

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

Объект авторского права

УДК 577.112.083+577.212.3+577.322.23

ГИЛЕП
АНДРЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И НОВЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ
ФУНКЦИИ СТЕРОИД-ГИДРОКСИЛАЗ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2025

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

Научный консультант:

Усанов Сергей Александрович,
член-корреспондент НАН Беларуси, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси

Официальные оппоненты:

Андрианов Александр Михайлович,
доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси

Щербин Дмитрий Григорьевич,
доктор биологических наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом медицинских биотехнологий Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

Минеева Ирина Владимировна,
доктор химических наук, доцент, профессор кафедры органической химии химического факультета Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация: Институт физико-органической химии НАН Беларуси

Защита состоится «19» июня 2025 г. в 10.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220084, г. Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5/2, зал заседаний Учёного совета, e-mail: tbozhok@iboch.by, тел. +375(29)5697164.

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

Автореферат разослан «16» мая 2025 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук

Т.С. Божок

ЛИСТ ИЗМЕНЕНИЙ

к автореферату диссертации **Гилепа Андрея Александровича**
«Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-
гидроксилаз», представленной на соискание ученой степени доктора
химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Оборотная сторона обложки напечатано	Следует читать
Официальные оппоненты: Андреанов Александр Михайлович , доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси Щербин Дмитрий Григорьевич , доктор биологических наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом медицинских биотехнологий Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси Минеева Ирина Владимировна , доктор химических наук, доцент, профессор кафедры органической химии химического факультета Белорусского государственного университета	Официальные оппоненты: Михайлопуло Игорь Александрович , член-корреспондент, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории химии нуклеотидов и полинуклеотидов Института биоорганической химии НАН Беларуси Щербин Дмитрий Григорьевич , доктор биологических наук, профессор, заведующий научно-исследовательским отделом медицинских биотехнологий Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси Минеева Ирина Владимировна , доктор химических наук, доцент, профессор кафедры органической химии химического факультета Белорусского государственного университета

Соискатель

А.А. Гилеп

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.21.01
кандидат химических наук



Т.С. Божок

ВВЕДЕНИЕ

Стероиды выполняют значимые биологические функции: определяют свойства мембран и выполняют сигнальную функцию (выступают в качестве аутокринных, паракринных и эндокринных факторов). В последнее время наблюдается постоянное установление новых стероидов и их соответствующих рецепторов. Действие стероидов осуществляется через различные типы рецепторов, включая ядерные рецепторы и GPCR (рецепторы, активирующие G-белок). Также существуют предположения о наличии у млекопитающих рецепторов, специфически связывающих экзогенные стероиды, включая производные вторичных желчных кислот и фитостероиды.

Функции стероидов зависят от степени их модификации. Одна из ключевых групп ферментов, участвующих в модификации стероидов, – стероид-гидроксилазы. Эта группа ферментов широко представлена во всех царствах живых организмов. Нарушения работы этих ферментов в организме человека могут привести к тяжелым наследственным заболеваниям. Кроме того, многие из этих ферментов являются потенциальными мишенями для воздействия лекарственных соединений.

Стероид-гидроксилазы входят в состав различных регуляторных систем организма, а их активность зависит от электронных доноров и модуляторов активности. Модуляторы активности воздействуют не только на эффективность каталитического процесса, но также на субстратную специфичность и спектр образующихся продуктов. Важным аспектом исследования стероид-гидроксилаз является поиск низкомолекулярных модуляторов активности этих ферментов, что позволяет в будущем разрабатывать новое поколение лекарств для лечения онкологических, инфекционных и эндокринных заболеваний.

Поэтому ключевой задачей является определение субстратной специфичности и спектра образующихся под действием стероид-гидроксилаз продуктов, выявление ингибиторов данных фармацевтически значимых ферментов, а также проведение комплексных интерактивных исследований в области анализа белок-белковых взаимодействий. Консолидация знаний о молекулярной организации и функционировании стероид-гидроксилаз способствует пониманию ключевых регуляторных процессов в организме человека, патогенеза различных заболеваний, а также предоставляет возможность применения рационального подхода в создании новых терапевтических средств, механизм действия которых связан с данными ферментативными системами.

Настоящая работа посвящена комплексному анализу молекулярной организации и функций стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности в Республике Беларусь на:

– 2011-2015 гг. (Указ Президента Республики Беларусь № 378 от 22.07.2010 г.): «Медицина, медицинская техника и технологии, фармация», 21. Макротехнология «Диагностика и лечение заболеваний», критические технологии: диагностика и лечение инфекционных заболеваний; 23. Макротехнология «Лекарственные, лечебно-диагностические препараты и тест-системы», критические технологии: производство диагностикумов, средств иммунохимического микроанализа, тест-систем нового уровня;

– 2016-2020 гг. (Указ Президента Республики Беларусь № 166 от 22.04.2015 г.): 4. «Медицина, фармация, медицинская техника» – технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы.

– 2021-2025 гг. (Указ Президента Республики Беларусь № 156 от 07.05.2021 г.): 2. «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства» – биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные); диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской помощи; фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, лекарственные средства и иммуномодуляторы.

Тема диссертационной работы также соответствует:

– приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2011-2015 гг. (постановление Совета Министров Республики Беларусь № 585 от 19.04.2010 г.): 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; 3.6. идентификация и картирование генов; паспортизация, маркирование, идентификация, селекция и создание сельскохозяйственных растений, животных и микроорганизмов с помощью ДНК-технологий; ДНК-

технологии и генно-инженерные методы в диагностике и лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных.

– приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 гг. (постановление Совета Министров Республики Беларусь № 190 от 12.03.2015 г.): 3. Биологические системы и технологии. 4. Медицина и фармация.

– приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности Республики Беларусь на 2021-2025 гг. (Указ Президента Республики Беларусь № 156 от 07.05.2020 г.): 2. Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства (биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные); системная и синтетическая биология; персонифицированная медицина; фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, антибиотикорезистентность).

Диссертационная работа выполнена в рамках тематики научных исследований, проводимых в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси: ГПНИ «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал», подпрограмма «Химфармсинтез», задание 2.13 «Структурно-функциональный анализ рекомбинантных цитохром Р450-зависимых ферментов с целью создания лекарственных препаратов нового поколения» (2011-2013 гг., № гос. рег. 20121693); ГП «Инновационные биотехнологии», подпрограмма «Малотоннажные биотехнологии», задание 9.1 «Разработка технологий получения высокоочищенных препаратов рекомбинантных ферментов и создание производственно-технологического участка по их выпуску» (2013-2015 гг., № гос. рег. 20131769); гранта на выполнение научно-исследовательских работ докторантами и аспирантами Национальной академии наук Беларуси «Молекулярное клонирование и характеристика стероид-14-дегидрогеназ патогенных грибов отдела Ascomycota» (2013 г., № гос. рег. 20132238); гранта БРФФИ, Наука № X17-013 «Синтез, структурный и биохимический анализ стероидов с гетероциклическим фрагментом в цикле D» (2017-2019 гг., № гос. рег. 20171270); ГП «Наукоемкие технологии и техника», подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии – 2020», мероприятие 40 «Разработать протокол идентификации грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции» (2016-2020 гг., № гос. рег. 20170199); ГПНИ «Химические технологии и материалы», подпрограмма 2 «Биологически активные вещества» Химические технологии и материалы, задание 2.20 «Интерактомика и метаболомика стероид-гидроксилирующих монооксигеназ» (2016-2020 гг., № гос. рег. 20162001); ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия», подпрограмма 2 «Химические основы процессов жизнедеятельности» (Биооргхимия), задание 2.3.1 «Дизайн, синтез,

структурный и биохимический анализ потенциальных ингибиторов и субстратов ключевых ферментов человека, вовлеченных в процессы возникновения и развития тяжелых патологических состояний» (2021-2025 гг., № гос. рег. 20210590); гранта БРФФИ № X23РНФ-090 «Оценка метаболизма и эффективности связывания разных классов изопреноидных, полифенольных и хиноидных метаболитов с активным центром фармацевтически значимых ферментов человека и патогенных микроорганизмов» (2022-2024 гг., № гос. рег. 20230019).

Цель и задачи исследования. Цель работы – установить закономерности молекулярной эволюции и молекулярных механизмов функционирования стероид-гидроксилаз, включая субстратную специфичность, взаимодействие с белками партнерами, а также взаимодействие с модуляторами данных ферментативных систем.

Задачи исследования:

1. Разработать методические подходы получения в препаративных количествах функционально активных стероид-гидроксилаз млекопитающих, *Mycobacterium tuberculosis* и патогенных грибов рода *Candida*.

2. Установить субстратную специфичность стероид-гидроксилаз млекопитающих, *Mycobacterium tuberculosis* и патогенных грибов рода *Candida*.

3. Провести гетерологическую экспрессию и получить в препаративных количествах функционально активные белки-партнеры стероид-гидроксилаз.

4. Определить участие стероид-гидроксилаз в каталитическом превращении секостероидов.

5. Определить участие стероид-гидроксилаз в каталитическом превращении 5,7-диен-стероидов.

6. Изучить взаимодействие стероид-гидроксилаз с производными стероидов, азолов и полифенолов, а также с олигонуклеотидными аптамерами и выявить соединения, которые могут быть использованы для последующего рационального дизайна высокоспецифичных ингибиторов стероид-гидроксилаз.

7. Изучить белок-белковые взаимодействия стероид-гидроксилаз с белками-партнерами.

Объект исследования – CYP17 из различных организмов, CYP21A2 человека, CYP19A1 человека, CYP3A4 человека, CYP3A5 человека, CYP2C9 человека, CYP51 человека и патогенных грибов, стероид-гидроксилазы и стероид-дегидрогеназа *Mycobacterium tuberculosis*, цитохромы *b₅* (CYB5) человека и *Rattus norvegicus*, НАДФН-цитохром P450 редуктаза человека и *Rattus norvegicus*, PGMRC1 *Rattus norvegicus*, а также различные компоненты CYP-зависимых систем млекопитающих и *Mycobacterium tuberculosis*.

Предмет исследования – субстратная специфичность, молекулярная эволюция, белок-лигандные и белок-белковые взаимодействия стероид-гидроксилаз.

Научная новизна:

1. Установлены особенности молекулярной эволюции CYP17 и CYP51.
2. Впервые установлено участие монооксигеназ *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов.
3. Впервые установлено участие стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов на уровне изолированных ферментов в каталитическом превращении 5,7-диен-стероидов.
4. Установлено, что белки группы PGRMC относятся к группе гемопротеинов.
5. Установлены кинетические и термодинамические параметры взаимодействия стероид-гидроксилаз с белками партнерами.
6. Установлены потенциальные модуляторы активности стероид-гидроксилаз из числа производных стероидов, азолов и полифенолов, а также олигонуклеотидных аптамеров.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Установление избирательности типа катализируемых реакций в зависимости от формы CYP17 с использованием молекулярного клонирования CYP17 из различных организмов, получение высокоочищенных препаратов данных ферментов и определение их лигандсвязывающих и каталитических свойств, что в совокупности необходимо для понимания патогенеза онкологических и эндокринных заболеваний и разработки новых систем диагностики.
- 2) Установление каталитического превращения 5,7-диен-стероидов и секостероидов ферментами начальных этапов биосинтеза стероидных гормонов – CYP11A1 и CYP17A1 с использованием *in vitro* реконструкции ферментативной системы и методов идентификации образующихся производных стероидов, что в совокупности необходимо для понимания патогенеза заболеваний, вызванных недостаточностью 7-дегидрохолестерин редуктазы, участия 5,7-диен стероидов в метаболических процессах в организме человека, установления новых природных производных секостероидов, а также для создания эффективной системы реконструкции ферментативной реакции, катализируемых CYP11A1 и CYP17A1, с использованием в качестве субстратов 3 β -гидрокси-5-ен-стероидов.
- 3) Определение закономерностей молекулярной эволюции клинически-значимых стероид-гидроксилаз и факта специфического взаимодействия, расчёт параметров взаимодействия производных стероидов и противогрибковых азолсодержащих соединений с активным центром стероид-гидроксилаз, а также установление факта специфического взаимодействия сконструированных олигонуклеотидных аптамеров и лютеолин-7,3'-дисульфата с поверхностью стероид-гидроксилаз с использованием методов спектрофотометрического титрования, биосенсорного анализа и *in vitro* реконструкции ферментативных

систем, что позволяет обосновать клиническую значимость отдельных аминокислотных замен в развитии резистентности патогенных грибов, а также использовать данные группы соединений для создания нового поколения высокоспецифичных модуляторов активности стероид-гидроксилаз.

4) Определение параметров белок-белковых взаимодействий стероид-гидроксилаз с редокс-партнерами митохондриального и микросомального типа с использованием биосенсорного анализа, анализа одноэлектронного переноса в системах и *in vitro* реконструкции ферментативных систем, что позволило предложить молекулярные механизмы переноса электронов и специфичности белок-белковых взаимодействий в CYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах.

5) Установление молекулярных основ действия цитохромов b_5 и PGRMC на стероид-гидроксилазы с использованием расчета кинетических и термодинамических параметров белок-белковых взаимодействий стероид-гидроксилаз с модуляторами активности, что позволило выявить особенности молекулярных механизмов аллостерической регуляции в CYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах и обосновать клиническую значимость отдельных аминокислотных замен в белках партнеров.

6) Открытие участия ферментов *M.tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов с использованием методов бионформационного анализа, спектрофотометрического титрования, *in vitro* реконструкции ферментативных систем, подходов по созданию ингибиторов ферментов, структурного анализа и анализа метаболизма иммуноактивного стероида клетками *M.tuberculosis*, что в совокупности важно для понимания толерантности микобактерий к действию иммунной системы человека, а также представляет практический интерес для разработки инновационных терапевтических подходов для лечения пациентов с микобактериозами.

Личный вклад соискателя ученой степени. Планирование эксперимента, постановка задач и подготовка материалов к публикации осуществлялась соискателем совместно с коллегами, принимающими участие в выполнении экспериментальных исследований. Соискателем проведена экспериментальная работа по молекулярному клонированию, гетерологической экспрессии, очистке и функциональной характеристике CYP17 из различных организмов, PGMRC1 *Rattus norvegicus* и ряда других стероид-гидроксилаз. В период с 1998 по 2003 гг. исследования стероид-гидроксилаз проводились совместно с к.х.н. Гурьевым О.Л., обсуждение полученных результатов и подготовка публикаций проводились совместно с научным консультантом чл.-корр. НАН Беларуси, д.х.н., проф. Усановым С.А. и академиком Национальной академии наук США, Prof. Estabrook R.W. Создание клеточной системы для коэкспрессии рекомбинантных белков с молекулярными шаперонами и hemA проводилось Гарностаем И.Н. Экспериментальные

исследования CYP51 из различных организмов проводились совместно с к.х.н. Струшкевич Н.В., Грабовец И.П. и к.х.н. Шкель Т.В. Исследования ферментов подсемейства CYP2 и CYP3 человека проводились совместно с к.х.н. Струшкевич Н.В., Грабовец И.П., к.х.н. Гайдукевич И.В., Кисель М.С. и к.х.н. Шкель Т.В. Исследования ферментов подсемейства CYP11 человека проводились совместно с к.х.н. Струшкевич Н.В. и Грабовец И.П. Исследования ферментов подсемейства CYP1 человека проводились совместно с Гарностаем И.Н., Лущиком А.В. и Грабовец И.П. Исследования белков *M.tuberculosis* проводились совместно с к.х.н. Струшкевич Н.В., Грабовец И.П., Варахсой Т.С., к.х.н. Василевской А.В., Ковалевским А.А. и к.х.н. Шкель Т.В. Работы по получению и анализу редокс партнеров стероид-гидроксилаз млекопитающих проводились совместно с Тумилович А.М., к.б.н. Бониной Т.А., к.х.н. Чудаевым М.В. и к.х.н. Сергеевым Г.В. Работы по дизайну аптамеров и проведению ППР-анализа проводились в рамках научной кооперации на базе лаборатории межмолекулярных взаимодействий Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». Работы по анализу кристаллической структуры стероид-гидроксилаз и их редокс-партнеров проводили совместно с к.х.н. Струшкевич Н.В., сотрудниками Structural Genomics Consortium (Торонто, Канада) и Московским физико-техническим институтом (Долгопрудный, Москва). Работы по генотипированию маркеров, значимых для фармакодиагностики, и составление инструкции по применению в области психиатрии проводилось совместно с к.х.н. Гайдукевич И.В., Кисель М.С., Бокуть О.С. и сотрудниками РНПЦ психического здоровья д.м.н. Докукиной Т.В., к.б.н. Голубевой Т.С. и к.м.н. Махровым М.В. Анализ антимикобактериальной активности был проведен в том числе в рамках научного сотрудничества с лабораторией иммуногенетики ФГБНУ «ЦНИИТ». Результатом научной коллаборации с д.б.н., проф. Аптом А.С. и к.б.н. Майоровым К.Б. является совместная работа по установлению роли цитохромов P450 *M. tuberculosis* в метаболизме иммунноактивных стероидов, установлению метаболизма ведущего иммуностероида 25-гидроксихолестрина клетками *M.tuberculosis* и определению антимикобактериальной активности нового поколения ингибиторов CYP *in vitro*, в макрофагальной инфекционной модели и *in vivo* модели. Синтетические производные стероидов, исследованные в работе, получены при участии сотрудников лаборатории химии стероидов и лаборатории физико-химических методов анализа Института биоорганической химии НАН Беларуси. Природные производные стероидов и другие соединения из морских организмов и макрофитов Дальнего Востока получены при участии сотрудников Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б.Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук. Написание научно-технической документации проводилось с участием к.б.н. Башко Н.П., к.х.н.

Шкель Т.В., Тумилович А.М. и к.х.н. Гайдукевич И.В. Работы по ВЭЖХ анализу и последующему масс-спектрометрическому анализу продуктов реакций, катализируемых стероид-гидроксилазами, проводились при участии к.б.н. Шабуни П.С., к.х.н. Фатыховой С.А. и Грабовец И.П.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Материалы диссертационной работы представлены на: IV Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 17-19 октября 2012 г.; на 11-ом Международном симпозиуме «Cytochrome P450», Турин, Италия, 22-26 июня 2012 г.; VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды», Уфа, 11-15 июня 2013 г.; Конференции «Успехи медицинской микологии», Москва, 26 сентября 2013 г.; V Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 4-6 июня 2014 г.; VI Всероссийском конгрессе по медицинской микологии «Успехи медицинской микологии», Москва, 8-10 апреля 2014 г.; Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 20-22 февраля 2017 г.; Международной научной конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова» и VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды», Москва, 18-22 сентября 2017 г.; 15-ом Международном симпозиуме «Cytochrome P450», Копенгаген, Дания, 27-30 июня 2023 г., 16-ом Международном симпозиуме «Cytochrome P450», Турин, Италия, 23-27 июня 2024 г.

Разработанный в ходе выполнения исследований метод и утвержденные Министерством здравоохранения РБ инструкции по применению метода «Метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9: инструкция по применению № 097-1117» используется врачами для выбора необходимого лекарственного средства и назначения его правильной дозировки. Разработанный в ходе выполнения исследований алгоритм установления таксономической принадлежности патогенных штаммов грибов с применением комплексных методов клинической лабораторной диагностики «Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов: инструкция по применению № 008-1119» внедрен в клиническую практику при лечении пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Опубликование результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 39 работ, в том числе 26 статей в научных журналах, соответствующих пункту 19 Положения о присуждении учёных степеней и присвоении учёных званий в Республике Беларусь (31,6 авторских листов), 1 статья в сборниках научных трудов (0,43 авторского листа) и тезисы 10 докладов (0,95 авторского листа). Общий объем опубликованных материалов составляет 32,98 авторских листов.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из содержания, перечня сокращений и обозначений, введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, списка использованных источников и приложения. Работа изложена на 191 странице, содержит 21 рисунок, 22 таблицы и 6 приложений. Список использованных источников состоит из библиографического списка, включающего 237 наименований, и списка публикаций соискателя ученой степени, включающего 39 наименований.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Организация систем биосинтеза и метаболизма стероидов (обзор литературы)

Проанализированы актуальные на момент проведения исследований литературные данные о классификации, структуре и функции стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов. Описана роль редокс-партнеров и регуляторов в работе стероид-гидроксилаз.

На основе научного анализа литературных данных выделен ряд нерешенных вопросов по данной проблеме и поставлены задачи исследования.

Глава 2. Методы исследований (экспериментальная часть)

Приведены использованные при выполнении работы материалы и методы, включающие молекулярно-биологические методы для конструирования экспрессионных векторов и молекулярного клонирования стероид-гидроксилаз и белков партнеров, методики наработки, выделения и очистки рекомбинантных белков. Описаны методы анализа физико-химических, лиганд-связывающих и каталитических свойств полученных рекомбинантных белков. Использовались как методы, описанные в литературе, так и подходы, разработанные в процессе выполнения работы.

В работе использованы следующие методы исследования: электрофоретический анализ белков и нуклеиновых кислот, электронная спектроскопия, различные виды колоночной хроматографии, ВЭЖХ, масс-спектрометрия, ЯМР-анализ и другие методы.

В рамках проведения исследования было проведено молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия и очистка рекомбинантных белков – компонентов стероид-гидроксилазных систем. С целью получения рекомбинантных стероид-гидроксилаз были разработаны подходы, обеспечивающие относительно высокий уровень гетерологической экспрессии белков и получение высокоочищенных препаратов каталитически активных рекомбинантных форм ферментов млекопитающих и патогенных микроорганизмов. Разработанные подходы включают модификацию 5'-области кДНК; включение шестигистидинового кластера в N- или C-концевую часть молекулы; использование пониженной температуры (22-26°C) при гетерологической экспрессии; использование коэкспрессии молекулярных

шаперонов (GroEL/GroES); использование коэкспрессии *hemA* (отвечающего за синтез глутамил-тРНК редуктазы, фермента обеспечивающего внутриклеточный синтез аминолевулиновой кислоты – лимитирующего субстрата в синтезе протопорфирина IX); использование синхронизации клеточного деления бактерий перед индукцией гетерологической экспрессии белков; использование лигандов активного центра в процессе гетерологической экспрессии и/или очистки стероид-гидроксилаз; использование ионных и неионных детергентов для солюбилизации белков из бактериальной мембраны и для стабилизации белка от агрегации в процессе очистки ферментов. В результате проведенных работ получены высокоочищенные препараты CYP17 из различных организмов, CYP21A2 человека, CYP19A1 человека, CYP3A4 человека, CYP3A5 человека, CYP2C9 человека, CYP51 человека и патогенных грибов, CYP *M. tuberculosis*, цитохромы *b₅* (CYB5) человека и *R. norvegicus*, НАДФН-цитохром P450 редуктаза человека и *R. norvegicus*, PGMRC1 *R. norvegicus*, а также различные компоненты CYP-зависимых систем млекопитающих и *M. tuberculosis*. По результатам проведенных работ подготовлена следующая научно-техническая документация:

1) Опытнo-промышленный регламент № ОНР-04/2021 на производство препарата ферментного «Рекомбинантный цитохром CYP51 грибов».

2) Лабораторный технологический регламент на изготовление ферментного препарата цитохрома P450 2C9 (изоформы *1, *2, *3) человека и методические рекомендации по определению взаимодействия данных ферментов с ингибиторами №6/2015.

Глава 3. Результаты исследований молекулярной организации и новых биохимических функций стероид-гидроксилаз и их обсуждение

Приведено обсуждение полученных результатов, направленных на анализ молекулярной организации и функции стероид-гидроксилаз млекопитающих и патогенных микроорганизмов.

3.1 Молекулярная эволюция и субстратная специфичность CYP17

В рамках выполнения исследований проведена сравнительная характеристика CYP17 из различных организмов. Молекулярная эволюция данного фермента представляет особый интерес, так как CYP17 является уникальным ферментом, катализирующим два типа реакций – стероид 17 α -гидроксилазную и стероид 17,20-лиазную реакцию. Отсутствие или наличие определённого типа активности данного фермента определяет путь биосинтеза стероидных гормонов по одному из трёх различных направлений: синтез минерал-кортикоидов (в случае отсутствия активности CYP17) и глюкокортикоидов (в случае преобладания стероид 17 α -гидроксилазной активности CYP17) и половых гормонов (в случае, когда CYP17 способен эффективно проявлять как стероид 17 α -гидроксилазную активность, так и стероид 17,20-лиазную). Следует отметить, что в зависимости от организма

наблюдаются различия в биосинтезе стероидных гормонов. По-видимому, это обусловлено видоспецифичностью CYP17. В рамках проведенных исследований впервые проведено молекулярное клонирование 7 новых природных CYP17 из организмов, для которых ранее последовательность CYP17 была неизвестна (*Bison bison* – GenBank: AF292565.1, белок: AAG02227.1; 2 изоформы CYP17 *Canis familiaris*; *Capra hircus* – GenBank: AF251387.1, белок: AAF65823.1; *Felis catus* – GenBank: AF292564.1, белок: AAG02226.1; *Ovis aries* – GenBank: AF251388.1, белок: AAF65824.1; *Xenopus leavis* – GenBank: AF325435.1, белок: AAG42003.1). Получены высокоочищенные рекомбинантные препараты и проведена сравнительная характеристика ферментативных особенностей для 5 новых CYP17 и 7 известных на момент начала исследования CYP17. В качестве объектов были выбраны ферменты как из близких таксонов (4 представителя одного семейства *Bovidae*), так и эволюционно далеких (изучены ферменты различных отрядов млекопитающих и представителя земноводных). Структурный анализ CYP17 показал, что различия первичной структуры внутри одного семейства, как правило, затрагивают лишь аминокислотные остатки, которые располагаются на поверхности белка. При этом изменения, наблюдаемые у CYP17, принадлежащих эволюционно удаленным организмам, могут затрагивать различные участки. Данные изменения могут затрагивать, в том числе, SRS (Substrate Recognition Site) фермента. На основании проведенного анализа и литературных данных CYP17 из различных организмов можно разделить на три группы по способности катализировать стероид 17,20-лиазную реакцию: $\Delta 4/5$ -тип (представители таксонов *Rodentia*, *Suidae*, *Equidae*, *Amphibia* и *Pisces*) – CYP17 катализирует реакции 17α -гидроксилирования прогестерона и прегненолона и 17,20-лиазную реакцию окисления 17α -гидроксипрогестерона и 17α -гидроксиpregненолона; $\Delta 5$ -тип (представители таксонов *Bovidae*, *Felidae* и *Primates*) – CYP17, которые не имеют или имеют незначительную 17,20-лиазную активность по отношению к 17α -гидроксипрогестерону, превращающую последний в андростендион; $\Delta 4$ -тип (в настоящее время идентифицирован только один представитель – *Cavia porcellus*) – CYP17, который либо не имеет или имеет незначительную 17,20-лиазную активность по превращению 17α -гидроксиpregненолона в дегидроэпиандростерон.

Методом химерогенеза идентифицированы участки последовательности, обуславливающие тип образуемых продуктов АК 100-400. В рамках анализа возможного участия CYP17 в каталитическом превращении субстратов нестероидной природы впервые было показано участие CYP17 в активации прокарциногенов – афлатоксина В1.

Эффективному протеканию стероид 17,20-лиазной активности способствует присутствие цитохрома b_5 (CYB5). Исследования показали, CYB5 оказывает стимулирующий эффект на 17,20-лиазную активность CYP17

большинства изученных организмов (таблица 1). При этом уровень стимулирующего эффекта стероид 17,20-лиазной активности различается в зависимости от вида организма. Уровень стимуляции 17,20-лиазной активности также зависит от соотношения CYP17/CYP5A. Избыток CYP5A в реакционной среде приводит к снижению степени стимуляции активности CYP17. Следует также отметить, что CYP5 *R. norvegicus* не оказывает влияния на скорость 17 α -гидроксилазной и 17,20-лиазной реакций, катализируемых цитохромом CYP17 *X. laevis*.

Таблица 1 – Каталитическая активность высокоочищенных рекомбинантных CYP17 (нмоль продукта/мин/нмоль CYP)

CYP17	Вид активности						Тип CYP17
	17α-гидроксилазная		17,20-лиазная				
	P5	P4	17OHP5		17OHP4		
	-CYB5	-CYB5	-CYB5	+CYB5	-CYB5	+CYB5	
<i>Bos taurus</i>	17,0	25,0	0,95	4,6	0	0	Δ ⁵
<i>Ovis aries</i>	20,0	69,0	1,2	6,2	0	0	
<i>Capra hircus</i>	16,0	60,0	0,9	5,1	0	0	
<i>Bison bison</i>	10,0	20,0	0,6	1,7	0	0	
<i>Homo sapiens</i>	2,4	5,3	0,3	1,4	0	0	
<i>Felis catus</i>	0,7	1,3	0,05	0,3	0	0	
<i>Guinea pig</i>	6,0	3,5	0	0	0,3	1,7	Δ ⁴
<i>Equus caballus</i>	15,5	11,3	2,7	10,5	6,0	27,1	Δ ^{4/5}
<i>Mesocricetus auratus</i>	19,0	12,5	1,0	2,0	0,6	1,3	
<i>Sus scrofa</i>	6,0	7,8	0,15	0,8	0,4	1,3	
<i>Rattus norvegicus</i>	8,1	6,2	0,6	0,8	0,5	2,2	
<i>Xenopus laevis</i>	0,54	0,72	0,10	0,09	0,12	0,14	

Анализ библиотеки кДНК ооцитов *X. laevis* позволил идентифицировать клоны, содержащие последовательность, гомологичную CYP5 млекопитающих. Сравнение аминокислотных последовательностей обнаруженного белка с последовательностями CYP5A и CYP5B млекопитающих свидетельствует о том, что цитохром *b*₅ *X. laevis* относится к митохондриальному типу, хотя и содержит ряд аминокислотных остатков, характерных для микросомального типа. Последующие исследования функции CYP17 *X. laevis* позволили установить возможное участие CYP17 в процессе созревания ооцитов у земноводных.

3.2 Участие стероид-гидроксилаз млекопитающих в каталитическом превращении 5,7-диен стероидов и секостероидов

Заключительная реакция биосинтеза холестерина – восстановление двойной связи при 7-положении стероидов – катализируется 7-дегидрохолестерин редуктазой (DHCR7). Дефицит данного фермента

приводит к тяжелому наследственному заболеванию – недостаточности 7-дегидрохолестерин редуктазы (Smith-Lemli-Opitz синдром, SLOS). Тяжесть заболевания зависит от степени недостаточности в диете экзогенного холестерина. Следует отметить, что 7-дегидрохолестерин является источником витамина D₃. Под действием ультрафиолетового света происходит разрыв В-кольца стероида с образованием секостероидов. При этом функция производных витамина D зависит от положения модификации молекулы.

В рамках проведенных исследований изучено участие ферментов биосинтеза стероидных гормонов в каталитическом превращении 5,7-диен стероидов и производных витамина D. Впервые показано, что CYP11A1 участвует в каталитическом превращении 7-дегидрохолестерина и витамина D₃. 7-Дегидрохолестрин превращается в 7-дегидропрегненолон (рисунок 1).

Синим цветом обозначены гипотетические пути метаболизма.

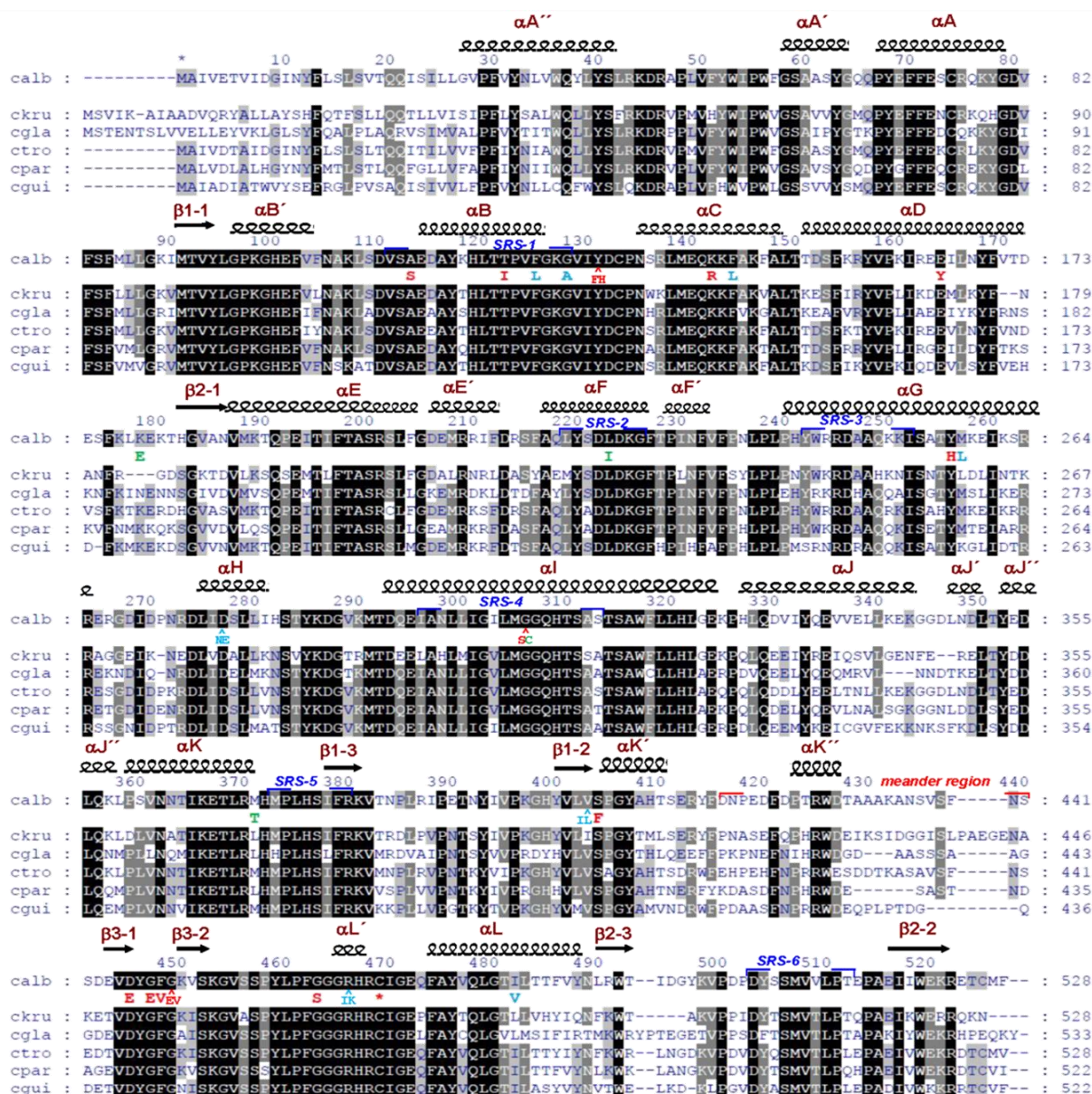
Витамин D₃ под действием CYP11A1 превращается в несколько продуктов. Среди идентифицированных продуктов обнаружены 20-гидроксивитамин D₃ и 20,22-дигидроксивитамин D₃ (рисунок 1). Образование

продуктов подтверждено методом масс-спектрометрии и ЯМР-анализа. Также показано, что 7-дегидропрегненолон под действием CYP17A1 превращается в 17 α -гидрокси-7-дегидропрегненолон и 7-дегидропроизводное дегидро-эпиандростерона.

3.3 Молекулярная эволюция и лиганд-связывающие характеристики CYP51

CYP51 – семейство белков, участвующих в катализе реакции 14-деметиляции стероидов. CYP51 идентифицированы в большинстве таксонов живых организмов, включая эукариот и прокариот. В рамках исследований молекулярной эволюции данных ферментов проведен биоинформационный анализ структур CYP51 из различных организмов и показаны таксон-специфические особенности организации данного фермента. Следует отметить, что CYP51 являются мишенью действия противогрибковых соединений и противопаразитных средств. При этом CYP51 человека рассматривается в качестве приоритетной «off-target» при разработке ингибиторов CYP51 патогенных микроорганизмов. Следует отметить, что микозы являются одной из основных причин внутрибольничных инфекций и смертей пациентов с иммунодефицитом, а также приводят к значительному увеличению смертности больных с вирусной инфекцией. Кроме этого, данные виды инфекций характеризуются высоким уровнем развития резистентности к существующим лекарствам. Развитие резистентности или наличие природной азол-резистентности грибов может быть обусловлена двумя факторами: мутациями CYP51 (аминокислотных остатков активного центра и/или канала доступа субстрата) или изменениями, приводящими к снижению уровня проникновения азол-содержащих соединений внутрь грибной клетки. В связи с этим особую актуальность имеют исследования, направленные на поиск нового класса ингибиторов CYP51, эффективных в отношении азол-резистентных форм грибов.

В ходе работы проведен комплексный биоинформационный анализ последовательностей гена *CYP51* грибов вида *C. albicans* с целью установления взаимосвязи мутаций с развитием резистентности к противогрибковым препаратам (рисунок 2). Также был проведен анализ последовательностей гена *CYP51* в клинических изолятах патогенных штаммов грибов, выявленных у пациентов РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии. Показано для *C. albicans*, что идентифицированные замены V488I, K128T и V404L не вызывают развития резистентности к противогрибковым препаратам азолового ряда (флуконазолу, вориконазолу и итраконазолу). Выявлены следующие мутации, которые, потенциально, способствуют развитию резистентности к противогрибковым препаратам азолового ряда – *C. albicans* (K179E, L224I, G307C, M372T), *C. guilliermondii* (C37W), *A. fumigatus* (Y46E, T248N и E255D), *C. glabrata* (S440C, G450D).



Верхняя строка – CYP51 *C. albicans* (PDB: 5V5Z). Белые символы на черном фоне – 100% идентичность, белые символы на сером фоне – 75% сходства, черные символы на сером фоне – 50% сходства. Мутации в устойчивых к азолам клинических изолятах *C. albicans* выделены цветом, а мутированные остатки показаны под последовательностью (красный цвет – мутации, связанные с устойчивостью; синий цвет – устойчивость проявляется в сочетании с другими мутациями; зелёный цвет – мутации, обнаруженные нами впервые у устойчивого к азолам клинического изолята *C. albicans*). Calb (*C. albicans* – XP_716761); cgla (*C. glabrata* – XP_445876); ctro (*C. tropicalis* – XP_002550985); ckru (*C. krusei* / *Pichia kudriavzevii* – XP_029322955); cpara (*C. parapsilosis* – ACT67904); cgui (*C. guilliermondii* / – XP_001484034).

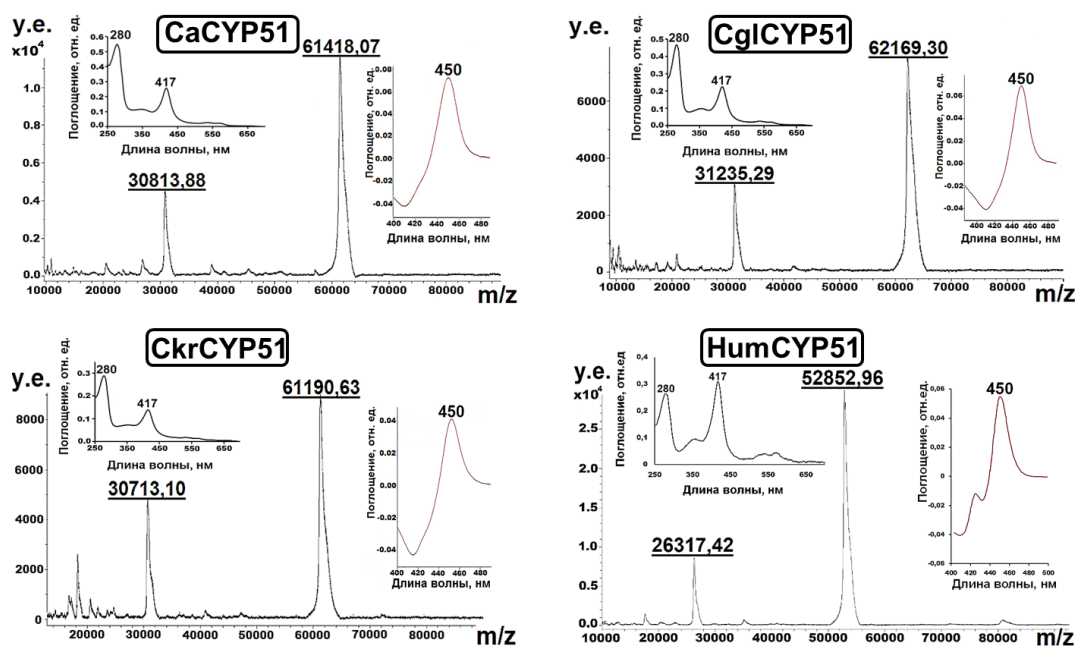
Рисунок 2 – Множественное выравнивание последовательностей белков CYP51 грибов рода *Candida*

В рамках проведения исследования CYP51 патогенных грибов разработан алгоритм для быстрого и эффективного определения видовой принадлежности

дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов с использованием микробиологических, молекулярно-биологических и масс-спектрометрических методов исследований.

Проведены молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия и очистка рекомбинантных форм CYP51 грибов (вызывающих нозокомиальную инфекцию: *C. glabrata* CYP51 (S440C, G450D), *C. albicans* CYP51 (K179D, L224I, G307C, M372T) и *C. krusei* CYP51 (K136R)).

Полученные гемопротеины характеризуются гомогенным состоянием (рисунок 3) без следов протеолитической деградации (согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле и МАЛДИ-масс-спектрометрии). СО-спектр восстановленных дитионитом натрия всех изучаемых CYP51 имеет пик при 450 нм, что свидетельствует о нативной конформации ферментов. В реконструированной системе полученные ферменты проявляют стероид-14 α -деметилазную каталитическую активность с образованием деметилированного продукта ланостерина – 4,4-диметилхолесто-8,14,24-триенола (FF-MAS).



CglCYP51 – *C. glabrata* CYP51 (S440C, G450D), CaCYP51 – *C. albicans* CYP51 (K179D, L224I, G307C, M372T), CkrCYP51 – *C. krusei* CYP51(K136R) и HumCYP51 – CYP51 человека.

Рисунок 3 – Параметры, характеризующие белковые препараты рекомбинантных форм CYP51 человека CYP51 грибов, вызывающих нозокомиальную инфекцию

Определение лиганд-связывающих свойств CYP51 проводили методом спектрофотометрического титрования. На основании данных титрования определены параметры связывания лигандов с активным центром CYP51 (ΔA_{max} и кажущуюся константу диссоциации комплекса белок-лиганд $K_{d_{\text{app}}}$).

Для мутантной формы CYP51 *C. albicans* эффективное связывание наблюдается для антимикотиков наружного применения: бифоназола, клотримазола, миконазола, эконазола и кетоконазола ($K_d = 0,005 \pm 0,001$ мкМ; $0,048 \pm 0,006$ мкМ; $0,31 \pm 0,07$ мкМ; $0,62 \pm 0,23$ мкМ; $0,68 \pm 0,18$ мкМ, соответственно); и пестицидов – эпоксиконазола и триадимефона ($K_d = 0,6 \pm 0,1$ мкМ и $0,4 \pm 0,06$ мкМ, соответственно) (таблица 2).

Не наблюдается связывания данной формы фермента с широко используемыми в лечении системных микозов антимикотиков – флуконазолом и вориконазолом (таблица 2). Полученные результаты указывают на развитие резистентности у патогенных грибов как формы адаптации на воздействие ингибиторов CYP51, что приводит к неспособности фермента связывать близкие по химической структуре молекулы. При этом мутации не снижают эффективность связывания неспецифических ингибиторов CYP с активным центром мутантной формы CYP51 *C. albicans*.

Таблица 2 – Кажущиеся значения констант диссоциации ($K_{d,app}$) комплексов исследованных соединений с CaCYP51, CglCYP51 и CkrCYP51

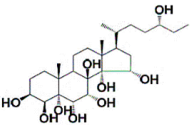
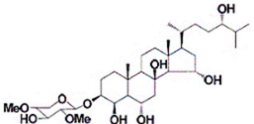
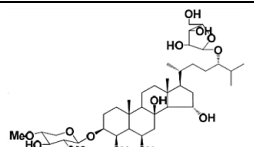
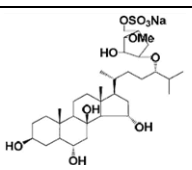
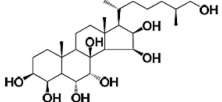
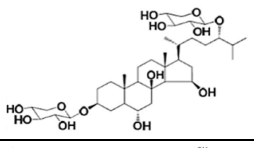
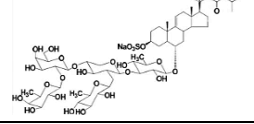
Название соединения	$K_{d,app}$, мкМ		
	CaCYP51	CglCYP51	CkrCYP51
Миконазол	$0,31 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,01$	$0,002 \pm 0,0009$
Эконазол	$0,62 \pm 0,23$	$0,10 \pm 0,02$	$0,0013 \pm 0,0004$
Кетоконазол	$0,68 \pm 0,18$	$0,35 \pm 0,03$	$0,0054 \pm 0,0026$
Клотримазол	$0,048 \pm 0,006$	$0,16 \pm 0,02$	$0,0013 \pm 0,0008$
Флуконазол	нет ответа	$0,21 \pm 0,03$	$0,004 \pm 0,001$
Вориконазол	нет ответа	$0,23 \pm 0,03$	$0,01 \pm 0,006$
Итраконазол	$1,4 \pm 0,3$	$0,11 \pm 0,02$	не титр
Тиоконазол	$1,10 \pm 0,08$	$0,300 \pm 0,008$	не титр
Бифоназол	$0,0048 \pm 0,0011$	$0,02 \pm 0,005$	$0,003 \pm 0,001$
Пропиконазол	$10,9 \pm 0,8$	$0,10 \pm 0,02$	не титр
Триадименол (изомер А)	$3,71 \pm 0,44$	нет ответа	не титр
Ципроконазол	$11,6 \pm 3,4$	$1,20 \pm 0,09$	не титр
Тебуконазол	$4,94 \pm 1,28$	$0,60 \pm 0,03$	не титр
Эпоксиконазол	$0,6 \pm 0,1$	нет ответа	не титр
Пенконазол	$1,4 \pm 0,2$	нет ответа	не титр
Диниконазол	$1,4 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,03$	не титр
Триадимефон	$0,40 \pm 0,06$	нет ответа	не титр
Дифеноконазол	$1,3 \pm 0,2$	$0,26 \pm 0,01$	не титр
Тиабендазол	$1,9 \pm 0,2$	нет ответа	не титр

Примечание: не титр – не проводилась оценка связывания соединений с активным центром CYP51; нет ответа – не наблюдается спектрального ответа CYP51 при добавлении данных соединений.

В отличие от мутантной формы CYP51 *C. albicans*, ферменты *C. glabrata* и *C. krusei* обладают достаточно высоким сродством к антимикотикам (таблица 2), которые в настоящее время широко используются в лечении системных микозов. Данный факт указывает, что, возможно, устойчивость *C. glabrata* и *C. krusei* к действию антимикотиков азолового ряда обусловлена другими, не связанными с CYP51, механизмами возникновения резистентности.

С целью идентификации новых групп соединений – потенциальных лигандов активного центра CYP51 патогенных грибов, проведены комплексные исследования (спектрофотометрический и биосенсорный анализ) взаимодействия CYP51 человека (приоритетный «off-target») и азоле-резистентных штаммов патогенных грибов с производными стероидов, а также другими природными соединениями из макрофитов и морских организмов. Ряд соединений проявляют высокую аффинность к HumCYP51 (таблица 3).

Таблица 3 – Кажущиеся значения констант диссоциации (K_d) комплексов исследованных природных соединений с HumCYP51, CaCYP51 и CglCYP51

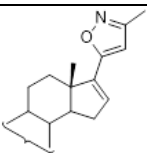
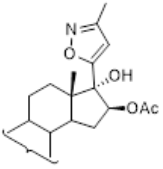
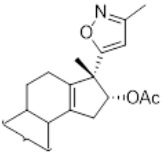
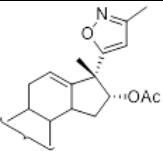
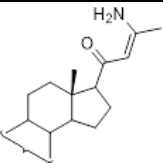
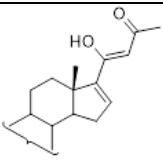
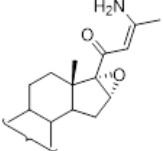
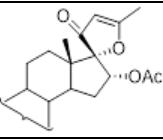
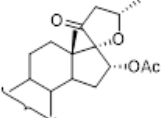
№ соединения / название	Структура	K_d , мкМ		
		HumCYP51	CglCYP51	CaCYP51
Нонаол		нет ответа	нет ответа	$0,16 \pm 0,01$
Хенрициозид Н1		$0,77 \pm 0,21$	нет ответа	$0,03 \pm 0,01$
Левискулозид G		$0,08 \pm 0,02$	$1,5 \pm 0,3$	нет ответа
Астеросапонин Р1		$0,03 \pm 0,01$	нет ответа	$1,88 \pm 0,03$
Октаол		нет ответа	$27,1 \pm 2,1$	$1,05 \pm 0,12$
Дистоластериозид D1		нет ответа	$5,1 \pm 1,0$	$3,29 \pm 0,38$
Торнастерозид А		нет ответа	$14,4 \pm 2,8$	$0,61 \pm 0,05$

Примечание: нет ответа – нет спектральных изменений при добавлении лиганда к раствору CYP51.

Таким образом, данная функционализация стероидов не может быть использована при разработке селективных модуляторов активности CYP51 патогенных грибов. Октаол, дистоластериозид D1 и торнастерозид А демонстрировали связывание с CglCYP51 и мутантной формой CaCYP51. При этом данные соединения не связываются с активным центром HumCYP51. Это позволяет рассматривать данные производные стероидов в качестве новых соединений для создания селективных ингибиторов CYP51 патогенных грибов и при этом обладающих минимальным действием на ортологический белок человека. В лаборатории физико-химических методов исследования Института биоорганической химии НАН Беларуси синтезированы структурные аналоги стероидных 17-изоксазолов и изоксазолинов (с фурановыми, изоксазольными, тетрагидрофурановыми кольцами и енаминокарбонильной функционализацией в боковой цепи). Оксигенированные 17-изоксазолилстероиды и продукты их превращений были протестированы на CYP51 человека и CYP51 *C.glabrata*. Соединения **14a** и **15a** (таблица 4) проявляют высокую селективность и эффективность ($K_d = 2,9 \pm 0,5$ мкМ и $5,2 \pm 0,7$ мкМ, соответственно) по отношению к CYP51 патогенных грибов. Отсутствие сродства соединений **14a** и **15a** к активному центру CYP51 человека дает возможность рассматривать эту группу лигандов как перспективную для разработки противогрибковых препаратов нового поколения, эффективных против азол-резистентных штаммов патогенных грибов.

В сотрудничестве с Институтом биомедицинской химии РАН нами осуществлен дизайн, синтез и анализ олигонуклеотидов, связывающих CYP51A1 человека в качестве мишени. Определение аффинности синтезированных олигонуклеотидов к CYP51, которая была проведена с использованием ППР-анализа, показала высокое сродство данных аптамеров к CYP51. Аффинность (K_{dapp}) олигонуклеотидов к CYP51A1 – от 140 нМ до 1,3 мкМ. Показано, что данные олигонуклеотиды не способны взаимодействовать с другими компонентами микросомальной монооксигеназной системы (НАДФН-цитохром P450 редуктазой, цитохромом b_5) и с основными белками плазмы крови (сывороточный альбумин и тромбин). При этом, данные олигонуклеотиды могут связываться с CYP3A4 (гомология CYP3A4 и CYP51A1) ~ 20% с близкими по уровню показателями аффинности. Следует при этом отметить, что существует один участок, имеющий относительную гомологию поверхности для большинства микросомальных CYP – область связывания с редокс-партнером. В перспективе, олигонуклеотиды, специфичные в отношении области связывания CYP с редокс-партнерами, могут быть использованы для модуляции белок-белковых взаимодействий в CYP-зависимых системах, таким образом влияя на каталитическую активность терминальных монооксигеназ.

Таблица 4 – Кажущиеся значения констант диссоциации (K_d) комплексов исследованных синтетических соединений с HsCYP51, CglCYP51 и CkrCYP51

Соединение	Структура	K_d , мкМ HsCYP51	K_d , мкМ CglCYP51
2b		$1,50 \pm 0,23$	нет ответа
4a		$1,06 \pm 0,48$	нет ответа
6a-2		$3,28 \pm 0,35$	нет ответа
7a		$1,98 \pm 0,43$	нет ответа
13a		$3,20 \pm 0,38$	нет ответа
14a		нет ответа	$2,9 \pm 0,5$
15a		нет ответа	$5,2 \pm 0,7$
16a-2		$2,20 \pm 0,23$	нет ответа
19a-2		$0,87 \pm 0,11$	нет ответа

Примечание: нет ответа – нет спектральных изменений при добавлении лиганда к раствору CYP51.

3.4 Взаимодействие стероид-гидроксилаз с белками-партнерами

С целью изучения механизмов, лежащих в основе молекулярных взаимодействий между компонентами стероид-гидроксилазных систем, проведено определение параметров белок-белковых взаимодействий между

компонентами СYP-зависимой митохондриальной (mit) и микросомальной (mic) монооксигеназной систем (рисунок 4) с использованием 12 различных изоформ СYP и двух редокс-партнеров: НАДФН-зависимой цитохром Р450 редуктазы (CPR) и аденодоксина (Adx).

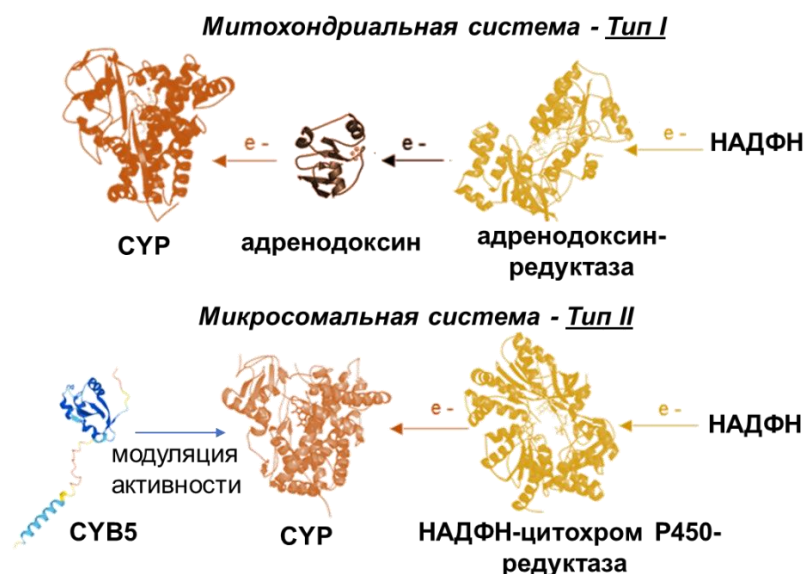


Рисунок 4 – СYP-зависимые системы млекопитающих

Проведен сравнительный анализ сродства, термодинамики, ферментативной активности и способности к одноэлектронному восстановлению. Исследование белок-белковых взаимодействий с целью определения равновесных констант диссоциации (K_d) проводили с помощью метода ППР (таблица 5). Комплексные исследования показали, что CPR и Adx взаимодействуют как с micCYP, так и с mitCYP, с разным сродством (значения K_d варьировались от 0,01 до 2 мкм). Все комплексы микросомального (micCYP) и митохондриального (mitCYP) СYP с редокс-партнерами можно разделить на три группы в зависимости от преобладающей роли энтальпийного или энтропийного вклада (таблица 6). Около 90% партнерских комплексов СYP/редокс были энтропийно-управляемыми, тогда как вклад энтальпии и энтропии значительно различался в случае комплексов mitCYP/Adx. Комплекс CYP11A1/Adx управляется энтальпией, тогда как комплексы CYP11B1/Adx и CYP11B2/Adx управляются энтропией.

Термодинамическая дискриминация комплексов mitCYPs/Adx, вероятно, связана с различным функциональным влиянием CYP11A1 и CYP11B. Исключением был энтальпийно-энтропийный комплекс CYP21A2/Adx. CPR и Adx способны передавать первый электрон micCYP, в то время как mitCYP продемонстрировали высокую специфичность к Adx. Каталитическая активность mitCYPs наблюдается только в присутствии пары Adx/AdR, тогда как в случае стероидогенных micCYP (CYP17A1, CYP19A1 и CYP21A2) он обнаруживается либо в присутствии CPR, либо пары Adx/AdR.

Таблица 5 – Константы равновесной диссоциации (Kd) для взаимодействия СУР/редокс-партнеров и функциональная характеристика СУР

Кажущееся значение равновесной константы диссоциации (Kd), мкМ					Перенос первого электрона		Каталитическая активность	
СУР	ADX	CPR	СУБ5А	СУБ5В	Adx/AdR	CPR	Adx/AdR, мин ⁻¹	CPR, мин ⁻¹
Микросомальные СУР								
СУР3А4	0,25±0,01	1,50±0,04	0,35±0,04	0,30±0,03	+	+	-	4,25
СУР3А5	0,55±0,03	0,70±0,04	4,8±0,4	0,50±0,04	+	+	-	0,30
СУР51	0,45±0,03	0,30±0,05	75,3±6,8	103,0±18,7	-	+	-	0,01
СУР2С9	0,70±0,05	0,10±0,02	н/о	н/о	+	+	-	5,25
СУР17А1	0,010±0,003	1,80±0,06	0,40±0,03	н/о	+	+	0,30	1,70
СУР1В1	0,010±0,003	0,020±0,005	0,01±0,001	0,04±0,005	+	+	-	0,05
СУР19А1	0,020±0,001	0,11±0,02	н/д	н/д	+	+	0,07	4,23
СУР21А2	0,10±0,02	0,090±0,002	н/д	н/д	+	+	39,6	18,60
СУР2С19	0,030±0,004	0,25±0,03	н/д	н/д	+	+	-	4,70
Митохондриальные СУР								
СУР11А1	0,010±0,001	0,30±0,02	н/о	0,50±0,02	+	-	3,26	-
СУР11В1	0,080±0,004	0,30±0,01	н/о	0,50±0,03	+	-	4,00	-
СУР11В2	0,040±0,004	0,50±0,03	н/о	0,190±0,003	+	-	2,76	-
СУР-зависимая изомераза								
СУР5А1	н/о	н/о	н/о	н/о	н/д	н/д	н/д	н/д

Примечание: н/о – образование комплекса не обнаруживалось; н/д – анализ не проводился. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение трёх независимых экспериментов, активность фермента выражена в мин⁻¹ – нмоль образующегося продукта/нмоль фермента/мин.

Таблица 6 – Значения ΔG , ΔH и $-T\Delta S$ для белок-белковых комплексов CYP с CPR и Adx

Белковая пара	CPR			Adx		
	ΔG (ккал/моль)	ΔH (ккал/моль)	$-T\Delta S$ (ккал/моль)	ΔG (ккал/моль)	ΔH (ккал/моль)	$-T\Delta S$ (ккал/моль)
CYP3A4	-7,9±0,2	27±3	-34±5	-9,1±0,3	22±3	-31±5
CYP3A5	-8,4±0,2	45±5	-53±8	-8,5±0,4	25±3	-33±5
CYP51A1	-8,8±0,7	26±3	-35±5	-8,7±0,3	34±4	-43±6
CYP17A1	-7,8±0,3	38±3	-46±6	-10,8±0,9	12±1	-23±3
CYP2C9	-9,3±0,5	42±4	-51±7	-8,1±0,5	48±5	-56±8
CYP2C19	9,0±0,8	16±2	-25±3	-10,3±2	18,6±2	-29±4
CYP19A1	-9,5±0,7	26±3	-36±4	-10,4±1,2	15,1±1,4	-25±2
CYP21A2	-9,6±0,4	11±1	-21±2	-9,5±0,8	-7,6±0,6	-1,90±0,02
CYP1B1	-10,5±0,9	39±4	-49±5	-10,8±0,8	46±5	-57±6
CYP11A1	-8,9±0,8	49±6	-58±7	-10,8±0,7	-22±3	11±1
CYP11B2	-8,6±0,4	24±4	-33±3	-10,3±0,5	-3,7±0,4	-6,6±0,7
CYP11B1	-8,9±0,3	18±3	-27±3	-9,6±0,4	-1,9±0,2	-7,8±0,8

Примечание: данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

С эволюционной точки зрения система транспорта электронов типа I (mitCYPs, Adx и AdR) существенно повышают специализацию белок-белковых взаимодействий, что сопровождается повышением специфичности переноса электрона. Напротив, эволюция системы транспорта электронов типа II (micCYP и CPR) приводит к увеличению универсальности белок-белковых взаимодействий. При этом следует отметить, что CPR теряет способность поддерживать CYP-зависимые реакции при удалении гидрофобного мембран-связанного домена. Полученные данные расширяют современное понимание молекулярного распознавания и обобщают качественные и термодинамические характеристики белок-белковых взаимодействий в CYP-зависимых митохондриальных и микросомальных монооксигеназных системах.

3.5 Взаимодействие стероид-гидроксилаз с аллостерическими белковыми регуляторами

Помимо редокс-партнеров CYP в регуляции активности цитохром CYP-зависимых стероид-гидроксилаз принимают участие белковые модуляторы (рисунок 4). Одним из наиболее известных модуляторов стероид-гидроксилаз является цитохром b_5 (CYB5). У человека обнаружены две основные изоформы мембран-связанного CYB5: один локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (тип CYB5A), другой во внешней мембране митохондрий (тип

CYB5B). В эритроцитах обнаружен цитозольный вариант CYB5 (не содержащий трансмембранного участка – продукт сплайсинга гена CYB5A). Основная биологическая функция цитозольной формы CYB5 – метгемоглобин-редуктазная активность в эритроцитах. Впервые получен и охарактеризован близкий структурный гомолог мембран-связанной формы CYB5 – PGMRC1 (Progesterone receptor membrane component-1 или IZA, Inner Zona Antigen). Данный белок впервые идентифицирован в микросомальной фракции коры надпочечников. В связи с чем предполагалось, что он также участвует в регуляции активности стероид-гидроксилаз. Нами показано, что PGMRC1 является гемопротеином. Для данного гемопротеина оценено модулирующее действие на CYP-зависимые системы.

В рамках комплексных исследований влияния модуляторов на активность стероид-гидроксилаз проведен анализ активности CYP17, CYP3A4, CYP51, CYP19, CYP21 и различных полиморфных вариантов CYP2C9 в присутствии различных изоформ CYB5, а также PGMRC1. Цитозольная форма CYB5 и PGMRC1 не способны модулировать активность данных стероид-гидроксилаз. CYB5A оказывает стимулирующее действие на 17,20-стероид-лиазную активность CYP17 из различных организмов, а также на стероид-гидроксилазную активность CYP3A4. При этом, уровень стимуляции активности зависит от соотношения CYP/CYB5A. Избыток CYB5A в реакционной среде может приводить к ингибированию активности CYP.

С целью понимания молекулярных механизмов взаимодействия стероид-гидроксилаз с модуляторами активности исследованы термодинамические параметры парных взаимодействий между CYP млекопитающих и CYB5 с помощью метода ППР. Анализ 18 пар комплексов CYB5-CYP, образованных девятью различными изоформами CYP млекопитающих и двумя изоформами CYB5, показал, что термодинамически эти комплексы можно разделить на энтальпийно-управляемые и энтропийно-управляемые группы (таблица 7). Образование энтальпийно-управляемых комплексов наблюдается в случае *mic*CYP, аллостерически регулируемых CYB5 (CYB5A-CYP3A4, CYB5A-CYP3A5, CYB5A-CYP17A1). Энтропийно-управляемые комплексы образовывались, когда CYB5 не влиял на активность CYP (CYB5A-CYP51A1, CYB5A-CYP1B1, CYB5B-CYP11A1). Результаты исследования позволяют предположить, что такие взаимодействия, определяющие кластеризацию белков, косвенно связаны с функционированием монооксигеназ. Положительные значения ΔH , характерные для таких взаимодействий, могут быть связаны со смещением сольватных оболочек белков при кластеризации. Таким образом, образование комплекса CYB5-CYP, сопровождающееся аллостерической регуляцией активности CYP с помощью CYB5, зависит от энтальпии.

Таблица 7 – Значения равновесных констант диссоциации (K_d , при 25°C), изменения свободной энергии Гиббса (ΔG), энтальпии (ΔH) и энтропии ($-T\Delta S$) при парном комплексообразовании девяти изоформ СУР млекопитающих с двумя изоформами СУВ5 человека

Комплекс СУВ5-СУР	K_d (мкМ)	ΔG (ккал/моль)	ΔH (ккал/моль)	$-T\Delta S$ (ккал/моль)
СУВ5А-СУР3А4	0,35±0,04	-8,8±0,6	-39,7±4,0	30,7±4,6
СУВ5В-СУР3А4	0,30±0,03	-8,9±0,8	-30,7±3,8	21,3±3,2
СУВ5А-СУР3А5	4,8±0,4	-7,2±0,2	-27,0±1,8	19,8±2,9
СУВ5В-СУР3А5	0,50±0,04	-8,6±0,2	-17,3±1,8	8,7±1,3
СУВ5А-СУР51А1	75,3±6,8	-5,6±0,8	76,6±9,5	-82,3±12,3
СУВ5В-СУР51А1	103,0±18,7	-5,4±0,8	32,1±3,8	-37,6±5,6
СУВ5А-СУР2С9	н/о	н/о	н/о	н/о
СУВ5В-СУР2С9	н/о	н/о	н/о	н/о
СУВ5А-СУР17А1	0,4±0,03	-8,8±0,7	-15,3±2,5	6,5±0,8
СУВ5В-СУР17А1	н/о	н/о	н/о	н/о
СУВ5А-СУР11А1	н/о	н/о	н/о	н/о
СУВ5В-СУР11А1	0,50±0,02	-8,5±0,5	38,2±4,3	-46,7±5,8
СУВ5А-СУР11В1	н/о	н/о	н/о	н/о
СУВ5В-СУР11В1	0,50±0,03	-8,6±0,3	9,6±1,4	-18,1±3,2
СУВ5А-СУР11В2	н/о	н/о	н/о	н/о
СУВ5В-СУР11В2	0,19±0,003	-9,2±0,4	61,3±6,4	-70,5±6,7
СУВ5А-СУР1В1	0,01±0,001	-10,8±1,2	8,9±0,9	-19,7±2,2
СУВ5В-СУР1В1	0,04±0,005	-10,0±1,1	16,6±1,9	-26,6±2,3

Примечание: н/о – образование комплекса не обнаруживалось. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

Проведенные исследования позволили сравнить в одной аналитической системе множество СУР млекопитающих, что обеспечивает комплексный анализ взаимодействия различных СУР с белками-партнёрами.

В рамках исследования действия СУВ5А на СУР проведен анализ влияния данного гемопротейна на три основные полиморфные формы СУР2С9: СУР2С9*1, СУР2С9*2 и СУР2С9*3. Добавление СУВ5А к *in vitro* реконструированной системе не влияет на активность СУР2С9*1 и СУР2С9*2, но при этом приводит к значительному снижению активности СУР2С9*3.

Полученные данные позволили подтвердить взаимосвязь генетического полиморфизма CYP2C9 с эффективностью метаболизма лекарственных средств. Это позволило применить полученные знания в области клинической лабораторной диагностики в психиатрии. В рамках выполнения исследований было подготовлено учебно-методическое пособие «Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования у пациентов с психическими и поведенческими расстройствами при назначении психотропных лекарственных средств» и инструкция по применению «Метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9: инструкция по применению № 097-1117».

3.6 Участие стероид-гидроксилаз и стероид-дегидрогеназ *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов

Секвенирование генома *M. tuberculosis* показало относительно большое количество генов (20), кодирующих CYP (микобактерии являются одними из лидеров по удельному содержанию генов CYP на геном). При этом следует отметить высокую консервативность последовательностей отдельных CYP, как в ряду патогенных микобактерий, так и в ряду резистентных штаммов *M. tuberculosis* (собственные исследования совместно с NIH NIAID в рамках проекта TB-portal). В рамках комплексных работ проведены функциональные, структурные и биоинформационные исследования ферментов *M. tuberculosis* (CYP125 (Rv3545c), CYP142 (Rv3518c), CYP124 (Rv2266) и 3 β HSD (Rv1106c)) (таблица 8 и 9).

Таблица 8 – Каталитическая активность (нмоль продукта/нмоль 3 β HSD/мин, мин⁻¹) рекомбинантной 3 β HSD *M. tuberculosis* в отношении производных стероидов

Субстрат	Каталитическая активность
Холестерин	0,129±0,004
25-Гидроксихолестерин (25ОНС)	0,218±0,002
7 β -Гидроксихолестерин (7 β ОНС)	0,69±0,01
25-Гидрокси-7-дегидрохолестерин	1,31±0,08
7-Кетохолестерин (7ketoC)	0,06±0,03
7-Кето-25-гидроксихолестерин (7keto,25ОНС)	н/д
7,25-Дигидроксихолестерин (7 α ,25diОНС)	1,09±0,10
17 α -Гидрокси-прегненолон (17P5)	0,169±0,002
Дегидроэпиандростерон (DHEA)	0,36±0,07
5-Андростен-3 β ,17 β -диол	0,053±0,004

Примечание: н/д – не детектируется образование продукта.

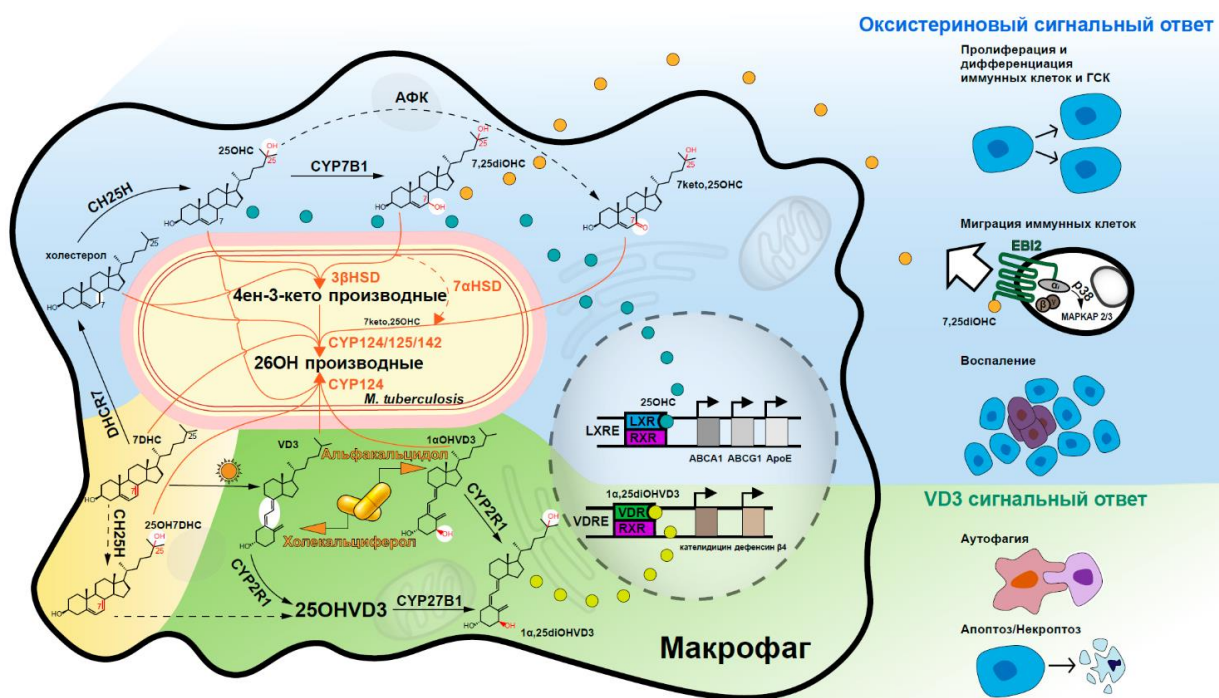
Таблица 9 – Каталитическая активность (нмоль продукта/нмоль СУР/мин, мин⁻¹) рекомбинантных ферментов *M. tuberculosis* (СУР124, СУР125 и СУР142) в отношении производных стероидов

Субстрат	Каталитическая активность		
	СУР124/ Rv2266	СУР125/ Rv3545c	СУР142/ Rv3518c
25-гидроксистерин (25ОНС)	0,22±0,01	н/д	н/д
25-гидроксистерон (25ОНС-one)	1,78±0,03	0,26±0,01	0,25±0,01
Холестерин	1,44±0,10	4,4±0,3	2,8±0,7
Холестерон	13,1±1,0	4,6±1,6	8,3±1,3
7-дегидрохолестерин (7ДНС)	7,39±0,13*	5,1±1,3	1,98±0,04
25-гидрокси-7-дегидрохолестерин (25ОН7ДНС)	0,27±0,01	н/д	н/д
20S-гидроксистерин (20СОНС)	0,19±0,02*	н/д	н/д
7β-гидроксистерин (7βОНС-one)	14,5±2,0	23±3	н/д
7β-гидроксистерин (7βОНС)	0,80±0,03	0,90±0,01	н/д
7-кетохолестерон (7ketoC-one)	4,7±0,8*	3,92±0,06*	2,60±0,01*
7-кетохолестерин (7ketoC)	6,45±1,05	0,60±0,27	3,3±0,8
7-кето-25-гидроксистерин (7keto,25ОНС)	0,31±0,08	0,13±0,01	0,030±0,005
7-кето-25-гидрокси-холест-4-ен-3-он	0,87±0,03	0,43±0,01	0,090±0,003
Витамин D ₃ (VD ₃)	0,45±0,08	н/д	н/д
Витамин D ₂ (VD ₂)	н/д	н/д	н/д
1α-гидроксистерин D ₃ (1αОНVD ₃)	3,4±0,6	н/д	н/д
1α-гидроксистерин D ₂ (1αОНVD ₂)	0,25±0,11	0,10±0,02	н/д
25-гидроксистерин D ₃ (25ОНVD ₃)	н/д	н/д	н/д
1α,25-дигидроксистерин D ₃ (1α,25diОНVD ₃)	н/д	н/д	н/д

Примечания: *– в ходе катализа образуются 2 продукта, н/д – не детектируется образование продукта.

Данные ферменты проявляют каталитическую активность по отношению к нескольким важным иммуноактивным стероидам (рисунок 5). Так, показано, что 25-гидроксистерин (лиганд рецептора врожденной иммунной системы LXR1) и 7β-гидроксистерин (агонист орфанного рецептора RORα/γ, потенциально участвующий в регуляции метаболизма в организме человека и/или иммунном ответе) преобразуются 3βHSD (Rv1106c) в потенциально неактивную форму – 3-кетопроизводное, которое затем гидроксилируется СУР микобактерий (СУР124, СУР125 и СУР142). 7,25-Дигидроксистерин (лиганд рецептора EBI2, связанного с G-белком, участвующий в миграции иммунных клеток) также эффективно инактивируется Rv1106c. Установлено, что СУР124 обладает чрезвычайно широкой способностью метаболизировать:

а) производные витамина D, предшественники лигандов VDR-рецептора, который, как известно, индуцирует транскрипцию антимикробных пептидов; б) производные оксистероинов, включая 20S-гидроксихолестерин (лиганд SMO рецептора в составе сигнального пути Hedgehog, который также активируется в ответ на патогены, включая микобактерии); в) 7-дегидро-25-гидроксихолестерин, который может выступать в качестве предшественника ключевых иммунных стероидов, включая как оксистероины, так и производные витамина D. Структуры высокого разрешения демонстрируют общие закономерности связывания стероидов и выявляют место окислительной атаки во время катализа.



Синий фон – оксистероидный путь; желтый фон – путь $\Delta 5,7$ -стероидов; зеленый фон – витамин D зависимый путь.

Рисунок 5 – Предполагаемый метаболизм иммуноактивных стероидов ферментами *M. tuberculosis*

In vitro экспериментальные данные по установлению роли CYP *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов подтверждены установлением метаболизма ведущего иммуностероида 25-гидроксихолестерина клетками *M. tuberculosis*. Также в рамках исследований проведен анализ антимикобактериального действия нового поколения ингибиторов CYP в культуре клеток *M. tuberculosis*, в макрофагальной инфекционной системе и *in vivo* модели. В целом, эволюционно консервативные ферменты *M. tuberculosis*, 3β HSD (конститутивно-экспрессирующаяся в клетках *M. tuberculosis*) и стероид-метаболизирующие CYP (экспрессия ферментов индуцируется на начальных стадиях микобактериальной инфекции) метаболизируют различные иммунные

оксистерины и секостероиды, тем самым оказывают влияние на широкий спектр сигнальных путей хозяина.

Полученные результаты способствуют пониманию молекулярных механизмов подавления иммунитета человека клетками микобактерий (рисунок 5) и позволяют предположить, что *M. tuberculosis* имеет свою собственную систему трансформации, являющуюся функциональным аналогом системы метаболизма ксенобиотиков I фазы человека и животных. Полученные результаты являются заделом для дальнейшего поиска уникальных и специфических функций ферментов семейства цитохромов P450, обуславливающих жизнеспособность и вирулентность патогенной микобактерии, которые могут быть использованы в качестве мишеней для антибактериальной терапии, либо могут быть использованы на доклиническом этапе при исследовании потенциального метаболизма вновь создаваемых лекарственных средств ферментами микобактерий. Установление структуры и функций данных белков позволит более полно понять механизмы устойчивости микобактерий к действию иммунной системы человека, расширить наши знания о факторах патогенности и выявить ряд принципиально новых специфических белков-мишеней микобактерий для создания новых лекарственных средств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты исследования:

1. Установлена субстратная специфичность стероид-гидроксилаз млекопитающих: молекулярная эволюция CYP17 в отношении субстратной специфичности для стероид-17,20-лиазной реакции, а также взаимосвязь данного фермента с регуляцией аллостерическими белковыми факторами. Впервые показано участие CYP17 в активации прокарциногенов. Полученные знания в совокупности необходимы для понимания патогенеза онкологических и эндокринных заболеваний и разработки новых систем диагностики [2-А; 4-А; 9-А; 10-А; 12-А; 13-А; 14-А].

2. Впервые установлено каталитическое превращение 5,7-диен стероидов отдельными ферментами: каталитическое превращение 7-дегидрохолестерина с участием CYP11A1 с образованием 7-дегидропрегненолона; каталитическое превращение 7-дегидропрегненолона с участием CYP17A1 с образованием 17 α -гидрокси-7-дегидропрегненолона и 7-дегидропроизводного дегидроэпиандростерона, а также субстратная специфичность CYP11A1 в отношении секостероидов. Полученные знания в совокупности необходимы для понимания патогенеза заболеваний, вызванных недостаточностью 7-дегидрохолестерин редуктазы, роли 5,7-диен стероидов в сигнальных процессах в организме человека, установления новых природных производных секостероидов, а также для создания эффективной системы детекции продуктов ферментативных реакций, катализируемых CYP11A1 и CYP17A1, с

использованием в качестве субстратов 3 β -гидрокси-5-ен-стероидов [3-A; 10-A; 13-A; 14-A].

3. Проведен анализ молекулярной эволюции CYP51 в ряду прокариот и эукариот. Экспериментально установлены мутации резистентных к действию противогрибковых препаратов азолового ряда CYP51 штаммов (изолятов клинического материала ряда белорусских клиник) – *Candida albicans* (K179E, L224I, G307C, M372T) и *Candida glabrata* (S440C, G450D). На основе проведенного анализа установлена взаимосвязь мутаций CYP51 с развитием у патогенных грибов резистентности к противогрибковым препаратам азолового ряда. Проведен анализ взаимодействия противогрибковых соединений азолового ряда с активным центром CYP51 *Candida albicans* (азол-резистентного штамма), *Candida glabrata*, *Candida krusei*. Показано, что комплекс мутаций K179E, L224I, G307C, M372T CYP51 *Candida albicans* обуславливают снижение аффинности фермента к наиболее используемым в клинической практике противогрибковым соединениям азолового ряда, подтверждая стохастичность процесса формирования резистентности. При этом, было доказано, что резистентность *Candida glabrata* и *Candida krusei* к противогрибковым препаратам азолового ряда обусловлена не особенностями структуры CYP51 данных микроорганизмов. С использованием полученных знаний разработан и внедрен в клиническую практику алгоритм установления таксономической принадлежности патогенных штаммов грибов с применением комплексных методов клинической лабораторной диагностики [11-A; 28-A; 29-A; 30-A; 31-A; 32-A; 33-A; 34-A; 35-A].

4. Проведен анализ взаимодействия синтетических и природных производных стероидов с активным центром CYP51 *Candida albicans* (азол-резистентного штамма), *Candida glabrata*, *Candida krusei* и человека. Идентифицированы соединения, которые селективно связываются с CYP51 патогенных грибов – производные стероидов животного и растительного происхождения, а также синтезированные производные 19-норстероидов. Установлен факт специфического взаимодействия сконструированных олигонуклеотидных аптамеров и лютеолин-7,3'-дисульфата с поверхностью стероид-гидроксилаз. Полученные результаты в совокупности позволят использовать идентифицированные группы соединений для создания нового поколения высокоспецифичных модуляторов активности стероид-гидроксилаз [16-A; 17-A; 19-A; 21-A; 25-A; 27-A; 37-A].

5. Получены высокоочищенные препараты компонентов CYP-зависимых стероид-гидроксилазных систем человека и установлены молекулярные основы межмолекулярных взаимодействий стероид-гидроксилаз с редокс-белками: показана возможность участия адренодоксина в работе стероид-гидроксилаз эндоплазматического ретикулума, установлены кинетические и термодинамические параметры межмолекулярных взаимодействий стероид-

гидроксилаз с редокс-белками. Полученные данные в совокупности позволили определить молекулярные механизмы переноса электронов и определить специфичность белок-белковых взаимодействий в CYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах [5-А; 7-А; 8-А; 12-А; 23-А; 24-А; 39-А].

6. Установлены молекулярные основы действия CYP5 и PGRMC на стероид-гидроксилазы; определены кинетические и термодинамические параметры белок-белковых взаимодействий стероид-гидроксилаз с модуляторами активности. Полученные данные в совокупности позволили определить молекулярные механизмы аллостерической регуляции в CYP-зависимых стероид-гидроксилазных системах и применять полученные знания в области персонализированной медицины [1-А; 6-А; 15-А; 18-А; 22-А; 36-А; 39-А].

7. Впервые установлено участие стероид-гидроксилаз и 3 β -гидроксистероид дегидрогеназы *Mycobacterium tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов, а также в метаболизме 7-дегидрохолестерина и 25-гидрокси-7-дегидрохолестерина. Полученные знания в совокупности необходимы для понимания толерантности микобактерий к действию иммунной системы человека, а также для разработки инновационных терапевтических подходов для лечения пациентов с микобактериозами [20-А; 26-А; 38-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов:

Полученные препараты стероид-гидроксилаз человека и патогенных микроорганизмов могут быть использованы при проведении комплексного структурно-функционального анализа фармацевтически значимых ферментов с целью создания новых терапевтических средств, а также разработки комплексных систем диагностики и терапии заболеваний, ассоциированных со стероид-гидроксилазами.

Идентифицированные лиганды стероид-гидроксилаз могут быть использованы для создания специфических модуляторов межмолекулярных взаимодействий фармацевтически значимых стероид-гидроксилаз.

Разработанный в ходе выполнения исследований метод и утвержденные Министерством здравоохранения РБ инструкции по применению метода «Метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9: инструкция по применению № 097-1117» используется врачами для выбора необходимого лекарственного средства и назначения его правильной дозировки.

Разработанный в ходе выполнения исследований алгоритм установления таксономической принадлежности патогенных штаммов грибов с применением комплексных методов клинической лабораторной диагностики «Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов: инструкция по применению № 008-1119» внедрен в клиническую практику при лечении пациентов с онкогематологическими заболеваниями.

Работы, подтверждающие практическую значимость результатов диссертации:

Учебно-методическое издание

Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования у пациентов с психическими и поведенческими расстройствами при назначении психотропных лекарственных средств: учеб.-метод. пособие / Т. В. Докукина, **А. А. Гилеп**, А. И. Старцев, Т. С. Голубева, М. В. Махров, И. В. Гайдукевич, С. А. Марчук, Е. А. Шеремет, А. С. Пинчук, А. В. Роменский, К. С. Жаранков. – Минск: Мисанта, 2016. – 56 с.

Инструкции по применению

Метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9: инструкция по применению № 097-1117: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 01.12.2017 г. / сост. Т. В. Докукина, **А. А. Гилеп**, Т. С. Голубева, М. В. Махров, И. В. Гайдукевич, С. А. Марчук, Е. А. Шеремет. – Минск: РНПЦ психического здоровья, 2017. – 10 с.

Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов: инструкция по применению № 008-1119 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 20.12.2019 г. / сост. С. А. Усанов, **А. А. Гилеп**, М. В. Белевцев, Т. В. Шкель, Т. Е. Секацкая, Т. Т. Кульбицкая, С. Л. Кондаурова, Т. В. Райко, Е. Я. Скоповец. – Минск: Институт биоорганической химии НАН Беларуси; РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, 2019. – 17 с.

Научно-техническая документация

Опытно-промышленный регламент № ОПР-04/2021 на производство препарата ферментного «Рекомбинантный цитохром CYP51 грибов» / **А. А. Гилеп**, Н. П. Башко, Т. В. Шкель, И. П. Грабовец // Институт биоорганической химии НАН Беларуси – Минск, 2021. – 31 с.

Лабораторный технологический регламент на изготовление ферментного препарата цитохрома P450 2C9 (изоформы *1, *2, *3) человека и методические рекомендации по определению взаимодействия данных ферментов с ингибиторами №6/2015 / **А. А. Гилеп**, И. В. Гайдукевич, С. А. Усанов// Институт биоорганической химии НАН Беларуси – Минск, 2015. – 21 с.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1-А. Apo-cytochrome b5 as an indicator of changes in heme accessibility: preliminary studies with cytochrome P450 3A4 / **A. A. Gilep**, O. L. Guryev, S. A. Usanov, R. W. Estabrook // J. Inorg. Biochem. – 2001. – Vol. 87, No. 4 – P. 237–244.

2-А. Molecular cloning and heterologous expression in E. coli of cytochrome P45017alpha. Comparison of structural and functional properties of substrate-specific

cytochromes P450 from different species / **A. A. Gilep**, R. W. Estabrook, S. A. Usanov // Biochemistry (Mosc). – 2003. – Vol. 68, No. 1. – P. 86–98.

3-A. A pathway for the metabolism of vitamin D3: unique hydroxylated metabolites formed during catalysis with cytochrome P450_{sc} (CYP11A1) / O. Guryev, R. A. Carvalho, S. Usanov, **A. Gilep**, R. W. Estabrook // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100, No. 25. – P. 14754–14759.

4-A. Chimero-genesis in estimation of specificity and pathway directions for cytochrome P450_{17α} catalyzed reactions / **A. A. Gilep**, R. W. Estabrook, S. A. Usanov // Biochemistry (Mosc). – 2004. – Vol. 69, No. 4. – P. 364–375. PMID: 15170370.

5-A. Engineering of proteolytically stable NADPH-cytochrome P450 reductase / T. A. Bonina, **A. A. Gilep**, R. W. Estabrook, S. A. Usanov // Biochemistry (Mosc) – 2005. – Vol. 70, No. 3. – P.357–365.

6-A. Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein / L. Min, N. V. Strushkevich, I. N. Harnastai, H. Iwamoto, **A. A. Gilep**, H. Takemori, S. A. Usanov, Y. Nonaka, H. Hori, G. P. Vinson, M. Okamoto // FEBS J. – 2005. – Vol. 272, No. 22. – P. 5832–5843.

7-A. The development of an efficient system for heterologous expression of cytochrome P450s in *Escherichia coli* using hemA gene co-expression / I. N. Harnastai, **A. A. Gilep**, S. A. Usanov // Protein Expr. Purif. – 2006. – Vol. 46, No. 1. – P. 47–55.

8-A. Adrenodoxin supports reactions catalyzed by microsomal steroidogenic cytochrome P450s / T. A. Pechurskaya, I. N. Harnastai, I. P. Grabovec, **A. A. Gilep**, S. A. Usanov // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2007. – Vol. 353, No. 3. – P. 598–604.

9-A. Engineering, expression, and purification of "soluble" human cytochrome P450_{17α} and its functional characterization / T. A. Pechurskaya, O. P. Lukashevich, **A. A. Gilep**, S. A. Usanov // Biochemistry (Mosc). – 2008. – Vol. 73, No. 7. – P. 806–811.

10-A. At the crossroads of steroid hormone biosynthesis: the role, substrate specificity and evolutionary development of CYP17 / **A. A. Gilep**, T. A. Sushko, S. A. Usanov // Biochim. Biophys. Acta. – 2011. – Vol. 1814, No. 1. – P. 200–209.

11-A. Молекулярное клонирование, экспрессия, очистка и определение лиганд-связывающих свойств цитохрома P450₅₁ *Candida albicans* / Т. В. Шкель, А. В. Василевская, **А. А. Гилеп**, М. А. Черновецкий, И. Г. Лукьяненко, С. А. Усанов // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 5. – С. 64–71.

12-A. Mechanism of intermolecular interactions of microsomal cytochrome P450s CYP17 and CYP21 involved in steroid hormone biosynthesis / T. A. Sushko, **A. A. Gilep**, S. A. Usanov // Biochemistry (Mosc). – 2012. – Vol.77, No. 6. – P. 585–592.

13-A. Role of microsomal steroid hydroxylases in Δ^7 -steroid biosynthesis / T. A. Sushko, **A. A. Gilep**, A. V. Yantsevich, S. A. Usanov // Biochemistry (Mosc). – 2013. – Vol. 78, No. 3. – P.282–289.

14-A. Genetics, structure, function, mode of actions and role in cancer development of CYP17 / T. A. Sushko, **A. A. Gilep**, S. A. Usanov // Anticancer Agents Med. Chem. – 2014. – Vol. 14, No. 1. – P. 66–76.

15-A. The role of cytochrome b5 structural domains in interaction with cytochromes P450 / G. V. Sergeev, **A. A. Gilep**, S. A. Usanov // Biochemistry (Mosc). – 2014. – Vol. 79, No. 5. – P. 406–416.

16-A. Поиск ингибиторов цитохрома P450(51) человека (CYP51A1): структурные аналоги ланостерола растительного и животного происхождения / О. В. Гнеденко, Н. В. Иванчина, А. А. Кича, **А. А. Гилеп**, Н. В. Струшкевич, Т. В. Шкель, М. А. Черновецкий, А. С. Иванов, А. В. Лисица, С. А. Усанов, В. А. Стоник, А. И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60, вып. 5. – С. 528–537.

17-A. Computer-aided design of aptamers for cytochrome P450 / D. S. Shcherbinin, O. V. Gnedenko, S. A. Khmeleva, S. A. Usanov, **A. A. Gilep**, A. V. Yantsevich, T. V. Shkel, I. V. Yushkevich, S. P. Radko, A. S. Ivanov, A. V. Veselovsky, A. I. Archakov // J. Struct. Biol. – 2015. – Vol. 191, No 2. – P. 112–119.

18-A. Thermodynamics of interactions between mammalian cytochromes P450 and b5 / E. Yablokov, A. Florinskaya, A. Medvedev, G. Sergeev, N. Strushkevich, A. Luschik, T. Shkel, I. Haidukevich, **A. Gilep**, S. Usanov, A. Ivanov // Arch. Biochem. Biophys. – 2017. – Vol. 619. – P. 10–15.

19-A. Structural Analogues of Lanosterol from Marine Organisms of the Class Asteroidea as Potential Inhibitors of Human and *Candida albicans* Lanosterol 14 α -demethylases / L. A. Kaluzhskiy, T. V. Shkel, N. V. Ivanchina, A. A. Kicha, I. P. Grabovec, **A. A. Gilep**, N. V. Strushkevich, M. A. Chernovetsky, A. E. Medvedev, S. A. Usanov, A. S. Ivanov // Nat. Prod. Commun. – 2017. – Vol. 12, No. 12. – P. 1843–1846.

20-A. Identification of Mycobacterium tuberculosis enzyme involved in vitamin D and 7-dehydrocholesterol metabolism / A. V. Vasilevskaya, A. V. Yantsevich, G. V. Sergeev, A. P. Lemish, S. A. Usanov, **A. A. Gilep** // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 2017. – Vol. 169. – P.202–209.

21-A. Белок-лигандные взаимодействия CYP51 *Candida glabrata* и CYP11B1 человека с 7-замещенными производными 19-нортестостеронов / Т. В. Шкель, И. П. Грабовец, **А. А. Гилеп**, Т. С. Варакса, Н. В. Струшкевич, В. И. Долгопалец, Ю. Г. Чернов // Известия НАН Беларуси. Серия химических наук. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 450–454.

22-A. Different inhibitory effects of azole-containing drugs and pesticides on CYP2C9 polymorphic forms: an in vitro study / I. V. Haidukevich, T. A. Sushko,

A. M. Tumilovich, I. P. Grabovec, S. A. Usanov, **A. A. Gilep** // Toxicol. in Vitro. – 2018. – Vol. 50. – P. 249–256.

23-A. A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners / E. O. Yablokov, T. A. Sushko, P. V. Ershov, A. V. Florinskaya, O. V. Gnedenko, T. V. Shkel, I. P. Grabovec, N. V. Strushkevich, L. A. Kaluzhskiy, S. A. Usanov, **A. A. Gilep**, A. S. Ivanov // Biochimie. – 2019. – Vol. 162. – P. 156–166.

24-A. SPR-Based study of affinity of cytochrome P450s / redox partners interactions modulated by steroidal substrates / P. V. Ershov, E. O. Yablokov, A. V. Florinskaya, Y. V. Mezentsev, L. A. Kaluzhskiy, A. M. Tumilovich, **A. A. Gilep**, S. A. Usanov, A. S. Ivanov // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2019. – Vol. 187. – P. 124–129.

25-A. Human Lanosterol 14-Alpha Demethylase (CYP51A1) Is a Putative Target for Natural Flavonoid Luteolin 7,3'-Disulfate / L. Kaluzhskiy, P. Ershov, E. Yablokov, T. Shkel, I. Grabovec, Y. Mezentsev, O. Gnedenko, S. Usanov, P. Shabunya, S. Fatykhava, A. Popov, A. Artyukov, O. Styshova, **A. Gilep**, N. Strushkevich, A. Ivanov // Molecules. – 2021. – Vol. 26, No. 8. – P. 2237.

26-A. Metabolic Fate of Human Immunoactive Sterols in Mycobacterium tuberculosis / T. Varaksa, S. Bukhdruker, I. Grabovec, E. Marin, A. Kavaleuski, A. Gusach, K. Kovalev, I. Maslov, A. Luginina, D. Zabelskii, R. Astashkin, M. Shevtsov, S. Smolskaya, A. Kavaleuskaya, P. Shabunya, A. Baranovsky, V. Dolgopalets, Y. Charnou, A. Savachka, R. Litvinovskaya, A. Hurski, E. Shevchenko, A. Rogachev, A. Mishin, V. Gordeliy, A. Gabrielian, D.E. Hurt, B. Nikonenko, K. Majorov, A. Apt, A. Rosenthal, **A. Gilep**, V. Borshchevskiy, N. Strushkevich // J. Mol. Biol. – 2021. – Vol. 433, No. 4. – P. 166763.

27-A. Transformations, NMR studies and biological testing of some 17 β -isoxazolyl steroids and their heterocyclic ring cleavage derivatives / A. Baranovsky, A. Ladyko, T. Shkel, S. Sokolov, N. Strushkevich, **A. Gilep** // Steroids. – 2021. – Vol. 166. – P. 108768.

28-A. Molecular Cloning, Heterologous Expression, Purification, and Evaluation of Protein-Ligand Interactions of CYP51 of *Candida krusei* Azole-Resistant Fungal Strain. / T. V. Tsybruk, L. A. Kaluzhskiy, Y. V. Mezentsev, T. N. Makarieva, K. M. Tabakmaher, N. V. Ivanchina, P. S. Dmitrenok, A. V. Baranovsky, **A. A. Gilep**, A. S. Ivanov // Biomedicines. – 2023. – Vol. 11, No. 11. – P. 2873.

Статьи в сборниках научных трудов:

29-A. Молекулярная диагностика патогенных грибов и разработка препаратов для лечения микозов / Т. В. Шкель, **А. А. Гилеп**, Н. В. Струшкевич, С. А. Усанов, М. А. Черновецкий, В. А. Стоник, Л. А. Калужский, А. С. Иванов // Биорегуляторы: исследование и применение. – 2014. – С. 249-261.

Тезисы докладов:

30-А. Molecular analysis of CYP51 of pathogenic fungi causing nosocomial infections (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida guilliermondii*) / Т. В. Шкель, А. В. Василевская, **А. А. Гилеп**, С. А. Усанов // Biodiversity & Biotechnology: 11th International Symposium on Cytochrome P450, 22-26 June 2012, Torino, Italy. – P. 67.

31-А. Шкель, Т.В. Молекулярный анализ, клонирование, экспрессия, очистка и определение лиганд-связывающих свойств СУР51 патогенных грибов отдела *Ascomycota*» / Т. В. Шкель, А. В. Василевская, **А. А. Гилеп** // Химия, структура и функция биомолекул: материалы IV междунар. науч. конф., Минск, 17-19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии, редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2012. – С. 239.

32-А. Структурно-функциональный анализ СУР51 патогенных грибов родов *Aspergillus* и *Candida*, являющихся причиной нозокомиальных инфекций / Т. В. Шкель, А. В. Василевская, **А. А. Гилеп**, С. А. Усанов // VI Российский симпозиум «Белки и пептиды»: Материалы симпозиума, Уфа Республики Башкортостан, 10-15 июня 2013 г. / ИСЭИ УНЦ РАН, редкол.: В. Т. Иванов [и др.]. – Уфа, 2013. – С. 249.

33-А. Молекулярный анализ СУР51 патогенных грибов родов *Aspergillus* и *Candida*, являющихся причиной нозокомиальных инфекций» / Т. В. Шкель, А. В. Василевская, **А. А. Гилеп**, С. А. Усанов // Успехи медицинской микологии: материалы конференции, Москва, 26 сентября 2013 г. / Национальная академия микологии, Ю.В. Сергеев (гл. ред) [и др.]. – Москва, 2013. – С. 59–60.

34-А. Структурно-функциональный анализ стерол-14 α -деметилаз из азол-резистентных штаммов патогенных грибов / Т. В. Шкель, Н. В. Струшкевич, Я. В. Диченко, С. А. Усанов, М. А. Черновецкий, Л. А. Калужский, Н. В. Иванчина, А. А. Кича, В. А. Стоник, А. С. Иванов, **А. А. Гилеп** // Успехи медицинской микологии: материалы VI Всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 8-10 апреля 2014 г. / Национальная академия микологии, Ю. В. Сергеев (гл. ред) [и др.]. – Москва, 2014. – Т.12. – С. 64–66.

35-А. Молекулярный анализ стерол-14 α -деметилаз патогенных грибов, вызывающих внутрибольничные инфекции / Т. В. Шкель, А. В. Василевская, С. А. Усанов, М. А. Черновецкий, И. Г. Лукьяненко, В. А. Стоник, Л. А. Калужский, А. С. Иванов, **А. А. Гилеп** // Химия, структура и функция биомолекул: материалы V междунар. науч. конф., Минск, 4-6 июня 2014 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси, редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 204–205.

36-А. Endocrine disorders and psychiatry: drug discovery and pharmacogenomics/ **А. А. Гилеп**, I. V. Haidukevich, N. V. Strushkevich, V. A. Kopats, M. V. Machrov, T. V. Dokukina, S. A. Usanov// Proceedings of the 10th

Jubilee East–West Immunogenetics Conference, Wrocław, April 21-23, 2016 / Arch. Immunol. Ther. Exp., Vol 64 (Suppl 1) – Wrocław, 2016. – P. 3-4.

37-A. Исследование взаимодействия структурных аналогов ланостерола со стерин-14 α -деметилазой патогенных грибов, вызывающих внутрибольничные инфекции / Т. В. Шкель, Л. А. Калужский, **А. А. Гилеп**, С. А. Усанов, М. А. Черновецкий // Материалы международного конгресса: Биотехнология: состояние и перспективы развития, Москва, 20-22 февраля 2017 г. / ООО «РЭД ГРУПП». – Москва, 2017. – Т.2. – С. 575–576.

38-A. Mycobacterium tuberculosis CYPome: functional genomics and redox-partners interactions / **A. Gilep** // Biodiversity & Biotechnology: 15th International Symposium on Cytochrome P450, June 23-27, 2024, Copenhagen, Denmark. – P. 34.

39-A. Molecular interactomics of CYPs with other enzymes / **A. Gilep**, I. Grabovec, A. Svirid, E. Yablokov, L. Kaluzhskiy, A. Tumilovich, T. Sushko, A. Ivanov // Biodiversity & Biotechnology: 16th International Symposium on Cytochrome P450, June 23-27, 2024, Torino, Italy. – P. 34.



РЕЗЮМЕ

Гилеп Андрей Александрович

Молекулярная организация и новые биохимические функции стероид-гидроксилаз

Ключевые слова: стероид-гидроксилазы, оксистероиды, секостероиды, белок-белковые взаимодействия, стероидные гормоны.

Цель работы: исследование молекулярной эволюции и установление молекулярных механизмов работы стероид-гидроксилаз, включая субстратную специфичность, взаимодействия с белками партнерами, а также взаимодействия с модуляторами данных ферментативных систем.

Методы исследования: биохимические, молекулярно-биологические, хроматографические и биосенсорные методы, спектрофотометрический анализ, масс-спектрометрия, структурная биоинформатика.

Результаты работы и их новизна: разработан способ получения в препаративных количествах рекомбинантных белков, компонентов стероид-гидроксилаз человека и патогенных микроорганизмов и установлена их субстратная специфичность. Впервые установлено каталитическое превращение 5,7-диен-стероидов на уровне отдельных ферментов млекопитающих – CYP11A1 и CYP17. Установлены принципы молекулярной эволюции CYP17 и CYP51. Установлена взаимосвязь структуры CYP51 ряда патогенных грибов с развитием резистентности к антимикотикам азолового ряда. Идентифицированы лиганды CYP51 – потенциальных селективных ингибиторов стероид-гидроксилаз. Впервые проведен комплексный анализ параметров взаимодействия 12 стероид-гидроксилаз человека с белками партнерами. Обнаружено, что ряд микросомальных стероид-гидроксилаз человека могут поддерживать катализ с использованием митохондриальных редокс-партнеров CYP. Впервые установлена взаимосвязь полиморфизма CYP2C9 с клинически-значимым эффектом CYP5. Впервые установлено участие стероид-гидроксилаз и 3 β -стероид-дегидрогеназы *M. tuberculosis* в метаболизме иммуноактивных стероидов.

Рекомендации по использованию: полученные препараты стероид-гидроксилаз человека и патогенных микроорганизмов, а также идентифицированные лиганды стероид-гидроксилаз могут быть использованы в научно-исследовательской работе при проведении комплексного структурно-функционального анализа фармацевтически значимых ферментов с целью создания новых терапевтических средств. Разработанный в ходе выполнения исследований метод диагностики может использоваться врачами для персонализированной фармакотерапии.

РЭЗЮМЭ

Гілеп Андрэй Аляксандравіч

Малекулярная арганізацыя і новыя біяхімічныя функцыі стэроід-гідраксілаз

Ключавыя словы: стэроід-гідраксілазы, оксістэроіды, секастэроіды, бялок-бялковыя ўзаемадзеянні, стэроідныя гармоны.

Мэта даследвання: даследаванне малекулярнай эвалюцыі і ўсталяванне малекулярных механізмаў працы стэроідгідраксілаз, уключаючы субстратную спецыфічнасць, узаемадзеяння з бялковымі партнёрамі, а таксама ўзаемадзеяння з мадулятарамі дадзеных ферментатыўных сістэм.

Метады даследвання: біяхімічныя, малекулярна-біялагічныя, храматаграфічныя і біясенсарныя метады, спектрафотаметрычны аналіз, мас-спектраметрыя, структурная біяінфарматыка.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны спосаб атрымання ў прэпаратыўных колькасцях рэкамбінантных бялкоў, кампанентаў стэроідгідраксілаз чалавека і патагенных мікраарганізмаў і ўстаноўлена іх субстратная спецыфічнасць. Упершыню ўстаноўлена каталітычнае ператварэнне 5,7-дыен-стэроідаў на ўзроўні асобных ферментаў млекакормячых – CYP11A1 і CYP17. Устаноўлены прынцыпы малекулярнай эвалюцыі CYP17 і CYP51. Устаноўлена ўзаемасувязь структуры CYP51 шэрагу патагенных грыбоў з развіццём рэзістэнтнасці да антымікотык азалавага шэрагу. Ідэнтыфікаваны ліганды CYP51 – патэнцыйных селектыўных інгібітараў стэроідгідраксілаз. Упершыню праведзена комплексная ацэнка параметраў узаемадзеяння 12 стэроідгідраксілаз чалавека з бялковымі партнёрамі. Выяўлена, што шэраг мікрасамальных стэроідгідраксілаз чалавека могуць падтрымліваць каталіз з выкарыстаннем мітахандрыяльных рэдокс-партнёраў CYP. Упершыню выяўлена ўзаемасувязь палімарфізму CYP2C9 з клінічна-значным эфектам CYP5. Упершыню ўстаноўлен удзел стэроід-гідраксілаз і 3 β -стэроіддэгідрагеназы *Mycobacterium tuberculosis* у метабалізме імунаактыўных стэроідаў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя прэпараты стэроід-гідраксілаз чалавека і патагенных мікраарганізмаў, а таксама ідэнтыфікаваныя ліганды стэроід-гідраксілаз могуць быць выкарыстаны ў навукова-даследчай працы пры правядзенні комплекснага структурна-функцыянальнага аналізу фармацэўтычна значных ферментаў з мэтай стварэння новых тэрапеўтычных сродкаў. Распрацаваны падчас выкананняў даследаванняў метады дыягностыкі можа выкарыстоўвацца ўрачамі для персаналізаванай фармакатэрапіі.

SUMMARY

Gilep Andrei Aleksandrovich

Molecular organization and new biochemical functions of steroid hydroxylases

Keywords: steroid hydroxylases, oxysteroids, secosteroids, protein-protein interactions, steroid hormones.

Aim of the work: steroid hydroxylases of mammals and pathogenic microorganisms, oxysteroids, secosteroids, protein-protein interactions, steroid hormones.

Methods of the research: biochemical, molecular biological, chromatographic and biosensor methods, spectrophotometric analysis, mass spectrometry, structural bioinformatics.

Results and their novelty: a method has been developed for obtaining recombinant proteins, components of human steroid hydroxylases and pathogenic microorganisms in preparative quantities, and their substrate specificity has been established. For the first time, the metabolism of 5,7-diene steroids was established at the level of individual mammalian enzymes – CYP11A1 and CYP17. The principles of molecular evolution of CYP17 and CYP51 have been established. The relationship between the structure of CYP51 of a number of pathogenic fungi and the development of resistance to azole antimycotics has been established. CYP51 ligands, potential selective inhibitors of steroid hydroxylases, have been identified. For the first time, a comprehensive assessment of the parameters of interaction of 12 human steroid hydroxylases with partner proteins was carried out. It has been found that a number of human microsomal steroid hydroxylases can support catalysis using mitochondrial redox partners CYP. For the first time, the relationship between CYP2C9 polymorphism and the clinically significant effect of CYB5 has been established. For the first time, the participation of steroid hydroxylases and 3 β -steroid dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* in the metabolism of immunoactive steroids has been established.

Application guidelines: the resulting preparations of human and pathogenic microorganism steroid hydroxylases, as well as identified steroid hydroxylase ligands, can be used in research work when conducting a comprehensive structural and functional analysis of pharmaceutically significant enzymes in order to create new therapeutic agents. The diagnostic method developed during the research can be used by doctors for personalized pharmacotherapy.

Подписано в печать 14.05.2025.
Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 2,33. Тираж 60 экз. Заказ № 163.

ФТИ НАН Беларуси.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 2/12 от 21.11.2013.
220084, ул. Академика Купревича, 10, г. Минск.