

УДК 612.015.1:577.152.162.08

©Коллектив авторов

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЦИТОХРОМОВ P450 С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОДОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ СУБСТРАТАМИ

*В.В. Шумянцева¹, Т.В. Булко¹, Г.П. Кузнецова¹, Н.Ф. Саменкова¹, Т. Бахман²,
Х. Шульце², Р. Шмид², С.А. Усанов³, А.И. Арчаков¹*

¹Государственное учреждение научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
ул. Погодинская, д. 10; тел.: 7 (495) 246-58-20; факс: 7 (495) 245-08-57;
эл. почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Институт технической биохимии Штутгартского университета, Штутгарт,
Германия

³Институт биоорганической химии Академии наук Республики Беларусь

Предложен новый подход для электрохимического восстановления цитохромов P450 с помощью электродов с иммобилизованными субстратами соответствующих изоформ этого гемопroteина (“обратные” биоэлектроды). Метод основан на анализе вольтамперограмм (циклических и квадратно-волновых), амперограмм и измерении таких электрохимических характеристик как каталитический ток и окислительно-восстановительный потенциал. Наиболее информативными являются изменения максимального тока и потенциалов квадратно-волновых вольтамперограмм и изменения тока, регистрируемые при хроноамперометрических экспериментах. Планарный режим электродов, полученных методом трафаретной печати (screen print electrodes), позволяет использовать 20-60 мкл электролита. Проанализированы следующие фермент-субстратные пары цитохром P450 2B4/бензфетамин, цитохром P450scс/холестерин.

Ключевые слова: цитохром P450, электрохимия, печатные электроды, холестерин, электрокатализ.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохромы P450 играют важную роль в окислении неполярных низкомолекулярных химических соединений, как попадающих в организм извне (лекарственные вещества, яды, пищевые добавки, атмосферные загрязнения и др.), так и образующихся в клетке (холестерин, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, стероидные гормоны, простагландины и др.) [1]. Цитохромы метаболизируют около 1 млн различных соединений, катализируя примерно 60 типов химических реакций: гидроксилирование, N-, O- или S-деметилирование, деалкилирование, эпоксидирование и т. д. [2]. Эта особенность цитохромов P450 делает их перспективными в использовании для анализа содержания в различных средах лекарственных препаратов и (или) их метаболитов, ксенобиотиков, а также для стереонаправленного синтеза стероидов или других классов биологически активных соединений. Повышение эффективности ферментативного катализа гемопroteинов является важной практической задачей [3].

Электронный транспорт в биологических системах осуществляется, как правило, в присутствии молекул - доноров электронов, например, NADPH, NADH, и молекул-медиаторов переноса электронов, например, флавиновых нуклеотидов. В процессе восстановления происходит окисление NADPH или NADH. Одним из возможных альтернативных методов восстановления цитохромов P450 является электрохимическое восстановление, при котором источником электронов является электрод [4,5]. Актуальность такого подхода связана с перспективой использования цитохромов P450 и ферментных электродов на их основе в качестве тест-систем, биосенсоров, биореакторов. Ранее были разработаны методы получения ферментных электродов, содержащих иммобилизованные различными методами цитохромы P450 [6-8]. Такие биоэлектроды могут быть использованы для анализа содержания соответствующих субстратов этого гемопroteина. Ток, возникающий при электрокаталитической реакции, пропорционален концентрации анализируемого вещества.

Цель настоящей работы - использовать "обратный" тип электродов для электрохимического восстановления и анализа цитохромов P450 в различных средах. "Обратный" тип электродов содержит иммобилизованные на поверхности трансдьюсера субстраты соответствующих форм цитохромов P450. Исследование и анализ электрохимических параметров таких электродов до и после прибавления проб, содержащих различные цитохромы P450, дает информацию о наличии в исследуемом материале той или иной формы гемопroteина.

МЕТОДИКА. В работе использовали следующие реактивы: холестерин - фирмы "Aldrich" (США), дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB) - фирмы "Fluka" (Швейцария).

Цитохром P450 2B4 (CYP2B4) (17-18 нмоль/мг, $A_{276}/A_{417}=1,5$) был выделен из микросом печени кроликов и очищен как описано ранее [9]. Цитохром P450scs (CYP11A1) был получен методом генной инженерии путем экспрессии в клетках *E. coli* (JM 109). Методики экспрессии и очистки белков описаны ранее [10, 11]. Концентрацию цитохромов P450 2B4 и P450scs определяли по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{450} = 91 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [12].

В работе использовали 100 мкМ цитохром P450 2B4 и 76 мкМ цитохром P450scs. Электрохимические исследования проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,01 М NaCl, pH 7,4. Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB "Eco Chemie" (Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре. В качестве рабочих электродов использовали графитовые электроды, в качестве электродов сравнения - хлорсеребряные электроды, полученные методом трафаретной печати [13, 14]. При измерениях использовали планарный режим печатных электродов. Объем электролита - 60 мкл. Параметры, используемые в квадратно-волновой вольтамметрии: начальный потенциал - 100 мВ, конечный потенциал - 600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц.

Приготовление "обратных" субстратных электродов. На поверхность рабочего графитового электрода наносили 5 мкл 0,1 М DDAB в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин.) наносили 5 мкл 50 мМ бензфетамин. Для получения холестерин-содержащего электрода на графитовую поверхность наносили 5 мкл смеси, содержащей равные объемы 0,1 М DDAB в хлороформе и 10 мМ холестерин в 30 % холате натрия. Электроды оставляли на 12 часов при +4°C.

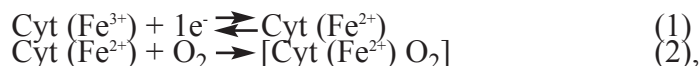
Для экспериментов в анаэробных условиях азот пропускали в буферный раствор электролита и анализируемый раствор фермента в течение 30 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Ранее была показана возможность как медиаторного [15, 16], так и прямого [17, 18] электрохимического восстановления цитохромов P450 с помощью различного типа электродов. Эти исследования могут найти применение как для разработки биосенсоров для

анализа биологически активных соединений [8, 19], так и для разработки биореакторов для коммерческого использования цитохромов P450 в качестве селективных окислителей [20]. В настоящем сообщении предлагается метод электрохимического восстановления цитохромов P450 с использованием электродов с иммобилизованными субстратами соответствующих изоформ гемопротейна. Как в электрохимических биосенсорах, так и в биореакторах каталитический ток возникает в результате электрокатализа в системе “электрод - фермент – субстрат”. Использование этого феномена в “обратном” режиме “электрод - субстрат – фермент” позволяет электрохимически восстанавливать и детектировать соответствующие формы цитохрома P450.

DDAB был использован ранее для исследования прямого переноса электродов в системе стеклоуглеродный электрод - гемопротейны (миоглобин, гемоглобин, цитохром P450cam) [21]. DDAB образует жидкокристаллические мембраноподобные пленки на поверхности электродов [22]. Включение ферментов в такие пленки позволяет получать стабильный электрохимический ответ редокс-системы. Такие электроды достаточно стабильны в гидродинамическом режиме измерений.

Для исследования электрохимических параметров электродов, содержащих пленки синтетического мембраноподобного вещества DDAB и типичного субстрата цитохрома P450 2B4 бензфетамина (Bz) в присутствии этого гемопротейна, было проведено сравнение цикловольтамперограмм до и после прибавления цитохрома P450 2B4. Характер цикловольтамперограмм (CV), полученных в аэробных и анаэробных условиях (рис. 1), свидетельствует о появлении восстановительного пика в области $E_{\text{red}} = -280$ мВ (относительно Ag/AgCl). Эта область характерна для восстановления железа гема гемопротейнов [23]. Наблюдалась линейная зависимость величины восстановительного катодного и окислительного анодного тока от скорости сканирования, что характерно для процессов, происходящих на поверхности электродов [24]. Был исследован диапазон скоростей сканирования от 10 до 100 мВ/с. Цикловольтамперограммы в аэробных условиях не содержат окислительных пиков вследствие быстрой и необратимой реакции (2):



где Cyt (Fe³⁺) – окисленная форма цитохрома P450, Cyt (Fe²⁺) – восстановленная форма [1, 2].

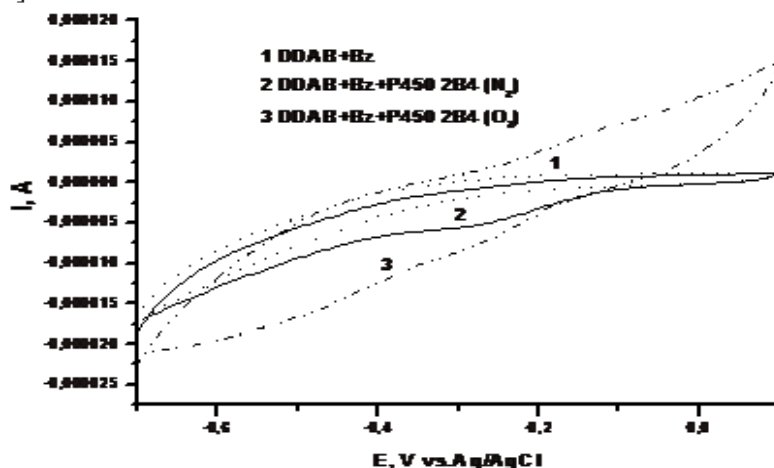


Рисунок 1.

Циклическая вольтамперограмма печатных электродов (DDAB + Bz) (1), электродов (DDAB + Bz), после добавки 4 мкл 100 мкМ P450 2B4 в анаэробных условиях (2), в аэробных условиях (3).

Скорость сканирования (развертки) 100 мВ/с. Объем электролита 60 мкл 100 мМ калий-фосфатный буфер, 10 мМ NaCl, pH 7,4.

Более четкие результаты были получены с помощью метода квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV), дающего лучшее соотношение шум – сигнал [21,25]. На рисунке 2 представлены SW-вольтамперограммы “субстратного” (DDAB+Bz) и “фермент – субстратного” (DDAB+Bz+P450 2B4) электродов для восстановительного процесса в аэробных и анаэробных условиях. Значение восстановительного потенциала, определенное по SW-вольтамперограммам, $E_{sw} = -245$ мВ (при частоте $F=10$ Гц) для аэробных условий и $E_{sw} = -262$ мВ в анаэробных условиях. Как следует из рисунка 2, “субстратный” электрод (DDAB + Bz), содержащий бензфетамин (Bz) не содержит восстановительного пика в исследуемой области $-0,6$ до $0,1$ В, тогда как этот же электрод, содержащий P450 2B4, демонстрирует восстановительный пик как в анаэробных, так и в аэробных условиях. Соотношение амплитуд пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных и анаэробных условиях $I_{max}(O_2)/I_{max}(N_2) = 2,7$.

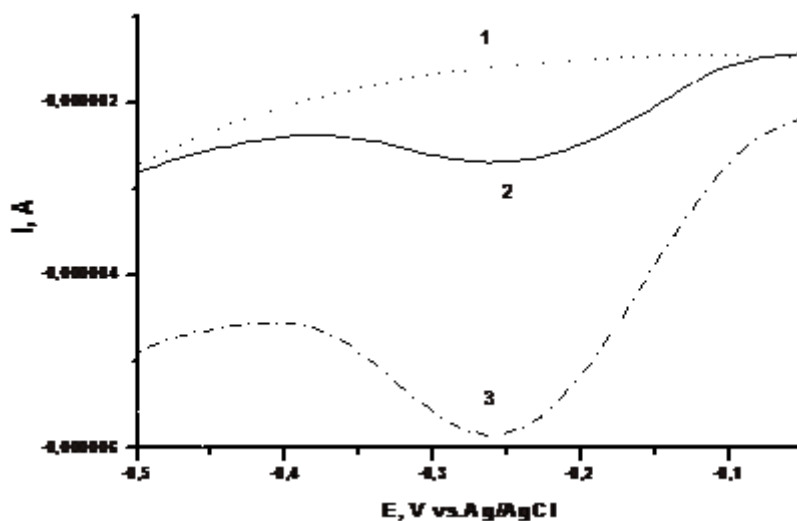


Рисунок 2.

Квадратно-волновые вольтамперограммы печатных электродов, содержащих (DDAB + Bz) (1), электродов DDAB + Bz, после добавки 4 мкл 100 мкМ P450 2B4 в анаэробных (2) и аэробных (3) условиях. Частота 10 Гц.

При исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии использовались следующие экспериментальные параметры: начальный потенциал $0,1$ В, конечный потенциал $-0,7$ В; шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота 10 Гц. Максимальная амплитуда тока SW-вольтамперограмм увеличивается с ростом используемой частоты.

Первая стадия в каталитическом цикле цитохрома P450 состоит в присоединении молекулы субстрата к окисленной форме гемопroteина [2, 26, 27]. Образование фермент-субстратного комплекса приводит к переходу железа гема в высокоспиновую форму [28]. Следующая стадия – восстановление фермент-субстратного комплекса. Восстановление может происходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях [29-31]. Восстановленный одним электроном комплекс субстрата с цитохромом P450 присоединяет молекулярный кислород. Многостадийный последующий каскад реакций приводит к продукту монооксигеназной реакции.

Хроноамперометрические эксперименты также подтверждают чувствительность электрода, содержащего бензфетамин, включенный в мембраноподобные пленки DDAB, к цитохрому P450 2B4 (рис. 3). При добавлении к “субстратному” (DDAB + Bz) – электроду цитохрома P450 2B4 в аэробных условиях (аликвоты по 2 мкл 100 мкМ раствора фермента) (рис. 3) наблюдается изменение анализируемого (каталитического) тока. Планарный

режим измерений позволяет использовать объемы анализируемых проб в диапазоне 2-4 мкл. Амперометрические эксперименты проводились при контролируемом напряжении $E = -500$ мВ (относительно Ag/AgCl) в течение 5 минут. Чувствительность такого электрода (2,2 мкА/нмоль P450 2B4).

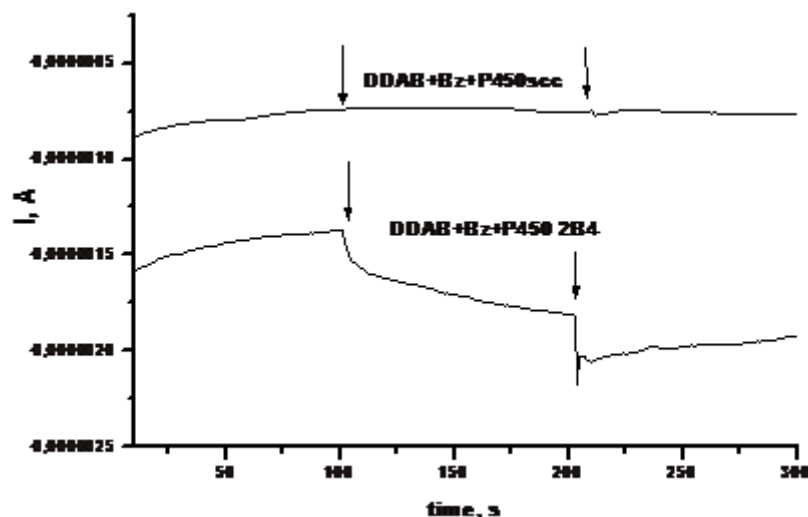


Рисунок 3.

Амперометрический ответ электрода (DDAB + Bz), на добавку P450 2B4 (аликвоты по 2 мкл 100 мкМ P450 2B4) и на добавку P450scс (аликвоты по 2 мкл 76 мкМ P450scс). Напряжение $E = -500$ мВ. Аэробные условия.

Прибавление цитохрома P450scс к “субстратному” электроду (DDAB + Bz), содержащему бензфетамин, не дает четкого изменения тока (рис. 3) в течение 5 минут амперометрического эксперимента. Однако, более длительная инкубация цитохрома P450scс (7-12 минут) с электродом, содержащим DDAB и бензфетамин, позволяет регистрировать также и “не свою” форму, что подтверждено квадратно-волновыми вольтамперограммами в кинетическом режиме (рис. 4).

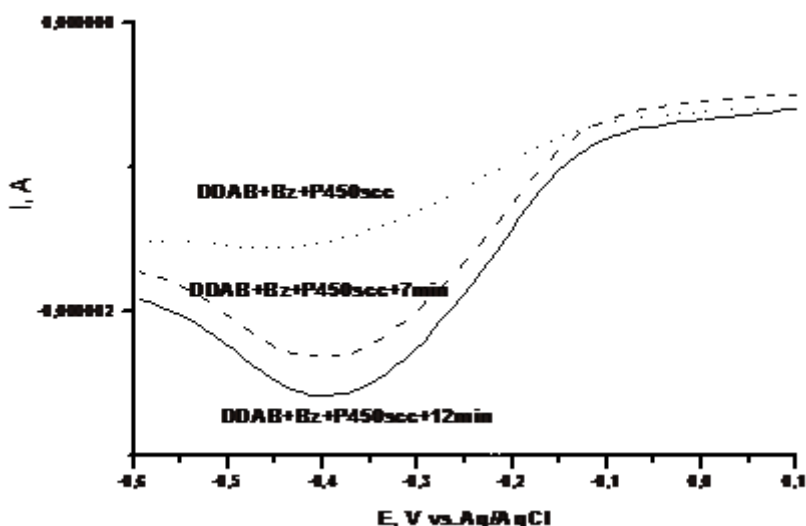


Рисунок 4.

Квадратно-волновая вольтамперограмма электрода (DDAB + Bz), после добавки цитохрома P450scс (4 мкл 76 мкМ раствора), через 7 мин., через 12 мин. Аэробные условия.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ P450

По данным амперометрических экспериментов, “субстратный” электрод, содержащий DDAB и холестерин (DDAB+Chol) давал амперометрический сигнал на добавление P450_{scc} (аликвоты по 2 мкл 76 мкМ раствора фермента) (рис. 5). Чувствительность (DDAB+Chol) электрода (1,5 мкА/нмоль P450_{scc}).

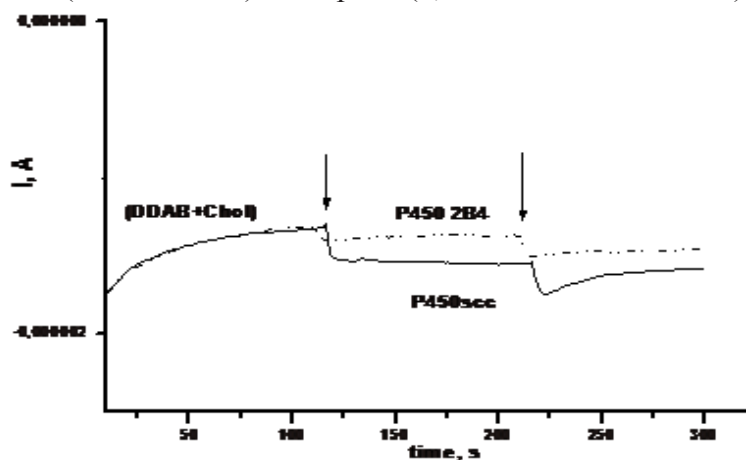


Рисунок 5.

Амперометрический ответ электрода (DDAB +Chol) на добавку 100 мкМ P450 2B4 (---), и на добавку 76 мкМ цитохрома P450_{scc} (-) (аликвоты по 2 мкл). Напряжение E=-500 мВ. Аэробные условия.

Амперометрический ответ (DDAB+Chol) – электрода на прибавление “не своей” изоформы – цитохрома P450 2B4 - был существенно меньше, однако все же регистрировался (рис. 5). Одной из причин такого неполного соответствия в системе “обратных” электродов может быть то, что цитохром P450_{scc} является моносубстратным ферментом, и, по-видимому, субстрат-связывающий участок имеет четкие параметры для связывания с холестерином. Цитохром P450 2B4 метаболизирует различные соединения, среди которых замещенные ароматические амины (аминопирин, бензфетамин), фосфорорганические пестициды (параоксон), алкоксирезорурфин (7-пентоксирезорурфин), анилин, циклофосфамид, антипирин, флорамфеникол, ДДТ, фенитоин, 4-трифторметил-7-этоксикумарин [2], и субстрат-связывающий участок этой формы менее “жесткий”, имеет меньше ограничений по параметрам субстрата.

Как следует из рисунка 6, амперометрические эксперименты для анализа цитохрома P450_{scc} с помощью электрода, содержащего холестерин (DDAB+Chol), дают четкие изменения, в отличие от экспериментов с электродами содержащими бензфетамин – субстрат цитохрома P450 2B4, а не P450_{scc}.

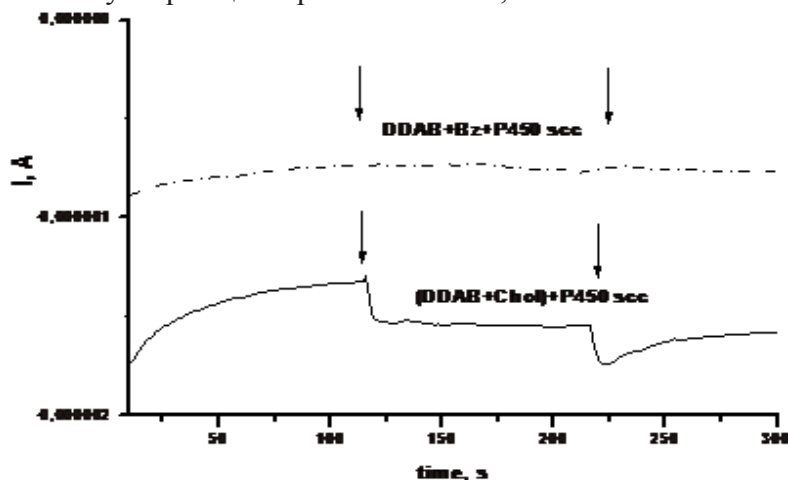


Рисунок 6.

Амперометрический ответ электрода (DDAB +Bz), на добавку 76 мкМ P450_{scc} (---), электрода (DDAB +Chol) на добавку 76 мкМ P450_{scc} (-) (аликвоты по 2 мкл). Напряжение E=-500 мВ. Аэробные условия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Таким образом, предложен метод прямого безмедиаторного электрохимического восстановления цитохромов P450 с использованием электродов, содержащих субстраты цитохромов P450. Предложенный подход может быть использован для детекции соответствующих форм этого гемопroteина в анализируемых пробах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London.
2. Lewis D.F.V. (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function. Taylor and Francis, London and New York.
3. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Арчаков А.И. (2004) Биомедицинская химия, **50**, 243-259.
4. Scheller F.W., Ronnenberg P., Mohr G.-R., Janing K., Ruckpaul. (1976) FEBS Lett., **71**, 309-312.
5. Арчаков А.И., Кузнецов Б.В., Изотов М.В., Карузина И.И. (1981) Биофизика, **26**, 352-354.
6. Lei C., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **268**, 740-744.
7. Johnson D.L., Martin L.L. (2005) J. Am. Chem. Soc., **127**, 2018-2019.
8. Shumyantseva V.V., Deluca G., Bulko T.V., Carrara S., Nicolini C., Usanov S.A., Archakov A.I. (2004) Biosens. Bioelectron., **19**, 971-976.
9. Karuzina I.I., Zgoda V.G., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., A. Archakov A.I. (1999) Free Rad. Biol. Med., **26**, 620-632.
10. Лепешева Г.И., Усанов С.А. (1998) Биохимия, **63**, 224-234.
11. Lepesheva G.I., Strushkevich N.V., Usanov S.A. (1999) Biochim. Biophys. Acta., **1434**, 31-43.
12. Omura T. and Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2379-2385.
13. Bachmann T.T., Schmid R.D. (1999) Anal. Chim. Acta., **401**, 95-103.
14. Bachmann T.T., Leca B., Vilatte F., Marty J.L., Fournier D., Schmid R.D. (2000) Biosens. Bioelectron., **15**, 193-201.
15. Estabrook R.W., Faulkner K.M., Shet M.S., Fisher C.W. (1996) Methods Enzymol., **272**(B), 44-51.
16. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Bachmann T., Bilitewski U., Schmid R.D., Archakov A.I. (2000) Arch. Biochem. Biophys., **377**, 43-48.
17. Joseph S., Rusling J.F., Lvov Y.M., Friedberg T., Fuhr U. (2003) Biochem Pharmacol., **65**, 1817-1826.
18. Shumyantseva V.V., Ivanov Yu.D., Bistolas N., Scheller F.W., Archakov A.I. (2004) Anal. Chem., **76**, 6046-6052.
19. Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W. (2005) Biosens. Bioelectron., **20**, 2408-2423.
20. Udit A.K., Arnold F.H., Gray H.B. (2004) J. Inorg. Biochem., **98**, 1547-1550.
21. Rusling J.F., Nassar A.-E.F. (1993) J. Am. Chem. Soc., **115**, 11891-11897.
22. Zhang Z., Nassar A.-E.F., Lu Z., Schenkman J.B., Rusling J.F. (1997) J. Chem. Soc., **93**, 1769-1774.
23. Lo K.K.-W., Wong L.-L., Hill H.A.O. (1999) FEBS Letters., **451**, 342-346.
24. Murray R.W., Bard A.J. (1984) in Electroanalytical Chemistry (Bard A.J., ed.) Marcel Dekker, New York, **13**, 191-368.
25. Trnkova L., Kizek R., Vacek J. (2004) Bioelectrochemistry, **63**, 31-36.
26. Метелица Д.И. (1982) Активация кислорода ферментными системами. Наука, М., с. 109-114.
27. Lewis D.F.V., Hlavika P. (2000) Biochem. Biophys. Acta., **1460**, 353-374
28. Sliger S.G. (1976) Biochemistry, **15**, 5399-5406.

29. *Iwuoha E. I., Smyth M. R.* (2003) *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 237-244.
30. *Iwuoha E. I., Joseph S., Zhang Z., Smyth M. R., Fuhr U., Ortiz de Montellano P.* (1998) *J. Pharm. Biomed. Analysis*, **17**, 1101-1110.
31. *Johnson D.L., Levis B.C., Elliot D.J., Miners J.O., Martin L.L.* (2005) *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 1533-1541.

Поступила: 04. 07. 2005.

ELECTROCHEMICAL REDUCTION OF CYTOCHROME P450s BASED ON ELECTRODES WITH IMMOBILIZED SUBSTRATES.

V.V. Shumyantseva¹, T.V. Bulko¹, N.F. Samenkova¹, G.P. Kuznetsova¹, T. Bachman², H. Schulze², R.D. Schmid², S.A. Usanov³, A.I. Archakov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: 7(495) 246-58-20; fax: 7(495) 245-08-57;
e-mail: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Institute of Technical Biochemistry Stuttgart University, Stuttgart, 70569 Germany,

³Institute of Bioorganic Chemistry, Belarus National Academy of Science, Minsk, 220141, Belarus

A new approach for the electrochemical reduction of cytochromes P450 (P450s, CYPs) with electrodes chemically modified with appropriate substrates of P450s ("reverse" electrodes) has been proposed. The method is based on the analysis of cyclic voltammograms, square wave voltammograms, amperograms and determination of such electrochemical characteristics as catalytic current and redox potential. The sensitivity of the proposed method is 0.2-1 nmol P450/electrode. The differences of maximal current and potentials in square wave voltammograms and catalytic current in amperometric measurements are more sensitive and reliable. Planar regime of screen-printed electrodes permits to use 20-60 µl of electrolyte volume. We investigated P450 2B4 – benzphetamine or P450_{scc} – cholesterol enzyme – substrate pairs. Electrochemical parameters of electrodes with nonspecific P450 substrate were differed from electrodes with appropriate substrates.

Key words: cytochrome P450, electrochemistry, screen-printed electrodes, cholesterol, electrocatalysis.