

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики**

ГУДНЫЙ
Евгений Сергеевич

**ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ И ОЧИСТКА
РЕКОМБИНАНТНОЙ 7А-ГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И СКРИНИНГ
ЛИГАНДОВ СРЕДИ СТЕРОИДОВ АНДРОСТАНОВОГО РЯДА**

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
к. х. н., с.н.с. лаборатории
белковой инженерии
ИБОХ НАН Беларуси
Я. В. Диченко

Минск, 2019

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 45 стр., 20 рис., 2 табл., 59 источн.

МОНООКСИГЕНАЗЫ, ЦИТОХРОМЫ, СПАСТИЧЕСКАЯ ПАРАПЛЕГИЯ 5А, СYP7B1, МУТАЦИЯ F470I, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ, УСКОРЕННАЯ МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА, ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ.

Объект исследования: Рекомбинантный фермент мутантная 7α -гидроксилаза человека с аминокислотной заменой Phe 470 Ile, полученный путём гетерологической экспрессии.

Цель работы: Получить очищенный препарат рекомбинантного фермента стероид 7α -гидроксилазы человека с аминокислотной заменой Phe 470 Ile и провести скрининг лигандов среди стероидов андростанового ряда.

Методы исследования: ПЦР, Ионообменная хроматография, маталлафинная хроматография, спектрофотометрическое титрование.

В данной работе была сконструирована система для гетерологического получения рекомбинантного фермента стероид 7α -гидроксилазы человека с аминокислотной заменой Phe 470 Ile. Была разработана и оптимизирована методика, подобраны оптимальные условия для экспрессии и выделения целевого белка. Спрогнозированы и экспериментально подтверждены изменения в пространственной структуре мутантной стероид 7α -гидроксилазы человека, а именно установлено, что аминокислотная замена Phe 470 Ile увеличивает стабильность и жесткости структуры белковой молекулы. Был получен очищенный гомогенный препарат рекомбинантного фермента CYP7B1_F470I, который в дальнейшем был использован для проведения скрининга лигандов среди стероидов андростанового ряда.

Результаты скрининга лигандов указывают на то, что изменения в пространственной структуре вызванные аминокислотной заменой Phe 470 Ile также затрагивают структуру активного центра. Изменения в структуре активного центра CYP7B1 привели к изменениям его химических характеристик.

Определены фармакофорные особенности лигандов CYP7B1_F470I.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 45 стар., 20 мал., 2 табл., 45 крынак.

МОНАОКСИГЕНАЗЫ, ЦЫТАХРОМ, СПАСТЫЧНАЯ ПАРАПЛЕГІЯ 5А, СYP7B1, мутація F70I, СПЕКТРАФОТАМЕТРЫЧЫСКАЕ ТЫТРАВАННЕ, ПАСКОРАННАЯ МАЛЕКУЛЯРНАЯ ДЫНАМІКА, ГЕТЕРАЛАГІЧНАЯ ЭКСРЭСІЯ.

Аб'ект даследавання: Рэкамбінантны фермент мутантнай 7α -гидроксилазы чалавека з амінакіслотнай заменай Phe 470 Ile, атрыманы шляхам гетерологічнай экспрэсіі. Атрымаць вычышчаны прэпарат рэкамбінантнага фермента стэроід 7α -гидроксилазы чалавека з амінакіслотнай заменай Phe 470 Ile і правесці скрынінг лігандаў сярод стэроідаў андростановага шэрагу.

Метады даследавання: ПЦР, іонаабменная хромаціграфія, маталлафінная хромаціграфія, спектрафотаметрычнае тытраванне.

У дадзенай працы была сканструяваная сістэма для гетерологічнага атрымання рэкамбінантнага фермента стэроід 7α -гидроксилазы чалавека з амінакіслотнай заменай Phe 470 Ile. Была распрацавана і аптымізавана метадыка, падабраныя аптымальныя ўмовы для экспрэсіі і вылучэнні мэтавага бялку. Спрагназаваны і эксперыментальна пацверджаны змены ў прасторавай структуры мутантнага стэроід 7α -гидроксилазе чалавека, а менавіта ўстаноўлена, што амінакіслотная замена Phe 470 Ile павялічвае стабільнасць і калянасць структуры бялковай малекулы. Быў атрыманы вычышчаны гамагенны прэпарат рэкамбінантнага фермента CYP7B1_F470I, які ў далейшым быў выкарыстаны для правядзення скрынінга лігандаў сярод стэроідаў андростановага шэрагу.

Вынікі скрынінга лігандаў паказваюць на тое, што змены ў прасторавай структуры выклікаюцца амінакіслотнай заменай Phe 470 Ile таксама закранаюць структуру актыўнага цэнтра. Змены ў структуры актыўнага цэнтра CYP7B1 прывялі да зменаў яго хімічных характарыстык.

Вызначаны фармакофорныя асабеності лігандаў CYP7B1_F470I.

ABSTRACT

Graduate work 45 pages, 20 figures, 2 tables, 59 sources.

MONOXYGENASES, CYTOCHROMES, SPASTIC PARAPLEGIA 5A, CYP7B1, MUTATION F470I, SPECTROPHOTOMETRIC TITRATION, ACCELERATED MOLECULAR DYNAMICS, HETEROLOGICAL EXPRESSION.

Research object: Recombinant human mutant 7α -hydroxylase with the amino acid substitution Phe 470 Ile, obtained by heterologous expression.

Aim of this study is obtain a purified recombinant enzyme preparation of a human steroid 7α -hydroxylase with the amino acid substitution Phe 470 Ile and screening for ligands among the androstane steroids.

Research techniques: PCR, Ion exchange chromatography, matlaphine chromatography, spectrophotometric titration.

In this work, we designed expression system for heterologous production of a recombinant human steroid 7α -hydroxylase with the amino acid substitution Phe 470 Ile. The technique was developed and optimized; we selected the optimal conditions for the expression and isolation of the target protein. Changes in the spatial structure of the human mutant steroid 7α -hydroxylase are predicted and experimentally confirmed, namely, it was established that the amino acid substitution of Phe 470 Ile increases the stability and rigidity of the protein molecule structure. A purified homogeneous preparation of recombinant enzyme CYP7B1_F470I was obtained, which was later used to screen for ligands among androstane steroids.

The results of ligand screening indicate that changes in the spatial structure caused by the amino acid substitution Phe 470 Ile also affect the structure of the active center. Changes in the structure of the active center of CYP7B1 led to changes in its chemical characteristics.

The pharmacophore features of CYP7B1_F470I ligands were determined.