неоднородность поверхности электродов влияет на электрохимические параметры, при этом гетерогенная константа скорости переноса электронов выше для электродов из более однородных (гладких) материалов, таких как стеклоуглеродный электрод. Однако количество электроактивного белка, по расчетам авторов, было больше для электродов с неоднородной поверхностью, что можно объяснить более развитой поверхностью для включения белка. В работе Walker et al. [91] исследовали влияние неоднородности поверхности электрода на электрохимические характеристики микросом с использованием дискового электрода. Целью работы было создание биосенсора с прямой иммобилизацией микросом на поверхности электрода без дополнительных медиаторов электронного транспорта. Дисковые электроды из высокочистого графита легко возобновляемы путем полировки. Авторы выяснили, что оптимальным для иммобилизации микросом является поверхность электрода с неоднородностью ~8 мкм; более гладкая поверхность хоть и способствует увеличению скоростей переноса электронов, однако снижает ток в присутствии кислорода, негативно сказываясь на эффективности метаболизма субстрата.

С развитием методических подходов молекулярной биологии стала доступна коэкспрессия в культурах клеток, инфицированных рекомбинантными бакуловирусами, или в бактериальных клетках одновременно цитохрома P450, редуктазы и цитохрома *b₅*. Получаемые данным методом биологические материалы коммерчески доступны и реализуются под названиями бактосомы (BactosomesTM, компания «Сурех»), суперсомы (SupersomesTM, разработанные компанией «Gen Test») или

бакулосомы (Baculosomes™, компания «Thermo-Fisher») [92, 93]. Применение бактосом для создания биокатализаторов было продемонстрировано в работе Nerimetla et al. [94]. В качестве рабочего электрода авторы использовали покрытые золотом кристаллы кварца, модифицированные самоорганизующимися слоями цистеамина, с адсорбированными пленками бактосом. В исследовании использовались бактосомы, содержащие следующие комбинации белков: CYP2C9, CPR, CYP2C9 + CPR, CYP3A4 + CPR. В качестве субстрата был выбран диклофенак, подвергающийся гидроксигированию под действием CYP2C9 и CYP3A4. Авторы оценили эффективность электрокатализа различных систем и продемонстрировали значимость CPR в бактосомальных пленках для эффективности катализа, а также благотворное влияние каталазы на скорость реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре описаны подходы к повышению эффективности катализа цитохрома P450, представленные в современных работах. Проведен анализ преимуществ в использовании цитохромов P450 при создании биореакторов, а также основные сложности и затруднения на пути к их реализации. В качестве основной тенденции как для реконструированных систем, так и для электрохимических является встраивание цитохрома P450 в

ограниченный объем за счет использования трехмерных конструкций на основе нанопористых материалов. При этом могут использоваться различные материалы и их сочетания, например, мезопористые материалы или пористые мембраны. Электрохимические методы анализа функциональной активности ферментов получили широкое развитие вследствие информативности методов и их многопараметричности. Кроме того, важный аспект — технологическая разработанность приборной базы и наличие программного обеспечения. Это позволяет стандартизовать исследования и проводить сравнительный анализ ансамбля различных биологических объектов. В связи с этим электроанализ ферментов может быть одним из важнейших направлений в создании биосенсоров и биореакторов на основе цитохромов P450.

Вклад авторов. Шумянцева В.В. — концепция и руководство работой; Королева П.И. — написание текста статьи; Булко Т.В., Агафонова Л.Е. — редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-25-00064, <https://rscf.ru/project/23-25-00064/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shumyantseva, V. V., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2005) Electrochemical reduction of cytochrome P450 as an approach to the construction of biosensors and bioreactors, *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1051-1063, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2005.01.014.
2. Guengerich, F. P. (2015) Human cytochrome P450 enzymes, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (de Montellano, O. P. R., eds) Springer, N. Y., pp. 523-785, doi: 10.1007/978-3-319-12108-6.
3. Zhang, Y.-Y., and Yang, L. (2009) Interactions between human cytochrome P450 enzymes and steroids: physiological and pharmacological implications, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **5**, 621-629, doi: 10.1517/1742525090296764.
4. Oliw, E. H., Guengerich, F. P., and Oates, J. A. (1982) Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. Isolation and metabolism of four epoxide intermediates, *J. Biol. Chem.*, **257**, 3771-3781, doi: 10.1016/S0021-9258(18)34848-8.
5. Zanger, U. M., and Schwab, M. (2013) Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation, *Pharmacol. Ther.*, **138**, 103-141, doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007.
6. Crettol, S., Petrovic, N., and Murray, M. (2010) Pharmacogenetics of phase I and phase II drug metabolism, *Curr. Pharm. Des.*, **16**, 204-219, doi: 10.2174/138161210790112674.
7. Sono, M., Roach, M. P., Coulter, E. D., and Dawson, J. H. (1996) Heme-containing oxygenases, *Chem. Rev.*, **96**, 2841-2887, doi: 10.1021/cr9500500.
8. Zuccarello, L., Barbosa, C., Todorovic, S., and Selivera, C. M. (2021) Electrocatalysis by heme enzymes-applications in biosensing, *Catalysts*, **11**, 218, doi: 10.3390/catal11020218.

9. Bandoorkwala, M., Nemani, K. S., Chatterjee, B., and Sengupta, P. (2020) Reactive metabolites: generation and estimation with electrochemistry based analytical strategy as an emerging Screening tool, *Curr. Anal. Chem.*, **16**, 811-825, doi: 10.2174/1573411016666200131154202.
10. Portychova, L., and Schug, K. A. (2017) Instrumentation and applications of electrochemistry coupled to mass spectrometry for studying xenobiotic metabolism: a review, *Anal. Chim. Acta*, **993**, 1-21, doi: 10.1016/j.aca.2017.08.050.
11. Grint, I., Crea, F., and Vasiliadou, R. (2022) The combination of electrochemistry and microfluidic technology in drug metabolism studies, *ChemistryOpen*, **11**, e202200100, doi: 10.1002/open.202200100.
12. Waskell, L., and Kim, J.-J. P. (2015) Electron transfer partners of cytochrome P450, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (de Montellano, O. P. R., eds) Springer, N. Y., pp. 33-68, doi: 10.1007/978-3-319-12108-6.
13. Im, S.-C., and Waskell, L. (2011) The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome *b₅*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **507**, 144-153, doi: 10.1016/j.abb.2010.10.023.
14. Zhang, H., Im, S.-C., and Waskell, L. (2007) Cytochrome *b₅* increases the rate of product formation by cytochrome P450 2B4 and competes with cytochrome P450 reductase for a binding site on cytochrome P450 2B4*, *J. Biol. Chem.*, **282**, 29766-29776, doi: 10.1074/jbc.M703845200.
15. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K. M., and Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains, *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 330-344, doi: 10.1016/j.bbagen.2006.07.017.
16. Lambeth, J. D. (1990) in *Molecular Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application* (Ruckpaul, K., and Rein, H., eds) De Gruyter, Berlin, Boston, pp. 58-100, doi: 10.1515/9783112563281-003.
17. Atkins, W. M., and Sligar, S. G. (1988) The roles of active site hydrogen bonding in cytochrome *P-450cam* as revealed by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.*, **263**, 18842-18849, doi: 10.1016/S0021-9258(18)37359-9.
18. Narhi, L. O., and Fulco, A. J. (1986) Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*, *J. Biol. Chem.*, **261**, 7160-7169, doi: 10.1016/S0021-9258(17)38369-2.
19. Denisov, I. G., Makris, T. M., Sligar, S. G., and Schlichting, I. (2005) Structure and chemistry of cytochrome P450, *Chem. Rev.*, **105**, 2253-2278, doi: 10.1021/cr0307143.
20. Katagiri, M., Ganguli, B. N., and Gunsalus, I. C. (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation, *J. Biol. Chem.*, **243**, 3543-3546, doi: 10.1016/S0021-9258(18)93343-0.
21. Hedegaard, J., and Gunsalus, I. C. (1965) Mixed function oxidation: IV. Aninduced methylene hydroxylase in camphor oxidation, *J. Biol. Chem.*, **240**, 4038-4043, doi: 10.1016/S0021-9258(18)97147-4.
22. Conrad, H. E., Lieb, K., and Gunsalus, I. C. (1965) Mixed function oxidation: III. An electron transport complex in camphor ketolactonization, *J. Biol. Chem.*, **240**, 4029-4037, doi: 10.1016/S0021-9258(18)97146-2.
23. Estabrook, R. W., Hildebrandt, A., Baron, J., Netter, K. J., and Leibman, K. (1971) A new spectral species associated with cytochrome P-450 in liver microsomes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 260-261, doi: 10.1016/0006-291X(71)90372-X.
24. Guengerich, F. P., and Johnson, W. W. (1997) Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems, *Biochemistry*, **36**, 14741-14750, doi: 10.1021/bi9719399.
25. Bernhardt, R. (1996) Cytochrome P450: structure, function and generation of reactive oxygen species, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **127**, 137-221, doi: 10.1007/BFb0048267.
26. Hrycay, E. G., and Bandiera, S. M. (2012) The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450, *Arch. Biochem. Biophys.*, **522**, 71-89, doi: 10.1016/j.abb.2012.01.003.
27. Bernhardt, R., and Urlacher, V. B. (2014) Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 6185-6203, doi: 10.1007/s00253-014-5767-7.
28. Kumar, S. (2010) Engineering cytochrome P450 biocatalysts for biotechnology, medicine and bioremediation, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **6**, 115-131, doi: 10.1517/17425250903431040.
29. Venkatakrishnan, K., von Moltke, L. L., and Greenblatt, D. J. (2001) Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of *in vitro* models, *J. Clin. Pharmacol.*, **41**, 1149-1179, doi: 10.1177/00912700122012724.
30. Baj-Rossi, C., De Micheli, G., and Carrara, S. (2011) P450-based nano-bio-sensors for personalized medicine, in *Biosensors Emerging Materials and Applications* (Serra, P. A., ed) InTech, London, doi: 10.5772/16328.
31. Joseph, S., Rusling, J. F., Lvov, Y. M., Friedberg, T., and Fuhr, U. (2003) An amperometric biosensor with human CYP3A4 as a novel drug screening tool, *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1817-1826, doi: 10.1016/S0006-2952(03)00186-2.
32. Morant, M., Bak, S., Møller, B. L., and Werck-Reichhart, D. (2003) Plant cytochromes P450: tools

- for pharmacology, plant protection and phytoremediation, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14**, 151-162, doi: 10.1016/s0958-1669(03)00024-7.
33. Jennewein, S., and Croteau, R. (2001) Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 13-19, doi: 10.1007/s002530100757.
 34. Falck, J. R., Reddy, Y. K., Haines, D. C., Reddy, K. M., Krishna, U. M., Graham, S., Murry, B., and Peterson, J. A. (2001) Practical, enantiospecific syntheses of 14,15-EET and leukotoxin B (vernolic acid), *Tetrahedron Lett.*, **42**, 4131-4133, doi: 10.1016/S0040-4039(01)00694-3.
 35. Krishnan, S. (2020) Bioelectrodes for evaluating molecular therapeutic and toxicity properties, *Curr. Opin. Electrochem.*, **19**, 20-26, doi: 10.1016/j.coelec.2019.09.004.
 36. Sakaki T. (2012) Practical application of cytochrome P450, *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 844-849, doi: 10.1248/bpb.35.844.
 37. Di Nardo, G., and Gilardi, G. (2020) Natural compounds as pharmaceuticals: the key role of cytochromes P450 reactivity, *Trends Biochem. Sci.*, **45**, 511-525, doi: 10.1016/j.tibs.2020.03.004.
 38. Girhard, M., Bakkes, P. J., Mahmoud, O., and Urlacher, V. B. (2015) P450 Biotechnology, in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (de Montellano, O. P. R., eds) Springer, N. Y., pp. 451-520, doi: 10.1007/978-3-319-12108-8.
 39. Urlacher, V. B., and Girhard, M. (2012) Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application, *Trends Biotechnol.*, **30**, 26-36, doi: 10.1016/j.tibtech.2011.06.012.
 40. Bernhardt, R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts, *J. Biotechnol.*, **124**, 128-145, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.026.
 41. Yun, C.-H., Kim, K.-H., Kim, D.-H., Jung, H.-C., and Pan, J.-G. (2007) The bacterial P450 BM3: a prototype for a biocatalyst with human P450 activities, *Trends Biotechnol.*, **25**, 289-298, doi: 10.1016/j.tibtech.2007.05.003.
 42. Correddu, D., Di Nardo, G., and Gilardi, G. (2021) Self-sufficient class VII cytochromes P450: from full-length structure to synthetic biology applications, *Trends Biotechnol.*, **39**, 1184-1207, doi: 10.1016/j.tibtech.2021.01.011.
 43. Gilardi, G., Meharena, Y. T., Tsotsou, G. E., Sadeghi, S. J., Fairhead, M., and Giannini, S. (2002) Molecular Lego: design of molecular assemblies of P450 enzymes for nanobiotechnology, *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 133-145, doi: 10.1016/s0956-5663(01)00286-x.
 44. Cirino, P., and Arnold, F. (2002) Regioselectivity and activity of cytochrome P450 BM-3 and mutant f87A in reactions driven by hydrogen peroxide, *Adv. Synth. Catal.*, **344**, 932-937, doi: 10.1002/1615-4169(200210)344:9<932::AID-ADSC932>3.0.CO;2-M.
 45. Strohmaier, S. J., De Voss, J. J., Jurva, U., Andersson, S., and Gillam, E. M. J. (2020) Oxygen surrogate systems for supporting human drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes, *Drug Metab. Dispos.*, **48**, 432-437, doi: 10.1124/dmd.120.090555.
 46. Albertolle, M. E., and Guengerich, F. P. (2018) The relationships between cytochromes P450 and H₂O₂: Production, reaction, and inhibition, *J. Inorg. Biochem.*, **186**, 228-234, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.05.014.
 47. Veith, A., and Moorthy, B. (2018) Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species, *Curr. Opin. Toxicol.*, **7**, 44-51, doi: 10.1016/j.cotox.2017.10.003.
 48. Girhard, M., Kunigk, E., Tihovsky, S., Shumyantseva, V. V., and Urlacher, V. B. (2013) Light-driven biocatalysis with cytochrome P450 peroxygenases, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **60**, 111-118, doi: 10.1002/bab.1063.
 49. Chen, H., Huang, M., Yan, W., Bai, W.-J., and Wang, X. (2021) Enzymatic regio- and enantioselective C-H oxyfunctionalization of fatty acids, *ACS Catal.*, **11**, 10625-10630, doi: 10.1021/acscatal.1c03292.
 50. Wise, C. E., Hsieh, C. H., Poplin, N. L., and Makris, T. M. (2018) Dioxygen activation by the biofuel-generating cytochrome P450 OleT, *ACS Catal.*, **8**, 9342-9352, doi: 10.1021/acscatal.8b02631.
 51. Yamazaki, H., Nakano, M., Imai, Y., Ueng, Y.-F., Guengerich, F. P., and Shimada, T. (1996) Roles of cytochrome *b₅* in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **325**, 174-182, doi: 10.1006/abbi.1996.0022.
 52. Backes, W. L., and Kelley, R. W. (2003) Organization of multiple cytochrome P450s with NADPH-cytochrome P450 reductase in membranes, *Pharmacol. Ther.*, **98**, 221-233, doi: 10.1016/s0163-7258(03)00031-7.
 53. Shangguan, L., Wei, Y., Liu, X., Yu, J., and Liu, S. (2017) Confining a bi-enzyme inside the nanochannels of a porous aluminum oxide membrane for accelerating the enzymatic reactions, *Chem. Commun.*, **53**, 2673-2676, doi: 10.1039/C7CC00300E.
 54. Furlani, I. L., Oliveira, R. V., and Cass, Q. B. (2023) Immobilization of cytochrome P450 enzymes onto magnetic beads: an approach to drug metabolism and biocatalysis, *Talanta Open*, **7**, 100181, doi: 10.1016/j.talo.2023.100181.
 55. Brian, W. R., Sari, M. A., Iwasaki, M., Shimada, T., Kaminsky, L. S., and Guengerich, F. P. (1990) Catalytic activities of human liver cytochrome P-450 IIIA4 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry*, **29**, 11280-11292, doi: 10.1021/bi00503a018.
 56. Rendic, S. (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data, *Drug Metab. Rev.*, **34**, 83-448, doi: 10.1081/dmr-120001392.

57. Srdić, M., Fessner, N. D., Yildiz, D., Glieder, A., Spiertz, M., and Schwaneberg, U. (2022) Preparative production of functionalized (N- and O-Heterocyclic) polycyclic aromatic hydrocarbons by human cytochrome P450 3A4 in a bioreactor, *Biomolecules*, **12**, 153, doi: 10.3390/biom12020153.
58. Shumyantseva, V. V., Bulko, T. V., Schmid, R. D., and Archakov, A. I. (2002) Photochemical properties of a riboflavins/cytochrome P450 2B4 complex, *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 233-238, doi: 10.1016/S0956-5663(01)00181-6.
59. Le, T.-K., Park, J. H., Choi, D. S., Lee, G.-Y., Choi, W. S., Jeong, K. J., Park, C. B., and Yun, C.-H. (2019) Solar-driven biocatalytic C-hydroxylation through direct transfer of photo induced electrons, *Green Chem.*, **21**, 515-525, doi: 10.1039/c8gc02398k.
60. Park, J. H., Lee, S. H., Cha, Choi, G. S., D. S., Nam, D. H., Lee, J. H., Lee, J.-K., Yun, C.-H. Jeong, K. J., and Park, C. B. (2015) Cofactor-free light-driven whole-cell cytochrome P450 catalysis, *Angew. Chem.*, **127**, 983-987, doi: 10.1002/anie.201410059.
61. Shumyantseva, V. V., Kuzikov, A. V., Masamrekh, R. A., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2018) From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450, *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 192-204 doi: 10.1016/j.bios.2018.08.040.
62. Schneider, E., and Clark, D. S. (2013) Cytochrome P450 (CYP) enzymes and the development of CYP biosensors, *Biosens. Bioelectron.*, **39**, 1-13, doi: 10.1016/j.bios.2012.05.043.
63. Ducharme, J., and Auclair, K. (2018) Use of bio-conjugation with cytochrome P450 enzymes, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics*, **1866**, 32-51, doi: 10.1016/j.bbapap.2017.06.007.
64. Valikhani, D., Bolivar, J. M., and Pelletier, J. N. (2021) An overview of cytochrome P450 immobilization strategies for drug metabolism studies, biosensing, and biocatalytic applications: challenges and opportunities, *ACS Catal.*, **11**, 9418-9434, doi: 10.1021/acscatal.1c02017.
65. Bistolas, N., Wollenberger, U., Jung, C., and Scheller, F. W. (2005) Cytochrome P450 biosensors – a review, *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 2408-2423, doi: 10.1016/j.bios.2004.11.023.
66. Asturias-Arribas, L., Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., and Arcos-Martínez, M. J. (2013) Electrochemical determination of cocaine using screen-printed cytochrome P450 2B4 based biosensors, *Talanta*, **105**, 131-134, doi: 10.1016/j.talanta.2012.11.078.
67. Rusling, F., Wang, B., and Yun, S. (2008) Electrochemistry of redox enzymes, in *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* (Bartlett, P. N., ed) John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, pp. 39-85, doi: 10.1002/9780470753842.ch2.
68. Lamb, D. C., Waterman, M. R., Kelly, S. L., and Guengerich, F. P. (2007) Cytochromes P450 and drug discovery, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 504-512, doi: 10.1016/j.copbio.2007.09.010.
69. Guengerich, F. P. (2021) Drug metabolism: cytochrome P450, in *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elsevier, Netherlands, doi: 10.1016/B978-0-12-820472-6.99996-1.
70. Bavishi, K., Laursen, T., Martinez, K. L., Møller, B. L., and Della Pia, E. A. (2016) Application of nanodisc technology for direct electrochemical investigation of plant cytochrome P450s and their NADPH P450 oxidoreductase. *Sci. Rep.*, **6**, 29459, doi: 10.1038/srep29459.
71. Shumyantseva, V. V., Koroleva, P. I., Bulko, T. V., Shkel, T. V., Gilep, A. A., and Veselovsky, A. V. (2023) Approaches for increasing the electrocatalytic efficiency of cytochrome P450 3A4, *Bioelectrochemistry*, **149**, 108277, doi: 10.1016/j.bioelectchem.2022.108277.
72. Miller, W. L. (2005) Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer, *Endocrinology*, **146**, 2544-2550, doi: 10.1210/en.2005-0096.
73. Di Nardo, G., and Gilardi, G. (2021) Engineered human CYP2C9 and its main polymorphic variants for bioelectrochemical measurements of catalytic response, *Bioelectrochemistry*, **138**, 107729, doi: 10.1016/j.bioelectchem.2020.107729.
74. Zhang, C., Lu, M., Lin, L., Huang, Z., Zhang, R., Wu, X., and Chen, Y. (2020) Riboflavin is directly involved in N-dealkylation catalyzed by bacterial cytochrome P450 monooxygenases, *ChemBioChem*, **21**, 2297-2305, doi: 10.1002/cbic.202000071.
75. Gray, J. J. (2004) The interaction of proteins with solid surfaces, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 110-115, doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.001.
76. Mie, Y., Ikegami, M., and Komatsu, Y. (2016) Nanoporous structure of gold electrode fabricated by anodization and its efficacy for direct electrochemistry of human cytochrome P450, *Chem. Lett.*, **45**, 640-642, doi: 10.1246/cl.160164.
77. Dai, Q., Yang, L., Wang, Y., Cao, X., Yao, C., and Xu, X. (2020) Surface charge-controlled electron transfer and catalytic behavior of immobilized cytochrome P450 BM3 inside dendritic mesoporous silica nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 4703-4712, doi: 10.1007/s00216-020-02727-0.
78. Xu, X., Zheng, Q., Bai, G., Dai, Q., Cao, X., Yao, Y., Liu, S., and Yao, C. (2018) Polydopamine functionalized nanoporous graphene foam as nanoreactor for efficient electrode-driven metabolism of steroid hormones, *Biosens. Bioelectron.*, **119**, 182-190, doi: 10.1016/j.bios.2018.08.009.
79. Lu, J., Li, H., Cui, D., Zhang, Y., and Liu, S. (2014) Enhanced enzymatic reactivity for electrochemically driven drug metabolism by confining cytochrome P450 enzyme in TiO₂ nanotube

- arrays, *Anal. Chem.*, **86**, 8003-8009, doi: 10.1021/ac502234x.
80. Shumyantseva, V. V., Kuzikov, A. V., Masamreh, R. A., Filippova, T. A., Koroleva, P. I., Agafonova, L. E., Bulko, T. V., and Archakov, A. I. (2022) Enzymology on an electrode and in a nanopore: analysis algorithms, enzyme kinetics, and perspectives, *BioNanoScience*, **12**, 1341-1355, doi: 10.1007/s12668-022-01037-2.
 81. Kuchler, A., Yoshimoto, M., Luginbühl, S., Maveli F., and Walde, P. (2016) Enzymatic reactions in confined environments, *Nat. Nanotech.*, **11**, 409-420, doi: 10.1038/nnano.2016.54.
 82. Шумянцев В. В., Королева П. И., Гилеп А. А., Напольский К. С., Иванов Ю. Д., Канашенко С. Л., Арчаков А. И. (2022) Повышение эффективности электрокатализа цитохрома P450 3A4 с помощью модификации электрода пространственно-упорядоченными наноструктурами на основе анодного оксида алюминия для исследования метаболических превращений лекарственных препаратов, *Докл. Росс. Акад. Наук Науки о Жизни*, **506**, 62-67, doi: 10.31857/S26867389220502986.
 83. Koroleva, P. I., Gilep, A. A., Kraevskiy, S. V., Tsybruk, T. V., and Shumyantseva, V. V. (2023) Improving the efficiency of electrocatalysis of cytochrome P450 3A4 by modifying the electrode with membrane protein streptolysin o for studying the metabolic transformations of drugs, *Biosensors*, **13**, 457, doi: 10.3390/bios13040457.
 84. Арчаков А. И. (1975) *Микросомальное окисление*, Наука, Москва, 327 с.
 85. Sultana, N., Schenkman, J. B., and Rusling, J. F. (2005) Protein film electrochemistry of microsomes genetically enriched in human cytochrome P450 monooxygenases, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13460-13461, doi: 10.1021/ja0538334.
 86. Krishnan, S., and Rusling, J. F. (2007) Thin film voltammetry of metabolic enzymes in rat liver microsomes, *Electrochem. Commun.*, **9**, 2359-2363, doi: 10.1016/j.elecom.2007.07.002.
 87. Nerimetla, R., and Krishnan, S. (2015) Electrocatalysis by subcellular liver fractions bound to carbon nanostructures for stereoselective green drug metabolite synthesis, *Chem. Commun.*, **51**, 11681-11684, doi: 10.1039/c5cc03364k.
 88. Xu, X., Bai, G., Song, L., Zheng, Q., Yao, Y., Liu, S., and Yao, C. (2017) Fast steroid hormone metabolism assays with electrochemical liver microsomal bioreactor based on polydopamine encapsulated gold-graphene nanocomposite, *Electrochim. Acta*, **258**, 1365-1374, doi: 10.1016/j.electacta.2017.11.195.
 89. Nerimetla, R., Premaratne, G., Liu, H., and Krishnan, S. (2018) Improved electrocatalytic metabolite production and drug biosensing by human liver microsomes immobilized on amine-functionalized magnetic nanoparticles, *Electrochim. Acta*, **280**, 101-107, doi: 10.1016/j.electacta.2018.05.085.
 90. Walgama, C., Nerimetla, R., Materer, N. F., Schildkraut, D., Elman, J. F., and Krishnan, S. (2015) A simple construction of electrochemical liver microsomal bioreactor for rapid drug metabolism and inhibition, *Assays Anal. Chem.*, **87**, 4712-4718, doi: 10.1021/ac5044362.
 91. Walker, A., Walgama, C., Nerimetla, R., Alavi, S. H., Echeverria, E., Harimkar, S. P., McIlroy, D. N., and Krishnan, S. (2020) Roughened graphite biointerfaced with P450 liver microsomes: Surface and electrochemical characterizations, *Colloids Surf. B*, **189**, 110790, doi: 10.1016/j.colsurf.2020.110790.
 92. Kahma, H., Filppula, A. M., Launiainen, T., Viinamäki, J., Neuvonen, M., Evangelista, E. A., Totah, R. A., and Backman, J. T. (2019) Disparities in CYP2C8 inactivation between enzyme sources, *Drug Metab. Dispos.*, **47**, 436-443, doi: 10.1124/dmd.118.085498.
 93. Kumar, V., Rock, D. A., Warren, C. J., Tracy, T. S., and Wahlstrom, J. L. (2006) Enzyme source effects on CYP2C9 kinetics and inhibition, *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 1903-1908, doi: 10.1124/dmd.106.010249.
 94. Nerimetla, R., Walgama, C., Singh, V., Hartson, S. D., and Krishnan, S. (2017) Mechanistic insights on the voltage-driven biocatalysis of a cytochrome P450 bacteosomal film on a self-assembled monolayer, *ACS Catal.*, **7**, 3446-3453, doi: 10.1021/acscatal.6b03588.

CATALYTIC AND ELECTROCATALYTIC MECHANISMS OF CYTOCHROMES P450 IN THE DEVELOPMENT OF BIOSENSORS AND BIOREACTORS

Review

P. I. Koroleva¹, T. V. Bulko¹, L. E. Agafonova¹, and V. V. Shumyantseva^{1,2*}

¹ Institute of Biomedical Chemistry (IBMC),
119121 Moscow, Russia; e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

² The Russian National Research Medical University named after N. I. Pirogov, 117997 Moscow, Russia

Cytochromes P450 are unique family of isozymes, discovered in all kingdoms of living species (in animals, bacteria, plants, fungi, archaea). The main functional role of the cytochromes P450 is biotransformation of exogenous and endogenous compounds. This review is highlighted problem of enhancing effectivity of electrocatalysis of cytochromes P450, enzymes that have unique capabilities both for biosensors' design and for biotechnological application. In this review paper, we summarize main methods and modern trends based on biochemical mechanism of cytochromes P450 for development of reconstructing and electrochemical catalytic systems for practical application of these enzymes.

Keywords: cytochrome P450, mechanism of catalysis, bioelectrochemistry, electrocatalysis