

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 577.112.083+577.151.04

СЕРГЕЕВ
ГЕННАДИЙ ВАЛЕРЬЕВИЧ

РОЛЬ ДОМЕНОВ ЦИТОХРОМА b_5 ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С
ФЕРМЕНТАМИ СТЕРОИДОГЕННЫХ СИСТЕМ

АВТОРЕФЕРАТ
диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2015

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии государственного научного учреждения «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: **Усанов Сергей Александрович**,
доктор химических наук, профессор,
чл.-корр. НАН Беларуси, директор
Института биоорганической химии НАН
Беларуси

Официальные оппоненты: **Шкуматов Владимир Макарович**,
доктор биологических наук, профессор,
чл.-корр. НАН Беларуси, заведующий
научно-исследовательской лабораторией
физико-химических проблем
Белгосуниверситета

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

Оппонирующая организация: Белорусский государственный
технологический университет

Защита состоится «05» ноября 2015 г. в 10.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 при Институте биоорганической химии НАН Беларуси по адресу: 220141 г. Минск, ул. акад. Купревича, 5/2, e-mail: babitskaya@iboch.bas-net.by, тел.: +375(17)2678553.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан «30» сентября 2015 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций

 С.В. Бабицкая

Введение

Цитохромы P450 – суперсемейство ферментов, относящихся к классу гемопротеидов и обладающих монооксигеназной активностью. Они катализируют реакции окисления ксенобиотиков и жирных кислот, гидроксирования стероидов и витаминов, биосинтеза простагландинов и ряд других реакций. Данные ферменты обнаружены у представителей всех царств живых организмов. Учитывая их физиологическую значимость, особое внимание уделяется механизмам регуляции активности цитохромов P450, которая зависит не только от условий реакционной среды, типа субстрата и изоформы самого фермента, но и от активности редокс-партнеров – белков, участвующих в переносе электронов на цитохром P450.

Цитохром P450 3A4 (CYP3A4) - один из важнейших ферментов печени, участвующий в метаболизме ксенобиотиков и ряда эндогенных веществ, таких как стероидные гормоны (кортизол, тестостерон, 17β -эстрадиол и прогестерон). Данный фермент обладает широкой субстратной специфичностью и гидроксилирует большинство известных лекарственных средств. Активность CYP3A4 во многом определяет индивидуальный уровень метаболизма лекарственных веществ у человека и находится под многоуровневым контролем. В этой связи, актуальной является задача изучения механизмов регулирования активности CYP3A4 как на уровне взаимодействия с субстратом, так и на уровне взаимодействия с белками-партнерами.

Цитохром P450 17A1 (CYP17) - ключевой фермент биосинтеза стероидных гормонов в надпочечниках и половых клетках. Данный фермент катализирует две последовательные реакции: 17α -гидроксирование прегненолона (P5) и прогестерона (P4) (первые стадии синтеза глюкокортикоидов) и последующее расщепление боковой цепи между атомами C17 и C20, превращая 17α -гидроксистероиды в дегидроэпиандростерон и андростендион (путь биосинтеза половых гормонов). У человека CYP17 является определяющим регулятором того типа стероидов, который должен образовываться в клетках. Нарушение функций CYP17 приводит к гипокалиемии, артериальной гипертензии и задержке полового развития.

В регуляции активности CYP3A4 и CYP17 важную роль играет небольшой отрицательно заряженный гемопротеид – цитохром b_5 . Данный белок может как стимулировать, так и ингибировать активность цитохромов P450. Для объяснения механизма действия цитохрома b_5 есть несколько теорий, основанных как на его непосредственном участии в процессах переноса электронов, так и аллостерической регуляции активности цитохромов P450.

Особенности структуры цитохрома b_5 определяют его функциональную активность в клетках млекопитающих. Микросомальная изоформа цитохрома b_5 при альтернативном сплайсинге мРНК может синтезироваться в виде

полноразмерного (134 аминокислотных остатка (а.о.)) цитохрома b_5 , локализованного в мембранах ЭПР (Mc b_5) или «растворимого» b_5 , состоящего лишь из 98-аминокислотного N-концевого гидрофильного домена. Существует еще одна изоформа цитохрома b_5 , которая кодируется другим геном и локализована во внешней мембране митохондрий (Om b_5). Цитохромы Mc b_5 и Om b_5 имеют общую доменную организацию и 50% гомологию аминокислотного состава, однако функции Om b_5 в регуляции активности цитохромов P450 до конца не выяснены.

В настоящей работе, используя сходство доменной структуры двух изоформ цитохрома b_5 и их различия в аминокислотных последовательностях, создан ряд мутантных белков с целью изучения роли структурных доменов b_5 в регуляции активности CYP3A4 и CYP17.

Общая характеристика работы

Связь работы с крупными научными программами, темами. Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 г. № 585): «2.2 Биологически активные синтетические и природные соединения, биополимеры, биорегуляторы, аминокислоты и их производные, наноструктурированные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты»; «2.7 Новые лекарственные средства и биокорректоры различных заболеваний, фармацевтические субстанции, современные диагностические тест-системы, технологии их производства, оценки качества и безопасности»; «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».

Диссертационная работа выполнялась в рамках задания 2.09 «Генно-инженерные подходы к изучению цитохром P450-зависимых систем биосинтеза стероидных гормонов и трансформации ксенобиотиков, получение рекомбинантных белков и штаммов для их практического применения» (№ госрегистрации 20061541, 2006-2010 годы) ГПОФИ «Физиологически активные вещества», задания 2.01 «Біяінжынерыя і структурная арганізацыя кампанентаў цытахром Р-450 залежных манааксігеназных сістэм біясінтэзу і трансфармацыі стэроідных гармонаў» (№ госрегистрации 20012624, 2001-2005 годы) ГПОФИ «Накіраваны сінтэз, мадыфікацыя, даследаванне структуры, уласцівасцей і функцыі біямалекул, другіх арганічных злучэнняў з заданымі ўласцівасцямі», задания Д10 «Разработка и освоение технологии производства препаратов высокоэффективных термостабильных ДНК полимераз» (№ госрегистрации 20102229, 2010-2012годы) подпрограммы «Диагностикумы» Государственной программы по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций,

готовых лекарственных и диагностических средств в Республике Беларусь на 2010-2014 годы и на период до 2020 года, гранта БРФФИ Б04М-103 «Влияние цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий на ферменты стероидогенных систем» (№ госрегистрации 20042459, 2004-2006 годы), гранта БРФФИ Х06М-114 «Конструирование и гетерологическая экспрессия в *E. coli* сшитого электрон-транспортного комплекса NADH-цитохром b_5 редуктазы и цитохрома b_5 » (№ госрегистрации 20064278, 2006-2008 годы).

Цель и задачи исследования. Цель исследования – разработать комплексный подход к экспрессии в бактериальных системах Ом цитохромов b_5 , получить и охарактеризовать полноразмерные и мутантные Ом цитохромы b_5 , определить вклад структурных доменов цитохрома b_5 во взаимодействие с белковыми редокс-партнерами и регуляцию активности СYP3A4 и СYP17.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

1. разработать эффективную систему гетерологической экспрессии в *E. coli* рекомбинантных Ом цитохромов b_5 ;
2. получить гомогенные препараты Мс и Ом цитохромов b_5 *R. norvegicus* и их мутантных форм, последовательность которых состоит из гидрофильного домена одной изоформы и гидрофобного домена второй. Получить гомогенный препарат Ом цитохрома b_5 *H. sapiens*;
3. сравнить физико-химические свойства полноразмерных и мутантных Ом цитохромов b_5 со свойствами Мс цитохрома b_5 *R. norvegicus*;
4. оценить способность к восстановлению полноразмерных и мутантных Ом цитохромов b_5 NADPH-цитохром P450 редуктазой, NADPH-адрендоксин редуктазой и NADH-цитохром b_5 редуктазой;
5. установить роль структурных доменов цитохрома b_5 во взаимодействии и регуляции активности СYP3A4 и СYP17.

Научная новизна.

Разработана универсальная методика гетерологической экспрессии и очистки различных рекомбинантных форм цитохрома b_5 . Впервые определена *in vitro* каталитическая активность цитохромов СYP3A4 и СYP17 в присутствии полноразмерных форм Ом b_5 *H. sapiens* и Ом b_5 *R. norvegicus*. Для выяснения роли доменов цитохрома b_5 в регуляции каталитической активности цитохромов P450 впервые применен подход с использованием химерных цитохромов b_5 , содержащих гетерологичные гидрофильные или гидрофобные домены изоформ b_5 . Показана возможность восстановления полноразмерных Ом b_5 и химерных цитохромов b_5 NADPH-цитохром P450 редуктазой, NADPH-адрендоксин редуктазой и NADH-цитохром b_5 редуктазой.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Новый комплексный метод гетерологической экспрессии и очистки рекомбинантных Ом цитохромов b_5 , заключающийся в конструировании

векторной системы (вектор pT7 и штамм *E. coli* BL21), оптимизации условий синтеза белка и разработке процедуры выделения рекомбинантных гемопротеидов с использованием металло-аффинной и адсорбционной хроматографии, включая стадию реконструкции холоформы гемопротеида из апобелка.

2. Конструирование векторных систем для эффективной гетерологической экспрессии и получения химерных белков Mc b_5 –Om b_5 , Om b_5 –Mc b_5 и полноразмерного Om b_5 *H. sapiens*. Доказательство принадлежности гемопротеидов Mc b_5 –Om b_5 и Om b_5 –Mc b_5 к b_5 -типу гемопротеидов и демонстрация их способности восстанавливаться NADPH-цитохром P450 редуктазой.

3. Установление зависимости между природой гидрофильного домена химерного цитохрома b_5 и эффективностью его восстановления редуктазами.

4. Доказательство роли структурных доменов цитохрома b_5 во взаимодействии с CYP17 и CYP3A4 и регуляции их ферментативной активности: эффективность взаимодействия и степень стимуляции активности определяется пластичностью гидрофильного домена цитохрома b_5 .

5. Получение нового препарата ферментного - смесь термостабильных ДНК полимераз TP-mix polymerases TУ ВУ 100185093.067-2013, как инструмента для клонирования и сайт-направленного мутагенеза белков с измененной доменной организацией.

Личный вклад соискателя. Разработка векторных систем для экспрессии цитохромов Om b_5 и химерных цитохромов b_5 , их выделение, очистка, анализ физико-химических свойств и взаимодействие с редуктазами выполнены автором самостоятельно. Проведение сайт-направленного мутагенеза и создание препарата ферментного TP-mix polymerases, организацию клинических испытаний автор проводил самостоятельно, написание опытно-промышленного регламента и технических условий было осуществлено при участии к.х.н. Василевской А.В., к.х.н. Гилепа А.А., ведущего инженера по стандартизации УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» Замуловой Р.М. Исследование продуктов ферментативной активности цитохромов CYP17 и CYP3A4 проводилось при участии н.с. Грабовец И.П. Регистрация MALDI-TOF масс-спектров белков осуществлялась при участии м.н.с. Карпенко Т.А. Планирование работы и обсуждение результатов проводилось совместно с научным руководителем чл.-корр., д.х.н., проф. Усановым С.А. и к.х.н. Гилепом А.А.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Материалы диссертационной работы представлены на Международных научных конференциях «Молодежь в науке» (Минск, 2003 и 2004), на I-ой, II-ой и III-ей Международных конференциях «Химия, структура и функции биомолекул» (Минск, 2004, 2006 и 2008), 13-ой Международной

конференции «Cytochromes P450 – Biochemistry, Biophysics and Drug Metabolism» (Prague, 2003), 14-ой Международной конференции «Cytochromes P450 – Biochemistry, Biophysics and Bioinformatics» (Dallas, 2005), 16-ой Международной конференции «Microsomes and Drug Oxidation» (Budapest, 2006), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика инфекционных болезней» (Минск, 2007).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 8 статей в научных журналах (5,8 авторских листа), 3 статьи в сборниках научных трудов, тезисы 7 докладов и 1 нормативный документ Республики Беларусь. Общий объем опубликованных материалов составляет 8,0 авторских листов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, списка литературы и шести приложений. В первой главе приводится аналитический обзор литературы, во второй главе – описание материалов и методов исследования, в третьей главе представлены результаты исследования и обсуждение полученных данных. Работа изложена на 184 страницах машинописного текста, содержит 49 рисунков, 15 таблиц. Список литературы состоит из 194 источников (включающий 175 цитируемых источников и 19 публикаций соискателя).

Основное содержание работы

В **первой главе** приведен обзор литературы по структуре, физико-химическим свойствам и функциональной активности b_5 в клетке. Основной акцент сделан на роли b_5 в регуляции активности цитохромов P450 посредством его взаимодействия с гемопротейдами. Приведены общие сведения о суперсемействе цитохромов P450, каталитическом цикле реакций, в результате которых происходит окисление химических соединений. Дана подробная характеристика CYP17 и CYP3A4 – важнейших белков метаболизма стероидных гормонов у человека. На основании литературных данных выявлены нерешенные проблемы, определившие цели и задачи диссертационного исследования.

Во **второй главе** описаны реактивы, оборудование и методы, которые были использованы при проведении диссертационного исследования. Подробно приведены генно-инженерные подходы для получения b_5 , методология выделения и очистки синтезированных белков, анализа их физико-химических свойств и каталитической активности. Подробно изложена процедура разработки препарата ферментного - смесь термостабильных ДНК полимераз TP-mix polymerases, ГУ ВУ 100185093.067-2013: проведен анализ литературных данных об используемых в современной ПЦР полимеразах и методах по улучшению их функциональных свойств, описана методология выделения, очистки и оценки каталитической активности TP-mix polymerases.

В третьей главе приводятся основные экспериментальные данные, их анализ и обсуждение.

Разработка бактериальной векторной системы для экспрессии Om b_5 *R. norvegicus*. Для синтеза Om b_5 была выбрана бактериальная система клеток *E. coli* DH5 α , несущих плазмиду pCWori+ om b_5 HT. Данная плазида содержит кДНК полноразмерного Om b_5 под контролем двойного *tac* промотора. Подобная система эффективно применялась при экспрессии Mc b_5 *R. norvegicus*. Результаты экспрессии показали крайне низкий уровень синтеза Om b_5 (не более 100 нмоль на 1 литр среды). При сопоставлении аминокислотных последовательностей обеих изоформ видно, что больший размер Om b_5 обусловлен более протяженным гидрофильным доменом. Данная особенность может препятствовать синтезу белка в бактериальных клетках. Поэтому были созданы две векторные конструкции - pCWori+ b_5 om2 HT и pCWori+ b_5 om3 HT, несущие кДНК, кодирующие Om b_5 с делециями на N-концевой последовательности в 11 и 13 а.о. соответственно. Однако, проведение экспрессии не показало увеличения выхода укороченных Om b_5 .

На следующем этапе кДНК Om цитохрома b_5 переклонировали в pT7 вектор под более сильный T7 промотор. Проведение аналитической экспрессии показало, что общее количество целевого белка спустя 48 ч синтеза составляет 2 мкмоль на 1 литр среды.

Для увеличения выхода рекомбинантного Om b_5 были оптимизированы время инкубации культуры клеток до индукции, температурный и аэрационный режимы, а также метод выделения и очистки белка. Установлено, что оптимальными условиями для экспрессии Om b_5 являются 23°C, 130 об/мин при индукции синтеза белка спустя 4-4,5 ч после начала роста клеток.

Дополнительные остатки гистидина на C-концевой последовательности белка позволяют использовать металло-аффинную хроматографию, что сокращает процесс выделения до одной стадии. Высокий уровень синтеза Om b_5 послужил причиной тому, что до 50% синтезируемого белка оказалось в апоформе. Для получения холоформы Om b_5 , в раствор белка добавляли экзогенный хлорид гема, а для концентрирования Om b_5 и удаления избытка гема белок подвергался дополнительной хроматографии на ГАПе.

Для разрушения клеток использовали гомогенизатор EmulsiFlex; при этом потери белка не превышали 4% (Таблица 1). В качестве солюбилизирующего агента был выбран дезоксихолат Na, поскольку он обеспечивает 70%-ый выход белка (Таблица 1), не ингибирует активность цитохромов P450 и его можно удалить диализом в процессе выделения белка.

В результате проведенной работы удалось осуществить эффективную экспрессию Om b_5 *R. norvegicus* (до 6-8 мкмоль белка на 1 л культуральной среды) и оптимизировать условия синтеза с минимальным содержанием гемопротеида в

тельцах включения. Благодаря применению метода металло-аффинной хроматографии, в чистом виде удалось получить ~ 3 мкмоль (~57 мг) белка, что достаточно для проведения комплекса запланированных исследований.

Таблица 1. - Эффективность выделения Om цитохрома b_5 на различных стадиях

	Стадия выделения белка				
	Клетки после экспрессии	Клетки после разрушения	Солюбилизация	Очистка на Ni-NTA-агарозе	Конечный препарат белка
Общее количество белка, мкмоль	3,65 ^{*)}	3,5 ^{*)}	2,5 ^{*)}	2,5 ^{*)}	3,33
* - не учитывается белок, находящийся в апоформе					

Разработка векторных конструкций для экспрессии химерных белков Om b_5 -Mc b_5 и Mc b_5 -Om b_5 . В структуре цитохрома b_5 выделяют два домена: N-концевой гидрофильный и C-концевой гидрофобный. Между двумя доменами находится связующая область длиной около семи аминокислотных остатков. Считается, что у Mc b_5 гидрофильный домен состоит из 98 а.о., а гидрофобный домен - из остатков аминокислот с 106 по 134. Присутствие в клетке Om b_5 , который имеет одинаковую доменную организацию с Mc b_5 , привело нас к мысли о создании химерных белков, у которых домен одной изоформы заменен доменом другой изоформы. При этом сохраняется третичная структура b_5 и реконструкция активности цитохромов P450 в присутствии немодифицированных и химерных b_5 позволяет идентифицировать те структурные области у b_5 , которые ответственны за регуляцию цитохромов P450. Точкой обмена доменами в аминокислотной последовательности Mc b_5 выбраны два остатка серина – 107 и 108, находящиеся на границе двух доменов белка. У Om b_5 в качестве точки обмена доменами использовали два остатка серина (117 и 118) на N-концевой последовательности гидрофобного домена. В данные области сайт-направленным мутагенезом вводился *XhoI* сайт. Для создания химер полученные нуклеотидные конструкции обрабатывали рестриктазами и проводили процедуры: 1. лигирование фрагмента, содержащего C-концевую последовательность Mc b_5 с фрагментом, содержащим N-концевую область Om b_5 и 2. лигирование фрагмента, содержащего C-концевую область Om b_5 с фрагментом, содержащим N-концевую область Mc b_5 (Рисунки 1, 2). После процедуры лигирования, полученные векторные конструкции были переклонированы в рТ7 вектор по сайтам рестрикции *NdeI/Sall*. Уровень экспрессии Om b_5 -Mc b_5 и Mc b_5 -Om b_5 составил до 6 мкмоль на 1 литр культуральной среды.

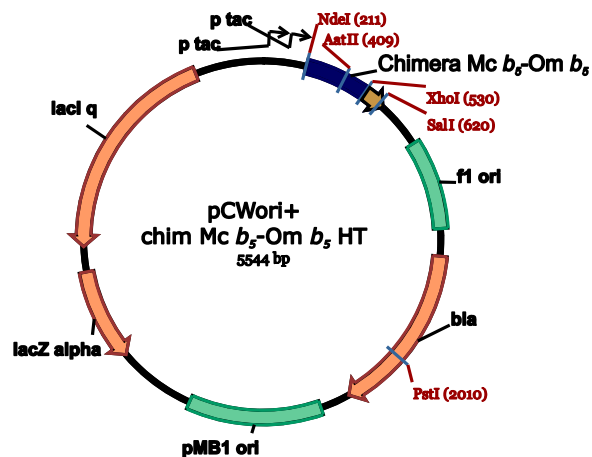
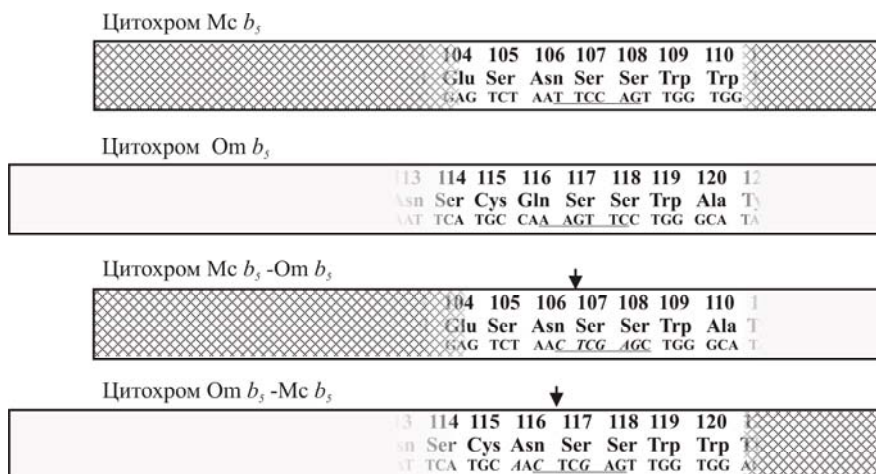


Рисунок 1. – Векторная конструкция pCWori+chim Mc b_5 -Om b_5 HT, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок Mc b_5 -Om b_5



Подчеркиванием обозначена область ввода сайта *XhoI*. Курсивом выделены нуклеотидные замены, введенные мутагенезом. Стрелкой обозначено место обмена доменами между изоформами $b_5 R. norvegicus$

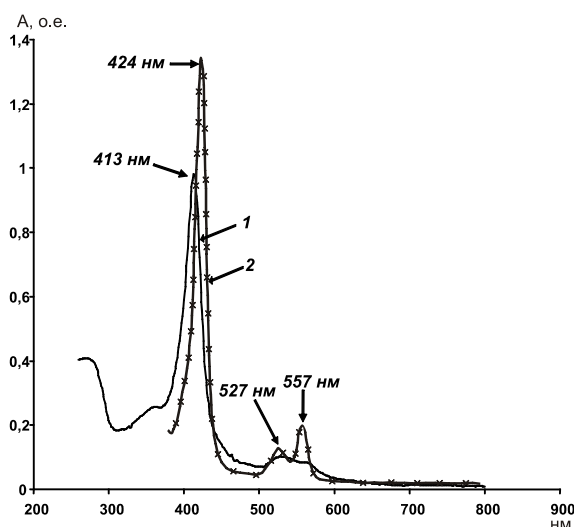
Рисунок 2. - Схематическое изображение последовательностей Mc b_5 и Om $b_5 R. norvegicus$, и созданных на их основе химерных белков - Mc b_5 – Om b_5 и Om b_5 – Mc b_5

Молекулярное клонирование Om $b_5 H. sapiens$ и создание векторной системы для его экспрессии в клетках *E. coli*. Последовательность, кодирующая Om $b_5 H. sapiens$ (ген *CYB5B*) расположена на 16 хромосоме (16q22.1). Анализ последовательностей мРНК выявил, что в одних случаях Om $b_5 H. sapiens$ состоит из 146 аминокислот, а в других – из 150. Разница обусловлена точкой начала трансляции белка: Met1 (150 а.о.) или Met5 (146 а.о.), причем в

литературе упоминаются обе формы белка. При подборе праймеров первым кодоном был выбран Met5 по аналогии с Om b_5 *R. norvegicus*, длина которого составляет 146 аминокислот.

На промежуточном этапе получения экспрессионного вектора было обнаружено, что секвенирование кДНК ряда клонов демонстрирует только 84% гомологии с мРНК, кодирующей Om b_5 *H. sapiens*. Использование программы BLAST NCBI показало, что последовательность кДНК данных клонов на 100% гомологична последовательности участка 15 хромосомы *H. sapiens* (NT_010194, Region: 17910260..17910720). Трансляция данного участка останавливается на 23 аминокислоте. Объяснение факта наличия в 15 хромосоме последовательности, высоко гомологичной с кДНК Om b_5 *H. sapiens* в литературе отсутствует. Клоны, содержащие кДНК Om b_5 *H. sapiens*, были использованы для лигирования данной последовательности в вектор pT7 и создания на его основе векторной системы, состоящей из клеток *E. coli* BL21, несущих конструкцию pT7 Om b_5 Human NT. Уровень экспрессии Om b_5 *H. sapiens* составил до 7 мкмоль на 1 литр культуральной среды.

Физико-химические характеристики Om цитохромов b_5 и созданных на их основе мутантных белков. При записи электронных спектров поглощения, b_5 в окисленном состоянии демонстрирует пик при 413 нм. Добавление восстанавливающего агента приводит к изменению спектрального профиля белка и появлению пиков поглощения при 424 нм (γ полоса), 527 и 557 нм (β и α полосы). Выделенные белки – Om b_5 *R. norvegicus*, Om b_5 *H. sapiens*, b_5 Om2, b_5 Om3, Om b_5 -Mc b_5 и Mc b_5 -Om b_5 демонстрируют идентичные спектры поглощения как в окисленном, так и в восстановленном состоянии (Рисунок 3). Укороченные формы - b_5 Om2 и b_5 Om3 - характеризуются повышенным соотношением A_{413}/A_{280} , равным 2,7-2,9.

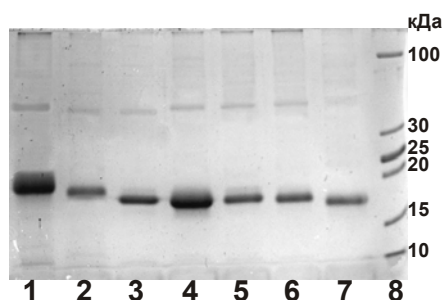


1 – окисленная форма белка; 2 – восстановленная форма белка

Рисунок 3. – Спектры поглощения препарата Om b_5 *R. norvegicus*

Все используемые в работе b_5 способны восстанавливать NADPH-цитохром P450 редуктазой (CPR).

Гомогенность выделенных препаратов b_5 подтверждается электрофорезом в денатурирующих условиях (Рисунок 4). Помимо полосы, соответствующей по массе мономерному белку, на электрофорезе детектируется слабая полоса димера/тетрамера b_5 . Полученные данные были подтверждены MALDI-TOF масс-спектрами, на которых детектируется как мономерный белок, так и его олигомерные комплексы.



1 – Ом b_5 *H. sapiens*, 2 – Ом b_5 *R. norvegicus*, 3- Ом b_5 – Мс b_5 , 4- Мс b_5 – Ом b_5 , 5- b_5 Ом2, 6- b_5 Ом3, 7- Мс b_5 *R. norvegicus*, 8- маркеры молекулярного веса

Рисунок 4. – Электрофорез препаратов b_5 в 15% ПААГ при денатурирующих условиях

Анализ спектров кругового дихроизма показал, что для Ом b_5 характерно меньшее, по сравнению с Мс b_5 , содержание α -спиралей, но повышенное содержание β -складчатой структуры. Мс b_5 обладает бóльшим пиком отрицательной эллиптичности при 413 нм, чем Ом b_5 , что говорит о значимой разнице в окружении гема у разных изоформ b_5 . У обоих мутантов Ом b_5 меняется соотношение вторичных структур по сравнению с полноразмерной формой, что свидетельствует об изменениях в трехмерной структуре данных мутантов.

Иммуноблоттинг в присутствии антител против Мс b_5 показал, что Ом b_5 и его мутанты реагируют с поликлональными антителами против Мс b_5 , тем самым подтверждая наличие общих антигенных детерминант у двух изоформ b_5 .

Обработка Мс b_5 трипсином приводит к отщеплению мембран-связывающего домена с образованием фрагментов с массой 11 и 5 кДа, что согласуется с мембранной организацией этого белка. В то же время Ом b_5 расщепляется по нескольким сайтам, образуя, как минимум, 5 полос, видимых в 12% ПААГ. На основе белковых стандартов показано, что массы двух фрагментов находятся в пределах 16,5-17 кДа, а массы трех фрагментов – в пределах 10-15,5 кДа. Результаты ограниченного трипсинолиза отчетливо свидетельствуют о значительных отличиях в трехмерной структуре Мс и Ом форм b_5 .

При взаимодействии иммобилизованных Мс и Ом цитохромов b_5 с CPR, нами обнаружено, что при низкой ионной силе в отсутствие детергента CPR не

способна связываться с изоформами b_5 , что указывает на незначительный вклад электростатических контактов между белками. Вместе с тем, при более высокой ионной силе (0,3 М NaCl) в отсутствие детергента Mc b_5 образует устойчивый комплекс с CPR, диссоциация которого происходит только после введения в систему детергента, что указывает на участие гидрофобных контактов в образовании комплекса. Имобилизованный Om b_5 , как и его мутанты b_5 Om2 и b_5 Om3, не образуют комплекс с CPR даже при высокой ионной силе.

Восстановление изоформ b_5 NADPH-цитохром P450-редуктазой. Обе изоформы b_5 способны аутоокисляться в присутствии кислорода воздуха, поэтому восстановление цитохромов b_5 CPR проводили под током аргона. Повышение ионной силы приводит к увеличению в 13 раз скорости восстановления Mc b_5 и в 30 раз Om b_5 (Таблица 2). Введение в систему NaCl экранирует отрицательные заряды на поверхности у b_5 и CPR, что способствует их гидрофобному взаимодействию и, соответственно, увеличивается скорость реакции восстановления.

Таблица 2. - Скорость восстановления (нмоль b_5 /мин/нмоль CPR) NADPH-цитохром P450 редуктазой двух изоформ b_5 в различных условиях при пониженном содержании растворенного кислорода

Белок	Контроль	В присутствии 0,3М NaCl	В % к контролю	В присутствии 0,1% Triton X100	В % к контролю
Mc b_5	11,40±0,49	156,80±3,89	1380	4,50±0,28	40
Om b_5	0,60±0,06	18,10±1,13	3000	1,35±0,04	225

Как показано нами, Mc b_5 восстанавливается CPR в несколько раз эффективнее, чем Om b_5 . Это, по-видимому, обусловлено разницей окислительно-восстановительных потенциалов у изоформ b_5 . CPR энергетически выгоднее отдавать электроны Mc b_5 , потенциал которого равен +20 mV, чем Om b_5 (-100 mV).

При высокой ионной силе Om b_5 намного эффективнее восстанавливается CPR. И здесь определяющую роль играют гидрофобные контакты. С другой стороны, введение в систему детергента не столь драматично сказывается на скорости восстановления Om b_5 по сравнению с Mc b_5 . По-видимому, детергент снижает количество олигомерных комплексов из молекул Om b_5 , тем самым повышая доступность последнего для восстановления CPR. Кроме этого, детергент может ослаблять гидрофобные внутримолекулярные контакты в Om b_5 , что способствует взаимодействию Om b_5 и CPR. При этом эффект от увеличения подвижности Om b_5 превышает эффект от разрушения гидрофобных контактов между CPR и Om b_5 .

Восстановление изоформ b_5 NADPH-аденодоксин редуктазой (AdR) и NADH-цитохром b_5 редуктазой. NADH-цитохром b_5 редуктаза восстанавливает Mc b_5 *R. norvegicus* со скоростью 62 нмоль b_5 /мин/нмоль редуктазы. При аналогичных условиях восстановление Om b_5 *R. norvegicus* зафиксировать не удалось. Несколько отрицательно заряженных остатков аминокислот Mc b_5 на поверхности молекулы ответственны за связывание с NADH-цитохром b_5 редуктазой. Аналогичные остатки аминокислот присутствуют и у Om b_5 , поэтому неспособность к восстановлению может быть связана с наличием в N-концевом гидрофильном домене двух гидрофобных сетей из остатков аминокислот, куда также вовлечены ряд боковых групп гема. Данные сети снижают подвижность глобулы Om b_5 и препятствуют эффективному взаимодействию с редуктазой. Однако, когда реакцию восстановления проводили в присутствии 0,3М NaCl, скорость реакции составила 0,97 мин⁻¹ (Таблица 3). Высокая ионная сила должна снижать скорость восстановления цитохромов b_5 редуктазой, что и происходит в случае с мутантами b_5 Om2 и b_5 Om3. В отличие от мутантов, Om b_5 на N-концевой последовательности содержит дополнительный отрицательный остаток, который может связываться с положительно заряженным участком в C-концевой последовательности с образованием димеров белка. Присутствие в системе хлорида натрия приводит к диссоциации олигомерных структур Om b_5 , что повышает доступность последнего для восстановления NADH-цитохром b_5 редуктазой. Введение в систему детергента приводит к увеличению скорости реакции восстановления Om b_5 и его мутантов до 15 мин⁻¹. Это обусловлено как снижением олигомеризации b_5 , так и тем, что образование мицелл способствует лучшему взаимодействию NADH-цитохром b_5 редуктазы и b_5 .

Таблица 3. - Скорость восстановления Om b_5 и его мутантов (мин⁻¹) NADH-цитохром b_5 редуктазой в различных условиях

Белок			
	Контроль	В присутствии 0,3М NaCl	В присутствии 0,1% Triton X100
Om b_5	0	0,97±0,06	15,60±1,58
b_5 Om2	0,96±0,07	0,20±0,08	11,90±3,04
b_5 Om3	0,80±0,12	0,55±0,17	15,10±1,41

Mc b_5 почти в 25 раз более эффективно восстанавливается AdR, чем Om b_5 (Таблица 4). Добавление в систему NaCl ожидаемо снижает скорость восстановления b_5 на 95-100%, что говорит о важной роли электростатических взаимодействий между AdR и b_5 . То, что введение в систему неионного детергента не влияет на скорость восстановления b_5 , можно объяснить тем, что

AdR не является мембранным белком, перенос электронов происходит в растворе и для взаимной ориентации редокс-партнеров не требуется наличия мицелл.

Таблица 4. - Скорость восстановления (min^{-1}) изоформ b_5 NADPH-аденодоксин редуктазой в различных условиях

Белок			
	Контроль	В присутствии 0,3М NaCl	В присутствии 0,1% Triton X100
Mc b_5	17,6±1,4	0,69±0,06	17,6±1,02
Om b_5	0,72±0,05	0	0,7±0,09

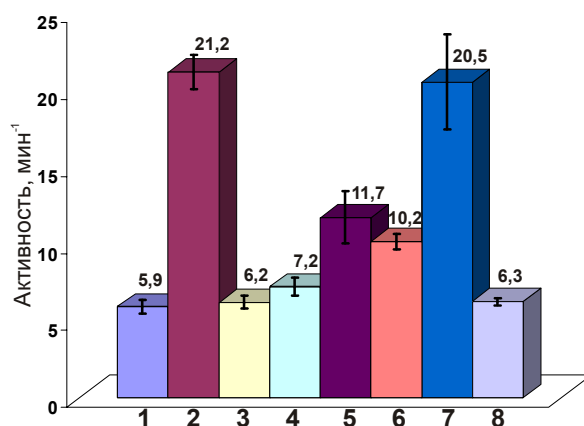
Взаимодействие изоформ b_5 с СУР3А4. Взаимодействие b_5 с СУР3А4 приводит к переходу железа гема последнего из низко- в высокоспиновое состояние. Наименьшее значение константы диссоциации (Таблица 5) наблюдается при взаимодействии Mc b_5 с СУР3А4. Om b_5 *R. norvegicus* и Om b_5 *H. sapiens* в 100 и 20 раз соответственно менее эффективно взаимодействуют с СУР3А4, чем Mc b_5 *R. norvegicus*. Мутант b_5 Om2 в 9 раз эффективнее взаимодействует с СУР3А4, чем полноразмерный Om b_5 . Различия в длине гидрофильных фрагментов двух изоформ b_5 могут быть одной из причин различных эффекторных свойств данных белков и удаление N-концевых аминокислотных остатков у гидрофильного домена Om b_5 может способствовать взаимодействию белка с СУР3А4.

Значения K_d при титровании СУР3А4 химерными b_5 различаются в 5 раз. Наиболее эффективно изменяет спиновое состояние СУР3А4 химера Mc b_5 – Om b_5 , имеющая гидрофильный домен Mc b_5 . Для химеры Om b_5 -Mc b_5 K_d близка по значению K_d , рассчитанной для полноразмерного Om b_5 .

Таблица 5. - Значения констант диссоциации (K_d) для комплексообразования СУР3А4 с различными формами b_5

Белок	K_d , мкМ	ΔA_{max}
Mc b_5 <i>R. norvegicus</i>	0,13 ± 0,033	0,064
Om b_5 <i>H. sapiens</i>	2,90 ± 0,130	0,045
Om b_5 <i>R. norvegicus</i>	13,9 ± 0,70	0,026
b_5 Om2	1,60 ± 0,20	0,061
Mc b_5 - Om b_5	1,85 ± 0,15	0,054
Om b_5 -Mc b_5	8,7 ± 0,30	0,040

Анализируя эффект различных форм b_5 на активность CYP3A4 следует учитывать, что большинство авторов склоняется к механизму аллостерической регуляции активности CYP3A4. Mc b_5 *R. norvegicus* стимулирует реакцию окисления тестостерона CYP3A4 в 3–3,5 раза (Рисунок 5). В тоже время, Om b_5 (как *R. norvegicus*, так и *H. sapiens*) стимулирует активность CYP3A4 только в 1,1–1,3 раза. Способность стимулировать активность CYP3A4 у мутантов b_5 Om2 и b_5 Om3 возрастает в 2 раза по сравнению с полноразмерной формой. Эти данные согласуются с результатами по титрованию – нарушение целостности гидрофильного домена Om b_5 способствует его большей пластичности при взаимодействии с редокс-партнерами. Химера Mc b_5 –Om b_5 увеличивает тестостерон β -гидроксилазную активность CYP3A4 в 3–4 раза. Несмотря на то, что в состав белка входит гидрофобный домен Om b_5 , уровень активности сопоставим со степенью активации полноразмерным Mc b_5 . Второй химерный белок – Om b_5 -Mc b_5 стимулирует активность CYP3A4 аналогично полноразмерным Om b_5 – в 1,1–1,2 раза.



1- контроль, 2 – Mc b_5 *R. norvegicus*, 3- Om b_5 *R. norvegicus*, 4 – Om b_5 *H. sapiens*, 5 – b_5 Om2, 6 – b_5 Om3, 7 – Mc b_5 -Om b_5 , 8 – Om b_5 -Mc b_5 .

Рисунок 5. – Активность β -гидроксилирования тестостерона CYP3A4 в присутствии различных форм b_5

Примечание – реакцию проводили в 50 мМ Трис-НСI (рН 7,4), содержащем 30 мМ MgCl₂, 150 мкМ тестостерона, 0,25 мкМ CYP3A4, 0,25 мкМ b_5 , 0,5 мкМ CPR, 40 мкг/мл фосфолипидов, 125 мкг/мл CHAPS, 1 мМ NADPH, 8 мМ изоцитрат натрия, 0,1ед/мл изоцитратдегидрогеназы. Время реакции 5 мин, 37°C.

Анализ активности CYP3A4 в присутствии различных форм b_5 позволил сделать вывод о том, что уровень стимулирующего эффекта определяется природой гидрофильного домена в составе химеры. Основываясь на этих данных, можно с определенной степенью уверенности говорить, что происхождение

гидрофобного домена не имеет существенного значения – важно, чтобы гидрофобный фрагмент присутствовал в составе химеры.

Использование метода поверхностного плазмонного резонанса для исследования межмолекулярных взаимодействий между b_5 и белками печени человека. В последнее время для исследования белок-белковых взаимодействий успешно используются оптические биосенсоры, которые позволяют определять кинетические и термодинамические параметры межмолекулярных взаимодействий. Совместно с коллегами НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (Москва, РФ) были определены равновесные константы диссоциации иммобилизованных на биосенсоре Mc b_5 и Om b_5 и цитохромов CYP3A4 и 3A5. Оба цитохрома P450 способны связываться с иммобилизованными b_5 , однако константа диссоциации комплекса Mc b_5 -CYP3A4 в несколько раз меньше константы диссоциации для комплекса Om b_5 -CYP3A4. При проведении электрокаталитического окисления тестостерона с участием CYP3A4 показано, что добавление Mc b_5 в реакционную среду повышает количество комплекса CYP3A4-тестостерон в два раза. Добавление же в систему Om b_5 не изменяет количество комплекса CYP3A4-тестостерон относительно контрольного. При использовании биосенсора с иммобилизованным Mc b_5 *H. sapiens* удалось выявить 98 белков из лизата клеток печени *H. sapiens*, которые могут образовывать комплекс с Mc b_5 . Причем, образование комплекса не обязательно ограничивается взаимодействием Mc b_5 и другого белка печени. Вполне вероятно, такое количество связавшихся белков обусловлено образованием мультибелковых комплексов, когда один белок связывается с другим, а второй с третьим. Полученные результаты позволяют анализировать белок-белковые взаимодействия при нормальном и патологическом состояниях организма, выявлять альтернативные пути регуляции активности ферментов и находить новых белковых партнеров у исследуемых ферментов.

Взаимодействие изоформ цитохрома b_5 с CYP17. При анализе эффектов всех изученных b_5 на активность CYP17 *E. caballus*, *C. porcellus* и *H. sapiens* можно выявить следующие тенденции (Таблица 6): Mc b_5 стимулирует лиазную активность CYP17 в 2-3 раза. Схожий стимулирующий профиль наблюдается для химеры Mc b_5 -Om b_5 . Om b_5 *R. norvegicus* минимум в 1,5 раза менее активен в стимуляции CYP17, чем Mc b_5 *R. norvegicus*, причем стимулирующие эффекты наблюдаются при максимальных соотношениях. Аналогичным стимулирующим профилем обладает химера Om b_5 -Mc b_5 . Усеченные b_5 Om2 и b_5 Om3 на 20-30% увеличивают активность CYP17 по сравнению с Om b_5 . Om b_5 *H. sapiens* более активно стимулирует CYP17, чем Om b_5 *R. norvegicus*, однако это наблюдается только при больших соотношениях и не достигает уровня Mc b_5 (максимум 70% от уровня стимулирующего эффекта Mc b_5 *R. norvegicus*).

Таблица 6. - Значения скорости 17,20-лиазной реакции (мин^{-1}), катализируемой СУР17 в присутствии различных форм b_5 при соотношении b_5 : СУР17=1:1

Белок	СУР17, (субстрат)		
	<i>E. caballus</i> , (17-ОН Р4)	<i>C. porcellus</i> , (17-ОН Р4)	<i>H. sapiens</i> , (17-ОН Р5)
Контроль	2,15±0,07	0,30±0,01	0,049±0,001
Mc b_5 <i>R. norvegicus</i>	4,1±0,1*)	1,00±0,06*)	0,087±0,006*)
Om b_5 <i>R. norvegicus</i>	2,50±0,04*)	0,32±0,03	0,064±0,003
b_5 Om2	2,5±0,1	0,47±0,01*)	0,072±0,013
b_5 Om3	3,00±0,05	0,51±0,01*)	0,086±0,010
Mc b_5 - Om b_5	5,50±0,04	1,40±0,09*)	0,103±0,012*)
Om b_5 -Mc b_5	2,60±0,05*)	0,31±0,01	0,062±0,020
Om b_5 <i>H. sapiens</i>	3,5±1,2	0,40±0,01*)	0,063±0,001*)
Mc b_5 <i>H. sapiens</i>	н.о.**)	н.о.	0,123±0,001*)
* -значения активности достоверно отличающиеся от контрольной (уровень значимости $p=0,05$)			
** - не определялось			

Примечание – реакцию проводили при 37°C в 50 мМ Трис-НСI (рН 7,5), содержащем 10 мМ MgCl₂, 50 мкМ субстрата, 0,5 мкМ СУР17, 0,5 мкМ b_5 , 1 мкМ СРР, 0,5 мМ NADPH, 8 мМ изоцитрат натрия, 0,1 ед/мл изоцитратдегидрогеназы.

По литературным данным в структуре Om b_5 обнаружены две гидрофобные сети из остатков аминокислот, окружающих гем. Именно эти сети обуславливают жесткость гидрофильного домена Om b_5 и его повышенную устойчивость к химической и термической денатурации. Вместе с тем, жесткость структуры, по-видимому, не позволяет Om b_5 эффективно взаимодействовать с Р450 и СРР. Доказательством этому служат результаты, полученные в настоящей работе. Полноразмерные Om b_5 *R. norvegicus* и *H. sapiens* в десятки раз менее эффективно (по сравнению с Mc b_5) взаимодействуют с СУР3А4, и в несколько раз менее эффективно стимулируют активность СУР3А4 и СУР17. Нарушение целостности структуры гидрофильного домена Om b_5 *R. norvegicus* – что наблюдается у мутантов b_5 Om2 и b_5 Om3 – приводит к более эффективному взаимодействию цитохрома b_5 с Р450. Это отражается и в снижении K_d при взаимодействии с СУР3А4, и в стимуляции реакций окисления тестостерона (СУР3А4) и 17,20-лиазной реакции (СУР17).

Наличие гидрофобного домена в структуре b_5 является необходимым фактором для эффективного взаимодействия с редокс-партнерами, однако происхождение его не оказывает значимого влияния на способность b_5

стимулировать активность P450. Это подтверждают эксперименты с химерными b_5 .

Способность стимулировать активность CYP3A4 и CYP17 для изученных полноразмерных форм Ом b_5 *H. sapiens* и *R. norvegicus* находится на сопоставимом уровне.

Результаты по реконструкции 17,20-лиазной активности CYP17 *H. sapiens* свидетельствуют, что замена Ом b_5 *R. norvegicus* на Ом b_5 *H. sapiens* не оказывает существенного влияния на профиль активации CYP17 *H. sapiens*. Таким образом, неспособность стимулировать активность CYP17 не связана с видовым происхождением Ом b_5 .

Полученные результаты четко демонстрируют важность пластичности структуры цитохрома b_5 для его эффективного взаимодействия с редокс-партнерами.

Заключение

Основные научные результаты диссертации.

1. Разработан высокоэффективный комплекс подходов к гетерологической экспрессии цитохромов b_5 в клетках *E.coli*, позволивший получать полноразмерные формы Ом цитохромов b_5 *R. norvegicus*, Ом b_5 *H. sapiens*, мутантные формы b_5 Ом2 и b_5 Ом3, а также химерные белки Ом b_5 –Mc b_5 и Mc b_5 –Ом b_5 в количестве не менее 3 мкмоль на 1 литр культуральной среды. Количество полученных белков позволяет использовать их для реконструкции *in vitro* биологических процессов окисления стероидных субстратов с участием CYP17 и CYP3A4. Содержание апобелка в финальном препарате составляет не более 0,6%. Разработанная технология позволила экспрессировать и выделить в высокоочищенном состоянии Mc b_5 *H. sapiens* для проведения международных протеомных исследований по поиску белков-партнеров в клеточных лизатах печени человека [2, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 18].

2. С целью оценки вклада структурных элементов цитохрома b_5 в процесс взаимодействия с цитохромами P450 и катализа с участием этого гемопротеида, впервые сконструированы химерные формы гемопротеида, в которых гидрофильный домен одной изоформы гемопротеида заменен гидрофильным доменом другой изоформы - Ом b_5 –Mc b_5 и Mc b_5 –Ом b_5 . Полученные белки характеризуются спектральными свойствами цитохрома b_5 типа, что говорит о корректной сборке при получении холобелка. Химерные белки способны восстанавливаться природными донорами электронов [5, 6, 18].

3. Проведена оценка взаимодействия различных форм цитохрома b_5 с редуктазами. Впервые показана возможность восстановления цитохрома Ом b_5 NADH-цитохром b_5 редуктазой и AdR. Ом b_5 более чем в 20 раз менее эффективно восстанавливается редуктазами, чем Mc b_5 . На эффективность восстановления

От b_5 существенное влияние оказывает жесткость структуры его гидрофильного домена, что показано при восстановлении гемопротеида CPR и NADH-цитохром b_5 редуктазой в присутствии детергента [2, 10, 13, 16].

4. Оценен вклад каждого из структурных доменов цитохрома b_5 во взаимодействие и регуляцию активности CYP17 и CYP3A4. Показано, что жесткость структуры гидрофильного домена не позволяет Ом b_5 , в отличие от Мс b_5 , эффективно взаимодействовать с цитохромом P450. Доказано, что происхождение гидрофобного домена в структуре химер не оказывает значимого влияния на способность цитохрома b_5 стимулировать активность цитохромов P450. Установлено, что неспособность Ом b_5 стимулировать активность CYP17 не связана с его видовым происхождением. Впервые описано взаимодействие Ом b_5 с CYP3A4 и доказана его неспособность, в отличие от микросомального аналога, эффективно стимулировать 6 β -гидроксилирование тестостерона, катализируемое CYP3A4. Полученные данные имеют важное фундаментальное значение для понимания эволюции стероид-гидроксилирующих систем, участвующих в метаболизме лекарственных веществ, а также факторов, регулирующих эффективность данных систем [5–8, 11, 14, 15].

5. Получены три мутантные формы *Taq* ДНК-полимеразы, оценены их каталитические свойства. В результате создан препарат смеси термостабильных ДНК полимераз TP-mix polymerases, обеспечивающий максимальную эффективность процедур сайт-направленного мутагенеза и молекулярного клонирования гем-содержащих белков. Данный препарат включен в состав ряда диагностических наборов медицинского и сельскохозяйственного профиля [4, 17, 19].

Рекомендации по практическому использованию результатов.

1. Разработанный высокоэффективный комплекс подходов для гетерологической экспрессии цитохромов b_5 в клетках *E.coli* может быть использован для получения гемопротеидов b_5 -типа. Полученные экспрессионные векторы могут быть использованы для внесения точечных мутаций в последовательности цитохромов Ом b_5 и Мс b_5 *R. norvegicus* и *H. sapiens*.

2. Полученные в ходе работы цитохромы b_5 могут быть использованы для реконструкции *in vitro* систем метаболизма лекарств.

3. Препарат смеси термостабильных ДНК полимераз TP-mix polymerases (ТУ ВУ 100185093.067-2013) может быть использован как в составе новых наборов по ПЦР диагностике, так и в качестве самостоятельного объекта для реализации учреждениям, работающим в области молекулярных исследований.

Список публикаций соискателя по теме диссертации

Статьи в научных журналах

1. Сергеев, Г.В. Восстановление цитохрома b_5 NADPH цитохром P450 редуктазой / Г.В. Сергеев // Известия НАН Беларуси, серия хим. наук. -2005.- №5. - С. 104-107.

2. Экспрессия цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий в *E. coli*. Выделение рекомбинантного гемопротеида и исследование взаимодействия с белками-партнерами / Г.В. Сергеев, А.А. Гилеп, С.А. Усанов, Р.У. Эстабрук // Биохимия. – 2006. - Т. 71, Вып. 7. - С. 972-983.

3. Молекулярное клонирование и гетерологическая экспрессия в клетках *E.coli* цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий человека / Г.В. Сергеев, А. В. Василевская, А. А. Гилеп, С. А. Усанов // Труды БГУ. Молек. биология. – 2010. - Т. 5, ч.1. - С. 179-184.

4. Оптимизация условий гетерологической экспрессии Pfu ДНК полимеразы в клетках *E. coli* / Г.В. Сергеев, А. В. Василевская, А. А. Гилеп, С. А. Усанов // Известия Нац. акад. наук Беларуси. Серия хим. наук. – 2010. - №4. - С. 100-104.

5. Сергеев, Г.В. Роль структурных доменов цитохрома b_5 во взаимодействии с цитохромами P450 / Г.В. Сергеев, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Биохимия. – 2014. - Т. 79, вып. 5. - С.520-531.

6. Белок-белковые взаимодействия в цитохром P450 3A4 и 3A5 системах / Г.В. Сергеев, О.В. Гнеденко, А.С. Иванов, Е.О. Яблоков, С.А. Усанов, Д.В. Муха, А.В. Кузиков, Н.Е. Москалева, Т.В. Булко, В.В. Шумянцева, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2014. - Т. 60, вып. 1. - С. 17-27.

7. SPR and electrochemical analyses of interactions between CYP3A4 or 3A5 and cytochrome b_5 / G.V. Sergeev, O.V. Gnedenko, E.O. Yablokov, S.A. Usanov, D.V. Mukha, T.V. Bulko, A.V. Kuzikov, N.E. Moskaleva, V.V. Shumyantseva, A.S. Ivanov, A.I. Archakov // Chemical Physics Letters. – 2014. - V.593. - P. 40-44.

8. Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: Practical realization and further SPR validation / G. Sergeev, A.S. Ivanov, A. Medvedev, P. Ershov, A. Molnar, Y. Mezentsev, E. Yablokov, L. Kaluzhsky, O. Gnedenko, O. Buneeva, I. Haidukevich, A. Lushchyk, A. Yantsevich, M. Medvedeva, S. Kozin, I. Popov, S. Novikova, V. Zgoda, A. Gilep, S. Usanov, A. Lisitsa, A. Archakov // Proteomics. – 2014. - V.14. - P. 2261–2274.

Статьи в материалах конференций

9. Сергеев, Г.В. Гетерологическая экспрессия в *E. coli* цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий / Г.В. Сергеев // Сборник материалов научной конференции “Молодёжь в науке 2003”, Минск, 28-31 октября 2003г.: в 3 т. / Нац. Академия наук Респ. Беларусь; ред.: В.Е. Агабеков [и др.]. – Минск, 2003. – Т. 3. - С. 141-144.

10. Сергеев, Г.В. Различная природа взаимодействия митохондриального и микросомального цитохромов b_5 с NADPH-цитохром P450 редуктазой / Г.В. Сергеев // Сборник материалов международной научной конференции “Молодёжь в науке 2004”, Минск, 8-13 ноября 2004 г.: в 5 т. / Нац. Академия наук Респ. Беларусь ; ред.: П.Г. Никитенко [и др.]. – Минск, 2004. – Т. 2. – С. 63-67.

11. Сергеев, Г.В. Структурные особенности цитохромов b_5 и их роль в окислительно-восстановительных реакциях / Г.В. Сергеев, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Биорегуляторы: исследование и применение : сб. научн. трудов / Ин-т биоорганич. химии НАН Беларуси ; редкол.: С.А. Усанов (гл. ред.) [и др.]. - Минск, 2014. - С. 230-248.

Тезисы докладов

12. Overexpression of full-length outer mitochondrial cytochrome b_5 in *E. coli* / G. Sergeev, A. Gilep, A. Ito, Sergey Usanov // Book of abstracts of 13th International Conference on Cytochromes P450, Prague, June 29-July 3, 2003 / Czech Chemical Society ; edited by : F.P. Guengerich [et al.]. – Prague, 2003. – P. S124.

13. Сергеев, Г.В. Разный характер взаимодействия митохондриального и микросомального цитохромов b_5 с NADPH-цитохром P450 редуктазой / Г.В. Сергеев, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Международная конференция «Химия, структура и функции биомолекул»: сб. тезисов, Минск, 29-30 июня 2004г. / Институт биоорганич. химии НАН Беларуси ; ред.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2004. - С. 101.

14. Sergeev, G. Different character of interaction of microsomal and mitochondrial cytochrome b_5 with cytochrome P450 enzymes / G. Sergeev, A. Gilep, S. Usanov // 14th International Conference on Cytochromes P450: program and abstracts, Dallas (USA), may 31-june 5, 2005. / American Chem. Society ; edited by: F.P. Guengerich [et al.]. – Dallas, 2005. - P. 153.

15. Sergeev, G. Role of outer mitochondrial cytochrome b_5 in cytochrome P4503A4 catalyzed testosterone 6beta-hydroxylation / G. Sergeev, A. Gilep, S. Usanov // 16th International symposium on MDO: programme and book abstracts, Budapest, 3-7 september, 2006. / MDO International Advisory Committee ; edited by: L. Vereszkey [et al.]. – Budapest, 2006. - P. 121.

16. Сергеев, Г.В. Роль цитохрома b_5 в реакциях, катализируемых цитохромом P450scs / Г.В. Сергеев, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Сб. тезисов II международной конференции «Химия, структура и функции биомолекул», Минск, 3-5 октября, 2006г. / Ин-т биоорганич. химии НАН Беларуси; ред.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2006. – С. PR-126.

17. Сергеев, Г.В. Гетерологическая экспрессия и очистка рекомбинантных ДНК-полимераз / Г.В. Сергеев, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Материалы Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика

инфекционных болезней», Минск, 17-18 мая 2007 г. / ГУ «Научн.-исслед. институт эпидем. и микробиол.»; ред.: Л.П. Титов [и др.]. – Минск, 2007. - С. 208.

18. Сергеев, Г.В. Конструирование векторов для гетерологической экспрессии химерных белков на основе микросомального и митохондриального цитохрома *b₅* крысы / Г.В. Сергеев, А.В. Василевская, С.А. Усанов // Материалы III Международной конференции «Химия, структура и функции биомолекул», Минск, 1-3 октября 2008 г. / Институт биоорг. химии НАН Беларуси; ред.: С.А. Усанов [и др.]. – Минск, 2008. - С. 218.

Технические условия

19. Препарат ферментный – смесь термостабильных ДНК полимераз TP-mix polymerases : ТУ ВУ 100185093.067-2013 / Г.В. Сергеев, Р.М. Замулова // Введ. 11.09.2013г. – Минск : УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси», 2013. – 17 с.

РЕЗЮМЕ

Сергеев Геннадий Валерьевич

Роль доменов цитохрома b_5 во взаимодействии с ферментами стероидогенных систем

Ключевые слова: микросомальный цитохром b_5 , цитохром b_5 внешней мембраны митохондрий, CYP3A4, CYP17.

Цель работы: разработать комплексный подход к экспрессии в бактериальных системах Om цитохромов b_5 , получить и охарактеризовать полноразмерные и мутантные Om цитохромы b_5 , определить вклад структурных доменов цитохрома b_5 во взаимодействие с белковыми редокс-партнерами и регуляцию активности CYP3A4 и CYP17.

Методы исследования и аппаратура: биохимические и молекулярно-генетические методы. Шейкер-инкубатор Infors HT Multitron Pro, амплификатор Bio-Rad PTC200, секвенатор Hitachi 3130, хроматографические системы BioLogic LP system и HP 1090, спектрофотометры Shimadzu UV-3000 и Solar CM2203, MALDI-TOF масс-спектрометр Microflex LRF system.

Полученные результаты и их новизна: Разработана универсальная методика для гетерологической экспрессии и очистки различных форм цитохрома b_5 . Впервые определена *in vitro* каталитическая активность CYP3A4 и CYP17 в присутствии полноразмерных цитохромов b_5 внешней мембраны митохондрий *H. sapiens* и *R. norvegicus*. Для выяснения роли доменов цитохрома b_5 в регуляции каталитической активности цитохромов P450 впервые применен подход с использованием химерных цитохромов b_5 , содержащих гетерологичные гидрофильные или гидрофобные домены изоформ b_5 . Показана возможность восстановления полноразмерных митохондриальных цитохромов b_5 и химерных цитохромов b_5 NADPH-цитохром P450 редуктазой, аденодоксин редуктазой и NADH-цитохром b_5 редуктазой. Разработан препарат ферментный - смесь термостабильных ДНК полимераз TP-mix polymerases ТУ ВУ 100185093.067-2013.

Рекомендации по использованию: Полученные цитохромы b_5 могут быть использованы для реконструкции *in vitro* систем метаболизма лекарств. Препарат TP-mix polymerases может быть использован в составе наборов по ПЦР диагностике.

Область применения: биохимия, медицинская диагностика.

РЭЗІЮМЭ

Сяргееў Генадзій Валер'евіч

Роля даменаў цытахрома b_5 ва ўзаемадзеянні з ферментамі стэроідагенных сістэм

Ключавыя словы: мікрасамальны цытахром b_5 , цытахром b_5 знешняй мембраны мітахондрыя, CYP3A4, CYP17.

Мэта работы: распрацаваць комплексны падыход да экспрэсіі ў бактэрыяльных сістэмах Om цытахромаў b_5 , атрымаць і ахарактарызаваць поўнапамерныя і мутантныя Om цытахромы b_5 , вызначыць ўклад структурных даменаў цытахрома b_5 ва ўзаемадзеянне з бялковымі рэдокс-партнёрамі і рэгуляцыю актыўнасці CYP3A4 і CYP17.

Метады даследавання і апаратура: біяхімічныя і малекулярна-генетычныя метады. Шэйкер-інкубатар Infors HT Multitron Pro, ампліфікатар Bio-Rad PTC200, секвенатар Hitachi 3130, храматаграфічныя сістэмы BioLogic LP system и HP 1090, спектрафатометры Shimadzu UV-3000 и Solar CM2203, MALDI-TOF мас-спектрометр Microflex LRF system.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: Распрацавана універсальная методыка для гетэралагічнай экспрэсіі і ачысткі розных формаў цытахрома b_5 . Упершыню вызначана *in vitro* каталітычная актыўнасць CYP3A4 і CYP17 у прысутнасці поўнапамерных цытахромаў b_5 знешняй мембраны мітахондрыя *H. sapiens* і *R. norvegicus*. Для высвятлення ролі даменаў цытахрома b_5 ў рэгуляцыі каталітычнай актыўнасці цытахромаў P450 ўпершыню ўжыты падыход з выкарыстаннем хімерных цытахромаў b_5 , якія змяшчаюць гетэралагічныя гідрафільныя або гідрафобныя дамены ізаформ b_5 . Паказана магчымасць аднаўлення поўнапамерных мітахондрыяльных цытахромаў b_5 і хімерных цытахромаў b_5 NADPH-цытахром P450 рэдуктазай, адрэнадаксіна рэдуктазай і NADH-цытахром b_5 рэдуктазай. Распрацаваны прэпарат ферментны - сумесь тэрмастабільных ДНК палімераз TP-mix polymerases TU BY 100185093.067-2013.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: Атрыманыя цытахромы b_5 могуць быць выкарыстаны для рэканструкцыі *in vitro* сістэм метабалізму лекаў. Прэпарат TP-mix polymerases можа быць выкарыстаны ў складзе набораў па ПЛР дыягностыцы.

Галіна ўжывання: біяхімія, медыцынская дыягностыка.

SUMMARY

Sergeev Gennady Valeryevich

The role of cytochrome b_5 domains in interaction with enzymes of steroidogenic systems

Keywords: microsomal cytochrome b_5 , outer mitochondrial cytochrome b_5 , CYP3A4, CYP17.

The aim of the study: development of comprehensive approach for expression of Om cytochromes b_5 in bacterial systems, preparation and characterization of full-length and mutant cytochromes b_5 , to determine the contribution of cytochrome b_5 structural domains in interaction with protein redox-partners and regulation of the activity of CYP3A4 and CYP17.

Methods and equipment: biochemical and molecular genetic methods. Shaker incubator Infors HT Multitron Pro, Bio-Rad thermal cycler RTS200, sequencer 3130 Hitachi, chromatographic systems BioLogic LP system and HP 1090, spectrophotometer Shimadzu UV-3000 and Solar CM2203, MALDI-TOF mass spectrometer Microflex LRF system.

Results: The universal method for the heterologous expression and purification of various forms of cytochrome b_5 was developed. *In vitro* catalytic activity of cytochromes CYP3A4 and CYP17 in the presence of full-length outer mitochondrial membrane cytochromes b_5 *H. sapiens* and *R. norvegicus* was determined for the first time. To elucidate the role of cytochrome b_5 domain in the regulation of the catalytic activity of cytochrome P450, the approach using chimeric cytochrome b_5 , containing heterologous hydrophilic or hydrophobic domains of b_5 isoforms was developed. The possibility of reduction of full-length mitochondrial cytochrome b_5 and chimeric cytochrome b_5 by NADPH-cytochrome P450 reductase, adrenodoxin reductase and cytochrome b_5 NADH-reductase was demonstrated. Enzyme preparation - a mixture of thermostable DNA polymerases TP-mix polymerases TY BY 100185093.067-2013 was designed.

Degree of use: Obtained cytochromes b_5 can be used to reconstruct *in vitro* the drug metabolism systems. TP-mix polymerases preparation can be used in the composition of diagnostic kits for PCR.

Fields of use: biochemistry, medical diagnostics.