

ОТ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА СТЕРОИДОВ К НОВЫМ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМ ТЕХНОЛОГИЯМ

© 2009 г. Л. А. НОВИКОВА^{1*}, Я. В. ФАЛЕТРОВ²,
И. Е. КОВАЛЕВА¹, Ш. МАУЕРСБЕРГЕР³,
В. Н. ЛУЗИКОВ¹, В. М. ШКУМАТОВ²

¹ *Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва;*

² *НИИ физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь;*

³ *Институт микробиологии, Технический университет Дрездена,
Дрезден, Германия*

I. Введение. II. Биосинтез стероидов. III. Реконструкция стероидтрансформирующих систем из индивидуальных белков. IV. Использование систем гетерологической экспрессии для изучения топогенеза цитохрома P450_{ssc}. V. Трансгенные микроорганизмы для биотехнологического получения стероидов. VI. Стероидтрансформирующие трансгенные микроорганизмы для фармакологических исследований. VII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Центральную роль в биосинтезе физиологически активных веществ (стероидов, витаминов группы D, желчных кислот и др.) и окислении ксенобиотиков играют ферментные системы с цитохромом

Принятые сокращения: P450_{ssc} – CYP11A1, цитохром P450 холестерингидроксилаза/20,22-лиаза; P450_{c17} – CYP17, цитохром P450 17 α -гидроксилаза/17,20-лиаза; P450_{c11} – CYP11B1, P450_{11 β} , цитохром P450 11 β -гидроксилаза; P450_{c18} – CYP11B2, цитохром P450 альдостеронсинтаза; P450_{c19} – CYP19, P450_{arom}, цитохром P450 ароматаза; P450_{c21} – CYP21, цитохром P450 21-гидроксилаза; CPR – NADPH-цитохром P450-редуктаза; Ad – адрендоксин, [2Fe-2S]-ферредоксин из коры надпочечников; AdR – FAD-содержащая NADPH-адрендоксинредуктаза; ГСД – гидроксистероиддегидрогеназа; СМЧ – субмитохондриальные частицы; ЭТС – (ферментная) электронтранспортная система; Fdc – бактериальный [2Fe-2S]-ферредоксин; Fld1 и Fld2 – бактериальные FMN-флаводоксины типов 1 и 2; FLDR – FAD-содержащая флаводоксин (ферредоксин)-оксидоредуктаза; SiR – NADPH-сульфитредуктаза.

Адрес для корреспонденции: novik@genebee.msu.su

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 05-04-48049а и № 08-04-00842а, гранта БРФИ Б04МС-030 и гранта INTAS СА 03-51-4366.

P450 в качестве терминальной оксидазы, осуществляющей регио- и стереоселективное гидроксирование молекул субстратов [1–3]. Широкое распространение, универсальность строения и ключевая роль в биосинтезе и метаболизме позволяют использовать эти системы для изучения ряда фундаментальных проблем современной биохимии, таких как: 1) регуляция биосинтеза физиологически активных веществ на тканевом, субклеточном и молекулярном уровнях; 2) принципы функционирования «многоцентровых» ферментов и систем, осуществляющих согласованные процессы электронного транспорта, взаимодействия с субстратами и активации молекулярного кислорода; 3) структурно-функциональные аспекты белок-белкового и белок-лигандного узнавания; 4) молекулярные механизмы филогенетического разнообразия путей биосинтеза и метаболизма.

Результаты исследований в области монооксигеназного катализа, накопленные за последние 30 лет, позволяют в настоящее время сформулировать ряд задач прикладного характера как реализованных, так и находящихся в стадии разработки. К ним относятся: 1) выявление генетических дефектов, приводящих к нарушению процесса биосинтеза гормонов и являющихся причиной ряда тяжелых заболеваний; 2) разработка экономически эффективных и экологически чистых методов регио- и стереоселективного ферментативного синтеза гормонов (химический синтез которых не эффективен, энергоемок, экологически опасен или вообще невозможен); 3) создание тест-систем на основе субстратспецифичных цитохромов P450 для использования при разработке и анализе новых противомикробных средств и модификаторов путей биосинтеза стероидов.

В обзоре представлены результаты исследований стероидтрансформирующих P450-монооксигеназ в области структурно-функциональной и молекулярной организации ферментных систем, особенностей топогенеза белков, субстратной специфичности, взаимозаменяемости электронтранспортных белков млекопитающих и микроорганизмов. Эти данные служат основой развития новых подходов, имеющих целью реконструкцию монооксигеназных систем в клетках микроорганизмов для создания метаболических аналогов стероид-синтезирующих органов млекопитающих.

II. БИОСИНТЕЗ СТЕРОИДОВ

ПУТИ БИОСИНТЕЗА СТЕРОИДОВ

Биосинтез стероидных гормонов из холестерина в организме млекопитающих включает окислительное расщепление боковой цепи холестерина с последующим регио- и стереоселективным гидроксированием, которое осуществляется цитохромами P450 – P450_{scc}, P450_{c17}, P450_{c21}, P450_{c11}, P450_{c18} и P450_{c19} [1, 3–5].

При биосинтезе стероидов четко выражен принцип компартментализации. В коре надпочечников цитохромы P450_{scc}, P450_{c18} и P450_{c11} функционируют в митохондриях вместе с FAD-содержащим флавопротеидом аденодоксинредуктазой, (AdR) и [2Fe-2S]-ферредоксином (аденодоксином, Ad). Цитохромы P450_{c21} и P450_{c17} осуществляют гидроксирование стероидов в эндоплазматическом ретикулеуме совместно с FAD/FMN-флавопротеидом NADPH-цитохром P450 редуктазой (CPR). В эндоплазматическом ретикулеуме половых желез женских особей дополнительно функционирует ароматаза (P450_{c19}).

Этапом, лимитирующим скорость стероидогенеза, является доставка холестерина к внутренней мембране митохондрий. Процесс доставки холестерина в митохондрии и факторы, контролирующие этот процесс, подробно описаны в обзоре [6].

В митохондриях коры надпочечников цитохром P450_{scc} (scc – от англ. «side chain cleavage») катализирует реакции 22- и 20-гидроксирования и реакцию расщепления связи C20–C22 с удалением боковой цепи холестерина. Образовавшийся прегненолон, являющийся предшественником всех стероидных гормонов, покидает митохондрии и попадает в эндоплазматический ретикулум. Здесь дальнейшие стадии стероидогенеза катализируют P450_{c17} (осуществляет 17 α -гидроксирование и лиазную реакцию C₁₇–C₂₀) и P450_{c21} (осуществляет 21-гидроксирование). Помимо перечисленных цитохромов в стероидогенезе в эндоплазматическом ретикулеуме участвует 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа / $\Delta^4 \rightarrow \Delta^5$ изомераза (3 β -ГСД). На следующем этапе промежуточные продукты синтеза – 11-дезоксикортикостерон и 11-дезоксикортизол – вновь поступают в митохондрии или секретируются в кровь. В митохондриях клеток коры надпочечников под действием P450_{c18} (двухстадийное 18-окисление) и P450_{c11} (11 β -гидроксирование) из них образуются соответственно два наиболее важных представителя кортикостероидов – альдостерон и кортизол.

Практически все монооксигеназные системы коры надпочечников млекопитающих обладают несколькими альтернативными активнос-

тиями, катализируемыми одной формой белка. Таким образом реализуется динамическая модель, в которой субстратные центры различных P450 (определяющие регио- и стереоспецифичность реакций) и гем-связанный оксидант обуславливают проявление множественных активностей [3] и, следовательно, возможность переключения путей биосинтеза стероидов при различных молекулярных патологиях, связанных с мутациями ферментов стероидогенеза. Качественные различия состава ферментов стероидогенеза, содержащихся в различных тканях и субклеточных компартментах, а также их субстратная специфичность определяют последовательности путей биосинтеза кортикостероидов, прогестин и половых гормонов. Количественные отличия в содержании P450c17, CPR и цитохрома b5 определяют, какой путь биосинтеза будет предпочтительно реализован – биосинтез кортикостероидов или биосинтез андрогенов и эстрогенов [7, 8].

Сведения о свойствах ферментов, вовлеченных в биосинтез стероидных гормонов, представлены в ряде обзоров. Например, подробное описание двух классов белков – цитохромов P450 и ГСД (номенклатура, кодирующие гены, хромосомная локализация, ткани, в которых осуществляется их экспрессия, функциональные свойства), обеспечивающих стероидогенез у человека и мыши, приведено в обзоре [5]. В работах [4, 6, 9–13] обсуждаются молекулярные механизмы и сигнальные пути, посредством которых регулируется процесс стероидогенеза в коре надпочечников, половых железах, плаценте, а также в нервной и сердечной ткани.

РЕАКЦИИ И МЕХАНИЗМЫ КАТАЛИЗА ЦИТОХРОМАМИ P450

Очевидно, что создание рекомбинантных микроорганизмов, синтезирующих стероидтрансформирующие цитохромы P450, может сопровождаться изменением направленности реакций и спектра продуктов в связи с наложением на активность этих P450, обладающих определенной субстратной специфичностью, активности собственных ферментов микроорганизмов. Для того, чтобы судить о том, являются ли стероидные метаболиты продуктами функционирования гетерологично экспрессированных цитохромов P450, необходимо рассмотреть механизм катализа P450, особенно – в отношении «необычных» реакций.

Цитохромы P450 катализируют разнообразные окислительно-восстановительные реакции, например, С-гидроксилирование, N-, S-, O-деалкилирование, окислительное дезаминирование и десульфирование, N-, S-окисление, окислительное дегалогенирование, эпоксирирование, образование пероксисоединений [14, 15]. Основные реакции трансформации стероидов цитохромами P450

включают С-гидроксилирование, окислительное расщепление С–С-связей, окисление спиртовой группы до альдегида (кетона), механизм-зависимую инактивацию искусственными соединениями, содержащими этинильную группу. Некоторые другие типы превращений наблюдаются при наличии в молекуле стероидов каких-либо редких для них фрагментов (например, N-, S-атомов).

Ферменты этого класса могут катализировать и такие «необычные» реакции, как образование циклов, восстановление и восстановительное дегалогенирование, дегидрирование оксимов, ароматизация и расширение цикла, *ipso*-замещение в пара-замещенных фенолах [16, 17], механизм-зависимое ингибирование [18]. Термин «необычный» не следует понимать, как обозначение нового вида каталитической активности фермента. Тип наблюдаемой реакции определяется природой цитохрома P450 и строением субстрата, а также внешними условиями протекания реакции. Все эти процессы могут быть объяснены с учетом механизмов катализа P450 и общих представлений о закономерностях внутримолекулярных перегруппировок, а также реакционной способности образующихся интермедиатов субстратов (радикалов, ионов, ион-радикалов). Можно выделить несколько случаев «необычного» катализа для какого-либо определенного цитохрома P450: 1) изменение под влиянием внешних условий стерео- и/или регио-селективности реакции с обычным субстратом; 2) минорные побочные реакции; 3) трансформация соединения, не являющегося его обычным физиологическим субстратом; 4) реакции, обусловленные особенностями строения субстрата (различные перегруппировки интермедиатов и механизм-зависимую инактивацию, см. также раздел VI).

Схема образования активных форм кислорода при катализе P450 показана на рис. 1. Считается, что обратимое присоединение субстрата происходит в самом начале указанного каталитического цикла (или на любой его стадии), поэтому его трансформация может осуществляться под воздействием любой из указанных активных структур. Структуры, которые непосредственно осуществляют окислительную трансформацию субстрата, называют «основными оксидантами». Наиболее распространенные типы трансформаций катализируются формами (4)–(7) [19]. Расщеплению O–O-связи (переход (5) в (6)) при катализе P450 способствует механизм эстафетной передачи заряда, т.н. «push–pull»-эффект. Он состоит в том, что проксимальный лиганд железа гема (тиолат Cys для P450) и электрофильные фрагменты активного центра способствуют смещению электронов O–O-связи и образованию новых H–O- и O–Fe-связей.

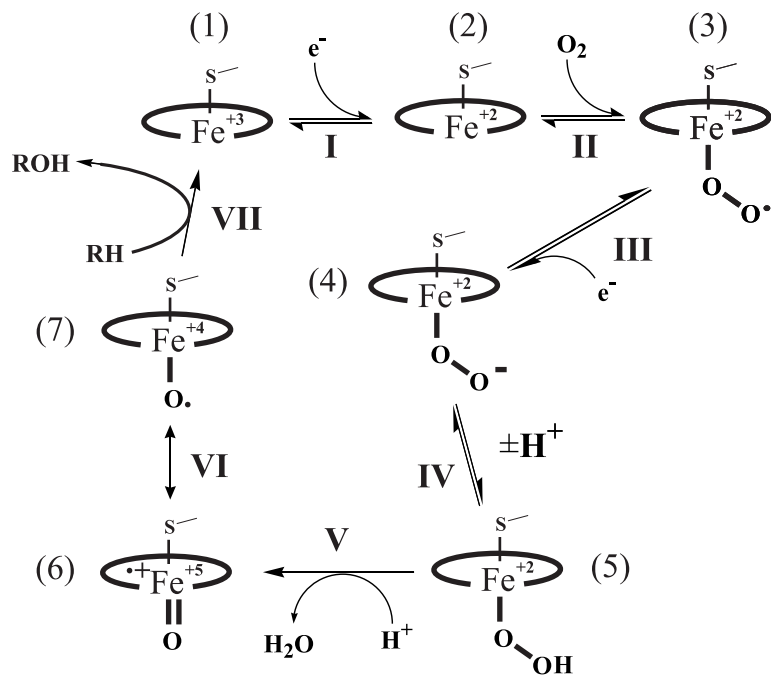


Рис.1. Схема классического каталитического цикла активации кислорода и окисления субстратов цитохромами P450 [18].

I – передача первого электрона на Fe гема от белка-партнера ЭТС, приводящая к превращению ферриформы железа гема P450 (1) в ферроформу (2); II – присоединение кислорода к ферроформе с образованием интермедиата (3); III – передача второго электрона на Fe гема от белка-партнера ЭТС с образованием железопероксидного интермедиата (4); IV – присоединение протона к интермедиату (4) с образованием его протонированной формы (5); V – присоединение второго протона к интермедиату (5) с последующим отщеплением воды и образованием перферрильного интермедиата (6); VI – изомеризация перферрильного интермедиата (6) в радикальную форму (7); VII – окисление субстрата.

Схема на рис. 1 обычно рассматривается совместно с другой, которая называется «отрыв водорода – перегруппировка кислорода» (рис. 2). Рассмотренный механизм помогает рационализировать C-гидроксилирование и, с учетом превращений радикальных интермедиатов, – расщепление связи C–C [18, 20]. Расщепление связей C–C катализируют P450_{scs}, P450_{c17}, P450_{c19}, 14 α -деметилаза и некоторые другие формы P450. Современные исследования подтверждают, что расщепление C–C в случаях деацилирования осуществляется

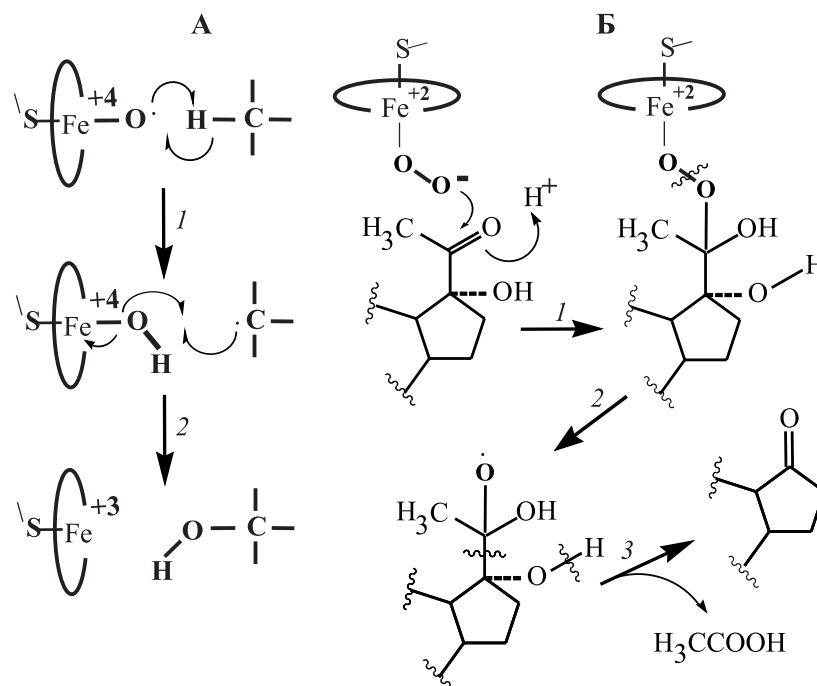


Рис.2. Схема реакций C-гидроксилирования и разрыва C-C-связи P450.

А – C-гидроксилирование по механизму «отрыв водорода – кислородная перегруппировка»; Б – разрыв C-C-связи на примере 17,20-лиазной реакции P450 по механизму Байера-Виллигера [18, 20].

А: 1 – отрыв атома водорода от субстрата перферрильным интермедиатом гема P450; 2 – перегруппировки интермедиатов гема P450 и субстрата, приводящая к восстановлению Fe гема до ферриформы и образованию гидроксилированного продукта (через присоединение гидроксил-радикала к интермедиату субстрата);

Б: 1 – присоединение дистального атома кислорода пероксидного интермедиата гема P450 к углероду 20-кетогруппы субстрата; 2 – образование радикального интермедиата субстрата при гомолитическом разрыве O-O-связи; 3 – радикальное 2β-расщепление интермедиата субстрата с образованием 17-кетопродукта и уксусной кислоты.

посредством активных форм кислорода ((4) в приведенной схеме на рис. 1). Оно реализуется также и ферментами класса флавиновых монооксигеназ – монооксигеназами по Байеру-Виллигеру [21].

Кроме того, под влиянием различных внешних и внутренних факторов может происходить так называемое «абортное отщепление» кислорода: формы (3) и (4–5) при переходе в форму (1) (рис. 1)

образуют супероксид-радикал и перекись водорода, соответственно. Эти частицы могут проявлять собственную окислительную активность [22, 23]. Они относительно стабильны, и поэтому могут окислять как фрагменты активного центра, так и любой другой компонент системы.

В свою очередь, пероксиды могут присоединяться к Fe гема P450, образуя форму (5) или ее аналог с последующим образованием (6–7). Таким образом, цитохромы P450 могут проявлять пероксидазную активность [24]. Однако, такой «шунт» характеризуется минимальной активностью для P450 и редко реализуется, особенно *in vivo* [25]. При использовании в качестве искусственного оксиданта иодозилбензола P450 образует исключительно формы (6–7), минуя (3–5) [26].

Хотя приведенные выше механизмы достаточно обоснованы, универсальны и позволяют объяснить практически все катализируемые P450 реакции, многие исследования свидетельствуют, что реальный химизм процессов может быть более сложным и разнообразным. На роль «предельного оксиданта» предлагают HO^+ и некоторые другие структуры [27]. Следует отметить, что в этих схемах не учитывается роль структуры активного центра для осуществления катализа, особенно структуры аминокислот – доноров или акцепторов протона.

III. РЕКОНСТРУКЦИЯ СТЕРОИДТРАНСФОРМИРУЮЩИХ СИСТЕМ ИЗ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ БЕЛКОВ *IN VITRO*

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВ

При изучении монооксигеназных систем широко использовались принципы высокоаффинных взаимодействий с использованием иммобилизованных белков, модифицированных субстратов и группоспецифичных лигандов, что явилось важной предпосылкой развития методов энзиматической инженерии в применении к стероидным гидроксилазам. Для осуществления реконструкции стероидтрансформирующих систем и изучения взаимозаменяемости электронтранспортных белков авторами настоящего обзора использовано более 20 гомогенных белков, участвующих в биосинтезе стероидов. Цитохромы P450 различной субстратной специфичности, а также электронтранспортные белки митохондриальных и микросомальных монооксигеназных систем млекопитающих и микроорганизмов получены по оригинальным методикам [3].

Для получения белковых компонентов митохондриальных стероидтрансформирующих систем широко использовались препараты иммобилизованных ферредоксинов [28]. Аденодоксин (Ad) был

иммобилизован через α -NH₂-группы Ser¹ и ϵ -аминогруппы Lys⁵, Lys¹⁶ и Lys²³ на бромциан-сефарозе. На основе высокого сродства в комплексообразующих парах удалось селективно выделить из грубых экстрактов гомогенные по химическому строению P450_{ssc} и P450_{c11}, а также AdR аффинной хроматографией на Ad-сефарозе. Синтез Ad-сефарозы с пространственной группой осуществляли путем сочетания предварительно тиолированного Ad с бромциан-сефарозой. Использование Ad-сефарозы с пространственной группой позволило значительно повысить активность иммобилизованного Ad в реакции отщепления боковой цепи холестерина за счет более полной реализации его функций в монооксигеназном катализе: электрон-транспортной, эффекторной и комплексообразующей.

Был проведен направленный синтез иммобилизованных препаратов цитохрома *c*, которые использовались для подтверждения принципа комплементарности взаимодействий ряда электронтранспортных белков [29]. Используя модификацию свободных карбоксильных групп цитохрома *c* гистамином, можно добиться обогащения белка имидазольными группами, которые будут более доступными для связывания с бромацетил-сефарозой, чем остатки His и Met в молекуле нативного белка. По этой схеме за счет 3-х дополнительно введенных имидазольных групп был получен иммобилизованный на бромацетил-сефарозе цитохром *c*. Селективность и эффективность синтезированного сорбента продемонстрирована при очистке Ad, гепаторедоксина, цитохрома b5 и выделении триптического фрагмента цитохрома b5.

Иммобилизация цитохромов P450_{ssc} и P450_{c11} через свободные SH-группы позволила изучить распределение доступных остатков цистеина и оценить их роль для функционирования гемопротеидов. Иммобилизация P450_{ssc} в денатурирующих условиях конъюгированием с тиопропил-сефарозой сопровождалась высвобождением 2,1–2,3 эквивалентов тиопиридона. Используя различную доступность остатков цистеина в нативном и денатурированном белке и различное распределение остатков Cys между доменами F1 и F2, удалось разработать схему селективного разделения доменов после трипсинолиза нативной молекулы P450_{ssc}. В суммарном химотриптическом гидролизате денатурированного P450_{ssc}, иммобилизованного на тиопропил-сефарозе, были обнаружены два цистеинсодержащих пептида с остатками Cys262 и Cys422. Последний остаток расположен в высокомолекулярной, консервативной области и выступает в нативных условиях в качестве лиганда железа гема [30].

РЕКОНСТРУКЦИИ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМ
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ТИПА

Были определены основные функциональные, физико-химические и структурные параметры, определяющие функциональную аналогию редуктазных компонентов в митохондриальных стероидтрансформирующих системах, связанных с различными путями метаболизма холестерина – биосинтезом стероидных гормонов в коре надпочечников и желчных кислот в печени млекопитающих [31]. Для исследования кинетики рекомбинации окиси углерода с высоко- и низкоспиновыми формами гемопротейда был использован импульсный фотолиз [32], метод «остановленного потока» позволил оценить скорость элементарных стадий переноса электронов в зависимости от стехиометрии белков-переносчиков электронов, а тандемная разностная спектроскопия вторых производных в средней УФ и видимой областях дала возможность оценить спектральные изменения, генерируемые аминокислотными остатками или гемовым хромофором [33].

Для сравнения субстратной специфичности P450_{scc} и P450_{27A1} определяли активность реконструированных стероидгидроксилирующих систем с реципрокной заменой субстратов (холестерин и 3 α ,7 α ,12 α -5 β -холестантриол) и электронтранспортных белков [34]. С точки зрения взаимозаменяемости электронтранспортных белков важно установление структуры активного центра ферредоксинов. С помощью химической модификации остатков цистеина [¹⁴C]йодацетамидом с последующим установлением структуры цистеинсодержащих пептидов и выравниванием аминокислотных последовательностей полипептидных цепей, вовлеченных в образование [2Fe-2S] кластера, были получены данные, позволившие предложить возможные схемы пространственной организации активного центра ферредоксинов, экспрессируемых в коре надпочечников и печени [35].

К настоящему времени накоплена большая информация о кинетических, спектральных и термодинамических параметрах белок-белкового взаимодействия компонентов митохондриальных стероидгидроксилирующих систем. Предложено два возможных механизма взаимодействия адренодоксина со своими партнерами: кластерный механизм, предполагающий образование ассоциированного тройного комплекса P450_{scc}/Ad/AdR [36, 37] и «челночный», предполагающий поочередное взаимодействия Ad с P450_{scc} и AdR [38]. Кроме того, есть данные о возможности образования димера Ad [28], который взаимодействует с AdR и цитохромом P450_{scc}, причем перенос электронов от AdR к цитохрому P450_{scc} осуществляется последовательно

по «мосту» из двух Ad [39]. Основываясь на имеющихся данных о наличии двойных комплексов между Ad и AdR и Ad и P450 и о том, что в молекуле Ad центры связывания AdR и цитохрома P450_{ssc} перекрываются [40–43], ряд авторов наиболее вероятным считают «челночный» механизм [44], однако в литературе также имеются данные в пользу кластерного механизма [45–47].

РЕЦИПРОКНАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ МИКРОСОМАЛЬНЫХ
И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМ
И ВЗАИМОЗАМЕНЯЕМОСТЬ ЭЛЕКТРОНТРАНСПОРТНЫХ БЕЛКОВ
МИКРООРГАНИЗМОВ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Под этим типом реконструкции подразумевают рекомбинацию белков митохондриального и микросомального типов из млекопитающих и микроорганизмов. Принципиальным было установление факта эффективного функционального сопряжения CPR, выделенных из *Candida maltosa* и *Yarrowia lipolytica*, с микросомальными цитохромами P450_{c21} и кумарин-7-гидроксилирующим P450, а также указание на возможность использования растительного стерина β-ситостерина в качестве субстрата в системе отщепления боковой цепи холестерина. Напротив, при использовании микросомальных CPR из микроорганизмов для реконструкции с митохондриальными цитохромами P450_{ssc} и P450_{c11} млекопитающих наблюдалось снижение активности в 50–500 раз [48, 49].

В ходе последующих исследований были обнаружены ферментные электронтранспортные системы (ЭТС) микроорганизмов, способные осуществлять перенос электронов на железо гема ряда цитохромов млекопитающих *in vitro* и *in vivo*. Наличие таких белков у микроорганизма-хозяина при реконструкции в микроорганизмах стероидтрансформирующей P450-монооксигеназной системы частично или полностью устраняет необходимость экспрессии белков P450-зависимых ЭТС млекопитающих.

*Белки электронтранспортных систем микроорганизмов,
способные взаимодействовать с P450 млекопитающих*

Ферредоксин из бактерии *E. coli* (Fdc) представляет собой небольшой водорастворимый анионный [2Fe–2S]-белок [50]. Предполагается, что он участвует в сложной системе образования железосерных кластеров многих белков *E. coli* [51, 52]. По своей первичной структуре и редокс-свойствам он близок к ферредоксинам зеленых растений, сине-зеленых водорослей, Ad и путидаредоксина из гидроксилирующей камфару системы из бактерий *Pseudomonas putida*. Fdc

способен восстанавливать флаводоксины (Fld) типов 1 и 2. Потенциал полувосстановления Fdc (-380 мВ) более отрицательный, чем для системы P450_{ssc}-холестерин (-290 мВ) [53], что указывает на потенциальную возможность Fdc восстанавливать гетерологично экспрессируемые в *E. coli* цитохромы P450_{ssc} и P450c11 [54].

Fld1 и Fld2 – небольшие анионные водорастворимые FMN-содержащие белки [55], являются физиологическими партнерами FAD-содержащей флаводоксин (ферредоксин)-оксидоредуктазы (FldR) [56]. Системы FldR–Fld1 (2) осуществляют перенос электронов с NAD(P)H на ряд важных ферментов *E. coli* [57]. Обратная реакция восстановления NADP^+ до NADPH также реализуется системами FldR–Fld и используется как защитная при окислительном стрессе бактерии [58]. Система NADPH/FldR/Fld способна поддерживать 17 α -гидроксилазную и 17,20-лиазную активности P450c17, правда, значительно уступая CPR. Результаты изучения кинетики восстановления свидетельствуют о том, что Fld осуществляет одноэлектронный перенос от FldR на гем-содержащий домен флавоцитохрома P450–BM3 (гидроксилазы жирных кислот из бактерии *Bacillus megaterium*) и P450c17 в соответствии с «челночным» механизмом, последовательно образуя комплексы со стехиометрией 1:1 [55, 59, 60]. Прямое взаимодействие с цитохромами P450 подтверждается успешным использованием Fld-сефарозы для выделения и очистки P450c17 и P450c21 [61].

FldR и Fld из цианобактерии *Anabaena* способны поддерживать 17 α -гидроксилирование прогестерона P450c17 и восстановление цитохрома *c*. Максимальная скорость этих реакций в 2–3 раза выше, чем для системы *E. coli*, но также значительно уступает природной системе CPR – P450c17 [62].

NADPH-сульфитредуктаза из *E. coli* (SiR) – мультимерный гемофлавопротеид, состоящий из восьми флавиновых α -субъединиц (SiR–FP) и четырех гемовых β -субъединиц. SiR катализирует шестиэлектронное восстановление сульфита в сульфид. Каждая α -субъединица содержит FAD и FMN в качестве простетических групп. Первичная структура SiR–FP аналогична структуре CPR, а два С-концевых участка формируют катионный FldR-подобный домен [63]. Установлено, что SiR–FP способен поддерживать 17-гидроксилирование прегненолона в присутствии цитохрома P450c17 с активностью в 12–15 раз более низкой, чем CPR млекопитающих. Показано, что P450c17 взаимодействует с FMN-связывающим N-концевым участком SiR–FP [64, 65].

CPR дрожжей способны поддерживать активности дрожжевых P450, а также гетерологично экспрессируемых микросомальных цитохромов P450c17, P450c21 и P450 1A [66–68]. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* были обнаружены гены *YAH1* [69] и *ARH1* [70], кодирующие белки с высокими степенями гомологии с Ad и AdR млекопитающих соответственно. Было найдено, что Arh1p совместно с Ad *in vitro* способны катализировать NADPH-зависимое восстановление феррицианида, цитохрома c и поддерживать 11 β -гидроксилазную активность P450c11 [71]. Вместе с тем, Yah1p *S. cerevisiae* не мог заменять Ad в реконструируемых системах гидроксирования стероидов. Установлено, что гомолог Ad из делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* etp1, содержащий [2Fe–2S]-кластер, может заменять Ad в реконструированных системах и осуществлять перенос электронов с AdR как на P450scs и P450c11 быка, так и на P450scs и P450c18 человека [72]. Гомолог AdR – белок Arh1p из *S. pombe* проявлял слабую способность связывать FAD, однако модифицированный Arh1 A18G обладал рядом спектральных и функциональных свойств, аналогичных таковым для AdR.

КОВАЛЕНТНО-СОРБЦИОННАЯ РЕКОНСТРУКЦИЯ СТЕРОИДНЫХ ГИДРОКСИЛАЗ И ПОЛУЧЕНИЕ РАДИОАКТИВНОМЕЧЕННЫХ СТЕРОИДОВ

При ковалентно-сорбционной реконструкции были применены три методических подхода: проведение реакции в объеме, использование проточных миниколонок и непосредственный спектрофотометрический контроль функциональных состояний иммобилизованных белков в проточных микрокуветах. Установлено, что мультиферментные комплексы монооксигеназных систем представляют собой двойные или тройные белковые комплексы, обладающие конформационной подвижностью и способностью к рекомбинации. При осуществлении отдельной элементарной стадии монооксигеназного цикла (связывание субстрата, восстановление, оксигенирование) белки монооксигеназных систем преимущественно находятся в ассоциированном состоянии [73, 74].

Изученные закономерности ковалентно-сорбционной реконструкции позволили разработать ряд методов селективного получения радиоактивно меченых стероидов из доступного предшественника – холестерина. Химические методы получения [^3H]- и [^{14}C]-стероидов основаны на двух принципиально отличающихся подходах. Получение стероидов, меченых углеродом 14, основано на взаимодействии меченого реактива Гриньяра со стероидными еноллактонами.

Меченые тритием стероиды получают методом гидрирования ненасыщенных предшественников газообразным тритием. При использовании ферментативных методов возможно получение по одной схеме из одного меченого предшественника ($[^{14}\text{C}]$ или $[^3\text{H}]$ холестерина) широкого спектра важнейших радиоактивно меченых стероидов [75, 76].

IV. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИСТЕМ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ТОПОГЕНЕЗА ЦИТОХРОМА P450_{scc}

Полученные на модельных системах результаты, касающиеся свойств белков стероидтрансформирующих систем в разных организмах-хозяевах, служат важными предпосылками для конструирования трансгенных микроорганизмов с целью биотехнологического синтеза стероидных гормонов из доступных предшественников с использованием гетерологической экспрессии цитохромов P450. Изучение цитохрома P450_{scc} представляется особенно важным как в теоретическом, так и в прикладном плане, поскольку экспрессия в микроорганизмах монооксигеназной системы цитохрома P450_{scc} позволит решить ключевую проблему синтеза C21-стероидных гормонов, т.е. обеспечить превращение холестерина (или его аналогов) в прегненолон.

Цитохром P450_{scc} синтезируется и обеспечивает синтез важных биологически-активных стероидов из холестерина в организме млекопитающих в стероидогенных тканях, в клетках центральной и периферической нервной системы [77] и в сердечной ткани [78].

К настоящему времени кДНК *CYP11A1* клонированы из многих источников [5]. Определена структура и локализация гена *CYP11A1* человека и мыши [79–82]. Показана высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей цитохромов P450_{scc} из разных видов млекопитающих; так, для P450_{scc} из надпочечников быка и человека она превышает 70% [5].

Цитохром P450_{scc} относится к классу цитохромов b-типа [83], его зрелая форма содержит 1 моль гема на моль белка. Простетическая группа – гем, представляет собой железопорфирин IX, она примерно параллельна поверхности мембраны и не погружена в гидрофобный слой мембраны [84].

СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ P450_{scc}

С помощью методов белковой химии была установлена первичная структура холестеринтрансформирующего цитохрома P450_{scc} [85].

Принципиальными для успешного выполнения этой задачи явились разработка высокоэффективного метода получения гомогенного цитохрома P450scs с помощью аффинной хроматографии на иммобилизованном Ad, выяснение доменного строения гемопротеида с помощью ограниченного протеолиза и разработка метода получения крупных фрагментов белка (F1 и F2) с помощью хроматографии тиол-дисульфидного обмена [30, 86]. Первичная структура белка-предшественника P450scs установлена в работе [87] на основании секвенирования ДНК.

До настоящего времени не удалось получить кристаллы цитохрома P450scs, пригодные для рентгеноструктурного анализа. В литературе представлены лишь модели этого белка, построенные с использованием компьютерного моделирования на основе экспериментальных трехмерных структур цитохромов P450cam (гидроксилазы камфары из *Pseudomonas putida*), P450-BM3, P4502C5 и P4502B4 [88–91]. В результате выравнивания аминокислотных последовательностей P450scs разных видов млекопитающих, использования метода сайт-направленного мутагенеза и анализа имеющихся моделей пространственной структуры также была получена информация об организации функционально-важных участков P450scs. В работе [92] представлена модель активного центра P450scs, где показано положение гема, субстрата и аминокислотных остатков активного центра. Гем-связывающая петля, которая содержит характерную для всех цитохромов P450 последовательность Phe-X-X-Gly-Arg-X-Cys-X-Gly, включающую абсолютно консервативный для цитохромов P450 остаток Cys (является пятым лигандом железа гема), находится в С-концевой части полипептидной цепи. В P450scs сайт взаимодействия с Ad расположен в непосредственной близости от гем-связывающего домена [93], взаимодействие осуществляется между отрицательно заряженными аминокислотными остатками Ad и положительно заряженными остатками P450scs [89]. Область первичного связывания субстрата находится в N-концевой части полипептидной цепи (аминокислоты 8–28) [94, 95]. За субстратную специфичность и региоселективность гидроксилирования как в бактериальных цитохромах P450, так и в цитохромах млекопитающих, отвечают специфические остатки в петле В'–С [96, 97].

ОСОБЕННОСТИ ТОПОГЕНЕЗА ЦИТОХРОМА P450scs

Цитохром P450scs синтезируется в цитоплазме клеток в форме предшественника (preP450scs), несущего на N-конце отщепляемую адресующую препоследовательность. Затем он транслоцируется в

митохондрии, подвергается протеолитическому процессингу под действием мембраносвязанной протеиназы и включается во внутреннюю митохондриальную мембрану [98, 99]. Белок-предшественник способен к слабой ассоциации с внутренней митохондриальной мембраной, но его встраивание в мембрану происходит только после процессинга [100].

Импорт цитохрома P450_{scc} в гетерологических системах

Как правило, наличие у белка специфической адресующей последовательности и способности обратимо разворачиваться являются необходимыми и достаточными условиями для его импорта в митохондрии [101, 102]. Тем не менее долгое время считалось, что preP450_{scc} может импортироваться только в митохондрии стероидогенных тканей. Основанием для предположения о тканеспецифичности импорта в митохондрии послужили данные о том, что preP450_{scc} не импортируется в митохондрии из сердечной мышцы [103, 104]. Однако позже была показана экспрессия активного P450_{scc} в COS-1 клетках *in vivo* [105], а также возможность импорта preP450_{scc} в митохондрии из растений в модельной системе *in vitro* [106]. Тезис о тканеспецифичности импорта preP450_{scc} неприменим также к модифицированной форме предшественника P450_{scc}, содержащего на N-конце адресующей последовательности 13 дополнительных аминокислот, 8 из которых несут положительный заряд (6His-preP450_{scc}) [107]. После экспрессии в бактериальных клетках и аффинной очистки 6His-preP450_{scc} успешно транслоцировался в митохондрии печени и сердца крысы и в митохондрии дрожжей и процессировался с образованием зрелой формы белка (mature, mP450_{scc}). В целом, данные приведенных работ продемонстрировали, что для изучения цитохрома P450_{scc} можно использовать модельные системы на основе нестероидогенных клеток, а результаты работы [107] указали на то, что именно структура адресующей препоследовательности может быть важным фактором, влияющим на «тканеспецифичность» импорта.

Свойства P450_{scc} была детально исследованы в дрожжевых митохондриях в системах *in vitro* и *in vivo* [108–112]. Одной из важных причин выбора дрожжевой системы для данных исследований была доступность мутантов по разным компонентам транслокационных комплексов и митохондриальным протеиназам, а также наличие информации о сигналах импорта, используемых дрожжевыми белками для компартментализации в митохондриях [113].

В экспериментах по импорту синтезированного *in vitro* preP450ssc в изолированные дрожжевые митохондрии обнаружено, что апо-цитохром транслоцируется в митохондрии с высокой скоростью, однако превращение предшественника в зрелую форму осуществляется с низкой эффективностью [108]. В отличие от ситуации в митохондриях коры надпочечников, молекулы P450ssc в основном не встраивались во внутреннюю митохондриальную мембрану, а накапливались в матриксе. Здесь чужеродный белок подвергся деградации под действием эндогенной растворимой сериновой протеиназы Pim1p при участии шаперона Hsp70(Ssc1p) и связанных с ним кошаперонов (Mdj1p и Mge1p). В отсутствие протеолитически активной протеазы Pim1p наблюдалась агрегация новоимпортированного preP450ssc [108]. Полученные результаты стимулировали поиск адресующих последовательностей дрожжевых белков, способствующих более эффективному встраиванию P450ssc в мембрану дрожжевых митохондрий. С этой целью был сконструирован белок Su9(112)-ΔP450, в котором последовательность из 75 N-концевых аминокислотных остатков mP450ssc была заменена на последовательность из 112 аминокислотных остатков 9 субъединицы F₁F₀-АТФ-азы *Neurospora crassa*. Эта последовательность включала митохондриальную адресующую последовательность и первый трансмембранный домен, которые способны обеспечивать эффективное включение репортерных белков во внутреннюю мембрану по механизму «ре-экспорта» [114, 115]. Гибридный белок Su9(112)-ΔP450 эффективно связывался с внутренней мембраной дрожжевых митохондрий, тем не менее, цитохром P450ssc не приобретал нативной конформации и также подвергался протеолизу, но уже под действием мембраносвязанного протеолитического комплекса Yta10p/Yta12p (m-AAA протеиназа) [108]. В этой работе впервые показано, что субстратные специфичности Pim1p и Yta10p/Yta12p перекрываются; для них важно не наличие специфических сайтов у мишеней, а их конформационное состояние.

P450ssc с препоследовательностью субъединицы IV дрожжевой цитохром *c*-оксидазы (preCoxIV-mP450ssc) импортируется и правильно процессируется в дрожжевых митохондриях *in vivo* [109]. Однако лишь небольшая часть импортированных молекул включается во внутреннюю мембрану, где белок проявляет способность трансформировать 22R-гидроксихолестерин в прегненолон (в реконструированной системе, включающей изолированные Ad и AdR быка). При экспрессии P450ssc с препоследовательностью VI-й субъединицы дрожжевой цитохром *c*-оксидазы также наблюдалось низкое содержание белка во внутренней мембране дрожжевых митохондрий [116].

В работе [112] проведено сравнительное изучение топогенеза в дрожжевых митохондриях в условиях *in vivo* preP450scc и Su9(1–112)-mP450scc с полноразмерной последовательностью mP450scc. Собственная препоследовательность preP450scc, как и preCoxIV [109] обеспечивала эффективный импорт P450scc в матрикс митохондрий, где белок обнаруживается преимущественно в форме агрегатов. Процессинг собственной препоследовательности приводил к образованию mP450scc и промежуточной формы iP450scc. Белок Su9(1–112)-mP450scc переносился в митохондриальный матрикс, процессировался и встраивался во внутреннюю мембрану за счет сигнала «ре-экспорта», при этом происходила агрегация молекул белка. По-видимому, полный перенос белка в матрикс приводит к его неправильному сворачиванию, и последующее включение его в мембрану не сопровождается восстановлением правильной конформации. Измерения холестерингидроксилазной/лиазной активности показали, что при удержании во внутренней мембране дрожжевых митохондрий молекул mP450scc и iP450scc, они полностью превращаются в холо-форму. На основании этих фактов было высказано предположение, что критическим моментом топогенеза P450scc в дрожжевых митохондриях является его «удерживание» во внутренней мембране при транслокации из цитозоля. Сказанное иллюстрируется схемой, приведенной на рис. 3.

Данные в пользу этого предположения получены при экспрессии в дрожжах гибридных конструкций с другими адресующими сигналами [117]. Активность в митохондриальных фракциях гибридных белков, включающих сигнал остановки транслокации в мембране (AAC-mP450scc, DLD(1–72)-mP450scc, Bcs1(1–83)-mP450scc), была существенно выше активности белка с сигналом ре-экспорта Su9(1–112)-mP450scc; не встраивающийся в мембрану гибрид Ad-mP450scc не проявлял ферментативную активность.

Следует также знать, какие количества импортированных гетерологических белков способны составить конкуренцию за шапероны и протеиназы с природными мишенями последних. Показано, что гибрид AdR-Ad, импортированный в матрикс дрожжевых митохондрий *in vivo* в количестве до 0,2% общего митохондриального белка, не влияет на развитие дыхательного аппарата клетки. Вместе с тем, AdR-Ad подавляет протеолиз и стимулирует агрегацию P450scc, включенного в те же митохондрии [110]. Этот результат свидетельствует об ограниченных размерах фонда митохондриальных шаперонов и протеиназ (Pim1p, Yta10p/Yta12p, Yme1p), играющих ключевую роль в формировании дыхательных комплексов, и уста-

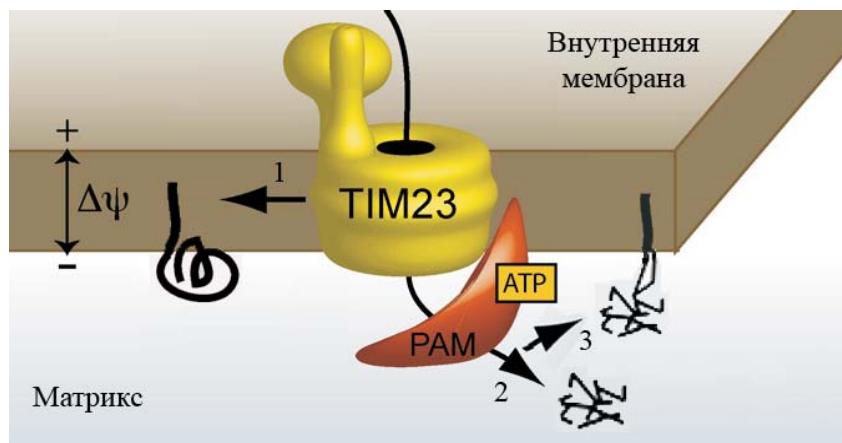


Рис. 3. Возможные пути импорта предшественников P450sc в митохондрии дрожжей.

1) Котранслокационный способ встраивания в мембрану, приводящий к образованию активного белка (предположительно способ встраивания preP450sc в митохондриях коры надпочечников); 2) быстрая транслокация основной части preP450sc и CoxIV(1–25)-mP450sc в матрикс дрожжевых митохондрий, где они агрегируют; 3) транслокация Su9(1–112)-mP450sc в матрикс и встраивание во внутреннюю мембрану по механизму ре-экспорта.

TIM23 – транслоказа внутренней мембраны (*translocase of inner membrane*); PAM – комплекс белков, осуществляющий перенос предшественников в матрикс митохондрий (*presequence translocase-associated motor*).

навливает определенные рамки для экспрессии гетерологических белков в дрожжах.

Один из путей «адаптации» P450sc в дрожжевых митохондриях состоял в изменении липидного состава митохондриальных мембран. Попытки приостановить агрегацию цитохрома P450sc в дрожжевых митохондриях путем замены эргостерина на холестерин в митохондриальных мембранах, и, кроме того, посредством осуществления суперэкспрессии шаперона Hsp78 [111], не привели к положительному результату.

Причиной отличия топогенеза P450sc в дрожжевых митохондриях от его топогенеза в природных митохондриях (а именно более быстрый перенос в матрикс) может служить различие механизмов белкового импорта между этими системами. Показано, что дрожжевой белок Tim44 (компонент PAM-комплекса, отвечающего за перенос белковых предшественников в матрикс [118]) прочно ассоциирован с внутренней мембраной митохондрий, а Tim44 млекопитающих

локализован преимущественно в растворимой фракции матрикса. Это позволяет предполагать, что в митохондриях млекопитающих в основном реализуется более пассивный mtHsp70-зависимый механизм переноса предшественников в матрикс [119]. Недавно получена клеточная линия карциномы надпочечников человека, сохраняющая способность к ответу на адренотропный гормон [120]. Это открывает возможность для изучения топогенеза и тонкой регуляции активности P450_{ssc} в условиях, максимально приближенных к природным.

ИЗУЧЕНИЕ ТОПОГЕНЕЗА ЦИТОХРОМА P450_{ssc} С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЬНОЙ ПРОКАРИОТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

В 1991 г. было показано, что при экспрессии зрелой формы P450_{ssc} (mP450_{ssc}) в клетках *E. coli*, заведомо не содержащих специфических для стероидогенных митохондрий белков и липидов, синтезированный белок встраивается в цитоплазматическую мембрану и проявляет свойства, характерные для нативного P450_{ssc} [121]. Отсюда следует, что клетки бактерий, синтезирующие цитохром P450_{ssc} млекопитающих, могут служить адекватной моделью для изучения процессов, обеспечивающих формирования мембранной холо-формы белка (внедрение в липидный бислой, присоединение гема, сворачивание полипептидной цепи mP450_{ssc} в каталитически-активную конформацию).

Топология цитохрома P450_{ssc}

Цитохром P450_{ssc} формально отнесен к интегральным мембранным белкам на основании того, что при обработке препаратов внутренней мембраны митохондрий карбонатом натрия он не вымывается из мембраны [100] и солюбилизируется при использовании детергентов [28]. Однако при анализе первичной структуры зрелого цитохрома P450_{ssc} не обнаружено протяженных участков, обогащенных неполярными аминокислотными остатками, которые могли бы служить трансмембранными доменами [122, 123], удерживающими белок в мембране. Установлено, что с мембраной наиболее прочно связана N-концевая часть P450_{ssc}. С-концевой пептид (содержащий участки связывания гема и Ad) слабо ассоциирован с матриксной поверхностью внутренней мембраны митохондрий [100] и центр связывания субстрата P450_{ssc} ориентирован в митохондриальный матрикс [124].

На основе экспериментов по связыванию отдельных участков полипептида со специфическими антителами в препаратах митоплас-

тов и субмитохондриальных частиц, была предложена модель, согласно которой цитохром P450_{ssc} состоит из двух доменов, пересекающих внутреннюю митохондриальную мембрану [125]. Позже, при исследовании препаратов липосом с встроенным P450_{ssc} получены результаты, указывающие на то, что цитохром P450_{ssc} прочно интегрирован с мембраной, но не является трансмембранным белком [126, 127].

Профиль гидрофобности, полученный для митохондриальных цитохромов P450_{ssc}, P450_{c11} и P450 27A1, указывает на наличие в их молекулах участков, включающих несколько гидрофобных аминокислот, которые могут быть вовлечены в связывание с мембраной, но не обязательно должны ее пронизывать [128]. Высказывалось предположение, что ассоциация митохондриальных и микросомальных цитохромов P450 с мембраной осуществляется в результате «заякоривания» в липидный бислой большого гидрофобного домена, образованного несколькими несоседними участками полипептидной цепи [129]. Результаты недавних исследований топологии митохондриальных P450 указывают на то, что участком, обеспечивающим взаимодействие с мембраной, служит протяженная F–G петля, находящаяся в центральной части полипептидной цепи [90]. Мутации в области F–G петли P450_{ssc}, P450 27A1 и P450 7A1, экспрессированных в клетках *E.coli*, приводят к снижению сродства цитохромов P450 к мембране, что проявляется в изменении субклеточного распределения белков [130–132]. В случае P450_{ssc} для двух аминокислот из области F–G петли (последовательность Val207–Arg226) четко показано встраивание в липидное окружение [132]. Кроме того, в связывании цитохрома P450_{ssc} с мембраной предполагают участие N-концевой A'-спирали; ее удаление также приводит к снижению сродства цитохрома P450_{ssc} к мембране *E. coli* [90].

*Роль различных концевых участков последовательностей
в формировании структуры белка*

В литературе имеются работы, посвященные изучению роли концевых последовательностей цитохромов P450 в процессе сворачивания белковых молекул. Для ряда цитохромов P450 показано, что консервативная N-концевая последовательность, обогащенная остатками пролина (PR-последовательность, от англ. *proline rich*), расположенная в области, связывающей адресующую последовательность и каталитический домен, играет важную роль в формировании структуры белка [133, 134]. PR-последовательность цитохрома P450_{ssc} включает четыре остатка пролина (в положениях 6, 8,

13 и 15), причем пролин в положении 13 играет определяющую роль в процессе приобретения нативной конформации – замена данного остатка на аланин приводит к образованию белка, не обладающего характерным СО-разностным спектром [134]. Однако данные о роли PR-последовательности неоднозначны. С одной стороны, утверждается, что она не только необходима для правильного сворачивания белка, но также стабилизирует его окончательную конформацию, взаимодействуя с определенными участками молекулы [135, 136]. С другой стороны, для цитохрома P450c17 установлено, что PR-последовательность играет важную роль только в процессе сворачивания полипептидной цепи и не является необходимой для поддержания структуры свернутого белка [133]. В СООН-концевой последовательности цитохрома P450 46A1 также обнаружен участок, обогащенный остатками пролина, однако этот участок, в отличие от PR-последовательности, не влияет на сворачивание полипептидной цепи, а обеспечивает образование димеров белка [137].

*Свойства рекомбинантного цитохрома P450scc,
синтезируемого в клетках E. coli*

При развитии новых ферментативных методов биотрансформации стероидов с использованием зрелых форм митохондриальных белков коры надпочечников, возникают вопросы о структурно-функциональной организации этих белков в отсутствие митохондриальных адресующих последовательностей.

При экспрессии кДНК зрелого цитохрома P450scc из митохондрий коры надпочечников быка (mP450scc) в клетках *E. coli* активный рекомбинантный белок выявлен как в мембранной, так и в растворимой фракциях, полученных центрифугированием клеточного гомогената в стандартных условиях [54]. Методом гель-проникающей высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что в растворимой фракции цитохром P450scc находится исключительно в составе частиц размером более 400 кДа. Эти данные, подтвержденные методами аффинной хроматографии и кинетическими исследованиями, позволяют предполагать, что частицы, содержащие цитохром P450scc, представляют собой сложные липопротеиновые структуры. Растворимый цитохром P450scc в клетках *E. coli* не обнаружен, следовательно, встраивание в мембрану является необходимой стадией формирования холофермента. Показано, что белок встраивается в мембрану бактерий в той же ориентации, что и во внутреннюю мембрану митохондрий коры надпочечников.

При добавлении NADPH к высокоскоростному супернатанту цитохром P450scc подвергается одноэлектронному восстановлению и

катализирует превращение 22R-гидроксихолестерина в прегненолон. Возможным партнером цитохрома P450_{scc} в клетках *E. coli* может служить бактериальный ферредоксин [50], обладающий структурным сходством с Ad [51], который, вероятно, восстанавливается NADPH-зависимой флавопротеинредуктазой, по структуре близкой к AdR надпочечников [57]. Таким образом, впервые установлена возможность функционального сопряжения цитохрома P450_{scc} млекопитающих с электротранспортной системой бактерий.

Сравнительное изучение топогенеза цитохрома P450_{scc} и его гибридов с аденодоксином при экспрессии в клетках E. coli

Данные о роли N- и C-концевых последовательностей в сворачивании цитохромов P450 получены в основном при изучении белков с deletированными или несущими мутации концевыми участками [133–137]. В работе [138] в клетках *E. coli* осуществлена экспрессия рекомбинантных кДНК, кодирующих гибридные белки Ad-mP450_{scc} и mP450_{scc}-Ad. Эти белки включают аминокислотную последовательность mP450_{scc}, с N- или C-концом которой слита последовательность зрелой формы небольшого (12 кДа) белка Ad, который является ярко выраженным гидрофильным белком, несущим общий отрицательный заряд [44]. Предполагалось, что наличие домена Ad, сохраняющего свойства нативного белка [139] и, следовательно, расположенного на поверхности цитоплазматической мембраны, может создавать конформационное напряжение в структуре белка P450_{scc}, «фиксируя» концы молекулы у поверхности мембраны. В случае участия концевых участков полипептидной цепи P450_{scc} в процессе его сворачивания, присоединение домена Ad может влиять на свойства P450_{scc}.

Обнаружено, что наличие последовательности Ad на концах P450_{scc}-домена не препятствует связыванию белков с мембраной и связыванию гема. Можно отметить, что при экспрессии в клетках *E. coli* других модельных белков с модифицированным N-концом получены аналогичные результаты: несмотря на экранировку N-конца mP450_{scc} протяженной аминокислотной последовательностью, включающей 52 аминокислоты (His6preP450_{scc}) и на удаление более 50 аминокислот ($\Delta 1-53$ mP450_{scc}), модельные белки, как и немодифицированный mP450_{scc}, обнаруживались в клеточной мембране [140].

Слияние N-конца P450 с Ad несущественно влияет на процесс сворачивания белка и не приводит к структурной деформации домена P450; при модификации C-конца значительно увеличивается фракция белка с неправильно свернутым P450 ($P450/P420=0,2$). Удельная активность (в расчете на содержание P450-формы) mP450_{scc}-Ad

примерно равна активности немодифицированного mP450, модификация N-конца P450scs в белке Ad-mP450scs приводит к снижению активности фермента на 30%. Таким образом, COOH-концевая область последовательности более, чем NH₂-концевая, важна для обеспечения правильного сворачивания и стабильности белка, а NH₂-концевая область молекулы P450scs, по-видимому, играет роль в поддержании структуры каталитически-активного фермента.

Итак, изучение топогенеза цитохрома P450scs в модельных системах на основе клеток дрожжей и бактерий позволило выявить позитивные и негативные моменты использования таких гетерологических моделей для экспрессии цитохрома P450scs. Показано, что встраивание новосинтезированных полипептидных цепей цитохрома P450scs в мембрану является обязательной стадией формирования холо-формы белка. Работы по экспрессии mP450scs в *E. coli* показали, что характеристики mP450scs, синтезирующегося в клетках бактерий, соответствуют характеристикам нативного белка и что цитохром P450scs млекопитающих способен осуществлять ферментативную реакцию, используя в качестве редокс-партнеров белки бактериальной клетки. Изучение импорта цитохрома P450scs в митохондрии дрожжей *S. cerevisiae* выявило критическую стадию импорта P450scs в дрожжевые митохондрии и в какой-то мере подтвердило тезис о его «тканеспецифичности», которая проявляется в дрожжах на стадии процессинга и внутримитохондриальной компартментализации.

V. ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОЛУЧЕНИЯ СТЕРОИДОВ

При конструировании трансгенных систем «субстратспецифичные цитохромы P450 – микроорганизм» должны быть сохранены следующие принципы структурно-функциональной организации мультиферментных систем: 1) высокая аффинность белок-белковых взаимодействий и возможная замена в трансгенных системах белков ЭТС млекопитающих на собственные белки микроорганизмов, обеспечивающие более эффективное использование восстановительных эквивалентов при активации молекулярного кислорода [3]; 2) сохранение регуляторного принципа равновесия спиновых форм цитохрома P450 в трансгенных системах, как проявление наиболее предпочтительных конформаций и редокс-потенциалов при реализации взаимодействий экспрессированных гемопротеидов с физиологическими лигандами [141]; 3) сохранение аффинности при взаимодействии с субстратами и интермедиатами,

с учетом необходимости направленного транспорта и стерического соответствия, и проявления в ряде случаев множественных активностей одной молекулярной формой фермента [142, 143].

Технология промышленного получения стероидных гормонов и лекарственных средств на их основе включает в качестве начальной стадии микробиологическую трансформацию одного из природных стероидов (холестерина, эргостерина, β -ситостерина). При этом происходит полная деградация боковой цепи и образуются андрогены (андростендион и андростендиендион), которые в последующих химико-ферментативных стадиях превращаются в соединения, дающие начало всему спектру стероидных гормонов (минералокортикоидов, глюкокортикоидов, половых гормонов). Использование трансгенных микроорганизмов, синтезирующих белки, которые обеспечивают синтез стероидных гормонов, может позволить получать прегнаны путем микробиологической биотрансформации с проведением нескольких реакций в одну технологическую стадию, что принципиально меняет технологию производства конечных стероидных препаратов. Важным условием для выбора оптимального реципиента для молекулярного клонирования является определение базовой активности микроорганизмов в отношении стероидов и установление состава белковых компонентов микроорганизмов, которые могут являться редокс-партнерами цитохромов P450. При этом следует учитывать, что наличие собственных ферментов, способных осуществлять модификацию стероидных субстратов, может приводить к образованию желательных или нежелательных побочных продуктов [143, 144].

РЕКОНСТРУКЦИЯ СТЕРОИДГИДРОКСИЛИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ ЦИТОХРОМА P450_{sc} МЛЕКОПИТАЮЩИХ В КЛЕТКАХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для создания рекомбинантных штаммов микроорганизмов, способных осуществлять метаболические процессы трансформации стероидов, необходимо обеспечить введение в клетки-реципиенты нескольких генов, кодирующих белки одной или нескольких многокомпонентных систем. В литературе описаны различные методические подходы, разработанные для осуществления коэкспрессии белков [145–151].

Конструирование и экспрессия слитых белков

Известно, что природные стероидтрансформирующие ферментные системы обладают относительно низкой функциональной активностью – максимальные значения числа оборотов для P450_{sc},

P450c11 или P450c17 не превышают 100. Идея создания слитых монооксигеназных систем, объединяющих в составе одной полипептидной цепи все компоненты, необходимые для катализа, возникла после того, как были обнаружены природные «слитые» монооксигеназы [152, 153], в частности, бактериальный цитохром P450–BM3, демонстрирующий очень высокую каталитическую активность (более 1000 оборотов). В состав полипептидной цепи этого белка входят 2 каталитических домена (один содержит P450-подобный домен, другой – участки связывания FAD и FMN, как в CPR). Обнаружение природных прототипов послужило стимулом к созданию двухкомпонентных (микросомальных) [154–157] и трехкомпонентных (митохондриальных) [158–164] слитых монооксигеназ в надежде на то, что в пределах единой молекулы будет происходить более эффективный перенос электронов между белками-партнерами. Исследования двухкомпонентных слитых монооксигеназ показали, что в слитых белках может осуществляться более эффективное взаимодействие компонентов в сравнении с системами, в которых активность обеспечивается независимым взаимодействием отдельных компонентов [165–168]. Показано, что с целью получения максимально активных вариантов слитого белка можно изменять взаимное расположение доменов и междоменных линкеров [155, 167]. Однако в ряде случаев активность слитого белка увеличивалась при добавлении изолированной CPR [169, 170]. Выводы, касающиеся соотношения активности трехкомпонентных систем и слитых монооксигеназ, также различны. COS-1 клетки, экспрессирующие слитые белки preP450scs-AdR-Ad [158, 159] и preP45027A1-AdR-Ad [160], проявляют большую соответствующую монооксигеназную активность, чем клетки, экспрессирующие совместно эквимоллярные количества preP450scs, AdR и Ad. Однако при экспрессии в COS-1 клетках слитой дезоксикортизолгидроксилазы (preP450c11-Ad-AdR) полученная система оказалась менее эффективной, чем цитохром P450c11, функционирующий в комбинации с коэкспрессированными или даже эндогенными компонентами монооксигеназы [161].

Изучение трехкомпонентных монооксигеназ, включающих прокариотический P450cam [162] и микросомальный P4501A1 [163], выделенных после экспрессии в клетках *E. coli* и охарактеризованных с использованием традиционных энзимологических методов, показало, что эти белки представляют собой самодостаточные каталитические единицы, эффективно функционирующие в результате внутримолекулярного транспорта электронов. Активность выделенного белка путидаредоксинредуктаза-путидаредоксин-P450cam

сопоставима с активностью системы, реконструированной из индивидуальных белков (1:1:1).

Взаимодействие каталитических доменов в слитых белках, составленных из компонентов холестерингидроксилазной/лиазной системы

С целью повышения активности природной системы цитохрома P450_{scc} были сконструированы трех- и двухкомпонентные гибридные белки, составленные из цитохрома P450_{scc}, Ad и AdR коры надпочечников быка. При изучении слитых белков внимание было уделено не только каталитическим свойствам, но и таким аспектам, как сворачивание отдельных доменов в составе общей полипептидной цепи, формирование активных центров доменов и взаимодействие между компонентами системы в составе слитого белка [139, 164, 171].

При использовании искусственной слитой кДНК, кодирующей preP450_{scc}-AdR-Ad [158], сконструированы кДНК, кодирующие preP450_{scc}(h)-AdR(h)-Ad(h) (гомологический вариант preF2(h), h – human) и pre-CoxIVP450_{scc}(b)-AdR(h)-Ad(h) (гетерологический вариант preF2(b-h) с preP450_{scc} быка (b – bovine), в котором лидерная последовательность P450_{scc} заменена на препоследовательность IV-й субъединицы дрожжевой цитохром *c*-оксидазы). Плазмиды, включающие данные кДНК, обеспечивали достаточно эффективную экспрессию гибридных белков в дрожжах *S. cerevisiae*, однако после импорта в митохондрии белки F2(b-h) и F2(h) подвергались интенсивному протеолизу [164]. Так как низкое содержание активных слитых белков в митохондриях дрожжей препятствовало получению их более подробной характеристики, для экспрессии зрелых форм белков F2(h) и F2(b-h) были использованы клетки *E. coli* [139]. Кроме того, был сконструирован гибридный белок AdR(h)-Ad(h)-P450_{scc}(h) (AAP) с измененным порядком расположения доменов в полипептидной цепи по сравнению с F2(h), в котором COOH-конец, функционально важный для правильного сворачивания P450_{scc} [138], является свободным. Так, перемещение P450_{cam}-фрагмента с NH₂-конца на COOH-конец гибридного белка приводило к 3-кратному увеличению активности слитой монооксигеназы [162]. При исследовании тройных гибридных белков был установлен ряд интересных фактов: (1) значительная доля рекомбинантных белков встраивается в мембрану клеток *E. coli*, (2) спектры клеточного гомогената и мембранной фракции не характерны для интактного P450_{scc}; (3) белки подвергаются внутриклеточному протеолизу, причем набор низкомолекулярных продуктов, иммуногенных по

отношению к антителам к P450_{scc}, AdR и Ad, для разных гибридных белков различен (основным продуктом протеолиза F2(b-h) и F2(h) является 65-кДа белок, в случае AAR – 33-кДа белок). Все это позволяет заключить, что указанные белки имеют разную структуру вследствие разного взаимного расположения белковых доменов. Эффективный протеолиз тройных гибридов позволяет предположить, что сворачивание белков в компактную глобулу затруднено, и они преимущественно принимают конформацию, в которой участки, чувствительные к протеиназам, экспонируются в окружающую среду. Увеличения эффективности сворачивания белка в компактную структуру не удалось добиться ни при осуществлении синтеза гибридов в штаммах, дефицитных в отношении Lon протеиназы, ни при коэкспрессии молекулярного шаперона GroESL.

Слитые трехкомпонентные холестерингидроксилазы обладают более низкой активностью, чем система, реконструированная из изолированных P450_{scc}, AdR и Ad (в отношении 1:1:1): удельные активности белков F2(b-h) и F2(h), измеренные в гомогенатах клеток, на порядок меньше, а активность белка F2(b-h), выделенного из лизатов клеток *E. coli* методом аффинной хроматографии, почти на два порядка ниже активности реконструированной системы. Активности белков F2(b-h) и F2(h) и в гомогенатах *E. coli*, и в лизатах митохондрий *S. cerevisiae* существенно возрастают при добавлении экзогенных компонентов данных белков. Следовательно, в слитых белках, синтезированных в клетках бактерий и дрожжей, существуют ограничения для взаимодействия каталитических доменов P450_{scc}, Ad и AdR и/или деформация их активных центров.

Согласно предполагаемым механизмам взаимодействия Ad с AdR и P450_{scc} (см. главу III), для достижения эффективного внутримолекулярного транспорта электронов в слитой холестерингидроксилазе/лиазе домены P450 и AdR должны быть расположены таким образом, чтобы они могли либо формировать временный тройной комплекс с Ad, либо последовательно с ним взаимодействовать. Реализация «челночного» механизма требует высокой взаимной подвижности доменов – слитая молекула должна иметь гибкую подвижную конформацию, что сразу же делает ее потенциальной мишенью для внутриклеточных протеиназ. В работах [139, 158] было обнаружено существование обратной связи между активностью слитых холестерингидроксилаз/лиаз и их устойчивостью к протеолизу. При этом оказалось, что наиболее активные слитые полиферментные системы присутствуют в клетках в незначительных количествах при высоком содержании их фрагментов, что согласуется с «челночным»

механизмом функционирования слитой холестерингидроксилазной/лиазной системы.

Сворачивание гибридных белков изучалось с использованием более простых моделей – двухкомпонентных белков AdR-Ad, Ad-P450_{scs} и P450_{scs}-Ad [139]. При экспрессии в клетках *E. coli* двойные гибриды, в отличие от трехкомпонентных, не подвергаются протеолизу. Определение активности гибридных молекул в присутствии экзогенных индивидуальных белков, входящих в их состав, выявило наличие в каждом белке лимитирующего компонента: в белках mP450_{scs}-Ad и Ad-mP450_{scs} это P450_{scs}, а в белке AdR-Ad – Ad. Установлено, что формирование одних и тех же доменов в составе разных гибридных белков осуществляется по-разному [139].

Таким образом, при сворачивании слитых белков, составленных из компонентов холестерингидроксилазной/лиазной системы, формирование каталитических доменов в составе общей полипептидной цепи зависит от природы и взаиморасположения аминокислотных последовательностей отдельных доменов и их аранжировка осуществляется в результате кооперативного процесса, определяющего нативность отдельных доменов и результирующую активность слитых монооксигеназ.

Результаты работы по дизайну слитой холестерингидроксилазной/лиазной системы [139] выявляют ряд общих проблем формирования и функционирования слитых полиферментных систем (деформация активных центров, структурные ограничения для их взаимодействия, подверженность протеолизу) [139], что позволяет оценить возможность их использования в практических целях.

Совместная экспрессия индивидуальных компонентов холестерингидроксилазной/лиазной системы в клетках E. coli

Развитие би- и полицистронных систем для коэкспрессии белков сделало возможным реконструкцию ряда активных монооксигеназных систем в бактериальных клетках [150, 172–174].

На основе плазмиды pTrc99A/P450_{scs} [121] были сконструированы две генетические конструкции для коэкспрессии зрелых белков холестерингидроксилазной системы. Первая – это pTrc99A/P450_{scs}/AdR/Ad, в которой кДНК P450_{scs}, AdR и Ad находятся в составе одной экспрессионной кассеты. Вторая – pTrc/P450-AdR.Ad, в которой кДНК P450_{scs} и AdR находятся в составе одной экспрессионной кассеты, а ген Ad встроен в ту же плазмиду в составе отдельной транскрипционной единицы (регулируется собственными промотором и терминатором) [175]. В клетках *E. coli* эти плазмиды

направляют синтез всех трех белков, внутриклеточная локализация которых соответствует локализации соответствующих белков коры надпочечников быка. Гомогенаты клеток, культивируемых в условиях индукции экспрессии гетерологических кДНК, в системе *in vitro* демонстрируют холестерингидроксилазную/лиазную активность, обусловленную наличием каталитически-активных форм всех трех белков.

Для оптимального функционирования холестерингидроксилазной/лиазной системы *in vivo* Ad должен находиться в избытке по отношению к другим белкам [176]. Ожидалось, что использование плазмиды pTgc/P450-AdR.Ad обеспечит более эффективную трансляцию Ad с собственной короткой молекулы мРНК, чем плазида pTgc99A/P450scc/AdR/Ad. Однако определение стехиометрического соотношения экспрессируемых белков показало, что использование для коэкспрессии белков второй конструкции (pTgc/P450-AdR.Ad) не приводит к заметному увеличению содержания Ad по отношению к содержанию других компонентов холестерингидроксилазной/лиазной системы. Уровни экспрессии гетерологических белков в клетках *E. coli* обычно не соответствуют содержанию функционально-активных белков, поскольку часть молекул таких белков присутствует в них в неактивной форме в составе телец включения. Значительная часть рекомбинантных белков цитохрома P450scc, AdR и Ad (~50% от общего содержания) также образует тельца включения в бактериальных клетках [175].

ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

В 1989 г. была осуществлена гетерологическая экспрессия P450c17 в дрожжах *S. cerevisiae* под контролем промотора алкогольдегидрогеназы [177]. Позже была детально изучена субстратная специфичность рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117 α , содержащих ген P450c17 под контролем промотора *GAL10*. Сконструированные дрожжи осуществляют последовательную биотрансформацию прогестерона до 17 α -гидроксипрогестерона и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она. Структура указанных соединений доказана на основании данных ВЭЖХ, ТСХ и масс-спектрометрии. Реакция 17 α -гидроксирования осуществляется в результате функционального сопряжения гетерологично экспрессируемого цитохрома P450c17 и CPR дрожжей. Скорость этой реакции уменьшается в ряду субстратов: прогестерон > 11 β -гидроксипрогестерон > 11 α -гидроксипрогестерон > 19-гидроксипрогестерон. Реакция 20 α -восстановления, которая регистрируется после образования 17 α -гидроксипрогестерона, осущес-

ствляется дрожжевым белком-ортологом 20 α -ГСД млекопитающих. Скорость этой реакции уменьшается в ряду: 17 α -гидроксипрогестерон > 21-гидроксипрогестерон > 19-гидроксипрогестерон [178–180].

Поиск по функциональным участкам белков и гомологии структур позволил идентифицировать гены, соответствующие белкам, отвечающим за побочные реакции – *GCY1* (индуцируемый галактозой кристаллин-схожий белок дрожжей), *YPR1* (альдо-кето редуктаза дрожжей) и *ATF2* (О-ацетилтрансфераза). Биотрансформация прегн-4-ен-20(α,β)-ол-3-онов рекомбинантными клетками *S. cerevisiae* YEp5117 α протекает в следующем порядке: окисление 20(α,β)-дигидропроизводных прогестерона до прогестерона, 17 α -гидроксилирование и 20(α,β)-восстановление. 20-Окисление обусловлено как обратной реакцией, катализируемой собственным ферментом дрожжей, так и оксидазной активностью цитохрома P450c17 [180].

Последний этап биосинтеза глюкокортикоидов катализирует цитохром P450c11. Успешная экспрессия стероид 11 β -гидроксилазы в рекомбинантных дрожжах описана в работе [181]. Авторы осуществили коэкспрессию митохондриального Ad и модифицированного цитохрома P450c11, в котором исходная препоследовательность была заменена на дрожжевую. При этом было установлено, что дрожжи *S. cerevisiae* синтезируют собственный митохондриальный белок, подобный NADPH-зависимой AdR. В опытах с *S. cerevisiae*, в которых были коэкспрессированы цитохром P450c11 и цитохром P450scs, найдено, что цитохром P450scs повышает гидроксилазную активность P450c11 *in vivo* и *in vitro* [116].

В развитие этих работ в дрожжах *S. cerevisiae* были реконструированы две начальных стадии стероидогенеза млекопитающих, которые осуществляются системой отщепления боковой цепи холестерина с цитохромом P450scs и 3 β -ГСД [148]. При использовании холестерина в качестве исходного субстрата возникает проблема, связанная с его проникновением в клетку. Для того, чтобы обойти это затруднение, метаболизм *S. cerevisiae* изменили таким образом, чтобы при росте на глюкозо- или этанол-содержащей среде клетки продуцировали новый интермедиат – растительный аналог холестерина вместо эргостерина – природного стерола дрожжей. Отличие эргостерина от холестерина состоит в наличии двойных связей при C-7 и C-22 и метильной группы при C-24, поэтому конструирование биосинтеза было направлено на разрушение гена $\Delta 22$ -десатуразы и введение гена $\Delta 7$ -редуктазы из *Arabidopsis thaliana*. Полученный трансгенный штамм оказался способным синтезировать новый интермедиат – эргоста-5-енол вместо эргостерина. Это было замечательным достижением,

так как эргоста-5-енол может поддерживать жизнедеятельность микроорганизмов, заменяя эргостерин в мембранах, и в то же время служить исходным субстратом для P450_{ssc} млекопитающих [148].

В работе [182] осуществлена полная реконструкция синтеза кортизола с использованием рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae*. Кортизол был получен из простого источника углерода в процессе из восьми стадий, который включал собственно биосинтез стерина дрожжей, стадию рекомбинантных дрожжей, использующих один растительный фермент, и пять дополнительных ферментативных реакций, катализируемых восемью белками млекопитающих. Были проведены следующие генетические модификации: была осуществлена экспрессия растительного фермента ($\Delta 7$ -редуктазы), в результате чего биосинтез эргостерина приводил к получению соответствующих субстратов P450_{ssc}, а также восьми белков млекопитающих (цитохромов P450_{ssc} и P450c11, P450c17, P450c21, Ad, AdR, CPR, 3 β -ГСД), вовлеченных в биосинтез гормонов в коре надпочечников млекопитающих. Результатом работы стали штаммы дрожжей, которые синтезировали кортизол как доминирующий стероид при росте на глюкозе или этаноле.

Таким образом, был реконструирован наиболее сложный на сегодняшний день метаболический путь в эукариотических микроорганизмах. Другими словами, был создан биосинтетический аналог коркового слоя надпочечной железы млекопитающих. Безусловно, эта работа является выдающимся достижением в области метаболической протеомики [182]. Тем не менее, это не означает, что создание новых, еще более эффективных трансгенных микроорганизмов нецелесообразно. Пути открыты в направлении поиска микроорганизмов-реципиентов, адаптированных к трансформации гидрофобных соединений, и по линии упрощения генно-инженерных манипуляций.

Алкан-утилизирующие дрожжи (*Candida maltosa*, *C. tropicalis* или *Yarrowia lipolytica*) хорошо растут на гидрофобных субстратах (алканы, алкены, жирные кислоты, масла). В утилизацию гидрофобных субстратов этих дрожжей вовлечены несколько систем цитохромов P450 (семейство генов CYP52), которые характеризуются очень высокой активностью ферментов с числом оборотов для субстратов 1000–2000 мин⁻¹ в условиях *in vivo*. Это достигается благодаря наличию эффективных систем транспорта субстратов (индуцируемые системы поглощения и внутриклеточного транспорта гидрофобных соединений), высокому уровню экспрессии собственных компонентов, обеспечивающих транспорт электронов, и селективным механизмам выведения окисленных продуктов [183–185].

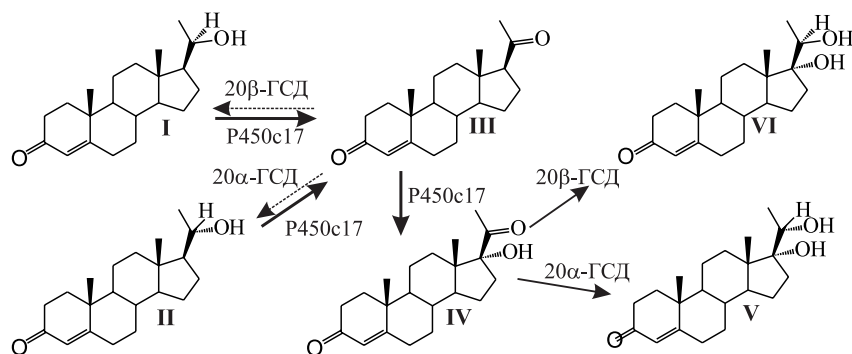


Рис. 4. Ферментативные превращения прегн-4-ен-20β-ол-3-она (I) и прегн-4-ен-20α-ол-3-она (II) в прогестерон (III) с последующим превращением его в 17α-гидроксипрогестерон (IV) и 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-он (V) и 17,20β-дигидроксипрегн-4-ен-3-он (VI) трансгенными дрожжами *Y. lipolytica*, экспрессирующими P450c17 [188].

Механизм, обеспечивающий утилизацию углеводов клетками *Y. lipolytica*, интенсивно изучался с середины 80-х годов. Было установлено, что при росте клеток на углеводородах индуцируется особый высокогликозилированный внеклеточный белок липосан – эмульсификатор [186], облегчающий попадание гидрофобных субстратов в клетку [187].

Показано, что при экспрессии P450c17 в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica* наблюдается активное превращение прогестерона в 17α-гидроксипрогестерон [180,188], что указывает на эффективное взаимодействие экспрессированного P450c17 с дрожжевой CPR. При превращении прогестерона рекомбинантными дрожжами *Y. lipolytica* E129A15, экспрессирующими P450c17 под контролем промотора изоцитрат-лиазы, установлено образование, помимо 17α-гидроксипрогестерона, двух дополнительных стероидных продуктов – 17α,20β- и 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-онов, строение которых доказано с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, ТСХ и ЯМР-спектроскопии [180] (рис. 4). Окисление хромовой кислотой по Джонсу смесей стероидов (17α-гидроксипрогестерона, 17α,20β- и 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-она) сопровождалось расщеплением связи C17–C20 в диолах с образованием андрост-4-ен-3,17-диона – второго продукта ферментативных реакций, катализируемых P450c17 [180, 188].

Получены рекомбинантные штаммы *Y. lipolytica*, способные осуществлять экспрессию белков холестерингидроксилазной/лиазной

системы (P450scs, AdR, Ad) (рис. 5А, 5Б), а также коэкспрессию белков холестерингидроксилазной/лиазной системы и P450c17 [189], что позволяет обеспечить сопряжение трансформации холестерина до прегненолона (прогестерона) с синтезом 17 α -гидроксилированных производных. При конструировании указанных рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* нами был использован новый подход для введения нескольких чужеродных кДНК в геном дрожжей, включающий (1) коинтеграцию множества копий разных кассет экспрессии в области повторяющихся элементов генома дрожжей (rDNA или участки LTR zeta ретротранспозона Ylt1 [190]) и (2) конструирование диплоидных штаммов с использованием гаплоидных трансформантов разного полового типа, что позволяет увеличить количество и получить новые комбинации кассет экспрессии с разными гетерологическими кДНК в одном диплоидном штамме (рис. 5А).

Интегративные вектора, содержащие кДНК зрелых форм белков холестерин-трансформирующей системы и P450c17 под контролем строгого регулируемого промотора и терминатора изоцитрат-лиазы (индукция этанолом и алканами, репрессия глюкозой [191–193]), были сконструированы на основе мультикопийных интегративных плазмид р64РТ и р67РТ (последовательности, обеспечивающие интеграцию – rDNA или LTRzeta ретротранспозона Ylt1, маркер для селекции *ura3d4* и pICL1-*SphI*-ICL1t) [194]. Саузерн-гибридизацией показана интеграция в геном до 3 векторов при одновременной трансформации клеток гаплоидных реципиентных штаммов *Y. lipolytica* смесью идентичных плазмид, включающих кассеты экспрессии с разными гетерологическими кДНК. Получены диплоидные штаммы, в которых присутствуют кассеты экспрессии (от 3 до 5) для белков холестерингидроксилазной/лиазной системы и P450c17. Экспрессия белков доказана методом Вестерн-блоттинга. Функциональная экспрессия в клетках *Y. lipolytica* двух систем P450 млекопитающих была подтверждена способностью клеток осуществлять биотрансформацию холестерина в прегненолон и далее в 17 α -гидроксипрегненолон, а также прогестерона в 17 α -гидроксипрогестерон. В данной работе показано, что при использовании метода, описанного выше, можно конструировать трансгенные дрожжи *Y. lipolytica*, способные экспрессировать 6 гетерологических белков, что, в частности, делает возможным создание новых штаммов, коэкспрессирующих большее количество белков, участвующих в процессе стероидогенеза.

Преимущества использования дрожжей *Y. lipolytica* для биотрансформации стероидов перед дрожжами *S. cerevisiae* можно продемонст-

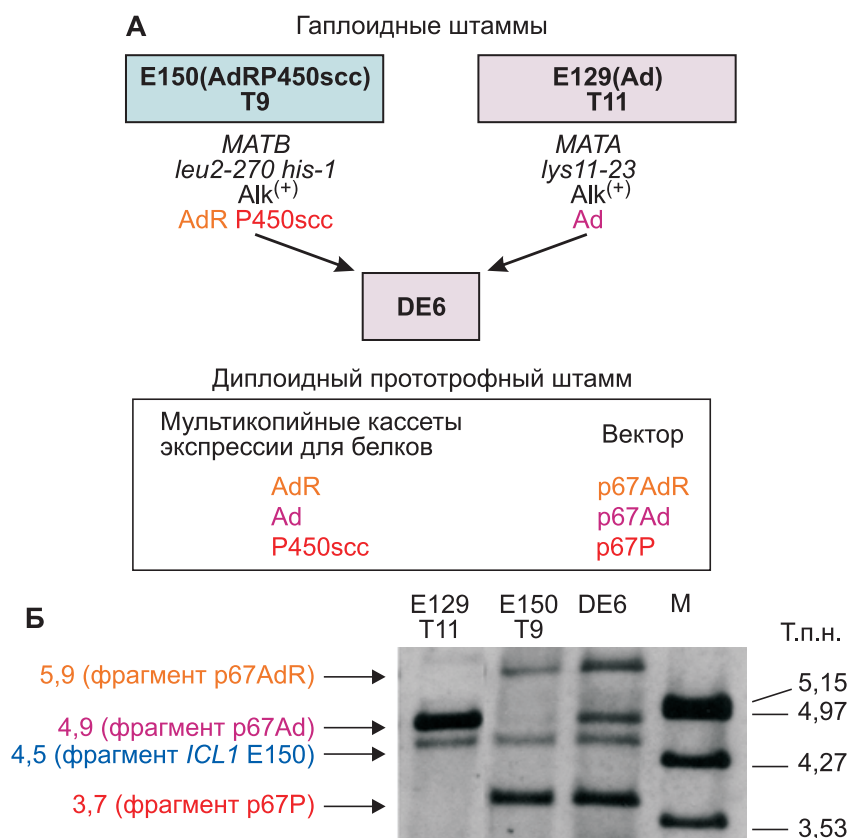


Рис.5. Конструирование рекомбинантного диплоидного штамма дрожжей *Y. lipolytica* DE6, осуществляющего коэкспрессию компонентов холестерин-гидроксилазной/лиазной системы млекопитающих (цитохрома P450scc, AdR и Ad) (А) и анализ методом Саузерн-гибридизации штамма DE6 и исходных гаплоидных мультикопийных трансформантов *Y. lipolytica* E150 T9 и E129 T11 (Б). Скрещивание использовано для комбинирования трех кассет экспрессии с разными гетерологическими кДНК в одном диплоидном штамме. Родительские штаммы E150 T9 и E129 T11, использованные для скрещивания, получены соответственно в результате трансформации E129L мультикопийной плазмидой p67Ad, и одновременной трансформации E150 мультикопийными плазмидами p67AdR и p67P.

При анализе хромосомной ДНК дрожжей (рестрицированной эндонуклеазой *NcoI*) в качестве зонда для Саузерн-гибридизации использован *SalI*-фрагмент вектора p67AdP (*pICL1-AdP*), позволяющий детектировать фрагменты гена *ICL1* и кассет экспрессии с гетерологическими кДНК (вследствие присутствия *pICL1*), входящих в состав интегративных векторов. Маркеры молекулярной массы (M) – препарат λ -DNA, рестрицированной *EcoRI/HindIII*.

рировать на примере рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* E129A15 (экспрессия P450c17), а также *Y. lipolytica* DC3, *Y. lipolytica* DC5, *Y. lipolytica* DE (коэкспрессия P450c17 и дрожжевой CPR) [195]. Определены каталитические параметры (V_{max} , K_m) для различных линий рекомбинантных дрожжей *Y. lipolytica*, близкие значения которых свидетельствуют о том, что в различных рекомбинантных микроорганизмах P450c17 синтезировался в нативном состоянии. Дополнительная экспрессия CPR сопровождалась снижением уровня синтеза гетерологично синтезируемого P450c17 и общей активности рекомбинантных клеток, но приводила к повышению выхода 17 α -гидроксипрогестерона.

Регуляцией активности промотора изоцитрат-лиазы достигнуто 98 %-е превращение прогестерона в 17 α -гидроксипрогестерон в случае *Y. lipolytica* DC5, что исключает, в отличие от трансгенных дрожжей *S. cerevisiae* [178, 182], необходимость разрушения генов, кодирующих белки-ортологи 20 α - и 20 β -ГСД. Селективное образование 17 α -гидроксипрогестерона было обеспечено в результате использования промотора изоцитрат-лиазы (отсутствие индукции галактозой белка Gcy1p, как в случае промотора *GAL10*, ведущего к образованию 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она) и быстрого выведения целевого 17 α -гидроксипрогестерона из клетки (отсутствие индукции этим стероидом белков-ортологов 20(α , β)-ГСД) [195].

VI. СТЕРОИДТРАНСФОРМИРУЮЩИЕ ТРАНСГЕННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На современном уровне процесс разработки новых лекарств начинается с идентификации белка с известной структурой, ответственного за появление или развитие болезни. Задачей следующей стадии является поиск лиганда (ингибитора, активатора, модификатора), обладающего, в частности, максимальным сродством к этому белку. Далее осуществляется направленный синтез оптимального лиганда, исходя из критериев взаимного конформационного соответствия функциональных центров белка и синтезируемых соединений. В связи с общей тенденцией, направленной на снижение числа животных, используемых на предварительных стадиях медико-биологических исследований, разработку систем гетерологической экспрессии ферментов или ферментных систем млекопитающих в клетках микроорганизмов можно рассматривать как новое перспективное направление, позволяющее использовать в фармакологических

исследованиях подходы метаболической протеомики. Необходимо отметить, что существуют сложности для дизайна селективных ингибиторов, так как пока отсутствуют трехмерные структуры мембраносвязанных стероидсинтезирующих P450, полученные экспериментальными методами.

Молекулярными мишенями для селективных ингибиторов, которые разрабатываются и/или используются как лекарства, являются следующие формы стероидтрансформирующих цитохромов P450: P450c17 – при терапии рака и доброкачественной гиперплазии простаты [196–203]; P450c19 – рака молочной железы и яичников [202, 204–206]; P450c18 – при гиперальдостеронизме и опосредованной им гипертензии, ишемии и фиброзе миокарда [196, 207–210].

Для применения в качестве лекарств предложено большое число ингибиторов P450c17 различной природы [197–201]. Многие из них характеризуются высоким сродством к P450c17 и селективностью (различие в сродстве к P450c17 и к другим цитохромам P450 – в десятки раз [199, 200]). Вследствие высокой степени гомологии пар P450c17 и P450c21, P450c18 и P450c11, а также катализа лиазной и гидроксилазной реакций в одном и том же активном центре P450c17, возникают сложности совместного ингибирования патогенетической и физиологических реакций. Однако совместное ингибирование P450c17 и других P450 может иметь фармакологическое преимущество: ингибирование P450c19 – для терапии эстроген-зависимых патологий [202], P450c24 (24-гидроксилазы) – при назначении витаминов D для терапии опухоли простаты [203], P450 печени – для минимизации биodeградации назначаемых препаратов [203]. Некоторые из таких соединений (ингибиторов P450c17) также способны ингибировать 5 α -стероид редуктазу (другой ключевой фермент биосинтеза андрогенов) [200] и выступать антагонистами рецепторов андрогенов [198].

Ингибиторам P450, участвующих в биосинтезе стероидных гормонов, посвящено большое количество работ (см. обзоры последних лет [200, 214–217]).

Принципиальными структурными фрагментами подавляющего большинства этих ингибиторов являются: 1) производное от субстрата стероидное ядро и 2) гетероцикл, способный выступать в качестве шестого лиганда Fe гема P450. Эти два фрагмента являются ключевыми в структурах трех основных классов ингибиторов P450 стероидогенеза: стероидные, гетероциклические нестероидные и гетероциклические стероидные. Гетероциклические ингибиторы потенциально способны уменьшать активность ряда других P450, а

стероидные – активность других ферментов биосинтеза стероидов, в том числе не являющихся цитохромами P450, и выступать агонистами или антагонистами стероидных рецепторов. Необходимо отметить, что гетероцикл-лиганд и фармакофор, ответственный за механизм-зависимую инактивацию (смотри далее), в общей структуре ингибитора расположен аналогично сайту окисления стероидного субстрата, т.е. в непосредственной близости к гему [200, 214, 216].

Для стероидных ингибиторов P450c17 класса 17-гетероарил-андростанов и некоторых других групп показано, что 3 β -гидрокси-5-ен-производные характеризуются большей ингибирующей способностью, чем 3-кето- Δ^4 , аналогично субстратам P450c17 прогестерону и прегненолону [200]. Стероидные ингибиторы P450c19 форместан и экземестан также являются производными термодинамически более выгодного субстрата андростендиона (17-кетона), а не тестостерона (17 β -ола) [215, 216]. Для ряда стероидных ингибиторов P450c17 показано, что дополнительное введение Δ^{16} -связи повышает их ингибирующую способность [200]. Интересно также отметить стероидные ингибиторы P450c17 ряда 3 β -гидрокси-5-ен-производных андростанов, содержащие 17 β -(метилсульфоксидные), винилфторидные 20-F- $\Delta^{17,20}$ - и 21,21-F₂- $\Delta^{20,21}$ -20-CH₃- группы, имитирующие соответственно 20-кетогруппу-, 17,20- и 20,21-енольные таутомеры прегненолона [200, 201].

Стероидные ингибиторы P450 помимо обратимой конкуренции с субстратом могут вызывать непосредственную или механизм-зависимую инактивацию P450. Непосредственная инактивация реализуется вследствие наличия в структурах стерически доступных электрофильных фрагментов, способных ковалентно модифицировать нуклеофильные группы аминокислот и N-атомы гема активного центра P450-мишени. Примерами служат 3,4-дикетонный (форместан), сопряженные 1-ен-3-оновый и 6-метилен-4-ен-3-оновый (экземестан, 6-метиленпрогестерон), 17-азридин-2-ильный и 20-карбальдегидный фрагменты структур ингибиторов P450c17 и P450c19. Механизм-зависимая инактивация реализуется при наличии фрагментов, интермедиаты окисления которых посредством P450 способны выступать как инактиваторы, например, 17-O- или 17-N-циклопропильного (P450c17), этинильного или винильного в положениях 17, 18 и 19 (P450c18 и P450c19 соответственно) [18, 196, 200, 216].

В качестве гетероциклических лигандов Fe гема P450 чаще всего используются различные азолильные, пиридинильный и пиридин-2,6-дионовый фрагменты. Координационные свойства N-атома в составе одного и того же гетероцикла могут значительно

изменяться в зависимости от положения и характера заместителей вследствие смещения электронной плотности и стерических препятствий. Аналогично, в рядах однотипных гетероциклов (в частности, триазолов) данное свойство дополнительно зависит от взаиморасположения и природы гетероатомов. Например, способность производных бифенила ингибировать P450c17 была наибольшей в случае имидазола, менее активными были 1,2,4-триазол-1-ил производные, а 1,2,4-триазол-4-ил практически не ингибировали P450c17 [218].

Гетероциклы совмещают функции доставки ингибитора в активный центр P450 и его ингибирования, препятствуя передаче электронов с CPR и присоединению O₂ к Fe гема. Стероидный либо нестероидный остаток молекулы гетероциклического ингибитора цитохрома P450 биосинтеза стероидных гормонов препятствует связыванию субстрата и отвечает за дополнительные взаимодействия в активном центре определенного фермента-мишени, определяя селективность и повышая стабильность комплекса P450-ингибитор. Нестероидные остатки гетероциклических ингибиторов P450 представлены сочетаниями плоских, в большинстве своем ароматических, структур, напоминающими циклы стероидного ядра их субстратов или ингибиторов. Например, бифенильный фрагмент имитирует систему колец AC, нафталиновый – CD или AB (P450c17); 1-метилен-1,2,3,4-тетрагидронафталиновый и 1-метилен-2,3-дигидро-1H-инденный – AB (P450c18), ABD – 2-фенилнафталина (P450c17) [219–221]. В структурах практически всех ингибиторов P450 гетероцикл соединен с ароматическим фрагментом через один атом углерода (метиленовую группу). Также принципиально наличие полярных заместителей, имитирующих 3β-гидроксил или 3-кетогруппу и, реже, 17α-гидроксил стероидных субстратов [200, 220]. Дополнительные фрагменты в молекулы ингибиторов могут быть введены с учетом изучения докинга ингибиторов в активные центры P450-мишеней в компьютерных моделях.

Наилучшие показатели на данный момент с точки зрения введения в медицинскую практику имеют ингибиторы P450c17 абиратерон, проходящий сейчас II фазу клинических испытаний [222], и стероидный 17-1H-бензо[d]имидазол VN/124-1, дополнительно выступающий как антагонист андрогеновых рецепторов [198]. Ингибиторы P450c19 анастрозол (Аримидекс, AstraZeneca), летрозол (Фемара, Novartis) (нестероидные триазолы) и экземестан (Аромазин, Pfizer) (стероидный инактиватор) являются официальными лекарствами [215, 216] (рис. 6).

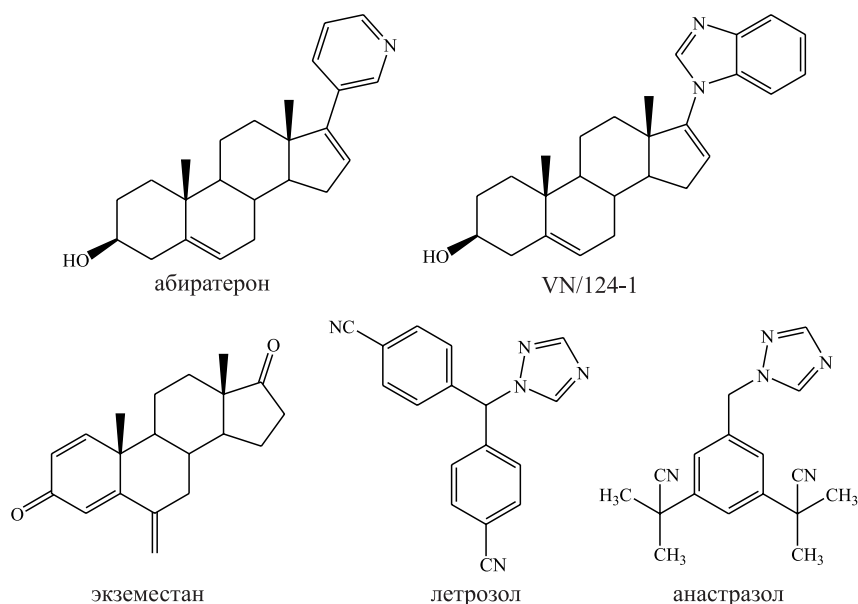


Рис. 6. Структуры ингибиторов P450c17 и P450c19, являющихся официальными лекарствами (нижний ряд), и некоторых наиболее перспективных ингибиторов в данном аспекте [198, 215, 216, 222].

Трансгенные бактерии и дрожжи, экспрессирующие ферменты биосинтеза стероидов, как тест-системы для первичной оценки потенциальных лекарственных средств

Рекомбинантные микроорганизмы, экспрессирующие *in vivo* функционально-активную P450-мишень, могут использоваться как тест-системы для скрининга потенциальных ингибиторов данного P450 [209, 210]. Активность цитохромов P450 в составе рекомбинантных микроорганизмов обеспечивается коэкспрессией белков природной ЭТС этих P450 или наличием собственных белков ЭТС, способных поддерживать активность гетерологических P450 [56, 72, 223]. В некоторых микроорганизмах обнаружены функциональные аналоги ГСД млекопитающих [178, 224], также рассматривающихся как фармакологические мишени для терапии аналогичных заболеваний [225].

Применение рекомбинантных микроорганизмов для скрининга ингибиторов P450 позволяет оценить общие токсические эффекты исследуемых веществ, а также вклад транспорта веществ, связывания с белками, индукции P450 и других белков в ингибирование активности P450-мишени [226, 227].

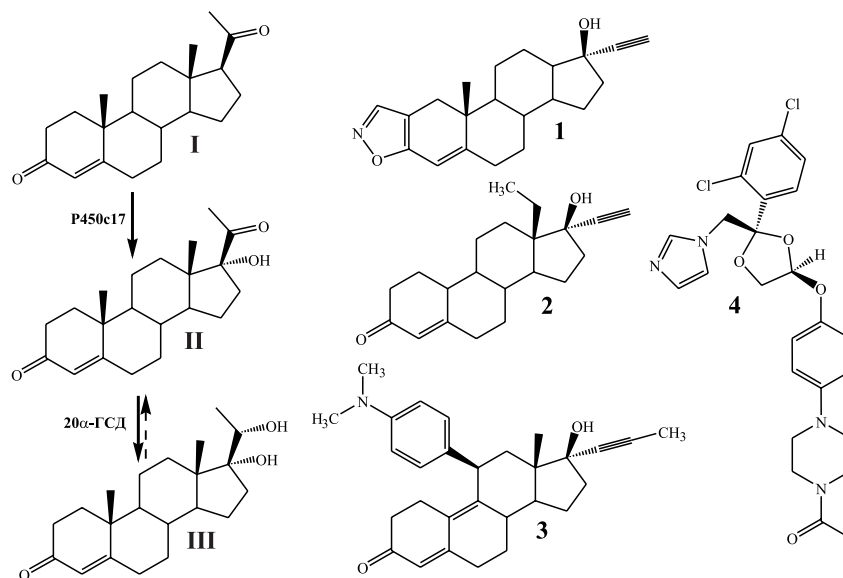


Рис. 7. Ферментативные превращения прогестерона (I) в 17α-гидроксипрогестерон (II) и 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-он (III) в рекомбинантных дрожжах *S. cerevisiae* GRF18YEp5117a, и структурные формулы некоторых исследованных модификаторов биосинтеза стероидных гормонов: 1 – даназол, 2 – левоноргестрел, 3 – мифепристон, 4 – кетоконазол (2R,4R-изомер) [228].

Опубликованы данные об использовании в качестве тест-системы клеток трансгенных бактерий *E. coli*, экспрессирующих P450c17 совместно с CPR. Эти бактерии демонстрировали 17α-гидроксилазную и 17,20-лиазную активности P450c17 при добавлении соответствующих стероидных субстратов к культуре клеток [228].

Рекомбинантные дрожжи *S. cerevisiae*, экспрессирующие P450c17, также были предложены в качестве тест-системы (рис. 7). Эти дрожжи проявляли прогестерон 17-гидроксилазную активность гетерологического P450c17, функционирующего совместно с дрожжевой CPR, способной поддерживать активность данного P450. Оценка пригодности данных дрожжей в качестве тест-системы проводилась с использованием 5 стероидных и 2 нестероидных соединений, включая кетоконазол, а также при проведении параллельных опытов с использованием микросом данных дрожжей [195, 228–230]. На первом этапе для обоснования рекомбинантных микроорганизмов *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a в качестве фармакологической модели были использованы известные лекарственные соединения, модифи-

цирующие биосинтез стероидов. С этой целью изучено влияние субстанций лекарств (кетоконазола, метирапона, дексаметазона, мифепристона, даназола, левоноргестрела) на соотношение биосинтетической и инактивирующей функций рекомбинантных микроорганизмов (рис. 6). Определены значения K_m/V_{max} , константы ингибирования и тип ингибирования изученных лекарственных соединений в реакциях 17 α -гидроксилирования прогестерона.

Установлено, что на начальных этапах биотрансформации действие даназола, мифепристона и кетоконазола характеризуется уменьшением образования 17 α -гидроксипрогестерона и потребления прогестерона. Замедленная трансформация прогестерона является результирующей двух последовательных процессов – 17 α -гидроксилирования и 20 α -восстановления. При соотношении (ингибитор)/(P450c17) 1000:1 и (ингибитор)/(прогестерон) 1:1 в условиях *in vivo* не было зафиксировано необратимого ингибирования P450c17 за счет ковалентного связывания даназола или мифепристона в активном центре гемопротеида. Даназол и мифепристон, имеющие, как и продукт, сопряженную Δ^4 -3-кето-структуру и 17-ОН группу, не модифицировали также по структурно-обусловленному механизму дрожжевой аналог 20 α -ГСД, так как соотношение 17 α -гидроксипрогестерона и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она на начальных этапах было одинаковым для контрольного эксперимента и для биотрансформаций в присутствии модификаторов. Замедленное образование 17 α -гидроксипрогестерона под действием кетоконазола на начальном этапе биотрансформации прогестерона отражает процесс замещения субстратом связанного с железом гема P450c17 имидазол-содержащего ингибитора – кетоконазола без его влияния на функциональные свойства аналога 20 α -ГСД [195, 228–230].

Рекомбинантные дрожжи *S. pombe*, экспрессирующие P450c18 или P450c11 (90% гомологии), также были предложены в качестве соответствующей тест-системы. Эти дрожжи проявляли альдостеронсинтазную и 11 β -гидроксилазную активности соответствующих P450 за счет белков собственных ЭТС (см. главу III). Оценка тест-системы проводилась с использованием 9 нестероидных азолов и 1 стероидного соединения, а также параллельных опытов с использованием культур клеток млекопитающих – V73MZ (китайского хомяка) и H295R (опухоль коры надпочечников человека), способных экспрессировать оба данных P450 [209, 210, 231].

Рекомбинантные дрожжи *S. pombe*, экспрессирующие P450c21 и P450c17, характеризующиеся высокой степенью гомологии, были использованы для сравнительной оценки влияния ингибиторов P450c17 на P450c21 [232].

К изучению метаболизма и токсичности лекарств, а также анализу влияния мутаций на функциональные свойства ферментов разрабатывается новый подход с использованием трансгенных клеток бактерий *E. coli* и *Salmonella typhimurium*, коэкспрессирующих P450 и CPR [233]. Наличие компьютерной модели трехмерной структуры белка-мишени, данные о докинге потенциальных веществ-лигандов, направленный синтез и использование трансгенных дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117, позволили установить, что 1-(3-бензилоксифенил)-1H-тетразол является потенциальным ингибитором цитохрома P450c17 – фермента, играющего важную роль в развитии опухолей предстательной железы человека [195, 227].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интенсивное многолетнее изучение ферментов, осуществляющих процесс стероидогенеза, заметно расширило представления о строении и функционировании монооксигеназных систем и стероид-гидроксилаз, участвующих в синтезе стероидных гормонов. Успешное клонирование кДНК этих ферментов открыло дорогу для современных молекулярно-биологических исследований.

Изучение структурно-функциональных свойств стероид-синтезирующих цитохромов P450 и механизмов регуляции биосинтеза стероидных гормонов служит необходимой предпосылкой, с одной стороны, для выяснения биохимических основ различных нарушений стероидогенеза и разработки подходов к коррекции дисфункции коры надпочечников, а с другой стороны, для конструирования биотехнологических систем направленного синтеза физиологически активных стероидов.

Традиционные методы получения стероидных гормонов (экстракция из растений и тканей животных, полный химический синтез, химико-ферментативный синтез) сделали доступными для медицинского применения широкий спектр лекарств, но в настоящий момент практически исчерпали свой потенциал с точки зрения промышленной технологии. Принципиально новой технологией в области синтеза субстанций лекарственных соединений можно считать использование трансгенных микроорганизмов, полученных с помощью техники рекомбинантных ДНК. Здесь сочетаются биотехнологические преимущества ферментативных трансформаций и возможность создания аналогов, моделирующих пути биосинтеза гормонов в стероидогенных тканях млекопитающих, включая человека. Предварительным этапом работ по конструированию таких

рекомбинантных микроорганизмов являются исследования, включающие экспрессию и изучение свойств белков стероидтрансформирующих систем в разных организмах-хозяевах, позволяющие оценить возможность приобретения белками нативных свойств в чужеродной среде и выбрать лучший микроорганизм-реципиент. С этой целью в ряде работ использованы системы гетерологической экспрессии белков, вовлеченных в процесс стероидогенеза млекопитающих, на основе клеток дрожжей и бактерий.

Очевидные преимущества алкан-утилизирующих «нетрадиционных» дрожжей *Y. lipolytica* в плане их использования для биотрансформации гидрофобных стероидов позволяют предполагать, что эти дрожжи могут эффективно применяться в биотехнологии. Сконструированные «очеловеченные» микроорганизмы с успехом можно использовать также для скрининга и направленного синтеза соединений, молекулярными мишенями которых являются субстратспецифичные цитохромы P450. В ближайшее время можно рассчитывать на установление 3D-структур мембраносвязанных стероидтрансформирующих P450, что должно облегчить проведение работ по созданию новых эффективных лекарственных соединений для лечения заболеваний, связанных с нарушениями функционирования ферментов, осуществляющих биосинтез стероидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsul, I.C., Nebert, D.W. (1996) *Pharmacogenetics*, **6**, 1–42.
2. Werck-Reichardt D., Feyereisen, R. (2000) *Genome Biol.*, **1**, 3003.1–3003.9.
3. Shkumatov, V.M., Usanov, S.A., Chashchin, V.L., Akhrem, A.A. (1985) *Pharmazie*, **10**, 757–773.
4. Miller, W.L. (1988) *Endocr. Rev.*, **9**, 295–318.
5. Payne, A.H., Hales, D.B. (2004) *Endocr. Rev.*, **25**, 947–970.
6. Sewer, M.B., Dammer, E.B., Jagarlapudi, S. (2007) *Drug Metabol. Rev.*, **39**, 371–388.
7. Miller, W.L., Auchus, R.J., Geller, D.H. (1997) *Steroids*, **62**, 133–142.
8. Usanov, S.A., Chashchin, V.L., Akhrem, A.A. (1990) in *Molecular Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application* (Ruckpaul, K., Rein, H., eds.), *Frontiers in Biotransformation*, Vol. 3, Berlin: Akademie-Verlag, pp. 1–57.
9. Miller, W.L. (2005) *Endocrinology*, **146**, 2544–2550.
10. Bose, H., Lingappa, V.R., Miller, W.L. (2002) *Nature*, **417**, 87–91.
11. Lala, D.S., Rice, D.A., Parker, K.L. (1992) *Mol. Endocrinol.*, **6**, 1249–1258.
12. Morohashi, K., Honda, S., Inomata, Y., Handa, H., Omura, T. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 17913–17919.

13. Mensah-Nyagan, A.G., Do-Rego, J.L., Beaujean, D., Loo-The, V., Pelletier, G., Vaudry, H. (1999) *Pharmacol. Rev.*, **51**, 63–81.
14. Катцунг Б.Г. (1998) Базисная и клиническая фармакология. М.-СПб.: Бином-Невский Диалект, Т. 1, с. 608.
15. Метелица Д.И. (1984) Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. Наука и техника, Минск, с. 293.
16. Ohe, T., Ashino, T., Akihirobe, A. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 116–122.
17. Coon, M.J., Vaz, A.D.N., McGinnity, F., Peng, H.-M. (1998) *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 1190–1193.
18. Guengerich, F.P. (2001) *Current Drug Metab.*, **2**, 93–115.
19. Lin, H.L., Kent, U.M., Hollenberg, P.F. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 160–167.
20. Gupta, M.K., Guryev, O.L., Auchus, R.J. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.*, **418**, 151–160.
21. Kamerbeek, N.M., Janssen, D.B., van Berkel, W.J.H., Fraaije, M.W. (2003) *Adv. Synth. Catal.*, **6–7**, 106–120.
22. Kashem, M.A., Dunford, H.B. (1987) *Biochem. Cell. Biol.*, **65**, 486–492.
23. Guengerich, F.P. (1992) *FASEB J.*, **6**, 669–673.
24. Mansuy, D. (1994) *Pure & Appl. Chem.*, **66**, 737–744.
25. Cirino, P.C., Tang, Y., Takahashi, K., Tirrell, D.A., Arnold, F.H. (2003) *Biotechnol. Bioeng.*, **83**, 729–734.
26. Guengerich, F.P., Vaz, A.D., Raner, G. N., Pernecky, S.J., Coon, M.J. (1997) *Mol. Pharmacol.*, **51**, 147–151.
27. Hlavica, P. (2004) *Eur. J. Biochem.*, **271**, 4335–4360.
28. Akhrem, A.A., Lapko, V.N., Lapko, A.G., Shkumatov, V.M., Chashchin, V.L. (1979) *Acta Biol. Med. Germ.*, **38**, 257–273.
29. Akhrem, A.A., Gilevich, S.N., Shkumatov, V.M., Chashchin, V.L. (1984) *Bio-med. Biochem. Acta*, **43**, 165–177.
30. Chashchin, V.L., Vasilevsky, V.I., Lapko, V.N., Adamovich, T.B., Berikbaeva, T.M., Shkumatov, V.M., Akhrem, A.A. (1984) *Biochem. Biophys. Acta*, **791**, 375–383.
31. Chashchin, V.L., Usanov, S.A., Lapko, V.N., Adamovich, T.B., Shkumatov, V.M., Akhrem, A.A. (1986) *Chemistry of Peptides and Proteins* (Voelter, W., Bayer, E., Ovchinnikov, Yu., Ivanov, V., eds.), Berlin–New York: Walter de Greyter and Co, pp. 177–189.
32. Ахрем А.А., Джагаров Б.М., Румас В.К., Тиминский Ю.В., Шкуматов В.М., Чащин В.Л. (1979) Докл. АН СССР, **5**, 1256–1259.
33. Smettan, G., Shkumatov, V.M., Ristau, O., Rein, H., Ruckpaul, K. (1989) *Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics* (Schuster, I., ed.), London–New York–Philadelphia: Taylor and Francis, pp. 435–438.
34. Гилевич С.Н., Гурьев О.Л., Шкуматов В.М., Чащин В.Л., Ахрем А.А. (1987) *Биохимия*, **52**, 198–213.
35. Чащин В.Л., Шкуматов В.М., Лапко А.Г., Дегтярева Л.Н., Шерман С.Н. (1989) *Биохимия*, **54**, 559–563.
36. Турко И.В., Усанов С.А., Ахрем А.А., Чащин В.Л. (1988) *Биохимия*, **53**, 1352–1356.
37. Hara, T., Kimura, T. (1989) *J. Biochem.*, **105**, 601–605.
38. Lambeth, J.D., Seybert, D.W., Kamin, H. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 7255–7264.
39. Pikuleva, I.A., Tesh, K., Waterman, M.R., Kim, Y. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 44–55.
40. Tuls, J., Geren, L., Lambeth, J.D., Millett, F. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 10020–10025.
41. Lambeth, J.D., Geren, L.M., Millett, F. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 10025–10029.
42. Vickery, L.E. (1997) *Steroids*, **62**, 124–127.
43. Muller, E.-C., Lapko, A., Otto, A., Muller, J., Ruckpaul, R., Heinemann, U. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1837–1843.

44. Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Muller, J., Heinemann, U., Bernhardt, R. (2000) *Proteins*, **40**, 590–612.
45. Kido, T., Kimura, T. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 11806–11815.
46. Hara, T., Koba, C., Takeshima, M., Sagara, Y. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 210–215.
47. Ivanov, Y.D., Kanaeva, I.P., Karuzina, I.I., Usanov, S.A., Hui Bon Hoa, G., Sligar, S.G., Archakov, A.I. (2001) *J. Inorg. Biochem.*, **87**, 175–184.
48. Juvonen, R.O., Shkumatov, V.M., Lang, M.A. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 205–211.
49. Smettan, G., Shkumatov, V.M., Pommerening, K., Ruckpaul, K. (1985) Cytochrome p-450. Biochemistry, Biophysics and Induction of Cytochrome P-450 (Vereczkey, L., Mayar, K., eds.), Budapest: Akademiai Kiado, pp. 207–210.
50. Ta, D.T., Vickery, L.E. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 11120–11125.
51. Kakuta, Y., Horio, T., Takahashi, Y., Fukuyama, K. (2001) *Biochemistry*, **40**, 11007–11012.
52. Knoell, H.E., Knappe, J. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **50**, 245–252.
53. Pember, S.O., Powell, G.L., Lambeth, J.D. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 3198–3206.
54. Шкуматов В.М., Радюк В.Г., Фалетров Я.В., Виноградова А.А., Лузиков В.Н., Новикова Л.А. (2006) *Биохимия*, **71**, 1091–1102.
55. Hall, D. A., Vander Kooi C.W., Stasik C.N., Stevens C.Y., Zuiderweg, E.R., Matthews, R.G. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9521–9526.
56. Ingelman, M., Bianchi, V., Eklund, H. (1997) *J. Mol. Biol.*, **268**, 147–157.
57. Wan, J.T., Jarrett J.T. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **406**, 116–126.
58. Leadbeater, C., McIver, L., Campopiano, D.J., Webster, S.P., Baxter, R.L., Kelly, S.M., Price, N.C., Lysek, D.A., Noble, M.A., Chapman, S.K., Munro, A.W. (2000) *Biochem. J.*, **352**, 257–266.
59. McIver L., Leadbeater C., Campopiano, D.J., Baxter, R.L., Daff, S.N., Chapman, S.K., Munro, A.W. (1998) *Eur. J. Biochem.*, **257**, 577–585.
60. Jenkins, C.M., Waterman, M.R. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 27401–27408.
61. Jenkins, C.M., Pikuleva, I., Kagava, N., Waterman, M.R. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **347**, 93–102.
62. Jenkins C.M., Genzor, C.G., Fillat, M.F., Waterman, M.R., Gymez-Moreno, C. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 22509–22513.
63. Gruez, A., Zeghouf, M., Bertrand, J., Eschenbrenner, M., Covus, J., Fontecave, M., Pignol, D., Fontecilla-Camps, J.-C. (1998) *Acta Cryst.*, **54**, 135–136.
64. Zeghouf, M., Fontecave, M., Machelrel, D., Coves, J. T. (1998) *Biochem.*, **37**, 6114–6123.
65. Zeghouf, M., Defaye, G., Fontecave, M., Coves, J. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **246**, 602–605.
66. Sakaki, T., Akiyoshi-Shibata, M., Yabusaki, Y., Manabe, K., Murakami, H., Ohkawa, H. (1991) *Pharmacogenetics*, **1**, 86–93.
67. Wu, D.A., Hu, M.C., Chung, B.C. (1991) *DNA Cell Biol.*, **10**, 201–209.
68. Sakaki, T., Shinkyo, R., Takita, T., Ohta, M., Inouye, K. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.*, **401**, 91–98.
69. Barros, M.H., Nobrega, F.G. (1999) *Gene*, **233**, 197–203.
70. Manzella, L., Barros, M.H., Nobrega, F.G. (1998) *Yeast*, **14**, 839–846.
71. Lacour, T., Achstetter, T., Dumas, B. (1998) *Biol. Chem.*, **273**, 23984–23992.
72. Schiffler, B., Bureik, M., Reinle, W., Müller, E.C., Hannemann, F., Bernhardt, R. (2004) *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 1229–1237.
73. Радюк В.Г., Шкуматов В.М., Чащин В.Л., Ахрем А.А. (1983) *Биохимия*, **48**, 454–463.
74. Шкуматов В.М., Радюк В.Г., Гапонова Г.И., Чащин В.Л., Ахрем А.А., Сметтан Г., Рукпауль К. (1988) *Биохимия*, **53**, 1962–1971.

75. Шкуматов В.М., Радюк В.Г., Гилевич С.Н., Чащин В.Л. (1987) Авторское свидетельство № 365709 (СССР), ДСП.
76. Шкуматов В.М., Радюк В.Г., Чащин В.Л. (1988) Авторское свидетельство. № 1461000 (СССР), ДСП.
77. Compagnone, N.A., Bulfone, A., Rubenstein, J.L., Mellon, S.H., (1995) *Endocrinology*, **136**, 2689–2696.
78. Kayes-Wandover, K.M., White, P.C., (2000) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 2519–2525.
79. Morohashi, K., Sogawa, K., Omura, T., Fujii-Kuriyama, Y., (1987) *J. Biochem.*, (Tokyo), **101**, 879–887.
80. Oonk, R.B., Parker, K.L., Gibson, J.L., Richards, J.S., (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 22392–22401.
81. Chung, B.C., Matteson, K.J., Voutilainen, R., Mohandas, T.K., Miller, W.L., (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 8962–8966.
82. Youngblood, G.L., Nesbitt, M.N., Payne, A.H., (1989) *Endocrinology*, **125**, 2784–2786.
83. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O (1993) *DNA Cell Biol.*, **12**, 1–51.
84. Blum, H., Leigh, J.S., Salerno, J.C., Ohnishi, T., (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 153–157.
85. Chashchin, V.L., Lapko, V.N., Adamovich, T.B., Lapko, A.G., Kuprina, N.S., Akhrem, A.A. (1986) *Biochem. Biophys. Acta*, **871**, 217–223.
86. Chashchin, V.L., Vasilevsky, V.I., Lapko, V.N., Adamovich, T.B., Berikbaeva, T.M., Shkumatov, V.M., Akhrem, A.A. (1984) *Biochem. Biophys. Acta*, **791**, 375–383.
87. Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Okada, Y., Sogawa, K., Hirose, T., Inayama, S., Omura, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4647–4651.
88. Vijayakumar, S., Salerno, J.C. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1160**, 281–286.
89. Usanov, S.A., Graham, S.E., Lepecheva, G.I., Azeva, T.N., Strushkevich, N.V., Gilep, A.A., Estabrook, R.W., Peterson, J.A. (2002) *Biochemistry*, **41**, 8310–8320.
90. Headlam, M.J., Wilce, M.C., Tuckey, R.C. (2003) *Biochim. Biophys. Acta*, **1617**, 96–108.
91. Sivozhelezov, V., Nicolini, C. (2005) *J. Theor. Biol.*, **234**, 479–485.
92. Storbeck, K.H., Swart, P., Swart, A.C., (2007) *Mol. Cell Endocrinol.*, **265–266**, 65–70.
93. Chashchin, V.L., I.V. Turko, I.V., Akhrem, A.A., Usanov, S.A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 313–324.
94. Tsujita, M., Ichikawa, Y., (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1161**, 124–130.
95. Lewis, D.F., Lee-Robichaud, P. (1998) *J Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **66**, 217–233.
96. Graham-Lorence, S., Peterson, J.A. (1996) *FASEB J.*, **10**, 206–214.
97. Gotoh, O., (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 83–90.
98. Nabi, N., Kominami, S., Takemori, S., Omura, T. (1983) *J. Biochem.*, **94**, 1517–1527.
99. Omura, T., Ito, A. (1991) *Methods Enzymol.*, **206**, 75–81.
100. Ou, W.J., Ito, A., Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Omura, T., (1986) *J. Biochem. (Tokyo)*, **100**, 1287–1296.
101. Pfanner, N., Rassow, J., van der Klei, I.J., Neupert, W. (1992) *Cell*, **68**, 999–1002.
102. Nguen, V., Argan, C., Lusty, C.J., Shore, G.C. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 800–805.
103. Matocha, M.F., Waterman, M., R., (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 8672–8678.
104. Ogishima, T., Okada, Y., Omura, T., (1985) *J. Biochem.*, (Tokyo), **98**, 781–79.
105. Zuber, M.X., Mason, J.I., Simpson, E.R., Waterman, M.R., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 699–703.

106. Luzikov, V.N., Novikova, L.A., Whelan, J., Hugosson, M., Glaser, E. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 33–36.
107. Novikova, L.A., Savel'ev, A.S., Zvyagil'skaya, R.A., Luzikov V.N. (1996) *FEBS Lett.*, **378**, 182–184.
108. Savel'ev, A.S., Novikova, L.A., Kovaleva, I.E., Luzikov, V.N., Neupert, W., Langer, T. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 20596–20602.
109. Савельев А.С., Новикова Л.А., Друца В.Л., Исаева Л.В., Черноголов А.А., Усанов С.А., Лузиков В.Н. (1997) *Биохимия*, **62**, 908–916.
110. Saveliev, A.S., Kovaleva, I.E., Novikova, L.A., Isaeva, L.V., Luzikov, V.N. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **363**, 373–376.
111. Ковалева И.Е., Гривенников С.И., Лузиков В.Н. (2000) *Биохимия*, **65**, 1425–1431.
112. Kovaleva, I.E., Novikova, L.A., Nazarov, P.A., Grivennikov, S.I., Luzikov, V.N. (2003) *Eur. J. Biochem.*, **270**, 222–229.
113. Stuart, R.A., Ono, H., Langer, T., Neupert, W. (1996) *Cell Struct. Funct.*, **21**, 403–406.
114. Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W., Stuart, R.A. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 19617–19722.
115. Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W., Stuart, R.A. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8040–8047.
116. Cauet, G., Balbuena, D., Achstetter, T., Dumas, B. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 4054–4062.
117. Minenko, A.N., Novikova, L.A., Luzikov, V.N., Kovaleva, I.E. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 1121–1130.
118. Hoogenraad, N.J., Ward, L.A., Ryan, M.T., (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 97–105.
119. Bohnert, M., Pfanner, N., van der Laan, M. (2007) *FEBS Letters*, **581**, 2802–2810.
120. Parmar, J., Key, R.E., Rainey W.E., (2008) *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **93**, 4542–4546.
121. Wada, A., Mathew, P.A., Barnes, H.J., Sanders, D., Estabrook, R.W., Waterman, M.R. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, **290**, 376–380.
122. Morohashi, K., Fujii-Kuriyama, Y., Okada, Y., Sogawa, K., Hirose, T., Inayama, S., Omura, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4647–4651.
123. Von Heijne, G. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 307–333.
124. Churchill, P.F., Kimura, T. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 10443–10448.
125. Usanov, S.A., Chernogolov, A.A., Chashchin, V.L. (1990) *FEBS Lett.*, **275**, 33–35.
126. Schwarz, D., Kruger, V., Chernogolov, A.A., Usanov, S.A., Stier, A. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **195**, 889–896.
127. Schwarz, D., Richter, W., Kruger, V., Chernogolov, A., Usanov, S., Stier, A. (1994) *J. Struct. Biol.*, **113**, 207–215.
128. Wimley, W.C., White, S.H. (1996) *Nat. Struct. Biol.*, **3**, 842–848.
129. Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F., McRee, D.E. (2000) *Mol. Cell*, **5**, 121–131.
130. Nakayama, K., Puchkaev, A., Pikuleva, I.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 31459–31465.
131. Pikuleva, I.A., Puchkaev, A., Bjorkhem, I. (2001) *Biochemistry*, **40**, 7621–7629.
132. Pikuleva, I. (2004) *Mol. Cell. Endocrinol.*, **215**, 161–164.
133. Kusano, K., Kagawa, N., Sakaguchi, M., Waterman, M.R., Omura, T. (2001) *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 259–269.
134. Kusano, K., Kagawa, N., Sakaguchi, M., Omura, T., Waterman, M.R. (2001) *J. Biochem. (Tokyo)*, **129**, 271–277.
135. Chen, C.D., Doray, B., Kemper, B. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **350**, 233–238.
136. Kemper, B. (2004) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **199**, 305–319.

137. Mast, N., Andersson, U., Nakayama, K., Bjorhem, I., Pikuleva, I. (2004) Arch. Biochem. Biophys., **428**, 99–108.
138. Виноградова А.А., Лузиков В.Н., Новикова Л.А. (2007) Биохимия, **72**, 247–254.
139. Nazarov, P.A., Drutsa, V.L., Miller, W.L., Shkumatov, V.M., Luzikov, V.N., Novikova, L.A. (2003) DNA Cell. Biol., **22**, 243–252.
140. Виноградова А.А., Лузиков В.Н., Новикова Л.А. (2004) Вестник молодых ученых. Изд-во МГУ, Москва, **1**, 31–41.
141. Shkumatov, V.M., Smettan, G., Ristau, O., Rein, H., Ruckpaul, K., Chaschin, V.L., Akhrem, A.A. (1988) Chem.-Biol. Inter., **68**, 71–83.
142. Shkumatov, V.M. (1993) 2nd International Symposium on Cytochrome P450 of Microorganisms and Plants, Hachioji-Tokyo, June 13–17. L-28.
143. Шкуматов В.М. (1991) Ферментные системы биосинтеза биологически активных веществ, содержащие цитохром Р-450. Дисс. докт. биол. наук, Институт биохимии им. А.Н.Баха, Москва.
144. Shkumatov, V.M. (1992) Proc. 7th Int. Conference «Biochemistry, Biophysics of Cytochrome P-450». Moscow: Joint Stock Company, p. 481.
145. Uchida, E., Kagawa, N., Sakaki, T., Urushino, N., Sawada, N., Kamakura, M., Ohta, M., Kato, S., Inouye, K. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun., **323**, 505–511.
146. Aoyama, T., Nagata, K., Yamazoe, Y., Kato, R., Matsunaga, E., Gelboin, H.V., Gonzalez, F.J. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 5425–5429.
147. Benson, R.E., Gottlin E.B., Christensen, D.J., Hamilton, P.T. (2003) Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **47**, 2875–2881.
148. Duport, C., Spagnoli, R., Degryse, E., Pompon, D. (1998) Nat. Biotechnol., **16**, 186–189.
149. Shimada, T., Tsumura, F., Gillam, E.M.J., Guengerich, F.P., Inoue, K. (2000) Protein Expression and Purification, **20**, 73–80.
150. Ehmer, P.B., Jose, J., Hartmann, R.W. (2000) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **75**, 57–63.
151. Steinborn, G., Gellissen, G., Kunze, G. (2007) FEMS Yeast Res., **7**, 1197–1205.
152. Narhi, L. O., and Fulco, A. J. (1986) J. Biol. Chem., **261**, 7160–7169.
153. McMillan, K., Bredt, D.S., Hirsch, D.J., Snyder, S.H., Clark, J.E., Masters, B.S. (1992). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 11141–11145.
154. Murakami, H., Yabusaki, Y., Sakaki, T., Shibata, M., Ohkawa, H. (1987) DNA, **6**, 189–197.
155. Yabusaki, Y., Murakami, H., Sakaki, T., Shibata, M., Ohkawa, H. (1988) DNA, **7**, 701–711.
156. Chun, Y.J., Shimada, T., Guengerich, F.P. (1996) Arch. Biochem. Biophys., **330**, 48–58.
157. Fisher, C.W., Shet, M.S., Claude, D.L., Martin-Wixtrom, C.A., Estabrook, R.W. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 10817–10821.
158. Harikrishna, J.A., Black, S.M., Szklarz, G.D., Miller, W.L. (1993) DNA Cell Biol., **12**, 371–379.
159. Black, S.M., Harikrishna, J.A., Szklarz, G.D., Miller, W.L. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 7247–7251.
160. Dilworth, F.J., Black, S.M., Guo, Y.D., Miller, W.L. (1996) Biochem. J., **320**, 267–271.
161. Cao, P.R., Bulow, H., Dumas, B., Bernhardt, R. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1476**, 253–264.
162. Sibbesen O., De Voss J.J., Montellano P.R. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 22462–22469.
163. Lacour, T., Ohkawa, H. (1999). Biochim. Biophys. Acta, **1433**, 87–102.

164. Новикова Л.А., Назаров П.А., Савельев А.С., Друца В.Л., Сергеев В.Н., Миллер В.Л., Лузиков В.Н. (2000) Биохимия, **65**, 1618–1623.
165. Shet, M.S., Fisher, C.W., Holmans, P.L., Estabrook, R.W. (1996). Arch. Biochem. Biophys., **330**, 199–208.
166. Wilks, A., Black, S.M., Miller, W.L., Ortiz de Montellano, P.R. (1995). Biochemistry, **34**, 4421–4427.
167. Sakaki, T., Shibata, M., Yabusaki, Y., Murakami, H., Ohkawa, H. (1990) DNA Cell Biol., **9**, 603–614.
168. Sakaki, T., Kominami, S., Takemori, S., Ohkawa, H., Akiyoshi-Shibata, M., Yabusaki, M.J. (1994) Biochemistry, **33**, 4933–4939.
169. Chaurasia, C.S., Alterman, M.A., Lu, P., Hanzlik, R.P. (1995) Arch. Biochem. Biophys., **317**, 161–169.
170. Helvig, C., Capdevila, J.H. (2000) Biochemistry, **39**, 5196–5205.
171. Исаева Л.В., Спиридонова В.А., Ломович Д., Ковалёва И.Е., Черноголов А.А., Усанов А.С., Лузиков В.Н. (1996) Биохимия, **61**, 1448–1459.
172. Gillam, E.M.J., Aguinaldo, A.M.A., Notley, L.M., Kim, D., Mundkowski, R.G., Volkov, A.A., Arnold, F.H., Souček, P., DeVoss, J.J., Guengerich, F.P. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **265**, 469–472.
173. Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K. (1999) Eur. J. Biochem., **265**, 950–956.
174. Sakaki, T., Sawada, N., Komai, K., Shiozawa, S., Yamada, S., Yamamoto, K., Ohyama, Y., Inouye, K. (2000) Eur. J. Biochem., **267**, 6158–6165.
175. Шапкова Т.В., Лузиков В.Н., Новикова Л.А. (2006) Биохимия, **71**, 996–1001.
176. Усанов С.А., Черноголов А.А., Петрашин А.И., Ахрем А.А., Чащин В.Л. (1987) Биол. мембраны, **4**, 1102–1115.
177. Sakaki, T., Shibata, M., Yabusaki, Y., Murakami, H., Ohkawa, H. (1989) DNA, **8**, 409–418.
178. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Поляко Ю.С., Фролова Н.С., Радюк В.Г., Мауерсбергер Ш., Черноголов А.А., Хонек Х., Шунк В.-Х. (2002) Биохимия, **67**, 456–467.
179. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Радюк В.Г., Фролова Н.С., Радюк А.В., Новикова Л.А., Назаров П.А., Друца В.Л., Лузиков В.Н. (2001) Избранные научные труды Белорусского государственного университета, т. V – Химия. Минск, с. 446–450.
180. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Радюк В.Г., Каишан Ж.Н., Ковганко Н.В., Юречек Т., Мауерсбергер Ш. (2003) Биоорг. химия, **29**, 640–647.
181. Dumas, B., Cauet, G., Lacour, T., Degryse, E., Laruelle, L., Ledoux, C., Spagnoli, R., Achstetter, T. (1996) Eur. J. Biochem., **238**, 495–504.
182. Szczebara, F.M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Dupont, C., Blanchard, S., Groisillier, A., Testet, E., Costaglioli, P., Cauet, G., Degryse, E., Balbuena, D., Winter, J., Achstetter, T., Spagnoli, R., Pompon, D., Dumas, B. (2003) Nat. Biotechnol., **21**, 143–149.
183. Mauersberger, S., Ohkuma, M., Schunck, W.-H., Takagi, M. (1996) *Candida maltosa*. In Non-conventional Yeasts in Biotechnology (Wolf, K., ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 411–580.
184. Barth, G., Gaillardin, C. (1996) *Yarrowia lipolytica*. In Nonconventional yeasts in biotechnology (Wolf, K., ed.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 313–388.
185. Fickers, P., Benetti, P.H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M.S., Nicaud, J.M. (2005) FEMS Yeast Res., **5**, 527–543.
186. Cirigliano, M.C., Carman, G.M. (1984) Appl. Environ. Microbiol., **48**, 747–750.

187. Mauersberger, S., Wang, H.J., Gaillardin, C., Barth, G., Nicaud, J.M. (2001) *J. Bacteriol.*, **183**, 5102–5109.
188. Шкуматов В.М., Фролова Н.С., Рудая Е.В., Фалетров Я.В., Мауерсбергер Ш., Барт Г. (2006) *Прикл. Биохим. Микробиол.*, **42**, 539–546.
189. Новикова Л. А., Йовкова В., Фалетров Я., Агаларов Я., Лузиков В.Н., Шкуматов В. М., Барт Г., Мауерсбергер Ш. (2008) Сборник трудов IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, изд-во «Арта», Новосибирск, с. 353.
190. Schmid-Berger, N., Schmid, B., Barth, G. (1994) *J. Bacteriol.*, **176**, 2477–2482.
191. Juretzek, T., Mauersberger, S., Schunck, W.-H., Nicaud, J.-M., Barth, G. (1999) *Current Genetics*, **35**, 307.
192. Juretzek, T., Wang, H.-J., Nicaud, J.-M., Mauersberger, S., Barth, G. (2000) *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **5**, 320–326.
193. Juretzek, T., Le Dall, M.T., Mauersberger, S., Gaillardin, C., Barth, G., Nicaud, J.M. (2001) *Yeast*, **18**, 97–113.
194. Juretzek, T. (1999) Entwicklung von Wirts-Vector-Systemen zur heterologen Expression von Proteinen in der nichtkonventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica* und ihre Anwendung für die Cytochrom P450-katalysierte Stoffumwandlung. PhD thesis, Technische Universität Dresden, Germany.
195. Shkumatov, V.M. (2007) EMBO Workshop «The Chemistry and Biochemistry of Catalysis by Biological Systems», 20–22 June, EMBL, Hamburg, p.20.
196. Delorome, C., Piffeteau, A., Sobrio, F., Marquet, A. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **254**, 252–260.
197. Zhu, N., Ling, Y., Lei, X., Handratta, V., Brodie, A.M. (2003) *Steroids*, **68**, 603–611.
198. Handratta, V.D., Vasaitis, T.S., Njar, V.C., Gediya, L.K., Kataria, R., Chopra, P., Newman, D.Jr., Farquhar, R., Guo, Z., Qiu, Y., Brodie, A.M. (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 2972–2984.
199. Matsunaga, N., Kaku, T., Itoh, F., Tanaka, T., Hara, T., Miki, H., Iwasaki, M., Aono, T., Yamaoka, M., Kusaka, M., Tasaka, A. (2004) *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 2251–2273.
200. Jarman, M., Smith, H.J., Nicols, P.J., Simons, C. (1998) *Natural Prod. Rep.*, **15**, 495–512.
201. Weintraub, P.M., Holland, A.K., Gates, C.A., Moore, W.R., Resvick, R.J., Bey, P., Peet, N.P. (2003) *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 427–431.
202. Hartmann, R.W., Paluszczak, A., Lacan, F., Ricci, G., Ruzziconi, R. (2004) *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **19**, 145–155.
203. Peeh, D.M., Seto, E., Hsu, J.Y., Feldman, D. (2002) *Urol.*, **168**, 1583–1588.
204. Saberi, M.R., Shah, K., Simons, C. (2005) *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **20**, 135–141.
205. Gasi, K.M., Stojanovic, S.Z., Sakac, M.N., Popsavin, M., Santa, S.J., Stankovic, S.M., Klisuric, O.R., Andric, N., Kovacevic, R. (2005) *Steroids*, **70**, 47–53.
206. Pouget, C., Yahiaoui, S., Fagnere, C., Habrioux, G., Chulia, A.J. (2004) *Bioorg. Chem.*, **32**, 494–503.
207. Ulmschneider, S., Muller-Vieira, U., Klein, C.D., Antes, I., Lengauer, T., Hartmann, R.W. (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 1563–1575.
208. Ulmschneider, S., Muller-Vieira, U., Mitrenga, M., Hartmann, R.W., Oberwinkler-Marchais, S., Klein, C.D., Bureik, M., Bernhardt, R., Antes, I., Lengauer, T. (2005) *J. Med. Chem.*, **48**, 1796–1805.
209. Ehmer, P.B., Bureik, M., Bernhardt, R., Müller, U., Hartmann R.W. (2002) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **81**, 173–179.

210. Bureik, M., Hubel, K., Dragan, C.A., Scher, J., Becker, H., Lenz, N., Bernhardt, R. (2004) *Mol. Cell Endocrinol.*, **217**, 249–54.
211. Yee, S.W., Simons, C. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 5651–5654.
212. Posner, G.H., Crawford, K.R., Yang, H.W., Kahramana, M., Jeon, H.B., Li, H., Lee, J.K., Suha, B.C., Hatcher, M.A., Labonte, T., Usera, A., Dolan, P.M., Kensler, T.W., Peleg, S., Jones, G., Zhang, A., Korczak, B., Saha, U., Chuang, S.S. (2004) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **89–90**, 5–12.
213. Parise, R.A., Egorin, M.J., Kante-rewicz, B., Taimi, M., Petkovich, M., Lew, A.M., Chuang, S.S., Nichols, M., El-Hefnawy, T., Hershberger, P.A. (2006) *Int. J. Cancer.*, **119**, 1819–1828.
214. Hakki, T., Bernhardt, R. (2006) *Pharmacol. Therapeut.*, **111**, 27–52.
215. Smith, I.E., Dowsett, M. (2003) *New Engl. J. Med.*, **348**, 2431–2442.
216. Brueggemeier, R.W., Hackett, J.C., Diaz-Cruz, E.S. (2005) *Endocrine Rev.*, **26**, 331–345.
217. Brunoa, R.D., Njar, V.C.O. (2007) *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5047–5060.
218. Zhuang, Y., Wachall, B.G., Hartmann, R.W. (2000) *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 1245–1252.
219. Handratta, V.D., Jelovac, D., Long, B.J., Kataria, R., Nnane, I.P., Njar, V.C.O., Brodie, A.M.H. (2004) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **92**, 155–165.
220. Jagusch, C., Negri, M., Hille, U.E., Hu, Q., Bartels, M., Jahn-Hoffmann, K., Pinto-Bazurco Mendieta, M.A., Rodenwaldt, B., Müller-Vieira, U., Schmidt, D., Lauterbach, T., Recanatini, M., Cavalli, A., Hartmann, R.W. (2008) *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 1992–2010.
221. Pinto-Bazurco Mendieta, M.A.E., Negri, M., Jagusch, C., Hille, U.E., Muller-Vieira, U., Schmidt, D., Hansenc, K., Hartmann, R.W. (2008) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 267–273.
222. O'Donnell, A., Judson, I., Dowsett, M., Raynaud, F., Dearnaley, D., Mason, M., Harland, S., Robbins, A., Halbert, G., Nutley, B., Jarman, M. (2004) *Br. J. Cancer.*, **90**, 2317–2325.
223. Aoyama, Y., Yoshida, Y., Kubota, S., Kumaoka, H., Furumichi, A. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, **185**, 362–369.
224. Vico, P., Cauet, G., Rose, K., Lathe, R., Degryse, E. (2002) *Yeast*, **19**, 873–886.
225. Ngatcha, B.T., Van, Luu-The, Poirier, D. (2000) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**, 2533–2536.
226. Gomez-Lechon, M.J., Donato, M.T., Castell, J.V., Jover, R. (2004) *Curr. Drug Metab.*, **5**, 443–462.
227. Shkumatov, V.M., Faletrov, Y.V., Frolenkov, K.A., Mauersberger, S., Barth, G., Novikova, L.A., Luzikov, V.N. (2008) 9th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, Nice, France – June 8–12, p. 67.
228. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Фролова Н.С., Барт Г., Мауерсбергер Ш. (2006) *Биомед. химия*, **52**, 298–308.
229. Шкуматов В.М., Фалетров Я.В., Мауерсбергер Ш., Барт, Г., Новикова Л.А., Лузиков В.Н. (2007) XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Москва, т. 4, с. 492.
230. Шкуматов В.М. (2007) Первый съезд ученых Республики Беларусь, Минск, 1–2 ноября 2007 г., с. 413–420.
231. Muller-Vieira, U., Angotti, M., Hartmann, R.W. (2005) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **96**, 259–270.
232. Drăgan, C.A., Hartmann, R.W., Bureik, M. (2006) *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **21**, 547–556.
233. Fujita, K., Kamataki, T. (2002) *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 1–22.