

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ”

УДК 577.112.083+577.322.24+547.92+547.77

ДИЧЕНКО
ЯРОСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ СТЕРОИД 7α -ГИДРОКСИЛАЗ
ЧЕЛОВЕКА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Минск, 2015

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель:

Усанов Сергей Александрович,
доктор химических наук, профессор,
член-корреспондент Национальной
академии наук Беларуси, директор
Института биоорганической химии
НАН Беларуси.

Официальные оппоненты:

Шкуматов Владимир Макарович,
доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент Национальной
академии наук Беларуси, заведующий
лабораторией биохимии лекарственных
препаратов НИИ физико-химических
проблем БГУ

Костюк Владимир Андреевич,
доктор химических наук, заведующий
научно-исследовательской
лабораторией физиологии
биологического факультета БГУ

Оппонирующая организация:

Белорусский государственный
технологический университет

Защита состоится «24» декабря 2015 г. в 10.00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» по адресу: 2200141, г. Минск, ул. Академика Купревича, 5/2, в зале заседаний Ученого Совета, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел. (017) 267-85-53.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа НАН Беларуси.

Автореферат разослан «17» ноября 2015 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук



С.В. Бабицкая

ВВЕДЕНИЕ

Стероид 7α -гидроксилазы – группа цитохромов P450, осуществляющих гидроксилирование ряда физиологически важных стероидов, в том числе предшественников желчных кислот, стероидных гормонов и нейростероидов, по C_6 и C_7 атомам.

К стероид 7α -гидроксилазам человека относятся цитохромы P450 7A1, 7B1 и 39A1. В основном эти ферменты экспрессируются в клетках печени и мозга. Точечные аминокислотные замены в структуре CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1 являются причиной тяжелых наследственных патологий, среди которых врожденные дефекты печени (летальное заболевание у новорожденных), спастическая параплегия типа 5 (нейродегенеративное заболевание), рак желчного пузыря, рак кишечника, атеросклероз, гиперхолестеринемия. Причины возникновения данных заболеваний на молекулярном уровне до настоящего времени не выяснены. Во многом это связано с тем, что об особенностях функционирования стероид 7α -гидроксилаз известно мало: недостаточно информации об их субстратной специфичности, каталитических свойствах, мало сведений об ингибиторах и следствиях ингибирования на организменном уровне, нет информации об особенностях превращения отдельных субстратов, для CYP7B1 и CYP39A1 не установлены пространственные структуры.

Настоящая работа посвящена исследованию физико-химических и каталитических особенностей рекомбинантных стероид 7α -гидроксилаз человека (цитохромов P450 7A1, 7B1, 39A1), а также мутантных форм цитохрома P450 7B1 с аминокислотными заменами, наличие которых связано с возникновением наследственного нейродегенеративного заболевания – спастической параплегии типа 5.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 г. № 585): 2. Супрамолекулярная химия, химический синтез новых веществ и материалов с заданной структурой, функциональными и физико-химическими свойствами. Новые химические продукты и технологии: 2.2. биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты; 3. Физико-химические основы биологии. Биотехнологии, биологическая энергетика и биотопливо: 3.1. биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, ее надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов.

Диссертационное исследование выполнено в лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, в соответствии с планом научно-исследовательских работ по темам: «Получение и структурно-функциональная характеристика рекомбинантного цитохрома P450 7B1» (проект, финансируемый из средств Национальной академии наук Беларуси, 2011–2013 гг., № г.р. 20132234); «Субстратная специфичность и топологические особенности активного центра цитохромов P450 7A1, 7B1 и 2E1» (проект, финансируемый из средств Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, 2013-2015 гг., № X13K-062, № г.р. 20131431); «Установление модуляторов процессов межбелковых взаимодействий и переноса восстановительных эквивалентов в системах стероидгидроксилаз» (проект, финансируемый из средств Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, 2013-2014 гг., № X13ЛИТ-022, № г.р. 20131430).

Работа является частью Государственной программы научных исследований на 2011-2015 гг. «Изучение закономерностей функционирования организма в норме и при патологии, причин и механизмов развития социально значимых заболеваний, разработка новых медицинских технологий и лекарственных средств (Фундаментальная и прикладная медицина, и фармация), подпрограмма 14.2: «Синтез и получение биологически активных соединений для производства реагентов и лекарственных средств (Химфармсинтез)», задание 2.13: «Структурно-функциональный анализ рекомбинантных цитохром P450-

зависимых ферментов с целью создания лекарственных препаратов нового поколения» (№ г.р. 20121693).

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – установление структурно-функциональных характеристик стероид 7 α -гидроксилаз человека для выяснения причин возникновения наследственных патологий на молекулярном уровне.

Для достижения поставленной цели планировалось решить следующие задачи:

1. Сконструировать плазмидные векторы, кодирующие рекомбинантные ферменты CYP7B1 с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser, Arg486Cys.

2. Усовершенствовать условия гетерологической экспрессии и выделения из бактериальных клеток рекомбинантных цитохромов P450 39A1, 7B1 и 7B1 с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser, Arg486Cys; разработать способ получения указанных белков в препаративных количествах.

3. Провести скрининг лигандов активного центра ферментов CYP7A1, CYP39A1, CYP7B1 и CYP7B1 с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser, Arg486Cys.

4. Построить теоретические модели пространственной структуры ферментов человека CYP39A1, CYP7B1 и CYP7B1 с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser, Arg486Cys *in silico*.

5. Установить связь между отдельными элементами и уровнями структуры ферментов и каталитическими свойствами стероид 7 α -гидроксилаз человека.

Объект исследования – рекомбинантные стероид 7 α -гидроксилазы человека, а также мутантные формы CYP7B1 с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser, Arg486Cys, связанные с возникновением спастической параплегии типа 5. **Предмет исследования** – структура и функции стероид 7 α -гидроксилаз человека.

Научная новизна:

1. Разработаны способы гетерологической экспрессии и очистки рекомбинантных ферментов человека CYP7B1 и CYP39A1, позволяющие получать указанные гемопротеиды в препаративных количествах с содержанием в конечном препарате функционально-активной формы соответствующего фермента не менее 95%.

2. Впервые сконструированы векторные конструкции, кодирующие мутантные формы CYP7B1 с аминокислотными заменами Gly57Arg (CYP7B1_G57R), Phe216Ser (CYP7B1_F216S), Arg486Cys (CYP7B1_R486C), связанными с возникновением спастической параплегии типа 5.

3. Разработан способ получения в препаративных количествах рекомбинантного гемопротеида CYP7B1_R486C с содержанием функционально-активной формы фермента более 95%.

4. Установлено, что замены Gly57Arg, Phe216Ser приводят к формированию функционально неактивного фермента.

5. Проведен скрининг лигандов активного центра рекомбинантных ферментов CYP7A1, CYP7B1, CYP7B1_R486C, CYP39A1 и установлены ранее неизвестные субстраты CYP7B1 и CYP39A1, относящиеся к стероидам, а также азолы, являющиеся ингибиторами рекомбинантного стероид 7 α -гидроксилаз человека.

6. Построены и исследованы компьютерные модели пространственной структуры CYP39A1, CYP7B1 и его мутантных форм с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser и Arg486Cys. Установлены структурные особенности данных ферментов, отличающие их от других представителей семейства цитохромов P450.

7. Обнаружено, что точечная мутация Arg486Cys приводит к изменению пространственной структуры активного центра CYP7B1, в результате чего изменяется профиль активности фермента по отношению к различным группам субстратов, что может являться причиной возникновения спастической параплегии типа 5.

Положения, выносимые на защиту:

1. Создание новых экспрессионных векторных конструкций, несущих гены, кодирующие мутантные формы гемопротеида CYP7B1 с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser, Arg486Cys, для гетерологической экспрессии указанных белков в клетках *E.coli*.

2. Способ получения высокоочищенных функционально-активных ферментов CYP7B1, CYP7B1_R486C, CYP39A1 человека в препаративных количествах, заключающийся в использовании оригинальных рекомбинантных штаммов *E. coli* и особых условий культивирования для биосинтеза целевых белков, и в последовательном применении металл-хелатной и ионообменной хроматографии для их выделения из бактериальных клеток и очистки до гомогенного состояния.

3. Использование спектрофотометрического титрования для скрининга лигандов активного центра стероид 7 α -гидроксилаз, позволившего установить ранее неизвестные субстраты цитохромов P450 7B1 и 39A1, а именно 21-гидроксипрегненолон, 5-андростен-3 β ,17 β -диол, 5 α -андростан-3 β -ол-17-он для CYP7B1 и 22(R)-гидроксихолестерин для CYP39A1.

4. Установление среди N1-замещенных производных имидазола и триазола ранее неизвестных ингибиторов стероид 7 α -гидроксилаз, способных с

высокой эффективностью связываться в активном центре указанных ферментов, что может являться причиной изменения функций печени и нервной системы на организменном уровне.

5. Компьютерные модели пространственной структуры цитохромов P450 39A1, 7B1 и 7B1 с аминокислотной заменой Arg486Cys, а также комплексов указанных ферментов с лигандами, отражающие структурные особенности стероид 7 α -гидроксилаз, определяющие их субстратную специфичность.

6. Установление молекулярного механизма возникновения спастической параплегии 5-го типа у носителей точечных мутаций гена CYP7B1, соответствующих аминокислотным заменам Gly57Arg, Phe216Ser и Arg486Cys, заключающегося в уменьшении стабильности нативной, функционально-активной формы фермента и изменении его каталитической активности в реакциях окисления нейростероидов.

Личный вклад соискателя ученой степени. Получение высокоочищенных белковых препаратов, физико-химическая и каталитическая характеристика полученных гемопротеидов, а также подготовка научных публикаций проводились автором самостоятельно. Работа выполнялась под руководством чл.-корр. НАН Беларуси, профессора С.А. Усанова, которым были сформулированы цель и основные задачи исследования. При выполнении работы соискатель пользовался консультационной помощью к.х.н. А.В. Янцевича и к.х.н. А.А. Гилепа. Соавторы работ, представленных в списке публикаций соискателя, участвовали в проведении отдельных экспериментов и обсуждении результатов.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Результаты работы представлены на международных и республиканских мероприятиях: «Сахаровские чтения 2011 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, Республика Беларусь, 2011), IV и V Международные конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, Республика Беларусь, 2012, 2014), «17th International Conference on Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Structure» (Manchester, UK, 2011), «The 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations and 12th European ISSX Meeting» (Noordwijk aan Zee, the Netherlands, 2012), «The 13th Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics» (Харьков, Украина, 2012), IV Конгресс физиков Беларуси (Минск, республика Беларусь, 2013), «The 56th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural Sciences Open Readings 2013» (Vilnius, Lithuania, 2013), «The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo» (San Francisco, USA, 2013), VI Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Уфа, Республика Башкортостан, 2013), «FEBS Congress 2013 “Mechanisms in Biology”» (Санкт-Петербург, Россия, 2013), «The 57th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural

Sciences Open Readings 2014» (Vilnius, Lithuania, 2014), XVI Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых (Брест, Республика Беларусь, 2014), 7-ая Международная научная и научно-методическая конференция «Свиридовские чтения 2015» (Минск, Республика Беларусь, 2015), VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015).

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 22 научных работах, среди которых 5 статей в научно-рецензируемых журналах и 1 статья в сборнике научных трудов, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь» общим объемом 3 авторских листа, 7 статей в сборниках материалов научных конференций и тезисы 9 докладов.

Практическая значимость результатов работы подтверждена актом внедрения в лекционный курс «Инженерная энзимология» на кафедре биохимии биологического факультета БГУ.

Получено свидетельство о регистрации компьютерной программы «ProteinD» № 694 от 08.08.2014.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения, библиографического списка, приложений. Полный объем диссертации составляет 144 страницы, в том числе 24 рисунка занимают 13 страниц, 18 таблиц занимают 22 страницы. Библиографический список состоит из 249 наименований цитируемой литературы и 22 публикации соискателя на 24 страницах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В главе 1 представлен аналитический обзор литературы по теме исследования. Рассмотрены основные особенности ферментов, относящихся к семейству цитохромов P450. Проведен анализ информации, касающейся стероид 7 α -гидроксилаз: CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1. Установлено, что только CYP7A1 изучен достаточно полно, в то время как о структуре и функциях CYP7B1 и CYP39A1 известно мало: практически отсутствует информация о субстратной специфичности и кинетических характеристиках, об особенностях метаболизма отдельных субстратов, а также ингибиторах и последствиях ингибирования, до сих пор не установлена пространственная структура гемопротеидов.

Анализ имеющейся информации о нейростероидах – низкомолекулярных биорегуляторах, участвующих во множестве важнейших процессов высшей нервной деятельности, – свидетельствует о том, что некоторые из указанных

соединений могут являться субстратами, либо продуктами реакций, катализируемых стероид 7 α -гидроксилазами.

Литературные данные о производных имидазола и триазола (в том числе универсальных противогрибковых препаратах), свидетельствуют о том, что указанные соединения являются ингибиторами цитохромов P450, и способны влиять на метаболические процессы, протекающие с участием данных ферментов.

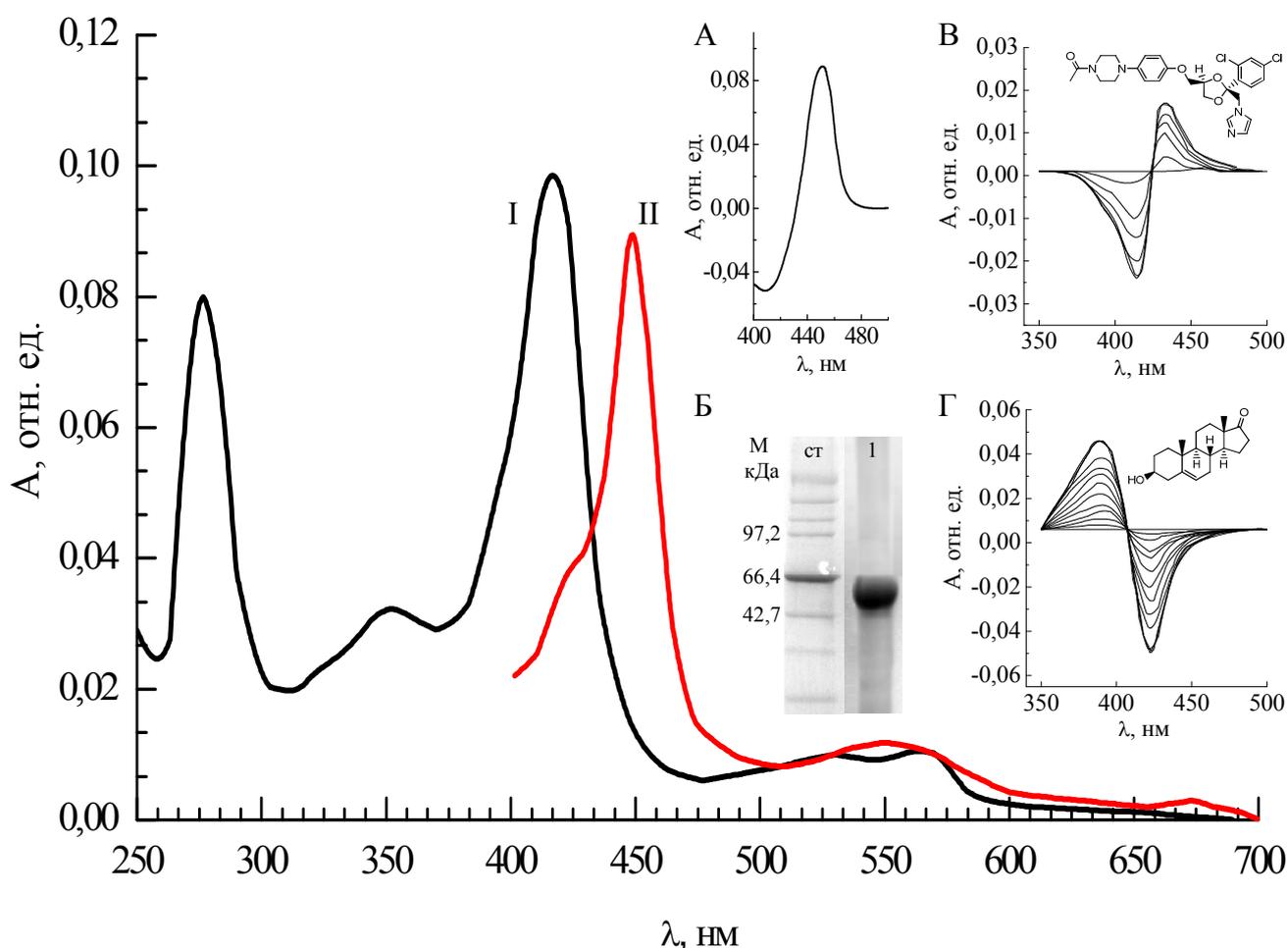
Глава 2 содержит описание методик и способов получения высокоочищенных гомогенных препаратов рекомбинантных гемопротейдов человека CYP7A1, CYP7B1 и CYP39A1, а также мутантных форм CYP7B1, с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser и Arg486Cys, наличие которых связано с возникновением нейродегенеративного заболевания – спастической параплегии типа 5.

Применение экспериментальных и теоретических методов исследования – масс-спектрометрии, спектрофотометрического титрования, реконструкции активности рекомбинантных ферментов *in vitro*, ВЭЖХ, определения термодинамических характеристик стабильности гемопротейдов, флуоресцентной спектроскопии, компьютерного моделирования пространственной структуры белков и молекулярного докинга – позволило провести комплексный анализ свойств стероид 7 α -гидроксилаз и установить взаимосвязь между отдельными элементами и уровнями структуры фермента и возникновением спастической параплегии типа 5 при определенных мутациях.

В **главе 3** приведены результаты оптимизации методик получения рекомбинантных гемопротейдов CYP39A1, CYP7B1 человека и мутантных форм CYP7B1, а также результаты исследования их каталитических свойств.

Усовершенствование стандартной процедуры гетерологической экспрессии и очистки рекомбинантных гемопротейдов CYP39A1 и CYP7B1 человека позволило значительно увеличить выход целевого белка и получить ферменты в количестве 70 нмоль (CYP39A1) и 200 нмоль (CYP7B1) с 1 литра культуральной среды. Показано, что в процессе биосинтеза в клетках *Escherichia coli* CYP7B1_G57R и CYP7B1_F216S образуются нерастворимые агрегаты (inclusion bodies), белок из которых можно выделить только в денатурирующих условиях (8 М мочевины). Обнаружено, что для получения функционально активного CYP7B1_R486C необходимо внесение в культуральную среду и все растворы, используемые при очистке, субстрата CYP7B1 – дегидроэпиандростерона (ДГЭА). Выход фермента при этом составляет 70 нмоль с 1 литра культуральной среды. Таким образом, аминокислотные остатки Gly57, Phe216 и Arg486 принципиально важны для фолдинга и формирования корректной пространственной структуры CYP7B1.

Содержание целевого белка в полученных препаратах составляет более 90% (рисунок 1), при этом не менее 95% от общего количества фермента обладает стероид 7 α -гидроксилазной активностью.



А – разностный спектр поглощения карбонильного комплекса восстановленного фермента; **Б** – электрофореграмма препарата фермента (ст – стандарт молекулярных масс; I – высокоочищенный препарат фермента); **В** – разностный спектр поглощения CYP7B1 при титровании кетоконазолом; **Г** – разностный спектр поглощения CYP7B1 при титровании ДГЭА; **И** – спектр поглощения окисленного CYP7B1; **II** – спектр поглощения карбонильного комплекса восстановленного CYP7B1

Рисунок 1. – Спектры поглощения и электрофореграмма препарата рекомбинантного фермента CYP7B1

Для изучения каталитических свойств рекомбинантных стероид 7 α -гидроксилаз человека проведен скрининг лигандов активного центра CYP7A1, CYP7B1, CYP7B1_R486C, CYP39A1 среди оксистеринов, C₁₉- и C₂₁-стероидов, а также производных имидазола и триазола.

Обнаружено, что CYP7A1, CYP7B1 и CYP39A1 обладают различной специфичностью по отношению к гидроксипроизводным холестерина (20-

гидроксихолестерин, 22(R)-гидроксихолестерин, 22(S)-гидроксихолестерин, 24(S)-гидроксихолестерин, 25-гидроксихолестерин, 27-гидроксихолестерин). Показано, что СУР7В1 связывает в активном центре только 25-гидрокси- ($K_d=0,80\pm 0,04$ мкМ, активность $9,23\pm 0,51$ мин⁻¹) и 27-гидроксихолестерин ($K_d=0,90\pm 0,02$ мкМ, активность $6,10\pm 0,48$ мин⁻¹). При этом, в результате гидроксилирования первого из указанных соединений образуются продукты двух типов: моно- ($m/z=383$ (MH^+-3H_2O)), и дигидроксилированный ($m/z=381$ (MH^+-4H_2O)).

Установлено, что сродство СУР7В1_R486С к оксистеринам совпадает по порядку по сравнению с СУР7В1 ($K_d=0,90\pm 0,10$ мкМ для 25-гидрокси- и $K_d=0,22\pm 0,05$ мкМ для 27-гидроксихолестерина), однако активность фермента в данном случае значительно меньше ($0,83\pm 0,10$ мин⁻¹ и $0,72\pm 0,10$ мин⁻¹, соответственно). Не обнаружено побочных продуктов реакции при гидроксилировании 25-гидроксихолестерина.

В результате спектрофотометрического титрования СУР39А1 гидрокси-производными холестерина установлено, что данный фермент взаимодействует только с нейростероидами 24(S)-гидрокси- ($K_d=0,08\pm 0,02$ мкМ, активность $1,49\pm 0,19$ мин⁻¹) и 22(R)-гидроксихолестерином ($K_d=1,82\pm 0,50$ мкМ, активность $0,47\pm 0,09$ мин⁻¹).

Скрининг лигандов активного центра СУР7В1 среди C₁₉- и C₂₁-стероидов показал, что данный фермент обладает сходным сродством по отношению к ДГЭА ($K_d=2,7\pm 0,1$ мкМ, активность $7,2\pm 1,0$ мин⁻¹), 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола ($K_d=1,3\pm 0,1$ мкМ, активность $8,1\pm 0,7$ мин⁻¹), 5-андростен-3 β ,17 β -диола ($K_d=1,0\pm 0,2$ мкМ, активность $8,2\pm 0,1$ мин⁻¹) и 5 α -андростан-3 β -ол-17-ону (ЭпиА) ($K_d=0,4\pm 0,1$ мкМ). Впервые показано, что в результате гидроксилирования ЭпиА СУР7В1 происходит образование двух моногидроксилированных продуктов, ($m/z=289$) со значениями активности $1,5\pm 0,4$ мин⁻¹ и $5,1\pm 0,1$ мин⁻¹, соответственно.

Установлено, что 5 β -андростан-3 β -ол-17-он (этиохоланон), 5 β -андростан-3 β ,17 β -диол, 5 α -андростан-17-он, 5 α -андростан-3 α -ол-17-он (андростерон), 5 α -андростан-3 α -ол, 5 α -андростан-17 β -ол-3-он (дигидротестостерон), 5 α -андростан, 5 α -андростан-3 β -ол связываются в активном центре СУР7В1, однако образования продуктов реакции гидроксилирования в данном случае не происходит.

Среди C₂₁-стероидов СУР7В1 связывает только прегненолон ($K_d=8,3\pm 0,1$ мкМ, активность $1,0\pm 0,1$ мин⁻¹) и 21-гидроксипрегненолон ($K_d=6,1\pm 0,1$ мкМ, активность $0,15\pm 0,02$ мин⁻¹), однако аффинность и скорость превращения субстрата в данном случае значительно меньше, чем для известных лигандов исследуемого белка: ДГЭА, 5 α -андростан-3 β ,17 β -диола, 25-гидрокси- и 27-гидроксихолестерина.

Установлено, что CYP7B1_R486C связывает в активном центре только ДГЭА ($K_d=9,6\pm 1,3$ мкМ), 5α -андростан- $3\beta,17\beta$ -диол ($K_d=1,1\pm 0,1$ мкМ), 5α -андростан- 3β -ол-17-он ($K_d=1,2\pm 0,1$ мкМ) и 5α -андростан- 3β -ол ($K_d\sim 10^{-3}$ мкМ). При этом, в отличие от CYP7B1, не обнаружено образования в реконструированной системе продуктов реакции гидроксирования, что может быть связано с низкой активностью данного фермента.

Установлено, что наличие двойной связи в 5-ом положении стероида является причиной его гидроксирования CYP7B1 в 7α -положение, в то время как отсутствие двойной связи приводит к тому, что для гидроксирования становятся доступны как 6-й, так и 7-й атомы углерода. Кроме того показано, что субстратами цитохрома P450 7B1 являются только C_{19} -стероиды, имеющие двойную связь у C_5 либо атом водорода в α -положении, полярную группу у C_{17} и гидроксильную группу у C_3 в β -положении. В то же время CYP7B1 с аминокислотной заменой Arg486Cys связывает только C_{19} -стероиды (за исключением ДГЭА), у которых атом водорода у C_5 находится в α -положении и есть гидроксильная группа у C_3 в β -положении. Полученные данные свидетельствуют о наличии серьезных конформационных изменений в белке в результате аминокислотной замены Arg486Cys.

Спектрофотометрическое титрование CYP7B1 и CYP39A1 лигандами стероидной природы указывает на принципиально важную роль указанных ферментов в метаболизме нейростероидов – низкомолекулярных биорегуляторов, опосредующих многие процессы высшей нервной деятельности.

Анализ лиганд-связывающих свойств стероид 7α -гидроксилаз человека по отношению к производным имидазола и триазола показал, что большая группа соединений, используемых в настоящее время в качестве эффективных противогрибковых препаратов, с высокой аффинностью связывается и ингибирует CYP7A1, CYP7B1 и CYP39A1. Установлено, что стероид 7α -гидроксилазы взаимодействуют только с азолами с разветвленной структурой боковых цепей, при этом эффективность взаимодействия в большинстве случаев выше, чем со стероидами. Следовательно, терапия указанными соединениями может оказывать влияние на баланс желчных кислот и нейростероидов в организме.

В главе 4 приведены результаты исследования структурно-функциональных особенностей стероид 7α -гидроксилаз человека.

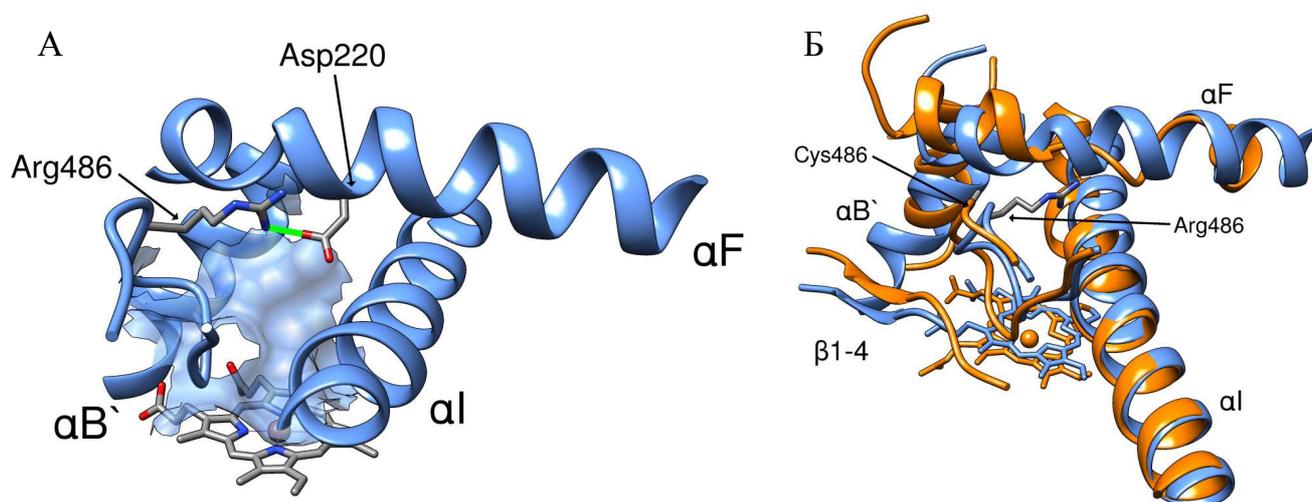
Для получения представления о молекулярной организации CYP7B1, CYP39A1 методом гомологичного моделирования построены пространственные структуры указанных ферментов.

Установлено, что для стероид 7α -гидроксилаз характерно наличие в α -спирали I «излома» (kink), из-за того, что в аминокислотной последовательности

на месте консервативного (для остальных цитохромов P450) Thr расположен Asn. В результате этого молекула субстрата занимает положение в активном центре, при котором возможно ее гидроксирование в 7 положение: плоскости гема и стерана параллельны, расстояние от атома железа до атома C₇ не более 5 Å. Обнаружено, что у CYP39A1 область меандра, а также неструктурированные участки между α-спиралями В и В', α-спиралью D и β-цепью 1-3, β-цепями 2-1 – 2-2, и α-спиралями К' и L короче, чем у ферментов семейства CYP7, в результате чего пространственная структура данного белка имеет более выраженную глобулярную структуру по сравнению с CYP7A1 и CYP7B1.

In silico анализ эффекта точечных мутаций Gly57Arg и Phe216Ser CYP7B1 на структурно-функциональные характеристики фермента показал, что аминокислотные остатки Gly57 и Phe216 принципиально важны для формирования общего фолда CYP7B1: в процессе молекулярной динамики происходит постепенное разворачивание глобул CYP7B1_G57R и CYP7B1_F216S.

Установлено, что Arg486 участвует в формировании системы связей, стабилизирующих пространственную структуру CYP7B1. Замена указанного остатка на Cys приводит к изменению геометрии активного центра оксистерин 7α-гидроксилазы (рисунок 2), что является причиной изменения каталитических свойств фермента.

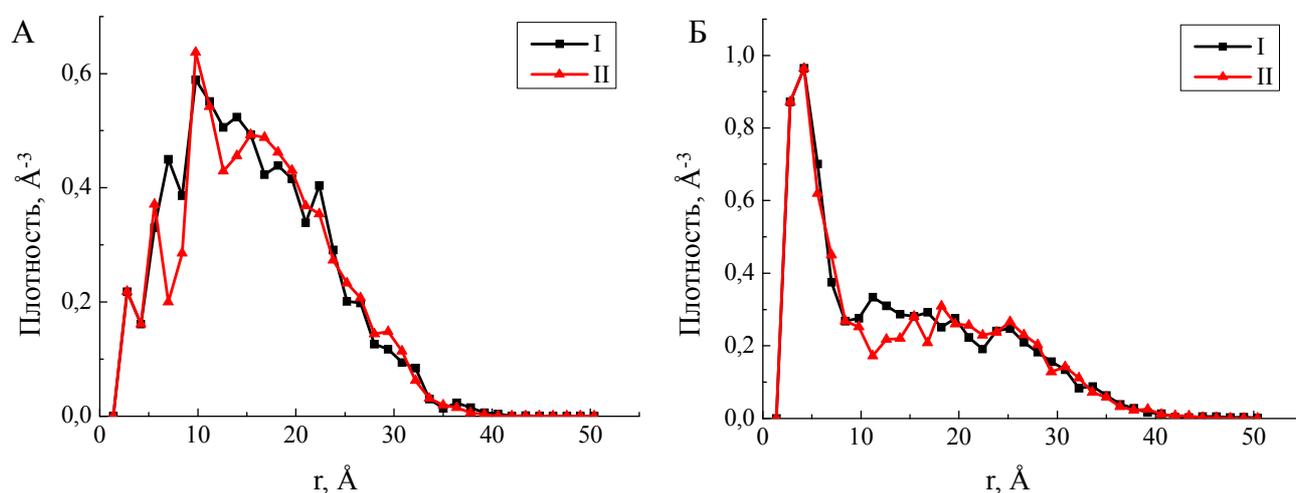


А – фрагмент пространственной структуры CYP7B1 (на рисунке показан фрагмент поверхности полости активного центра фермента, линией отмечена водородная связь Arg486-Asp220); Б – фрагмент выравнивания пространственных структур CYP7B1 (темный) и CYP7B1_R486C (светлый)

Рисунок 2. – Фрагменты пространственных структур CYP7B1 и CYP7B1_R486C в области активного центра

Анализ структуры СУР7В1_R486С методом молекулярной динамики показал, что общая укладка полипептидной цепи белка остается стабильной, однако среднеквадратичное отклонение боковой цепи, по сравнению с начальным моментом времени, а также величина внутренней энергии, больше у мутантной формы, чем у исходного фермента. При этом наибольшие отклонения наблюдаются в области петли Leu482-Gln492, содержащей Arg486.

Изменение пространственной локализации данного неструктурированного участка приводит к структурным изменениям α -спирали F, а также к смещению α -спирали В' из активного центра наружу. Наиболее существенные различия СУР7В1_R486С и СУР7В1 наблюдаются в диапазоне расстояний от 7 до 9 Å и от 10 до 15 Å от атома железа гема (рисунок 3), что соответствует аминокислотным остаткам Ser115, Ser366 и Thr367, а также Leu118, Leu119, участвующим во взаимодействии с молекулой лиганда в активном центре фермента.



А – кривые радиального распределения атомов гидрофильных аминокислотных остатков; Б – кривые радиального распределения атомов гидрофобных аминокислотных остатков; I – СУР7В1; II – СУР7В1_R486С

Рисунок 3. – Радиальное распределение атомов СУР7В1 и СУР7В1_R486С в зависимости от расстояния до атома железа

Для объяснения наблюдаемых *in vitro* каталитических свойств стероид 7 α -гидроксилаз, методом молекулярного докинга получены модели комплексов указанных ферментов с субстратами. Показано, что в большинстве случаев стероиды занимают в активном центре СУР7В1 и СУР39А1 положение, при котором плоскости стерана и гема параллельны, а расстояние от атома железа до С₇ лиганда во всех случаях составляет порядка 5 Å, что, согласно имеющимся представлениям, является оптимальным для осуществления гидроксилирования субстрата по 6 или 7 положению.

Установлено, что связывание лигандов в активном центре CYP7B1 происходит за счет взаимодействия с аминокислотными остатками Ser115, Leu118, Leu119, Phe123, Phe223, His285, Phe289, Thr367, Leu488 и Phe489. Согласно данным аланинового сканирования среди выявленных аминокислотных остатков наибольший эффект от замены на аланин наблюдается в случае Leu118, Leu119, Phe289, Trp291, Asn296, Leu488 и Phe489. Часть из них являются уникальными для CYP7B1 (Leu118, Leu119, Phe289, Leu488 и Phe489), а Trp291 и Asn296 сохраняются у стероид 7α -гидроксилаз и имеют принципиальное значение для связывания холестерина CYP7A1, что, таким образом, указывает на определяющую роль указанных остатков для функционирования оксистерин 7α -гидроксилазы.

Обнаружено, что из-за изменения пространственной локализации α -спирали В' у CYP7B1_R486C, доля субстратов, взаимодействующих с Phe123 (CPC-1, α -спираль В'), увеличивается, а с Phe223 (CPC-3, α -спираль F') и Phe289 (CPC-4, α -спираль I) – уменьшается. В результате этого молекула лиганда располагается внутри активного центра дальше от атома железа, чем в случае CYP7B1, что приводит к изменению каталитических свойств фермента.

Показано, что короткая боковая цепь C₂₁-стероидов, а также наличие гидрофильных заместителей в 20 и 21 положениях, приводят к тому, что молекула субстрата в активном центре CYP7B1 занимает промежуточное положение по сравнению с оксистеринами и андростанами. Это является основной причиной снижения аффинности CYP7B1 по отношению к указанным соединениям, по сравнению с C₂₇- и большинством C₁₉-стероидов.

Установлено, что в связывании лигандов в активном центре CYP39A1 участвуют консервативные аминокислотные остатки, как для данного фермента, так и для стероид 7α -гидроксилаз: Lys90, Val91, Asp92, Phe93, Leu95, Tyr102, Leu119, Leu123, Leu269, Asn277, Val343, Thr345 и Val452. Согласно данным аланинового сканирования только в случае Lys90, Leu95, Tyr102, Leu269, Asn277, Thr345 и Val452 замена на аланин приводит к значимому изменению энергии фермент-субстратного комплекса (>4 кДж/моль). Указанные остатки являются консервативными для CYP39A1, а Asn277 сохраняется также у CYP7A1 и CYP7B1. Кроме этого, с использованием метода множественного выравнивания обнаружено, что Tyr102, Leu269, Asn277 и Val452 соответствуют аминокислотным остаткам, которые принципиально важны для связывания молекулы субстрата в случае CYP7A1 и CYP7B1: Tyr102 – Phe109 (CYP7A1), Phe123 (CYP7B1); Leu269 – Val281(CYP7A1); Asn277 – Asn289 (CYP7A1), Asn296 (CYP7B1); Val452 – Leu486 (CYP7A1), Phe489(CYP7B1). Следовательно, можно утверждать, что указанные аминокислотные являются ключевыми для связывания

субстрата в активном центре CYP39A1 и, таким образом, определяют его уникальные каталитические особенности по сравнению с ферментами CYP7.

Обнаружено, что при связывании оксистероинов в активном центре стероид 7 α -гидроксилаз длинная алифатическая цепь стероидов располагается внутри гидрофобной полости, сформированной аминокислотными остатками, принадлежащими α -спиралям V' и I. Основной вклад в связывание гидроксипроизводных холестерина при этом обеспечивается уникальными для данных ферментов Leu118, Leu119 (α B'), His285 (α I) (CYP7B1); Thr104, Ser105 (α B'), Thr278 (α I) (CYP7A1); Asp92, Asn99 (α B'), Tyr266 (α I) (CYP39A1). Установлено, что различия гидрофобности указанных аминокислотных остатков являются основной причиной наблюдаемой *in vitro* избирательности CYP39A1 и CYP7B1 по отношению к оксистеринам.

Структурные особенности стероид 7 α -гидроксилаз человека дополнительно исследовались *in vitro* путем изучения поведения указанных ферментов при действии на них денатурирующих агентов, а также с использованием метода тушения собственной флуоресценции гемопротеидов.

Анализ термодинамических параметров стероид 7 α -гидроксилаз человека свидетельствует о том, что наиболее устойчивым к действию денатурантов белком является CYP39A1 (таблица 1). Согласно результатам компьютерного моделирования, основной причиной наблюдаемой высокой стабильности указанного фермента является низкая конформационная подвижность элементов вторичной структуры CYP39A1 друг относительно друга.

Таблица 1. – Термодинамические параметры разворачивания стероид 7 α -гидроксилаз при действии денатурирующих агентов

Денатурант	Параметр	CYP7A1	CYP7B1	CYP7B1_R486C	CYP39A1
Додецил-сульфат натрия	ΔG , кДж/моль	6,4 \pm 0,5	7,8 \pm 0,4	5,6 \pm 0,4	8,6 \pm 0,3
	m, Дж/моль на мкмоль додецилсульфата натрия	60 \pm 5	81 \pm 4	39 \pm 3	90 \pm 5
Мочевина	ΔG , кДж/моль	7,2 \pm 0,9	9,7 \pm 1,8	9,5 \pm 1,2	9,9 \pm 0,8
	m, кДж/моль на моль мочевины	3,3 \pm 0,4	3,3 \pm 0,6	4,8 \pm 0,6	3,4 \pm 0,7
Гуанидин гидрохлорид	ΔG , кДж/моль	4,0 \pm 0,6	9,7 \pm 1,6	6,1 \pm 1,3	10,0 \pm 0,9
	m, кДж/моль на моль гуанидин гидрохлорида	3,3 \pm 0,4	7,0 \pm 1,0	5,6 \pm 1,1	8,0 \pm 0,7

Обнаружено, что свободная энергия перехода из нативного в денатурированное состояние снижена для CYP7B1_R486C по сравнению с

CYP7B1, что свидетельствует об уменьшении конформационной стабильности белка в результате точечной мутации Arg486Cys.

Показано, что добавление в раствор лигандов фермента: ДГЭА, 27-гидроксихолестерина и миконазола – приводит к увеличению термодинамической стабильности рекомбинантного цитохрома P450 7B1. Однако в случае CYP7B1_R486C значительное повышение свободной энергии перехода белковой глобулы из нативного в денатурированное состояние, по сравнению со «свободной» формой фермента, показано лишь для комплекса гемопротеида с ДГЭА. Полученный результат позволяет объяснить увеличение выхода функционально-активной формы мутантного белка при гетерологической экспрессии в клетках *Escherichia coli* в присутствии указанного субстрата.

Изменение пространственной структуры CYP7B1 в результате точечной мутации Arg486Cys подтверждается методом тушения собственной флуоресценции (таблица 2). Установлено, что CYP7B1 содержит пять остатков триптофана: Trp52, Trp175, Trp260, Trp291, Trp303, из которых только Trp52, Trp175, Trp260 дают вклад в интегральную интенсивность (для Trp291, Trp303 происходит полное тушение флуоресценции за счет безызлучательного переноса энергии на гем).

Таблица 2. – Константы Штерна-Фольмера для нативной и полностью денатурированной форм белков CYP7B1, CYP7B1_R486C и CYP39A1

Фермент		Акриламид		Г		Cs ⁺	
		330 нм	350 нм	330 нм	350 нм	330 нм	350 нм
CYP7B1	I*	15,3±1,1	15,1±1,1	5,5±0,2	5,2±0,1	50,9±1,0	45,9±1,0
	II**	5,8±0,1	7,0±0,1	3,1±0,1	3,9±0,1	60,1±0,6	58,9±0,6
CYP7B1_R486C	I	5,4±0,3	5,8±0,3	4,1±0,3	4,3±0,3	56,4±1,5	49,9±1,6
	II	7,1±0,1	8,2±0,1	4,7±0,1	5,6±0,1	75,0±0,8	69,6±0,8
CYP39A1	I	4,8±0,2	5,2±0,2	1,9±0,1	2,1±0,1	31,1±0,6	26,4±0,6
	II	7,3±0,1	8,8±0,1	2,8±0,1	3,5±0,1	66,4±0,7	66,0±0,7

* 50 мМ Трис (pH 7,4)
 ** 50 мМ Трис (pH 7,4), 6 М гуанидин гидрохлорид

Обнаружено, что величины констант Штерна-Фольмера (таблица 2) при использовании в качестве тушителей ионов Г и молекул акриламида меньше для CYP7B1_R486C, чем для CYP7B1, а при использовании ионов Cs⁺ – несколько больше (порядка 9%). Согласно структурным данным свободно менять свое положение в пространстве может только Trp52, в то время как Trp175 и Trp260 находятся в жестком микроокружении, при этом вероятность безызлучательного переноса энергии на гем с Trp52 значительно выше для мутантной формы.

Полученные данные, свидетельствуют о том, что в результате замены Arg486Cys происходит смещение указанного аминокислотного остатка в сторону простетической группы.

Согласно данным флуоресцентной спектроскопии СУР7В1 наибольшие значения констант Штерна-Фольмера наблюдаются при использовании в качестве тушителя ионов Cs^+ , а наименьшие — ионов Γ . Это свидетельствует о высокой плотности отрицательного заряда у микроокружения флуорофоров. При этом различие величин констант концентрационного тушения, определенных при двух длинах волн, позволяет выделить несколько групп триптофанов, по-разному доступных молекулам тушителя (Trp175 и Trp260; Trp52). Полученный результат справедлив и для мутантной формы фермента.

Анализ аминокислотной последовательности СУР39А1 свидетельствует о том, что фермент содержит 10 остатков триптофана Trp35, Trp38, Trp215, Trp221, Trp272, Trp284, Trp330, Trp371, Trp380, Trp418, при этом, согласно структурным данным, вклад в интегральную интенсивность спектра флуоресценции дают лишь Trp35 и Trp371 (для остальных флуорофоров происходит практически полное тушение флуоресценции за счет безызлучательного переноса энергии). Расчет констант Штерна-Фольмера свидетельствует о том, что наиболее эффективно процесс тушения протекает при использовании в качестве тушителя ионов Cs^+ , а наименее эффективно — Γ , при этом соответствующие значения констант отличаются на порядок. В силу того, что поверхность вблизи Trp35 и Trp371 заряжена преимущественно положительно, решающим фактором в данном случае является большая доступность для ионов Cs^+ по сравнению с молекулами акриламида и ионами Γ . Расчетные данные также, как и в случае СУР7В1, позволяют говорить о наличии нескольких групп триптофанилов в молекуле белка, которые находятся в различном микроокружении, что соответствует результатам анализа пространственной структуры фермента *in silico*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты исследования

1. Впервые сконструированы векторные конструкции, кодирующие мутантные формы СУР7В1 с аминокислотными заменами Gly57Arg, Phe216Ser, Arg486Cys. Разработаны способы получения рекомбинантных СУР7В1 и СУР39А1 человека и мутантной формы СУР7В1 с аминокислотной заменой Arg486Cys (СУР7В1_R486С), что позволило получить указанные ферменты в количестве 200 нмоль (СУР7В1) и 70 нмоль (СУР39А1 и СУР7В1_R486С) на 1 литр культуральной среды, с содержанием в конечных препаратах

функционально-активной формы соответствующего фермента более 95%. Препарат фермента CYP7B1_R486C получен впервые. Установлено, что замены Gly57Arg, Phe216Ser приводят к формированию функционально неактивного фермента CYP7B1 [2, 4, 13, 18, 19].

2. Проведен скрининг лигандов активного центра рекомбинантных ферментов CYP7A1, CYP7B1, CYP7B1_R486C, CYP39A1 и установлено, что избирательность CYP7B1 и CYP39A1 к гидроксипроизводным холестерина выше по сравнению с CYP7A1. Обнаружено, что активность CYP7B1_R486C по отношению к оксистеринам на порядок меньше, чем для исходного белка. Установлены ранее неизвестные субстраты CYP7B1 и CYP39A1, к числу которых относятся 21-гидроксипрегненолон, 5-андростен-3 β ,17 β -диол и 5 α -андростан-3 β -ол-17-он в первом случае и 22(R)-гидроксистерин во втором [1, 3, 4, 7, 10].

3. Обнаружено, что стероид 7 α -гидроксилазы человека образуют комплексы с 22(R)-, 24(S)-гидроксистерином (CYP7A1, CYP39A1); прегненолоном, ДГЭА, этиохоланом, андростероном, дигидротестостероном (CYP7B1). Впервые показано, что точечная замена CYP7B1 Arg486Cys приводит к изменению аффинности фермента по отношению к субстратам CYP7B1, что может являться основной причиной возникновения спастической параплегии типа 5 [3, 6, 7, 10, 12, 13].

4. Обнаружено, что лигандами активного центра CYP7B1 среди C₁₉-стероидов, являются соединения, имеющие двойную связь у C₅ либо атом водорода в α -положении, гидроксид- или кетогруппу у C₁₇ и гидроксильную группу у C₃ в β -положении, при этом характер распределения электронной плотности около C₅ определяет стереохимию продукта гидроксирования: наличие двойной связи в 5-ом положении стероида направляет гидроксильную группу преимущественно в 7 α -положение; при отсутствии двойной связи, α -гидроксированию доступны 6 и 7-й атомы углерода. В то же время CYP7B1_R486C связывает только C₁₉-стероиды, у которых атом водорода у C₅ находится в α -положении, а гидроксильная группа у C₃ в β -положении [3, 4].

5. Установлена группа азолов с разветвленной пространственной структурой боковых цепей, которые с высокой эффективностью взаимодействуют с рекомбинантными гемопротеидами CYP7A1, CYP7B1, CYP7B1_R486C, CYP39A1. Показано, что аффинность CYP7B1_R486C к эконазолу, бифоназолу, клотримазолу, кетоконазолу, ципроконазолу, флусилазолу выше, чем для CYP7B1, что свидетельствует об изменении геометрических характеристик активного центра фермента в результате мутации [1, 2, 6, 8, 16, 17].

6. Построены компьютерные модели пространственных структур CYP39A1, CYP7B1 и его мутантных форм. Установлены основные структурные особенности данных белков, отличающие их от других цитохромов P450: наличие

в α -спирали I «изгиба» (kink), который приводит к разрыву α -спирали G (со стороны C-концевой последовательности) и образованию α -спирали G''; более протяженная, по сравнению с другими цитохромами P450, область меандра; наличие вблизи гема Asn (α -спираль I) вместо консервативного Thr. Обнаружено, что консервативные аминокислотные остатки Leu118, Leu119, His285, Phe289, Trp291, Asn296, Leu488 и Phe489 являются ключевыми для связывания субстрата в активном центре CYP7B1, а Lys90, Leu95, Tyr102, Leu269, Asn277, Thr345 и Val452 – CYP39A1 [5, 6, 9, 15, 20, 21, 22].

7. Установлен молекулярный механизм возникновения спастической параплегии типа 5 в результате аминокислотной замены Arg486Cys в последовательности CYP7B1, заключающийся в том, что данная мутация приводит к значительному изменению пространственной структуры гемопротеида, в результате чего снижается стабильность нативной, функционально-активной формы фермента и изменяются каталитические свойства оксистерин 7 α -гидроксилазы человека в реакциях окисления нейростероидов [4, 5, 11, 14, 20].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Экспрессионные системы «хозяин-вектор», а также методики биотехнологического синтеза, выделения и очистки рекомбинантных ферментов применяются для получения препаративных количеств CYP39A1, CYP7B1 человека и его мутантных форм. Указанные белки используются в качестве модельных систем для проведения *in vitro* скрининговых исследований по поиску ингибиторов и активаторов стероид 7 α -гидроксилаз.

Обнаруженные закономерности функционирования мутантных форм оксистерин 7 α -гидроксилазы перспективны для разработки оптимальной схемы лечения спастической параплегии типа 5.

На основании результатов, полученных при моделировании пространственных структур рекомбинантных ферментов, составлены методические указания, которые используются при проведении лекционных занятий по курсу «Инженерная энзимология» на кафедре биохимии биологического факультета БГУ. Разработанная в процессе выполнения диссертационного исследования компьютерная программа «ProteinD» используется для получения информации о плотности распределения атомов белка.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ***Статьи в рецензируемых научных журналах***

1. Взаимодействие цитохрома P450 7B1 с азолами и стероидами / А.В. Янцевич, Я.В. Диченко, Н.В. Струшкевич, С.В. Шпак, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Труды Белорусского государственного университета: научный журнал. – 2010. – Т.5, ч.1. – С. 230-235
2. Получение высокоочищенного цитохрома P450 7B1 человека и скрининг его лигандов среди замещенных производных имидазола и триазола / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, Н.В. Струшкевич, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2013. – Т. 57, №1. – С. 74–79.
3. Скрининг лигандов активного центра цитохрома 450 7B1 среди холестанов и андростанов / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, Н.В. Струшкевич, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2013. – №1. – С. 89–96.
4. Human steroid and oxysterol 7 α -hydroxylase CYP7B1: substrate specificity,azole binding and misfolding of clinically relevant mutants / A.V. Yantsevich, Y.V. Dichenko, F. MacKenzie, D.V. Mukha, A.V. Baranovsky, A.A. Gilep, N.V. Strushkevich, S.A. Usanov // FEBS J. – 2014. – V.281, №6. – P.1700-1713.
5. Диченко, Я.В. Структурно-функциональные особенности оксистерин 7 α -гидроксилазы с аминокислотной заменой R486C и их связь с возникновением нейродегенеративных заболеваний / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, С.А. Усанов // Журнал прикладной спектроскопии. – 2015. – Т. 82, №1. – С. 96-102.

Статьи в сборниках научных трудов

6. Структура и функции стероид-7 α -гидроксилаз / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, Н.В. Струшкевич, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Биорегуляторы: исследование и применение. Выпуск 3. : сб. науч. тр. / Ин-т биоорганической химии НАН Беларуси ; под ред. чл.-корр. С.А. Усанова. – Минск, 2014. – С. 186-197.

Тезисы докладов

7. Comparison of substrate specificity of steroid 7 α -hydroxylases / S.A. Usanov, Y.V. Dichenko, A.C. Dvornikov, A.V. Yantsevich, N.V. Strushkevich // 17th International Conference on Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Structure, Manchester, UK, June 26-30, 2011. – Manchester, 2011. – P. 72.

8. Effect of azole drugs on activity of oxysterol-7 α -hydroxylase, CYP7B1 [Electronic resource] / A.A. Gilep, Y.V. Dichenko, A.V. Yantsevich, S.A. Usanov, N.V. Strushkevich // The 19th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations and 12th European ISSX Meeting, Noordwijk aan Zee, Netherlands, June 17 – 21, 2012. – Mode of access: <https://issx.confex.com/issx/12euro/webprogram/Paper27652.html>. – Date of access: 13.10.2015.

9. Homology modeling and analysis of cytochrome P450 7B1 structure [Electronic resource] / Y.V. Dichenko, A.V. Yantsevich, D.V. Mukha, A.A. Gilep, S.A. Usanov // The 13th Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics, Kharkiv, Ukraine, December 4-7, 2012. – 1 elec. opt. disk (CD-ROM)

10. Dichenko, Y.V. Modified substrate specificity of CYP7B1 R486C mutant – a possible reason for spastic paraplegia type 5 / Y.V. Dichenko, A.V. Yantsevich, S.A. Usanov // The 56th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural Sciences Open Readings 2013, Vilnius, Lithuania, March 20-23, 2013. / Vilnius University ; ed. board: V. Aukstikalnis [et al.]. – Vilnius, 2013. – P. 168.

11. Диченко, Я.В. Исследование термодинамической стабильности белковой глобулы мутантной формы CYP7B1 ARG486CYS / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, С.А. Усанов // IV Конгресс физиков Беларуси : сб. науч. трудов, Минск, Республика Беларусь, 24–26 апреля 2013 г. / Ковчег ; редкол. С.Я. Килин (гл. ред.) [и др.] – Минск, 2013. – С. 367.

12. Steroid 7 α -hydroxylases: neurosteroids activation and cholesterol catabolism [Electronic resource] / A.A. Gilep, Y.V. Dichenko, A.V. Yantsevich, S.A. Usanov, N.V. Strushkevich // The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, June 15-18, 2013, San Francisco, USA. – Mode of access: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/endo-meetings.2013.NRSHA.5.SAT-374>. – Date of access: 13.10.2015.

13. Mutant form of CYP7B1 Arg486Cys: purification and substrate specificity / A.V. Yantsevich, Y.V. Dichenko, A.A. Gilep, S.A. Usanov, N.V. Strushkevich // FEBS Congress 2013 “Mechanisms in Biology”, St. Petersburg, Russia, July 6-11, 2013. / Wiley Blackwell ; ed. board: R. Perham [et al.]. – St. Petersburg, 2013. – P. 422.

14. Dichenko, Y.V. Alteration in conformational stability of CYP7B1 ARG486CYS mutant is a reason of neurodegenerative disorder / Y.V. Dichenko, A.V. Yantsevich, S.A. Usanov // The 57th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural Sciences Open Readings 2014, Vilnius, Lithuania, March 19-21, 2014. / Vilnius University ; ed. board: J. Berzins [et al.]. – Vilnius, 2014. – P. 171.

15. Molecular modeling of human oxysterol 7 α -hydroxylase complexes with ligands / Y.V. Dichenko, A.V. Yantsevich, N.V. Strushkevich, A.A. Gilep, S.A. Usanov // Sviridov Readings 2015 : 7th International Conference On Chemistry And Chemical

Education, Minsk, Belarus, April 7-11, 2015. / Krasico-Print ; ed. board: T.N. Vorobyova, E.I. Vasilevskaya. – Minsk, 2015. – P. 129.

Материалы конференций

16. Диченко, Я.В. Скрининг ингибиторов стероид-7 α -гидроксилаз человека / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, А.С. Дворников // «Сахаровские чтения 2011 года: экологические проблемы XXI века» : материалы 11-й Междунар. науч. конф., Минск, Республика Беларусь, 19–20 мая 2011 г. / МГЭУ им. А. Д. Сахарова ; редкол.: С. П. Кундас [и др.]. – Минск, 2011. – С. 95.

17. Диченко, Я.В. Взаимодействие цитохрома P450 7B1 с замещенными производными имидазола и триазола / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, С.А. Усанов // IV Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул» : материалы IV Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. акад. А.А. Ахрема, Минск, Республика Беларусь, 17-19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2012. – С. 63-64.

18. Получение высокоочищенного рекомбинантного цитохрома P450 39A1 и характеристика его функциональных свойств / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, Е.П. Шодор, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // IV Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул» : материалы IV Междунар. науч. конф., посвящ. 100-летию со дня рожд. акад. А.А. Ахрема, Минск, Республика Беларусь, 17-19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2012. – С. 65.

19. Диченко, Я.В. Получение и структурно-функциональная характеристика мутантной формы CYP7B1 человека R486C / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, С.А. Усанов // VI Российский симпозиум «Белки и пептиды» : материалы симпозиума, Уфа, Республика Башкортостан, 11–15 июня 2013 г. / ИСЭИ УНЦ РАН ; редкол.: В.Т. Иванов [и др.]. – Уфа, 2013. – С. 263.

20. Диченко, Я.В. Влияние аминокислотной замены Arg486Cys на топологические особенности активного центра цитохрома P450 7B1 / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, С.А. Усанов // V Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул» : материалы V Междунар. науч. конф., посвящ. 40-летию Института биоорг. химии и 85-летию Нац. акад. наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, 4-6 июня 2014 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси ; редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 67-68.

21. Диченко, Я.В. Молекулярное моделирование и анализ структурно-функциональных особенностей цитохрома P450 39A1 / Я.В. Диченко // XVI Республиканская научно-практическая конференция молодых ученых : сб.

материалов, Брест, Республика Беларусь, 16 мая 2014 г. / Брестский государственный университет им. А.С. Пушкина ; под общ. ред. В.В. Здановича. – Брест, 2014. – С. 45-46.

22. Каталитические особенности и структурно-функциональная характеристика цитохрома P450 39A1 человека / Я.В. Диченко, А.В. Янцевич, А.А. Гилеп, Н.В. Струшкевич, С.А. Усанов // VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» : материалы симпозиума, Новосибирск, Россия, 12–17 июля 2015 г. / ИХБФМ СО РАН; редкол.: В.В. Власов [и др.]. – Новосибирск, 2015. – С. 262.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A.V. Yanchevich', is located in the bottom right corner of the page. The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

Диченко Ярослав Владимирович

Физико-химическая характеристика и каталитические свойства рекомбинантных стероид 7 α -гидроксилаз человека

Ключевые слова: цитохром P450, CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1, нейростероиды, азолы, спастическая параплегия, структура, константы Штерна-Фольмера, компьютерное моделирование.

Цель работы: установление структурно-функциональных характеристик стероид 7 α -гидроксилаз человека для выяснения причин возникновения наследственных патологий на молекулярном уровне.

Методы исследования: спектрофотометрическое титрование, спектроскопия поглощения в видимой области, флуоресцентная спектроскопия, масс-спектрометрия, методы энзимологии, электрофорез в полиакриламидном геле, ВЭЖХ, молекулярная динамика, молекулярный докинг.

Результаты работы и их новизна: с использованием технологии рекомбинантных ДНК получены высокоочищенные гомогенные препараты рекомбинантных ферментов человека CYP39A1, CYP7B1 и его мутантной формы с аминокислотной заменой Arg486Cys. Проведен скрининг лигандов активного центра стероид 7 α -гидроксилаз. Построены компьютерные модели пространственной структуры CYP39A1, CYP7B1, а также его мутантных форм, что позволило установить структурные особенности ферментов и объяснить наблюдаемые *in vitro* данные. Впервые показано, что причиной возникновения спастической параплегии типа 5 в результате точечных мутаций CYP7B1 Gly57Arg, Phe216Ser и Arg486Cys является синтез неактивной формы фермента в первых двух случаях и существенное изменение каталитической активности оксистерин 7 α -гидроксилазы по отношению к нейростероидам в третьем случае.

Рекомендации по использованию: результаты работы могут быть использованы для проведения скрининговых исследований субстратной специфичности стероид 7 α -гидроксилаз *in vitro*. Полученные данные представляют интерес с точки зрения оценки влияния азолсодержащих лекарственных препаратов на метаболизм желчных кислот и нейростероидов. Результаты работы внедрены в учебный процесс на кафедре биохимии Биологического факультета БГУ. Разработанная программа может использоваться для получения информации о плотности распределения атомов белка в пространстве.

РЭЗІЮМЭ

Дзічэнка Яраслаў Уладзіміравіч

Фізіка-хімічная характэрыстыка і каталітычныя ўласцівасці рэкамбінантных стэроід 7 α -гідраксілаз чалавека

Ключавыя словы: цытахром P450, CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1, нейрастэроіды, азолы, спастычная параплегія, структура, канстанты Штэрна-Фольмера, камп'ютарнае мадэляванне.

Мэта даследавання: вызначэнне структурна-функцыянальных характарыстык стэроід 7 α -гідраксілаз чалавека для тлумачэння прычын узнікнення генетычных хвароб на малекулярным узроўні.

Метады даследавання: спектрафатаметрычнае цітраванне, спектраскапія паглынання ў бачнай вобласці, флуарэсцэнтная спектраскапія, мас-спектраметрыя, метады энзімалогіі, электрафарэз у поліакрыламідным гелі, ВЭВХ, малекулярная дынаміка, малекулярны докінг.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: з выкарыстаннем тэхналогіі рэкамбінантных ДНК атрыманы высокавычышчаныя гамагенныя прэпараты рэкамбінантных ферментаў чалавека CYP39A1, CYP7B1 і яго мутантавай формы з амінакіслотнай заменай Arg486Cys. Праведзены аналіз лігандаў актыўнага цэнтра стэроід 7 α -гідраксілаз. Пабудаваны камп'ютарныя мадэлі прасторавай структуры CYP39A1, CYP7B1, а таксама яго мутантвых формаў, што дазволіла вызначыць структурныя асаблівасці ферментаў і растлумачыць дадзеныя, што назіраюцца *in vitro*. Упершыню паказана, што прычынай узнікнення спастычнай параплегіі тыпу 5 у выніку кропкавых мутацый CYP7B1 Gly57Arg, Phe216Ser і Arg486Cys з'яўляецца сінтэз неактыўнай формы фермента ў першых двух выпадках і істотнае змяненне каталітычнай актыўнасці оксістэрын 7 α -гідраксілазы ў дачыненні да нейрастэроідаў у трэцім выпадку.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: вынікі доследу могуць быць выкарыстаны для правядзення скрынінгавых даследаванняў субстратнай спецыфічнасці стэроід 7 α -гідраксілаз *in vitro*. Атрыманыя дадзеныя ўяўляюць цікавасць з пункту гледжання ацэнкі ўплыву лекавых сродкаў, якія змяшчаюць азолы, на метабалізм жоўцевых кіслот і нейрастэроідаў. Вынікі доследу ўкаранёныя ў навучальны працэс на кафедры біяхіміі біялагічнага факультэта БДУ. Распрацаваная камп'ютарная праграма можа выкарыстоўвацца дзеля атрымання інфармацыі аб шчыльнасці размеркавання атамаў бялка ў прасторы.

SUMMARY

Dzichenka Yaraslau Uladzimiravich

Physical-chemical characterization and catalytic properties of human sterol 7 α -hydroxylases

Keywords: cytochrome P450, CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1, neurosteroids, azoles, spastic paraplegia, structure, Stern-Volmer constants, computer modeling.

Aim of the work: acquisition of structural and functional characteristics of human sterol 7 α -hydroxylases for identification of molecular basis of the congenital defects.

Methods of the research: spectrophotometric titration, visible region absorbance spectroscopy, fluorescence spectroscopy, mass-spectroscopy, methods of enzymology, electrophoresis in polyacrylamide gel, HPLC, molecular dynamics, molecular docking.

Results and their novelty: using recombinant DNA technology, highly purified recombinant human enzymes CYP39A1, CYP7B1 and its mutant form with Arg486Cys amino acid substitution were obtained. Screening of active site ligands of sterol 7 α -hydroxylases was performed. Spatial computer models of CYP39A1, CYP7B1, and its mutant forms were created that allowed establishing the structural characteristics of the enzymes and explaining of the *in vitro* data. It was shown for the first time that synthesis of inactive enzyme form in case of CYP7B1 point mutations Gly57Arg and Phe216Ser, and essential changes in catalytic activity of oxysterol 7 α -hydroxylase toward neurosteroids in case of Arg486Cys point mutation, are molecular reasons of type 5 spastic paraplegia.

Application guidelines: the results can be used for *in vitro* screening of sterol 7 α -hydroxylases substrate specificity. The data obtained are of interest for evaluation of the impact ofazole-containing drugs on the metabolism of bile acids and neurosteroids. The results are used in special course at the biochemistry department of the Biological Faculty of the BSU. The program developed can be used for obtaining results about protein atoms density distribution in space.