

**ВЫБРАНІЯ
НАВУКОВЫЯ ПРАЦЫ
БЕЛАРУСКАГА ДЗЯРЖАЎНАГА
УНІВЕРСІТЭТА**

У СЯМІ ТАМАХ

1921 – 2001



80 гадоў

**МІНСК
БДУ
2001**

**ВЫБРАННЯ
НАВУКОВЫЯ ПРАЦЫ
БЕЛАРУСКАГА ДЗЯРЖАЎНАГА
УНІВЕРСІТЭТА**

У СЯМІ ТАМАХ

**V
ТОМ**

ХІМІЯ

**МІНСК
БДУ
2001**

УДК 378:001.89(476)(06)+54(06)
ББК 72.4(4Бел)я43+24я43
В92

Р е д а к ц и й н ы с а в е т:

- А. У. Казулін* (старшыня), доктар педагагічных навук, прафесар;
С. К. Рахманаў (нам. старшыні), доктар хімічных навук;
С. А. Максіменка (адказны за выпуск зборніка), доктар фізіка-матэматычных навук;
В. М. Анішчык, доктар фізіка-матэматычных навук, прафесар;
В. М. Гадуноў, кандыдат юрыдычных навук, дацэнт;
А. І. Жук, доктар педагагічных навук, прафесар;
І. І. Пірожнік, доктар геаграфічных навук, прафесар;
В. В. Свірыдаў, доктар хімічных навук, прафесар, акадэмік НАН Беларусі;
М. І. Юрчук, доктар фізіка-матэматычных навук, прафесар;
А. А. Яноўскі, кандыдат гістарычных навук, дацэнт

Р е д а к ц и й н а я к а л е г і я:

- доктар хімічных навук, прафесар,
акадэмік НАН Беларусі *В. В. Свірыдаў* (адказны рэдактар);
кандыдат хімічных навук *Ю. В. Нечэпурэнка* (адказны сакратар);
доктар хімічных навук, прафесар *Г. А. Браніцкі*;
доктар хімічных навук *А. А. Івашкевіч*;
доктар хімічных навук, прафесар *Г. Я. Каба*;
доктар хімічных навук, прафесар, акадэмік НАН Беларусі *Ф. М. Капуцкі*;
доктар хімічных навук, прафесар *І. С. Станішэўскі*

Выпуск зборніка выбраных навуковых прац ажыццёлены пры фінансавай падтрымцы Беларускага рэспубліканскага фонду фундаментальных даследаванняў, Навукова-вытворчага рэспубліканскага унітарнага прадпрыемства «Унікаштмет БДУ», Вучэбна-навукова-вытворчага рэспубліканскага унітарнага прадпрыемства «Унітэхспрам БДУ», Установы БДУ «Навукова-даследчы інстытут фізіка-хімічных праблем», Беларуска-японскага сумеснага прадпрыемства «Lohis ТП», Мінскага вытворчага аб'яднання «Гарызонт», Дзяржаўнага камітэта па навуцы і тэхналогіях Рэспублікі Беларусь, Аб'яднанага інстытута ядзерных даследаванняў (г. Дубна Расійскай Федэрацыі), Нацыянальнага навукова-вучэбнага цэнтра фізікі часціц і высокіх энергій БДУ, ААТ «Пеленг», Закрытага акцыянернага таварыства «Спектраскапічныя сістэмы»

ISBN 985-445-534-3 (Т. 5)
ISBN 985-445-524-6

© БДУ, 2001

ПРЕДИСЛОВИЕ

Данный сборник научных работ издается в связи с 80-летним юбилеем Белорусского государственного университета. Он включает статьи, подготовленные не только преподавателями и научными сотрудниками химического факультета, история которого насчитывает уже семьдесят лет, но и сотрудниками Научно-исследовательского института физико-химических проблем БГУ, который был создан в 1978 г. в результате объединения выделившихся из состава кафедр факультета научных лабораторий и групп и выполняет исследования по единой с кафедрами тематике.

Несмотря на достаточно большой объем сборника, представлялось целесообразным предпринимать попытку проанализировать и обобщить все заслуживающие внимания научные результаты в области химии, полученные в университете за время его существования. Такого рода обобщения содержатся в целом ряде статей, опубликованных в прошлые годы в различных юбилейных изданиях. Материалы данного сборника представляют собой статьи двух типов: одни из них являются обобщающими обзорами выполнявшихся в течение длительного времени исследований на факультете и в институте, другие – подытоживают важные результаты работ, выполненных различными научными коллективами факультета и института в последние годы. В целом в сборнике достаточно полно отражена проблематика университетских научных исследований, относящихся к различным разделам химии: неорганической химии, химии твердого тела, электрохимии, фотохимии, синтетической органической химии, физической химии органических соединений, химии биологически активных соединений, химической и структурной модификации природных и синтетических полимеров, аналитической химии и химии окружающей среды.

Существенной особенностью исследований, проводимых в высшей школе, является широкий диапазон разрабатываемых проблем. Это вызвано необходимостью не только осуществлять обучение студентов, приобретающих знания в различных областях химии, но и готовить специалистов с учеными степенями, способных обеспечить современный уровень преподавания и привить студентам навыки творческой работы.

Данное обстоятельство и определило специфику научных направлений факультета и института, в рамках которых представлены разнообразные задачи и объекты исследования.

Статьи в сборнике объединены по четырем разделам.

В первом разделе рассмотрены различные вопросы химии твердого тела и неорганической химии. Значительное место занимают исследования в новой области – физико-химии высокодисперсных и наноструктурированных систем.

Второй раздел посвящен оригинальным исследованиям в области органической химии, физической химии органических соединений и биохимии лекарственных препаратов.

В третьем разделе приведены результаты исследований различных аспектов структурной и химической модификации природных и синтетических полимеров.

В четвертом разделе рассмотрены отдельные вопросы аналитической химии и химии окружающей среды, в частности процессы катионного обмена, сорбции радионуклидов, а также создание ионселективных электродов новых типов.

Редакционная коллегия

В. М. ШКУМАТОВ¹, Е. В. УСОВА¹, В. Г. РАДЮК¹, Н. С. ФРОЛОВА¹, А. В. РАЙКОВ¹,
Л. А. НОВИКОВА², П. А. НАЗАРОВ², В. Л. ДРУЦА², В. Н. ЛУЗИКОВ²

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ СТЕРОИДОВ

ВВЕДЕНИЕ

В перечне подходов для промышленного получения стероидов определяющее место занимает химико-ферментативный синтез с использованием природных микроорганизмов [1, 2]. Ряд биотехнологических стадий синтеза стероидов (отщепление боковых цепей природных стероидов, Δ^1 дегидрирование, 11α - и 11β -гидроксилирование) принципиально изменили технологию получения всего спектра стероидных гормонов [3]. Одновременно эти уже ставшие традиционными подходы практически исчерпали свой потенциал с точки зрения промышленного производства. Наличие множества побочных реакций требовало применения специально структурно-модифицированных исходных субстратов (фторпроизводные, $\Delta^{1,5}$ ненасыщенные стероиды, 3-оксиды стероидов и т. д.) и применения селективных ингибиторов побочных реакций (α, α' -дипиридил, 1,10-фенантролин, 8-гидроксихинолин и др.), что в целом существенно усложняет процесс [3, 4]. Стероидогенные органы высших организмов, включая человека, выгодно отличаются от природных микроорганизмов с точки зрения строгой последовательности, регио- и стереоспецифичности реакций биосинтеза [5]. В связи с развитием генной инженерии в последние годы появилось большое количество работ, посвященных гетерологической экспрессии стероидогенных ферментов в клетках микроорганизмов.

Предметом настоящей работы явилось окислительное расщепление боковой цепи холестерина (две реакции гидроксилирования и реакция расщепления связи C20–C22) с образованием прегненолона, а также 17α -гидроксилирование прогестерона и расщепление связи C17–C20 с образованием 17α -гидроксипрогестерона и андростендиона соответственно.

Суммарная реакция превращения холестерина в прегненолон является скоростью-лимитирующей стадией биосинтеза стероидов в коре надпочечников млекопитающих и осуществляется трехкомпонентной монооксигеназной системой «митохондриального типа», состоящей из NADPH-зависимого, FAD-содержащего флавопротеида (адренородоксинредуктаза, AR), [2Fe-2S]-ферредоксина (адренородоксин, Ad) и цитохрома P-450 [5]. Переход от двухэлектронного механизма перено-

¹ Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем» (Минск).

² НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова (Москва).

са электронов ($\text{NADPH} \rightarrow \text{AP}$) к одноэлектронному ($\text{AP} \rightarrow \text{Ад}$, $\text{Ад} \rightarrow \text{P-450}$) предполагает в общем виде следующий характер молекулярной организации систем «митохондриального типа»: модель, основанная на переносе электронов в результате «челночной» функции адренодоксина и содержащая ассоциированный мультиферментный комплекс. С помощью различных подходов, включающих ковалентно-сорбционную реконструкцию [6], а также химическую «сшивку» отдельных компонентов [7], кинетических экспериментов [8] получены доказательства в пользу той или иной модели. Обнаружение необычной бактериальной формы цитохрома P-450BM-3, имеющей в составе одной полипептидной цепи с Mg 119000 все необходимые для монооксигеназного катализа простетические группы FAD, FMN и гем и обладающей чрезвычайно высокой монооксигеназной активностью (число оборотов более 1500) [9], последующие интенсивные исследования этой необычной формы с установлением рентгеновской структуры цитохрома P-450BM-3 [10] стимулировали конструирование гибридных белков, имеющих в составе одной полипептидной цепи как редуктазные, так и цитохром P-450-содержащие компоненты (домены). Ген-инженерное конструирование и создание функционально-активных гибридных, слитых белков было осуществлено прежде всего для двухкомпонентных монооксигеназ «микросомального» типа [11–14]. Имеется ограниченное число работ, посвященных конструированию и характеристике тройных гибридных систем «митохондриального» типа. В частности, в работах [15, 16] приведены данные о конструировании слитых белков, установлена их относительно низкая функциональная активность, указано, что слитые белки не обладают активностью вне митохондрий, однако вследствие низких уровней экспрессии не осуществлена их физико-химическая характеристика. Более детальная характеристика приведена для тройного гибрида камфору-гидроксилирующей системы, выделены и охарактеризованы варианты с различным расположением доменов [17]. Ранее осуществлена экспрессия активного цитохрома P-450scс в дрожжах *S. cerevisiae* и бактериях *E. coli*, а также гибридного белка, включающего в состав одной полипептидной цепи пре-адренодоксинредуктазу и «зрелую» форму адренодоксина [18–21]. Вместе с тем предварительные данные по экспрессии F2, проведенные нами, не позволили оценить уровень P-450scс по разностным карбонильным спектрам, в отличие от экспрессии отдельного цитохрома P-450scс. Чтобы сделать однозначные заключения о функциональной эффективности тройных гибридных систем монооксигеназ «митохондриального» типа, необходимо создание различных конструкций гибридов с их характеристикой (различная аминокислотная последовательность и сближенность в полипептидной цепи FAD-, [2Fe-2S]- и гем-содержащих доменов, их стехиометрия, соотношения апо- и холоферментов, устойчивость к протеолитической деградации, функциональная стабильность и т. д.). Это возможно лишь с выделением и очисткой этих вариантов слитых белков, поскольку клетки как *E. coli*, так и *S. cerevisiae* обладают собственными редокс-системами [22, 23], затрудняющими на уровне неочищенных фракций и *in vivo* корректную оценку функциональной эффективности генно-инженерных белков-гибридов.

Другой многофункциональный фермент 17 α -гидроксилаза-17,20-лиаза (P-450c17) обеспечивает в клетках стероидогенных тканей разветвление путей биосинтеза на

17-дезоксиде (минералкортикоиды) и 17 α -гидроксикортикостероиды (глюкокортикоиды), а также катализирует реакцию расщепления связи C17–C20, ведущую к образованию половых гормонов [5, 24–26]. В ряде работ по гетерологической экспрессии P-450c17 установлено изменение удельной активности и последовательности реакций превращений прогестерона или прегненолона по сравнению с клетками стероидогенных органов млекопитающих. Цубер и др. [27] сообщили, что бычий P-450c17, экспрессированный в COS-1 клетках, проявлял обе активности, а Сакаки и др. [28] установили, что экспрессия P450c17 быка в *S. cerevisiae* AH22 под контролем промотора и терминатора алкогольдегидрогеназы I сопровождается только проявлением 17 α -гидроксилазной активности и отсутствием C17-20 лиазной активности. Фишер и др. [29] показали что экспрессия в *E. coli* слитого белка, содержащего P-450c17 и NADPH-P-450 редуктазу, и получение его в чистом виде также приводили к изменению субстратной специфичности, в частности, превращение 17 α -гидроксипрогестерона в несколько более полярных метаболитов. В работах [23, 28] обнаружено образование на уровне 20–25 % дополнительных, более полярных метаболитов, чем 17 α -гидроксипрогестерон, которые не были идентифицированы. Изменение субстратной специфичности и направленности реакций в некоторых случаях имеет полезный характер с точки зрения новых возможностей химико-ферментативной модификации стероидов. В частности, нами показано, что рекомбинантный штамм *Saccharomyces cerevisiae* YEp5117 α , экспрессирующий цитохром P-45017 α (CYP17) из коры надпочечников быка под контролем *GAL10* промотора, осуществляет биотрансформацию прогестерона в 17 α -гидроксипрогестерон, который далее превращался трансформантами дрожжей в 17 α -гидрокси-20-дигидропрогестерон благодаря действию конститутивной 20-стероиддегидрогеназы [30].

РЕАКЦИЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ БОКОВОЙ ЦЕПИ ХОЛЕСТЕРИНА

КОНСТРУИРОВАНИЕ ТРОЙНОГО ГИБРИДА

Плазмида pTtc99A/F2 для экспрессии гибридного белка (P-450scc-адренодоксин-редуктаза-адренодоксин, далее F2) в клетках *E. coli* была получена посредством модификации плазмиды pTtc99A/P-450scc, любезно предоставленной профессором М. Р. Ватерманом [31]. Фрагмент нуклеотидной последовательности (кодирующей P-450scc), включающий стоп-кодон, после обработки плазмиды эндонуклеазами *BalI* и *SmaI* (сайт рестрикции *BalI* – 1268 нуклеотид в последовательности P-450scc, сайт рестрикции *SmaI* – в полилинкере плазмиды с 3'-конца TGA стоп-кодона для P-450scc) был удален из плазмиды pTtc99/P-450scc. В данную плазмиду на его место был клонирован фрагмент ДНК, вырезанный из плазмиды pYeDP/prgCoxIV-F2. Плазмиду pYeDP/prgCoxIV-F2 последовательно обрабатывали эндонуклеазой *EcoRI* (уникальный сайт – с 3'-конца стоп-кодона для белка F2), достраивали ДНК с помощью фрагмента Кленова и рестрицировали по *BalI* сайту (1268 нуклеотид в последовательности P-450scc). Клонированный фрагмент содер-

жал нуклеотидную последовательность, кодирующую часть P-450_{scc}, делетированную из плазмиды pTrc99A/P450_{scc} (за исключением TGA-кодона) и кДНК для слитого белка аденодоксинредуктаза-аденодоксин.

ВЫДЕЛЕНИЕ И СВОЙСТВА ТРОЙНОГО ГИБРИДА

По данным иммуноблотинга в 1 л культуры *E. coli* содержится 2 мг белка F2, что соответствует 16 нмоль, исходя из молекулярной массы 123 000 Да. Удельное содержание определено как 0,018 нмоль на 1 мг суммарного белка, что требует фактора очистки более чем в 400 раз до теоретически возможного удельного содержания 8 нмоль на 1 мг белка. Антитела против аденодоксина позволили зарегистрировать полноразмерный F2 и свободный ферредоксин, а антитела против P-450_{scc} фиксировали ряд субформ F2, начиная от полноразмерной и с меньшей молекулярной массой (P-450_{scc} занимает в этой конструкции слитого белка NH₂-концевое положение).

Для выделения F2 использовали клетки, осажденные из 1 л культуры *E. coli*, несущей экспрессирующую плазмиду для тройного гибрида. Для разрушения клеточных стенок использовали совместный лизис лизоцимом (100 мкг/мл), несколько стадий замораживания-оттаивания (–20 °С – +4 °С) протопластов и обработку ультразвуком. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (5000 · g, 10 мин), а к суммарной фракции цитозоля и мембранных частиц добавляли по каплям Эмульген 913 (конечная концентрация детергента 1%), перемешивали 1 ч при 4 °С и центрифугировали в течение 60 мин при 50000 · g.

Ранее установлено, что при экспрессии отдельного цитохрома P-450_{scc} на уровне солюбилизата мембранных частиц фиксировались разностные карбонильные спектры с максимумом поглощения при 450 нм и наблюдался типичный переход типа I при взаимодействии с субстратом [31]. В случае солюбилизата мембранных частиц, содержащих F2, нам не удалось зарегистрировать типичных СО-спектров, а при спектрофотометрическом титровании холестерином – обнаружить образования фермент-субстратного комплекса. Это свидетельствовало о существенных нарушениях фолдинга цитохрома P-450_{scc} в составе тройного гибрида, связанных как со встраиванием гемовой группы и аксиальным лигандированием железа гема остатком Cys, так и организацией субстрат-связывающего участка. Вместе с тем нельзя было исключить, что в составе общего пула F2 имелась незначительная доля нативного домена P-450_{scc}, который «маскировался» при спектрофотометрических экспериментах. Поэтому для фракционирования солюбилизата были применены домен-направленные аффинные сорбенты: аденодоксин-сефароза (взаимодействие с цитохромом P-450_{scc} и аденодоксинредуктазой), 2',5'-ADP-сефароза (взаимодействие по NADPH-связывающему участку аденодоксинредуктазы).

Солюбилизат подвергали хроматографии на колонке (1 · 2 см) с 2',5'-ADP-сефарозой. После нанесения и промывки колонки 0,05 М фосфатным буфером, содержащим 0,1 % Эмульген 913, белковый материал, связавшийся с колонкой, был элюирован тем же буфером с добавлением 2 мМ 2'-AMP. В результате хроматографии было получено две фракции: F2-ADP-A (не взаимодействующая с

носителем) и F2-ADP-Б (элюированная 2 мМ 2'-AMP). Предполагалось, что фракция F2-ADP-Б могла содержать полноразмерный F2 и субформы с несколько меньшей молекулярной массой, а фракция F2-ADP-А – полипептидные субформы F2, не имеющие NADPH-связывающего домена. Фракция F2-ADP-А характеризовалась абсолютным спектром поглощения с невыраженным максимумом в районе 410 нм и разностным карбонильным спектром поглощения с максимумом при 430 нм, что не типично для нативного P-450_{scs}. Спектр поглощения фракции F2-ADP-Б в окисленном состоянии в видимой области являлся суперпозицией поглощения аденодоксинредуктазы, аденодоксина и P-450_{scs}. Фракция F2-ADP-Б обладала активностью по восстановлению цитохрома с. Добавление по отдельности экзогенных аденодоксина или аденодоксинредуктазы к этой фракции лишь незначительно повышало указанную активность. Это позволило предположить две возможности:

1) P-450_{scs} в F2 «неправильно» сочленен с аденодоксинредуктазой и одноэлектронное восстановление цитохрома с осуществлялось через комплекс [аденодоксинредуктаза-аденодоксин] в составе тройного белка;

2) во фракции F2-ADP-Б имела доля свободного двойного белка [аденодоксинредуктаза-аденодоксин] или аналогичной ему по функции субформы, образовавшихся в результате посттрансляционной протеолитической модификации.

Фракция F2-ADP-Б была сконцентрирована с 7,8 до 0,4 мл в ультраконцентрирующих центрифужных пробирках с пределом Mg 100 000 в расчете на удаление возможных белковых примесей с Mg менее 50 000. Полученный концентрат был подвергнут гель-электрофорезу в денатурирующих условиях. Обнаружено 4 основных полипептидных цепи и несколько минорных с Mg от 123 000 до 52 000. Их относительное содержание составило следующий ряд: 69–66000 (две цепи, 100 %) > 85 000 (одна цепь 40 %) > 52 (одна цепь, 40 %, две минорных) > 123 000 (одна цепь, 15 %).

Для последующего разделения фракции F2-ADP-Б был использован метод ВЭЖХВД гидрофобных взаимодействий на колонке с фенил-замещенным носителем. В специальных опытах были подобраны условия, при которых отдельные природные белки имели время удержания 2,0–2,1 мин (аденодоксинредуктаза и аденодоксин, без разделения), а P-450_{scs} – 17,2 мин. На рис. 1, а приведена хроматограмма разделения фракции F2-ADP-Б методом ВЭЖХВД, а на рис. 1, б – спектры поглощения, зарегистрированные в максимумах белковых пиков с временами удержания 2,0, 13,5 и 16,0 мин. Сопоставление значений времени удержания при ВЭЖХВД и спектров поглощения с природными отдельными белками показало отсутствие свободного (или нативного) домена P-450_{scs}, хотя в спектре пика с временем удержания 16,0 мин обнаружен гемовый хромофор (рис. 1, б, кривая 3). В свободном объеме колонки (2,0 мин) элюировался белковый материал, который содержал выраженный флавиновый хромофор (рис. 1, б, кривая 1).

Спектр пика с временем удержания 13,5 мин характеризовался наложением поглощений гемовой группы и FAD. Гель-электрофорез в денатурирующих условиях позволил установить, что эта фракция представлена полноразмерным F2 (123 000 Да, 70 %) и его субформой, очевидно, укороченной с COOH-конца (85 000 Да, 30 %).

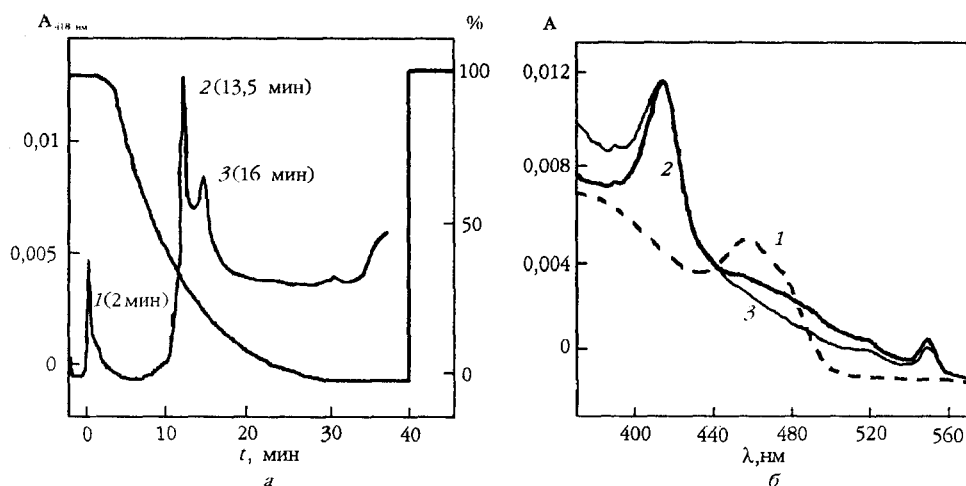


Рис. 1. Разделение фракции F2-ADP-B методом ВЭЖХВД: а – профиль хроматографического разделения ($A_{418 \text{ нм}}$); б – спектры поглощения для пиков 1–3. Колонка TSK Phenyl-5PW. Буфер А – 50 мМ калий-фосфатный буфер, рН 7,4, содержащий 10 % глицерин, 0,05 % Эмульген 913, 100 мкМ ЭЛТА, 100 мкМ дитиотреитол, 10 % сульфат аммония. Буфер В – содержащий 10 % глицерин, 0,05 % Эмульген 913, 100 мкМ ЭЛТА, 100 мкМ дитиотреитол. Объем пробы 200 мкл, скорость элюирования 1 мл/мин

Функциональную активность полученной фракции, содержащей F2, оценивали с использованием радиоактивно меченного холестерина и добавлением соответствующих отдельных белковых компонентов. В качестве контроля использовали реконструкцию холестеринтрансформирующей системы на основе трех природных белков, NADPH-генерирующей системы и холестерина в присутствии 0,05 % твина 20. Число оборотов (моль образующегося прегненолона на 1 моль F2 в 1 мин) очищенной фракции с F2 составило 0,03–0,06 мин⁻¹, или 1–2 % от контроля. При этом наибольший вклад в столь радикальное уменьшение активности вносил P-450scс, так как добавление природного белка приводило к активности, составлявшей около 10 % от контроля, в то время как добавление отдельно адrenoноксинредуктазы и адреноноксина практически не изменяло значения числа оборотов для фракции с F2.

Гетерогенность F2 при иммуноблоттинге и результаты по выделению F2 свидетельствовали о возможности протекания двух процессов:

- 1) неполного синтеза полипептидной цепи F2 в результате сплайсинга мРНК;
- 2) протеолиза F2 после процедур разрушения клеток, получения растворимой и мембранной фракций, солюбилизации и выделения F2.

Ранее установлены закономерности ограниченного протеолиза природных адреноноксинредуктазы, адреноноксина и P-450scс. Причем удалось получить функционально-активный FAD-содержащий домен адреноноксинредуктазы (M 29 000 Да), хотя без денатурации продукты протеолиза были ассоциированными. Этот домен содержал FAD-, NADPH- и адреноноксин-связывающий участки [32]. Аналогичные результаты были получены в работе [33]: ограниченный протеолиз с последующей хроматографией на адреноноксин-сефарозе позволил авторам заключить, что фла-

вин, NADPH- и аденодоксин-связывающий участки локализованы во фрагменте с М 30 500 Да. Зрелая форма аденодоксина гидролизовалась до функционально-активной формы с М 10 000 Да [34]. Рибосомальный синтез аденодоксина быка в цитоплазме завершается образованием предшественника, состоящего из 186 аминокислотных остатков, с М 19 790 Да [35], транспорт которого в митохондриальную мембрану сопровождается процессингом по N-концевой последовательности с образованием зрелой формы белка, которая, как предполагалось ранее, состоит из 114 аминокислот (М 12470 Да) [36]. Секвенирование кДНК, кодирующей синтез аденодоксина, показало наличие в молекуле зрелого белка дополнительной С-концевой последовательности, включающей 14 аминокислотных остатков, не обнаруживаемых при белковом сиквенсе [37–39]. Различия в результатах белкового и нуклеотидного сиквенса обусловлены ограниченным эндогенным протеолизом, которому подвергалась С-концевая последовательность молекулы аденодоксина в процессе его очистки. Протяженность отщепляемого участка полипептидной цепи варьировала, в результате чего очищенные препараты природного аденодоксина представляли собой гетерогенную смесь нескольких форм белка, различающихся длиной С-концевой области [34, 40–42]. Цитохром P-450scc гидролизовался трипсином до двух прочно ассоциированных фрагментов (доменов), сохраняющих функциональную активность исходного белка [43–45]. В молекуле P-450scc имеется выраженный положительно заряженный участок, расположенный над гемовой группой с проксимальной стороны, который может являться потенциальным участком для комплексообразования с ферредоксином. Этот участок представлен аминокислотной последовательностью, расположенной после остатка Cys422, выступающего в роли проксимального лиганда P-450scс, и включает остатки Arg425 и Arg426 [46, 47].

Неизбежные модификации функционально значимых участков белков при создании слитого тройного белка в последовательности конструкции F2, его неполный синтез и протеолитическая модификация, очевидно, приводили к «неправильным» сворачиванию и взаимному расположению доменов. Следствием этих процессов явилась низкая функциональная активность для очищенной фракции F2 тройного гибрида, что согласуется с ранее полученными данными по соиммобилизации трех отдельных белков [6] и экспрессии F2 в COS-1 клетках [15, 16].

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ 17 α -ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ И 20-ОКИСЛЕНИЯ-ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРИ БИОТРАНСФОРМАЦИЯХ С-21 Δ^4 -3-КЕТОСТЕРОИДОВ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ДРОЖЖАМИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ ЦИТОХРОМ P-45017 α БЫКА

ИСХОДНЫЕ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ МИКРООРГАНИЗМЫ

Исходный микроорганизм – *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 (*Mata his3-11 his3-15 leu2-3 leu2-112 cir⁺ can^r*,); трансформанты – *S. cerevisiae* GRF18/YEp51 (негативный контрольный штамм, далее YEp51); *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α (встроенный ген цитохрома P-45017 α , далее YEp51/17) [30].

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ПРОГЕСТЕРОНА ТРАНСФОРМАНТАМИ ДРОЖЖЕЙ И ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СТРУКТУРЫ ВОССТАНОВЛЕННОГО ПРОИЗВОДНОГО 17 α -ГИДРОКСИПРОГЕСТЕРОНА

В результате проведения отдельных 2- или 48-часовой биотрансформации прогестерона (рис. 2) установлено, что прогестерон (1) с помощью YEp51/17 α превращался в 17 α -гидроксипрогестерона (2) с последующим накоплением более полярного продукта 3 (рис. 2).

Инкубация в течение 24 ч с контрольным штаммом YEp51 не приводила к образованию детектируемых производных прогестерона. После очистки ТСХ и ВЭЖХВД были выделены соединения 2 и 3. Как и следовало ожидать, исходя из субстратной специфичности P450c17, строение 2 как 17 α -гидроксипрогестерона было подтверждено идентичностью времен удержания при ВЭЖХВД и масс-спектров выделенного 2 и аутентичного стандарта. Продукт 3, по данным ТСХ и ВЭЖХВД, не являлся андростендионом (расщепление связи C17–C20 17 α -гидрокси-прогестерона) или тестостероном (17 β -дегидрогеназная реакция по отношению к андростендиону), дельта⁵-производным 17 α -гидроксипрогестерона (изомеразная реакция), 3 α - или 3 β -ОН стероидом (3-дегидрогеназная реакция) или 16,17-оксидпрогестероном (дополнительное 16 α -гидроксилирование). Молекулярная масса по сравнению с 17 α -гидроксипрогестероном увеличилась на 2 единицы (M+332), а наличие в масс-спектре пиков с m/e 314, 288 и 287, обусловленных

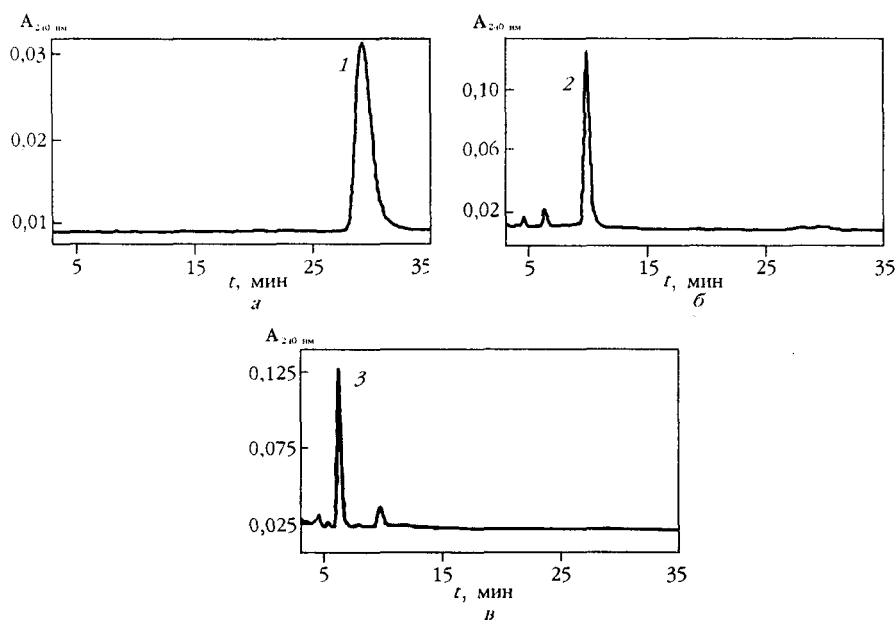


Рис. 2. Анализ ВЭЖХВД продуктов превращения прогестерона при отдельных биотрансформациях: а – прогестерон + контрольный штамм YEp51 без гена P-450c17 (24 ч инкубации); б – прогестерон + рекомбинантный штамм YEp51/17 (2 ч инкубации); в – прогестерон + рекомбинантный штамм YEp51/17 (24 ч инкубации). Колонка Nucleosil 100-5 C₁₈; элюент: ацетонитрил/вода – 4/6; детекция на длине волны 240 нм

элиминированием H_2O , CH_3CHO , CH_3CHOH соответственно, свидетельствовало о 20-восстановлении. Для окончательного установления структуры вещества **3** был проведен химический синтез $17\alpha,20\beta$ -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она и сравнительный анализ 1H ЯМР спектров [48]. Продукт **3** являлся $17\alpha,20\alpha$ -дигидрокси-прегн-4-ен-3-оном. Поскольку синтезированный $17\alpha,20\beta$ -дигидрокси-прегн-4-ен-3-он в условиях ВЭЖХВД имел время удержания на 1 мин больше и на хроматограммах (рис. 2) его не было обнаружено, то можно заключить, что 20-кетовосстановление происходило с образованием исключительно 20α -изомера.

**БИОТРАНСФОРМАЦИЯ $20(\alpha,\beta)$ ДИГИДРОПРОГЕСТЕРОНОВ
С ПОМОЩЬЮ YEP51/17 И ВЗАИМООТНОШЕНИЯ 17α -ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ
И 20-ОКСИДОВОССТАНОВЛЕНИЯ В ОТНОШЕНИИ
МОНОГИДРОКСИЛИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПРОГЕСТЕРОНА**

В качестве иллюстрации этой серии экспериментов на рис. 3 представлены хроматограммы этилацетатных экстрактов на различных интервалах времени инкубации 20α -дигидропрогестерона с рекомбинантными дрожжами YEP51/17 α . Помимо исходного субстрата (**4**) с временем удержания 19,8 мин, было установлено образование следующих продуктов: прогестерона (**1**) (28,8 мин), 17α -гидроксипрогестерона (**2**) (9,7 мин) и $17\alpha,20\alpha$ -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она (**3**) (6,3 мин). При проведении биотрансформации 20α -дигидропрогестерона (**4**) с контрольным штаммом YEP51 не было обнаружено заметных количеств дополнительных продуктов – концентрации исходного субстрата оставалась без изменений в течение 24 ч инкубации. Не обнаружено также прямого 17α -гидроксилирования дигидроксипроизводных прогестеро-

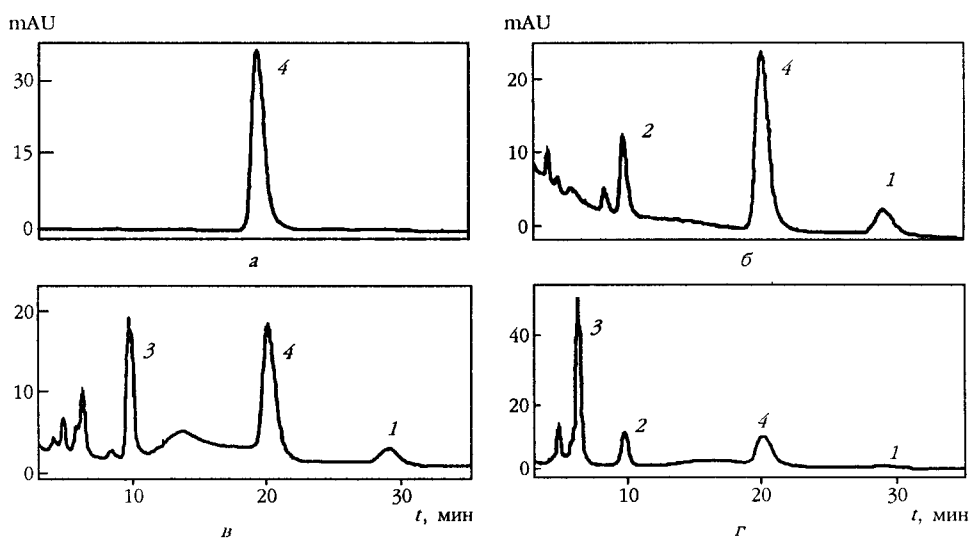


Рис. 3. Анализ ВЭЖХВД продуктов превращения 20α -дигидропрогестерона: а – исходный субстрат + контрольный штамм YEP51 без гена P-450C17 (24 ч инкубации); б – исходный субстрат + рекомбинантный штамм YEP51/17 (2 ч инкубации); в и г – как и б, но время инкубации б ч и 24 ч соответственно. Колонка: Nucleosil 100-5 C₁₈; Элюент: ацетонитрил/вода – 4/6. 1 – прогестерон, 2 – 17α -гидроксипрогестерон, 3 – $17\alpha,20\alpha$ -дигидрокси-прегн-4-ен-3-он, 4 – 20α -дигидропрогестерон

на или расщепления связи C17–C20. Максимальное содержание прогестерона (1) составило 14 мкМ на начальных этапах и уменьшалось до 4 мкМ через 24 ч. Это в 40–140 раз превышает концентрацию экспрессированного P-450c17. Следовательно, если C–20 окисление 20-дигидропрогестеронов осуществляется преимущественно через P450c17, то без прочного комплекса стероида и активного центра гемопротеида.

Образование 17 α -гидроксипрогестерона (2) характеризовалось максимумом (40 мкМ) через 10 ч, а 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она (3) (52 мкМ) через 24 ч инкубации. Более низкая глубина превращения наблюдалась в случае 20 β -дигидропрогестерона с последовательным образованием прогестерона (1), 17 α -гидроксипрогестерона (2) и 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она (3).

Для изучения взаимосвязи между процессами 17 α -гидроксилирования и 20-окисления-восстановления мы определили число оборотов (моль образующегося продукта на 1 моль P450c17 в 1 мин) при биотрансформации прогестерона и его производных дрожжами YEr51/17 (таблица).

Скорость 17 α -гидроксилирования прогестерона (7,75 мин⁻¹) в 6–10 раз выше, чем для 20 α - или 20 β -дигидропрогестеронов. Это обусловлено их предварительным 20-ОН-окислением (0,83 и 2,4 мин⁻¹), ингибирующим эффектом на P450c17 и различной скоростью поступления исходных субстратов в клетки. 11 α - и 11 β -гидроксипрогестероны подвергаются 17 α -гидроксилированию примерно в 20 раз менее эффективно по сравнению с прогестероном. Появление 17 α ОН-группы является критическим для проявления реакции 20 α -восстановления, и равновесие смещено в сторону образования конечного продукта 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она за счет его количественного выведения из клеток.

Известно, что введение и экспрессия чужеродных генов может сопровождаться изменением промежуточного метаболизма рекомбинантных клеток. В специальных опытах нами установлено, что проведение биотрансформаций прогестерона с помощью YEr51/17 на различных средах, одновременное добавление D-

Число оборотов (мин⁻¹) при биотрансформациях стероидов с помощью YEr51/17.
Концентрация экспрессированного P-450c17, определяемая из СО-разностных спектров
0,09–0,12 мкМ, концентрация стероидов – 100 мкМ

Субстрат	20-ОН-окисление ¹	17 α -гидроксилирование ²	20 α -восстановление ³
Прогестерон	–	7,75±0,47	0,58±0,05
20 α -дигидропрогестерон	2,4±0,17	1,33±0,12	0,27±0,02
20 β -дигидропрогестерон	0,83±0,06	0,80±0,07	0,11±0,01
17 α -гидроксипрогестерон	–	–	0,71±0,06
11 β -гидроксипрогестерон	–	0,33±0,03	–
11 α -гидроксипрогестерон	–	0,36±0,03	–
21-гидроксипрогестерон	–	–	0,08±0,01 ⁴

¹ Скорость 20-ОН-окисления оценивали по убыли соответствующих субстратов.

² Скорость 17 α -гидроксилирования по образованию 17 α -гидроксипрогестерона.

³ Скорость 20 α -восстановления по образованию 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она.

⁴ Стереохимия 20-ОН-группы не определена.

галактозы и прогестерона или последовательная индукция и биотрансформации стероида, а также смена сред непосредственно перед процессом биотрансформации не приводили к качественному изменению обнаруженной последовательности реакций. Можно предположить, что отличия между исходными COS-1 клетками и штаммами *S. cerevisiae* AH22, W303A, W303B, GRF18, используемыми для получения трансформантов, могут обуславливать различную последовательность реакций, приводящих к 17 α -гидроксипрогестерону, 17 α -гидроксипрогестерону + андростендиону и 17 α -гидроксипрогестерону + 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-ону [23, 27, 28, 30].

Восстановление 20-кетостероидов широко распространено у микроорганизмов и является одним из путей метаболизма и инактивации кортикостероидов у млекопитающих [1, 2, 49]. Нами установлено (рис. 2, таблица), что 20-дигидропрогестероны подвергались дрожжами YEp51/17 следующим превращениям: первоначальному окислению 20 α - или 20 β -гидроксигруппы с образованием интермедиата прогестерона, который затем подвергался последовательным 17 α -гидроксилированию и 20 α -восстановлению. Поскольку трансформанты дрожжей YEp51, у которых ген CYP17 отсутствовал, не превращали дигидропроизводные прогестерона, то можно предположить, что оксидазная активность связана с P450c17. Ранее с использованием очищенных форм цитохромов P-450 из коры надпочечников, участвующих в стероидогенезе, было показано окисление различных стероидов, например: окисление 19-гидроксиандростендиона до 19-оксо-андростендиона при превращении андрогенов в эстрогены [50] или 19-гидрокси-11-дезоксикортикостерона до 19-оксо-11-дезоксикортикостерона с помощью P45011b [51]; окисление тестостерона до андростендиона с помощью P450sc [52]; 20 β -оксидазная активность P450c21 по отношению к 20 β -дигидропрогестерону и 17 α ,20 β -дигидрокси-прегн-4-ен-3-ону [53, 54]. В условиях биотрансформации *in vivo* с YEp51/17 мы обнаружили окисление до прогестерона обоих 20-изомеров дигидропрогестерона. Отсутствие региоселективности при окислении дигидропрогестеронов при использовании YEp51/17 свидетельствует о возможности механизма прямого отнятия водорода железо-оксо-формой P450c17. Как и в предыдущих работах [23, 27], мы не обнаружили при биотрансформациях прогестерона реакции расщепления связи C17–C20. Очевидно, отсутствие лиазной активности связано со структурными и количественными различиями между *S. cerevisiae* и стероидогенными клетками млекопитающих в отношении цитохрома b₅ [23, 27, 28, 55–57] и липидов [58]. Нельзя исключить, что наличие 20 α -стероидредуктазной активности с образованием 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она блокировало проявление лиазной реакции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конструирование гибридных систем «субстратспецифичный цитохром P-450 – «микроорганизм» для целей направленного синтеза стероидов может оказаться плодотворным лишь при соблюдении ряда фундаментальных принципов функционирования: 1) высокой аффинности белок-белковых взаимодействий и взаимозаменимости белков в процессе электронного транспорта и гидроксилирования

субстратов в гибридных системах, обуславливающих наиболее эффективное использование восстановительных эквивалентов при активации молекулярного кислорода; 2) сохранении регуляторного принципа равновесия спиновых форм цитохромов P-450 в гибридных системах как проявлению наиболее предпочтительных конформаций и редокс-потенциалов при реализации взаимодействий экспрессированных гемопротеидов с физиологическими лигандами; 3) сохранении аффинности при взаимодействии с субстратами и интермедиатами биосинтеза, включая необходимость их направленного транспорта и выведения, стерического соответствия и проявления в ряде случаев множественных активностей одной протомерной формой цитохрома P-450.

В случае слитого белка F2 мы обнаружили принципиальные изменения в эффективности взаимодействия с холестерином и связывания окиси углерода, что свидетельствовало о нарушениях в аминокислотном окружении железа гема и формирования субстрат-связывающего участка. P-450_{scs}-содержащий домен в составе очищенного препарата белка F2 не подвергался заметному восстановлению NADPH через простетические группы и редуктазные белковые домены, локализованные в составе одной полипептидной цепи. Функциональная активность понижена в 50–100 раз по сравнению с реконструкцией реакции расщепления боковой цепи холестерина на основе отдельных белковых компонентов. Требуется работа по конструированию слитого белка с различным линейным расположением доменов, введение различных полипептидных линкеров, соединяющих домены, а также поиск подходящего реципиента для оценки функциональной активности вариантов слитого белка *in vivo*.

Гетерологическая экспрессия P-450_{c17} в дрожжах привела к созданию эффективной системы превращений стероидов. Успех был обеспечен функциональным сопряжением экспрессированного в нативной конформации гемопротеида с конститутивной NADPH-цитохром P-450-редуктазой дрожжей, эффективным транспортом прогестерона в клетки трансгенного микроорганизма и его взаимодействием с гемопротеидом, а также практически количественным выведением продуктов из сферы реакций. Кинетически и проведением биотрансформации прогестерона на различных средах можно регулировать соотношение 17 α -гидроксипрогестерона и 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она. В сочетании с химическим получением 17 α ,20 β -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она из 17 α -гидроксипрогестерона биотехнологическая трансформация прогестерона с YEp51/17 позволяет расширить возможности химико-ферментативной модификации, а именно: получение 17 α -гидроксипрогестерона или 17 α ,20 α -дигидрокси-прегн-4-ен-3-она из одного исходного соединения с высоким выходом.

Работа выполнена в рамках совместного проекта БРФФИ–РФФИ (гранты Б99Р-027, 00-04-81111 Бел2000-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Charney W., Herzog H. L. // Microbial transformation of steroids. Academic Press. New York, 1967.
2. Ахрем А. А., Титов Ю. А. // Стероиды и микроорганизмы. М., 1970. С. 307.
3. Smith L. L. // Biotechnology. Chap. 2. Steroids. 1988. P. 31.

4. *Kieslich K.* // *Biotechnology*. Chap. 8. Steroid Conversions. 1988. P. 369.
5. *Shkumatov V. M., Usanov S. A., Chashchin V. L., Akhrem A. A.* // *Pharmazie*. 1985. V. 10. P. 757.
6. *Шкуматов В. М., Радюк В. Г., Гапонова Г. И. и др.* // *Биохимия*. 1988. № 53. С. 1962–1971.
7. *Turko I. V., Adamovitch T. B., Kirillova N. M. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. V. 996. P. 37.
8. *Lambeth J. D., Pember S. O.* // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 5596.
9. *Narhi L. O., Fulco A. J.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 7160–7169.
10. *Ravichandran K. G., Boddupalli S. S., Hasemann C. A. et al.* // *Science*. 1993. V. 261. P. 731.
11. *Sakaki T., Shibata M., Yabusaki Y. et al.* // *DNA Cell Biol.* 1990. V. 9. P. 603–614.
12. *Yabusaki Y., Murakami H., Sakaki T. et al.* // *DNA*. 1988. V. 7. P. 701.
13. *Shet M. S., Fisher C. W., Arlotto M. P. et al.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1994. V. 311. P. 402–417.
14. *Murakami H., Yabusaki Y., Shibata M., Ohkawa H.* // *DNA*. 1987. V. 6. P. 189.
15. *Harikrishna J. A., Black S. M., Szklarz G. D., Miller W.L.* // *DNA Cell Biol.* 1993. V. 12. P. 371–379.
16. *Black S. M., Harikrishna J. A., Szklarz G. D., Miller W. L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 7247.
17. *Sibbesen O., De Voss J. J., Ortiz de Montellano P. R.* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 22462–22469.
18. *Novikova L. A., Savelev A. S., Zvyagil'skaya R. A., Luzikov V. N.* // *FEBS Lett.* 1996. V. 378. P. 182.
19. *Novikova L. A. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 203. P. 866–873.
20. *Savelev A. S., Novikova L. A., Kovaleva I. E. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 20596.
21. *Савельев А. С., Новикова Л. А., Друца В. Л. и др.* // *Биохимия*. 1997. Т. 62. С. 908.
22. *Jenkins C. M., Waterman M. R.* // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 6106.
23. *Auchus R. J., Lee T. C., Miller W. L.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 3158.
24. *Nakajin S., and Hall P.F.* // *J. Biol. Chem.* V. 256. 1981. P. 3871.
25. *Nakajin S., Shinoda M., Haniu M. et al.* // *J. Biol. Chem.* V. 259. 1984. P. 3971.
26. *Miller W. L., Auchus R. J., Geller D. H.* // *Steroids*. 1997. V. 62. P. 133–142.
27. *Zuber M. X., Simpson E.R., Waterman M.R.* // *Science*. 1986. V. 234. P. 1258.
28. *Sakaki T., Shibata M., Yabusaki Y. et al.* // *DNA*. 1989. V. 8. P. 409.
29. *Fisher C. W., Shet M. S., Caudle D. L. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. P. 10817.
30. *Шкуматов В. М., Усова Е. В., Поляков Ю. С. и др.* // *Биохимия* 2001. (в печати).
31. *Wada A., Mathew P. A., Barnes H. J. et al.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1991. V. 290. P. 376.
32. *Ахрем А. А., Бовдей И. И., Мороз И. Н. и др.* // *Докл. АН СССР*. 1980, Т. 250. С. 757.
33. *Warburton R. J., Seybert D. W.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 152. P. 177.
34. *Чащин В. Л., Лапко В. Н., Шолькина Л. В. и др.* // *Биохимия*. 1983. Т. 48. С. 1697–1703.
35. *Nabi N., Omura T.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980. V. 97. № 2. P. 680.
36. *Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. T., Kimura T.* // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248, № 4. P. 1141.
37. *Matocha M. F., Waterman M. R.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 13. P. 8672–8678
38. *Okamura T., John M. E., Zuber M. X. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82, № 17. P. 5705.
39. *Bhasker C. R., Okamura T., Simpson E. R., Waterman M. R.* // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 164, № 1. P. 21.
40. *Sakihama N., Hiwatashi A., Miyatake A. et al.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1988. V. 264, № 1. P. 23.
41. *Hiwatashi A., Sakihama N., Shin M., Ichikawa Y.* // *FEBS Lett.* 1986. V. 209, № 2. P. 311.

42. *Cupp J. R., Vickery L. E.* // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264, № 3. P. 1602.
43. *Ахрем А. А., Василевский В. И., Радюк В. Г. и др.* // *Биоорг. химия.* 1980. Т. 6. С. 285.
44. *Chashchin V. L., Vasilevsky V. I., Shkumatov V. M., Akhrem A. A.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1984. V. 787. P. 27.
45. *Chashchin V. L., Vasilevsky V. I., Shkumatov V. M. et al.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1984. V. 791. P. 375.
46. *Hasemann C. A., Kurumbail R. G., Boddupalli S. S. et al.* // *Structure.* 1995. V. 3., № 1. P. 41.
47. *Pikuleva I. A., Tesh K., Watermann M. R., Kim Y.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 246. P. 44.
48. *Ковганко Н. В., Кашкан Ж. Н., Шкуматов В. М.* // *Химия природ. соединений.* 2001 (в печати).
49. *Dorfman R.J., Ungar F.* // *Metabolism of steroid hormones.* Academic Press. New York, 1965.
50. *Suhara K., Ohashi K., Takeda K., Katagiri M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 140. P. 530.
51. *Ohta M., Fujii S., Wada A. et al.* // *J. Steroid Biochem.* 1987. V. 26. P. 73–81.
52. *Suhara K., Fujimura Y., Shiroo M., Katagiri M.* // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 530.
53. *Tsubaki M., Morimoto K., Tomita S. et al.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1995. V. 1259. P. 89.
54. *Tsubaki M., Matsumoto N., Tomita S. et al.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1998. V. 1390. P. 197.
55. *Onoda M., Hall P. F.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 104. P. 454.
56. *Katagiri M., Suhara K., Shiroo M., Fujimura Y.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 108. P. 37.
57. *Lee-Robichaud P., Akhtar M. E., Akhtar M.* // *Biochem. J.* 1998. V. 332. P. 293–296.
58. *Perrin A., Chambaz E. M., Defaye G.* // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995. V. 54. P. 121.