

БІААРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

УДК 577.151.42

В. А. КОПОТЬ, Г. В. СЕРГЕЕВ, А. А. ГИЛЕП, С. А. УСАНОВ

**СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНОЙ
СТЕРОИД 21-ГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА И ВЛИЯНИЕ ЦИТОХРОМА b_5
НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ**

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 06.05.2015)

Введение. В биосинтезе стероидных гормонов центральную роль играют ферменты суперсемейства монооксигеназ – цитохромы P450 [1]. Какие стероидные гормоны, в каком количестве и в каком соотношении будут продуцироваться стероидогенными клетками в значительной степени зависит от уровня экспрессии и набора ферментов, принимающих участие в биосинтезе. Одним из цитохромов P450, участвующих в стероидогенезе, является стероид 21-гидроксилаза (CYP21), которая катализирует реакцию гидроксилирования 21 атома углерода прогестерона или 17 α -гидроксипрогестерона, что приводит к образованию 11-дезоксикортикостерона и 11-дезоксикортизола соответственно. Эта реакция протекает в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и для ее проведения необходима одна молекула NADPH, одна молекула кислорода и микросомальная система переноса электронов [2].

Изменения ферментативной активности CYP21 приводят к серьезным нарушениям метаболизма. Врожденная гиперплазия надпочечников – одно из наиболее часто встречающихся аутосомно-рецессивных заболеваний, обусловленных нарушением биосинтеза стероидных гормонов в коре надпочечников. Частота классических форм заболевания оценивается по различным данным от 1:10 000 до 1:15 000 новорожденных [3–5]. В 90–95% всех случаев причиной является врожденный дефицит 21-гидроксилазы [6].

Цитохром b_5 , являясь компонентом электрон-транспортной системы II типа с участием цитохромов P450 в ЭПР эукариот, может стимулировать, ингибировать или не оказывать существенного эффекта на цитохром P450-опосредованные реакции гидроксилирования, а результат зависит как от фермента, применяемого субстрата, так и от условий проведения реакции [8]. Цитохром b_5 играет важную аллостерическую роль в регуляции активности цитохрома P450 в системе стероидогенеза – 17 α -гидроксилазы/17,20 лиазы (CYP17), тем самым дифференцируя синтез глюкокортикоидов и половых стероидов [16]. Цитохром b_5 необходим для C_{17,20}-лиазной активности [15]. В мембранах эндоплазматического ретикулума коры надпочечников присутствует другой цитохром P450 – 21-гидроксилаза, для которого роль цитохрома b_5 остается невыясненной. Поэтому цель данной работы – определение влияния цитохрома b_5 на 21-гидроксилазную активность CYP21 с различными субстратами.

Материалы и методы исследования. Реагенты. В работе использовали следующие материалы и реактивы: NaCl («Пять океанов», Беларусь); изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид – IPTG («Sigma», США); ампициллин, канамицин («Sigma», США); фенил-метил-сульфонилфторид – PMSF («Sigma», США); глицерин («Acrosorganic», Германия); Ni-NTAагароза («Qiagen», США); 5-аминолевулиновая кислота – АЛК, этиловый спирт, додецилсульфат натрия – SDS («Acrosorganic», Германия); акриламид (USB, США); прогестерон – P4, прегненолон – P5, 17 α -гидроксипрогестерон –

17ОНР4, 11-гидроксипрогестерон – 11ОНР4, 17 α -гидроксипрегненолон – 17ОНР5 («Sigma», США); арабиноза, легкоплавкая агароза для электрофореза (FMC), кумасси бриллиантовый голубой R-250, 1,4 дитиотреитол – ДТТ; эмульген-913 – Emulgen 913 («KaoAtlas», Япония); N-2-гидроксиэтиленпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота – Hepes; глицин, гистидин, гидроксилпатит («Bio-Rad», США), метиленхлорид («Экос-1», Россия); аммоний персульфат («USB», США); TEMED («USB», США); муравьиная кислота («Acrosorganics», Бельгия); синапиновая кислота («BrukerDaltonikGmbH», Германия); ацетонитрил («Sigma», США).

Экспрессия рекомбинантного CYP21 человека. В данной работе использовались клетки *E. coli DH5 α* , которые котрансформировали плазмидами, содержащими ген CYP21 *H. sapiens* и комплекс молекулярных шаперонов GroES-GroEL. Компетентные клетки *E. coli DH5 α* для трансформации плазмидами pTc и pGro со встроенными генами CYP21 *H. sapiens* и шаперонов GroES/GroEL соответственно, а также цитохром *b₅* были предоставлены лабораторией молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Скрининг колоний на наличие плазмид проводился на чашках с LB-агаром, содержащих ампицилин (100 мкг/мл) и канамицин (35 мкг/мл). Клетки, содержащие обе плазмиды, были использованы для экспрессии CYP21. Культуру клеток инкубировали в орбитальном термостатируемом шейкере MultitronPro (Швейцария) при 37 °С и 180 об/мин в течение 4,5–5 ч, после чего добавляли ИПТГ (0,5 мМ), АЛК (0,65 мМ), арабинозу (4 мг/мл) и Р4 (100 мкМ). Культивирование осуществляли в орбитальном термостатируемом шейкере при 26 °С и 160 об/мин. Через 48 ч экспрессии клетки охлаждали на льду в течение 1 ч и осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 20% глицерина, 0,3 М NaCl, 0,5 мМ PMSF и 50 мкМ Р4 (на 1 объем клеток 7 объемов буфера). Суспензию клеток замораживали и хранили при температуре –73 °С.

Выделение и очистка рекомбинантного CYP21. Клетки размораживали и разрушали с использованием прибора EmulsiFlexC5 («Avestin», Канада). Рекомбинантный цитохром Р450 солибилизовали из мембран добавлением Emulgen 913 к супернатанту до конечной концентрации 1%. Суспензию центрифугировали в течение 1 ч при 18 500 об/мин для осаждения мембран. Супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой. Колонку промывали 10 объемами калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,3 М NaCl, 20% глицерина, 50 мкМ Р4 с добавлением 0,2% Emulgen 913 и 100 мМ глицина. Белки элюировали с колонки 50 мМ калий-фосфатным буфером, содержащем 0,3 М NaCl, 20% глицерина, 50 мкМ Р4, 50 мМ гистидин и 0,5% Emulgen 913.

Для дополнительной очистки получаемого фермента собранные фракции наносили на колонку с гидроксилпатитом ($d = 1,5$ см, $h = 5$ см), уравновешенную в 10 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4. Колонку промывали 10 объемами 50 мМ калий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 20% глицерина, 50 мкМ Р4, 0,5% Emulgen 913 и 0,1 мМ ДТТ. Белок элюировали с колонки увеличением концентрации фосфата до 500 мМ. Очищенный белок хранился при температуре –73 °С.

Аналитические методы. Концентрацию цитохром Р450 стероид 21-гидроксилазы определяли спектрофотометрически, используя $\epsilon_{450-490} = 91$ мМ⁻¹ см⁻¹ для комплекса восстановленного гемопротейна с СО. Раствор белка в измеряемой кювете насыщали СО и далее записывали спектр поглощения при длине волны 400–500 нм.

Определение молекулярной массы CYP21 проводили при помощи масс-спектрометра с источником ионизации MALDI. В качестве матрицы использовали синапиновую кислоту, которую растворяли в 50%-ном ацетонитриле, содержащем 0,1%-ную трифторуксусную кислоту. Нанесение образцов и матрицы на мишень осуществляли методом сухой капли, после чего проводилась масс-спектрометрия исследуемых образцов на настольном MALDI-TOF времяпролетном масс-спектрометре MicroflexLRFSsystem (США).

Белковый электрофорез в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле проводили для анализа чистоты полученных фракций. Для проведения электрофореза в ПААГ в присутствии SDS использовали гель, состоящий из двух частей: 4%-ный концентрирующий гель (рН 6,8) и 15%-ный разделяющий гель (рН 8,8). Электрофорез проводили при напряжении 80В в концентрирующем геле, после входа в разделяющий гель использовали напряжение 200В. Для визуализации результатов электрофореза использовали окрашивание гелей красителем КумассиR-250.

Спектрофотометрическое титрование рекомбинантного CYP21 человека стероидными субстратами. Спектрофотометрическое титрование проводили в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,3 М NaCl. Титрование проводили при комнатной температуре в кварцевых кюветах. Для титрования использовали концентрации лиганда в диапазоне 0,1–100 мкМ. Стероидные субстраты, растворенные в этаноле, добавляли в опытную кювету, в контрольную кювету добавляли такой же объем этанола. Прописывали спектр поглощения на спектрофотометре при длине волны 350–500 нм. Регистрировали увеличение поглощения на длине волны 390 нм и уменьшение поглощения на – 420 нм. При проведении измерений контролировали базовую линию, изменение которой свидетельствовало об увеличении светорассеяния и снижении растворимости добавляемых стероидов.

Определение константы диссоциации комплекса фермент–лиганд. Для оценки способности связывания белка и стероидного субстрата рассчитывали константу диссоциации K_d комплекса фермент–лиганд, которую определяли по формуле с помощью программы SigmaPlot:

$$dA = \frac{dA_{\max}}{2P_0} \left(B_0 + P_0 + K_d - \sqrt{(B_0 + P_0 + K_d)^2 - 4B_0P_0} \right),$$

где dA – наблюдаемая величина поглощения; dA_{\max} – максимальное изменение поглощения; P_0 – концентрация цитохрома P450 CYP21; B_0 – концентрация субстрата; K_d – константа диссоциации для комплекса субстрат – CYP21.

Определение каталитической активности стероид 21-гидроксилазы человека. Каталитическую активность CYP21 определяли в реконструированной системе, содержащей CYP21 и NADPH цитохром P450-редуктазу (CPR) в 25 мМ HEPES буфере, (рН 7,4) содержащем 10 мМ $MgCl_2$. Аликвоты концентрированных белков (0,25 мкМ CYP21; 0,5 мкМ CPR) смешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 мин. Стероидные субстраты, растворенные в этаноле, добавляли в реакционную смесь до конечной концентрации 100 мкМ и преинкубировали 2 мин при 37 °С. Реакцию запускали добавлением регенерирующей системы (изоцитрат натрия, изоцитратдегидрогеназа и NADPH в конечной концентрации 0,25 мМ). Аликвоты (0,5 мл) отбирали из инкубационной смеси через определенные интервалы времени (каждые 5 мин). Реакцию останавливали добавлением 5 мл хлористого метилена. Смесь интенсивно встряхивали, после этого водный и органический слой разделяли центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин. Водный слой аккуратно удаляли и органический слой высушивали под током аргона. К осадку добавляли 100 мкл метанола, стероиды анализировались с использованием хроматографа Hewlett Packard HP 1090 серии II/L, оснащенном C18-колонкой μ -Bondapak (3,9 × 300 мм) и диодно-матричным детектором.

При постановке активности в присутствии микросомального цитохрома b_5 его концентрация в реакционной смеси составляла 0,0625 мкМ.

Измерения приводились, как минимум, трижды с расчетом средних арифметических значений активности.

Результаты исследований и их обсуждение. К настоящему времени известны примеры применения различных экспрессионных систем для синтеза рекомбинантных цитохромов P450 человека, в которых использовались клетки млекопитающих, насекомых, дрожжей и бактерий. Технические требования и расходы на поддержание клеточных культур млекопитающих и насекомых довольно высоки, а также для таких экспрессионных систем характерно достаточно длительное время культивирования. По этим причинам использование бактериальных и дрожжевых систем является более предпочтительным [13]. В отличие от многих бактерий, таких как *Pseudomonas sp.*, *Rhizobium sp.*, *Bacillus sp.*, а также большинства эукариот, *Enterobacteria sp.*, включая *Escherichia coli*, не имеют собственных цитохромов P450 [10]. Наряду с этим преимуществом, простотой генетических манипуляций и высоким выходом белков, *E. coli* чаще используют для рекомбинантной экспрессии стероид 21-гидроксилазы. Хотя также сообщалось об использовании рекомбинантных клеток *Saccharomyces sp.*, экспрессирующих CYP21 человека [19].

Благодаря использованию общих подходов к экспрессии цитохромов P450 в *E. coli*, включающих в себя модификацию N-концевой последовательности (второй кодон GCT), сокращение

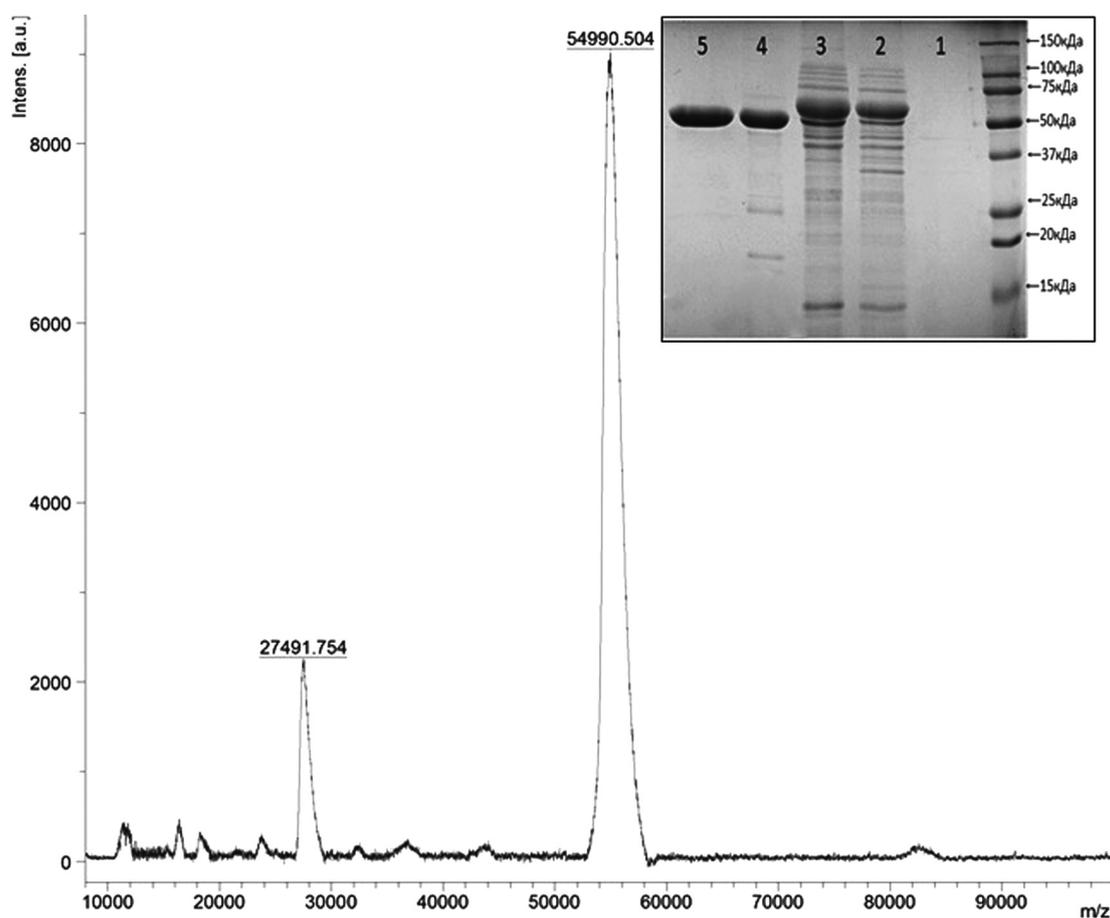


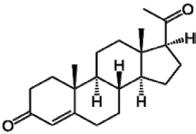
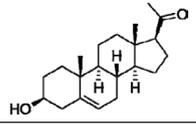
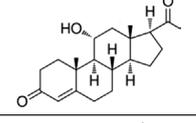
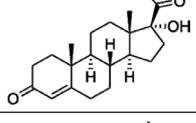
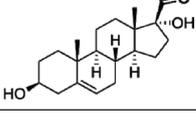
Рис. 1. Масс-спектр рекомбинантного СYP21 *H. sapiens*. На вставке приведены результаты электрофореза в 15% ПААГ (1 – клетки до индукции, 4,5 ч экспрессии; 2 – клетки после индукции, 48 ч экспрессии; 3 – разрушенные клетки после действия Эм-913; 4 – белковая фракция после элюции с колонки с Ni-NTA-агарозой; 5 – белковая фракция после элюции с колонки с гидроксипатитом)

N-концевой гидрофобной области, отвечающей за взаимодействие цитохрома P450 с мембраной [10], а также использованной методике, в частности коэкспрессии рекомбинантного СYP21 *H. sapiens* с комплексом молекулярных шаперонов GroES-GroEL и использованию АЛК в качестве предшественника биосинтеза гема, удалось добиться выхода гемопротейна 150 нмоль на литр культуральной среды. Согласно литературным данным, выход рекомбинантного СYP21 человека в более ранних экспериментах с использованием *E. coli* в качестве экспрессионного хозяина варьирует от 40–50 [12] до 180–190 нмоль на литр культуральной среды [10].

Данные масс-спектра ($m/z = 54990$) и результаты электрофореза в ПААГ (рис. 1) свидетельствуют о том, что несмотря на потери белка в ходе выделения, благодаря применению метода металлоаффинной хроматографии, полученный белок характеризуется высокой степенью чистоты и по физико-химическим характеристикам соответствует микросомальному СYP21 человека.

Полученный в данной работе препарат рекомбинантной стероид 21-гидроксилазы в дальнейшем использовали для скрининга потенциальных субстратов. Поиск потенциальных лигандов осуществляли методом спектрофотометрического титрования. Метод скрининга лигандов цитохрома P450 основан на способности вещества замещать молекулу воды в активном центре фермента и вызывать переход железа гема в высоко- или низкоспиновое состояния, что может быть обнаружено по изменениям в спектре поглощения при спектрофотометрическом титровании. Взаимодействие цитохрома P450 с субстратом индуцирует изменения конформации активного сайта молекулы и переход атома железа из 6-координированного низкоспинового в 5-координированное высокоспиновое состояние, что проявляется в увеличении поглощения на длине волны 390 нм и уменьшении поглощения на длине волны 420 нм. Данные изменения относятся к I типу

Таблица 1. Параметры взаимодействия ряда стероидов с рекомбинантной CYP21 *H. sapiens*

Номер опыта	Лиганд	Структура	dA_{\max}	K_d , мкМ
1	P4		$0,018 \pm 0,001$	$4,38 \pm 0,54$
2	P5		–	–
3	11ОНР4		$0,006 \pm 0,001$	$8,13 \pm 2,07$
4	17ОНР4		$0,021 \pm 0,001$	$4,94 \pm 1,09$
5	17ОНР5		–	–

Примечание. “–” – отсутствие спектрального ответа.

спектрального ответа [6]. Результаты спектрофотометрического титрования CYP21 P4, P5, 11ОНР4, 17ОНР4 и 17ОНР5 представлены в табл. 1.

Как известно, константа диссоциации фермент-субстратного комплекса характеризует его способность взаимодействовать с лигандом. Чем больше константа диссоциации, тем меньше сродство фермента к субстрату. Наибольшее сродство к CYP21 из пяти используемых стероидных субстратов имеют P4 и 17ОНР4. Константа диссоциации 11ОНР4 в ~1,85 раза больше константы диссоциации P4. Следует отметить, что, как и в эксперименте со стероид 21-гидроксилазой быка [6], при титровании CYP21 *H. sapiens* стероидными субстратами P5 и 17ОНР5 спектрального ответа не наблюдается.

CYP21 экспрессируется главным образом в коре надпочечников и представлен во всех трех зонах, но преимущественно экспрессируется в пучковой и клубочковой зонах [2]. Наименьший уровень экспрессии CYP21 наблюдается в сетчатой зоне, где доминирует CYP17 (17,20-лиазная активность). Белок-белковые взаимодействия между CYP21 и CYP17 считают дополнительным механизмом регуляции биосинтеза кортикостероидов [20]. Поэтому при поиске соединений, изменяющих активность CYP17, необходимо обратить внимание на возможное их влияние на 21-гидроксилазную активность CYP21, поскольку аминокислотные последовательности цитохромов CYP17 и CYP21 человека идентичны на 29%.

Известно, что микросомальный цитохром b_5 увеличивает активность значительного числа разных изоформ цитохрома P450 [17, 18]. А его роль по отношению к CYP17 и вовсе является уникальной, поскольку цитохром b_5 – основной физиологический регулятор биосинтеза половых гормонов [9]. А в связи с описанным в литературе аллостерическим эффектом цитохрома b_5 на активность CYP17 [16] вызывает интерес, оказывает ли он какой-либо эффект на 21-гидроксилазную активность CYP21 в качестве дополнительного регулятора биосинтеза стероидных гормонов.

В результате скрининга стероидных субстратов обнаружено, что CYP21 не связывает P5 и 17ОНР5, поэтому для определения каталитической активности CYP21 были выбраны три субстрата: P4, 17ОНР4 и 11ОНР4. В реконструированной системе с использованием в качестве донора электронов CPR оценивали каталитическую активность рекомбинантного высокоочищенного цитохрома CYP21 *H. sapiens* в присутствии P4, 17ОНР4 и 11ОНР4. Профиль образующихся

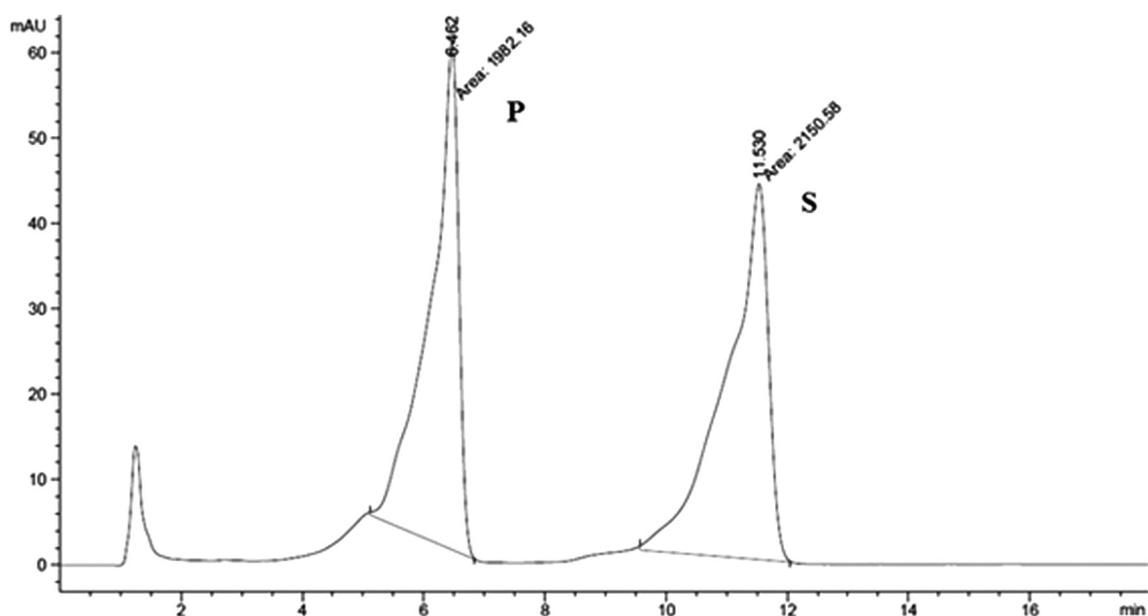


Рис. 2. ВЭЖХ профиль продуктов, образующихся при метаболизме 17ОНР4 СYP21 *H. sapiens* (5 мин), P – продукт 11-дезоксикортизол; S – субстрат 17ОНР4

в реконструированной системе продуктов реакции соответствует профилю образующихся продуктов природного фермента, причем цитохром b_5 не меняет профиль образующихся продуктов. При этом из 17ОНР4 посредством реакции 21-гидроксилирования образуется 11-дезоксикортизол (DCS), рис. 2. Ферментативная активность рассчитывалась исходя из количества образованного в ходе реакции продукта (нмоль) в единицу времени (мин) на 1 нмоль цитохрома P450 и выражалась в мин^{-1} . Активность определяли по формуле:

$$a = kA_p / (A_s + A_p) [S] / t,$$

где k – поправочный множитель (в рассматриваемом случае равен 1, поскольку коэффициенты молярной экстинкции субстрата и продукта на длине волны, используемой для детекции, равны); A_s – площадь хроматографического пика, соответствующего времени выхода субстрата; A_p – площадь хроматографического пика, соответствующего времени выхода продукта; $[S]$ – концентрация субстрата в реакционной смеси; t – время с момента начала реакции до ее остановки.

Для проведения эксперимента выбрано оптимальное соотношение стероид 21-гидроксилазы и цитохрома b_5 (1:0,25) [21], так как избыточное количество цитохрома b_5 может препятствовать взаимодействию цитохрома P450 и CPR. Результаты определения каталитической активности СYP21, представлены в табл. 2.

Таблица 2. Значения каталитической активности при гидроксилировании Р4, 17ОНР4, 11ОНР4 цитохромом СYP21 в реконструированной системе и в присутствии цитохрома b_5

Показатель	СYP21			СYP21+ b_5		
	5	10	15	5	10	15
Р4	27,89±2,84	26,28±1,77	19,54±0,26	30,78±2,71	26,36±0,92	19,65±0,97
17ОНР4	36,27±2,87	23,31±1,08	7,47±0,20	39,28±2,79	19,72±3,22	9,06±0,29*
11ОНР4	35,96±2,02	28,53±1,01	20,21±0,21	32,56±1,52	27,2±0,19	20,49±0,31

Примечание. * Статистически значимое различие.

Полученные значения 21-гидроксилазной активности СYP21 человека в реконструированной системе при соотношении СYP21: $b_5 = 1:0,25$ указывают на то, что цитохром b_5 не оказывает влияния на каталитическую активность рекомбинантной СYP21 при описанных выше условиях (рис. 3). В данном контексте важно указать, что в микросомах надпочечников морских свинок

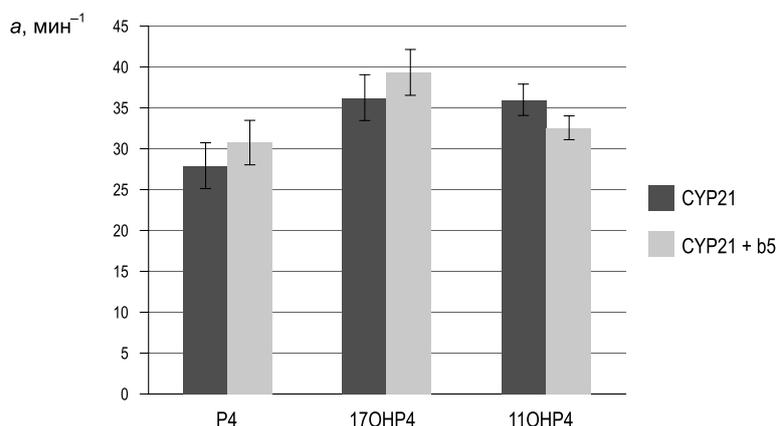


Рис. 3. Соотношение значений каталитической активности СУР21 при наличии и в отсутствие в реконструированной системе цитохрома b_5 при гидроксировании Р4, 17ОНР4 и 11ОНР4 (5 мин)

в малых количествах цитохром b_5 может быть активатором как 17 α -, так и 21-гидроксирования Р4 [7], а в опытах с микросомальными препаратами быка было показано, что цитохром b_5 в значительной степени стимулирует Р450-опосредованное образование 11-дезоксикортизола из 17 α -гидроксипрогестерона [14]. Следует отметить, что, согласно полученным результатам, динамика активности цитохрома Р450 стероид 21-гидроксилазы различается для всех трех субстратов. Наиболее резкое снижение активности СУР21 к 15-й минуте наблюдается при гидроксировании 17ОНР4 по сравнению с гидроксированием Р4 и 11ОНР4, причем в обоих случаях как в присутствии, так и в отсутствие цитохрома b_5 в реконструированной системе.

Выводы. Экспрессионная система, состоящая из плазмидных ДНК рGro+GroES/GroEL, рTtc+СУР21 и клеток *E. coli* штамма *DH5 α* , а также применение метода металлоаффинной хроматографии позволили добиться выхода белка 150 нмоль на литр культуральной среды. Полученный препарат обладает высокой степенью чистоты и был использован для скрининга потенциальных субстратов среди стероидов. Показано, что среди пяти используемых стероидных субстратов (Р4, 17ОНР4, 11ОНР4, Р5 и 17ОНР5) наибольшее сродство к СУР21 имеют Р4 и 17ОНР4, в то время как Р5 и 17ОНР5 рекомбинантная стероид 21-гидроксилаза не связывает. Обнаружено, что микросомальный СУР21 проявляет каталитическую активность по отношению к Р4, 17ОНР4 и 11ОНР4. Цитохром b_5 в реконструированной системе при соотношении СУР21: b_5 = 1:0,25, в отличие от СУР17А1, не оказывает влияния на 21-гидроксилазную активность СУР21 по отношению прогестерону, 11-гидроксипрогестерону и 17-гидроксипрогестерону, свидетельствуя о разных механизмах регуляции двух изоформ цитохрома Р450 в мембранах эндоплазматического ретикула коры надпочечников.

Литература

1. Schenkman J. B., Jansson I. // *Pharmacology & Therapeutics*. 2003. N 97. P. 139–152.
2. Payne A. H., Hales D. B. // *Endocr. Rev.* 2004. Vol. 25, N 6. P. 947–970.
3. Zhao B. et al. // *The journal of biological chemistry*. 2012. Vol. 287, N 13. P. 10613–10622.
4. Payne A. H., Hales D. B. // *Endocr. Rev.* 2004. Vol. 25, N 6. P. 947–970.
5. Reisch N., Arlt W., Krone N. Health Problems in Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2011. N 76. P. 73–85.
6. Arase M. et al. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. N 344. P. 400–405.
7. Kominami S. et al. The role of cytochrome b_5 in adrenal microsomal steroidogenesis. 1992. Vol. 42, N 1. P. 57–64.
8. Sergeev G. V., Gilep A. A., Usanov S. A. // *Biochemistry (Moscow)*. 2014. Vol. 79, N 5. P. 406–416.
9. Gilep A. A., Sushko T. A., Usanov S. A. // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. N 1814. P. 200–209.
10. Harnastai IN, Gilep A. A., Usanov S. A. // *Protein expression and purification*. 2006. N 46. P. 47–55.
11. Meng-Chun Hu, Bon-chu Chung // *Molecular Endocrinology*. 1990. Vol. 4, N 6. P. 893–898.
12. Guzov V. M. et al. // *Biokhimiia (Moscow)*. 1996. Vol. 61, N 10. P. 1758–1771.
13. Schroer K., Kittelmann M., Luts S. // *Biotechnology and Bioengineering*. 2010. Vol. 106, N 5. P. 699–706.
14. Katagiri M. et al. // *Biochemical and biophysical research communications*. 1982. Vol. 108, N 1. P. 379–384.
15. Tabas S. et al. // *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2011. Vol. 125. P. 23–31.

16. Akhtar M. K., Kelly S. L., Kaderbhai M. A. // J. Endocrinol. 2005. Vol. 187, N 2. P. 267–274.
17. Yamaori S. et al. Effects of cytochrome b(5) on drug oxidation activities of human cytochrome P450 (CYP) 3As: similarity of CYP3A5 with CYP3A4 but not CYP3A7. Biochemical Pharmacology, 2003. N 66, P. 2333–2340.
18. Yamazaki H. et al. // Protein Expression and Purification. 2002. N 24 P. 329–337.
19. Zehentgruber D. et al. // Journal of biotechnology. 2010. N 146. P. 179–185.
20. Sushko T. A., Gilep A. A., Usanov S. A. // Biochemistry (Moscow). 2012. Vol. 77, N 6. P. 585–592.
21. Guryev O. L. et al. // Biochemistry. 2001. N 40. P. 5018–5031.

V. A. KOPATS, G. V. SERGEEV, A. A. GILEP, S. A. USANOV

**SUBSTRATE SPECIFICITY OF RECOMBINANT STEROID 21-HYDROXYLASE *H. SAPIENS*
AND THE EFFECT OF CYTOCHROME *b*₅ ON ITS ACTIVITY**

Summary

Human cytochrome CYP21 (steroid 21-hydroxylase) has been expressed in *Escherichia coli* DH5 α and the expression level was 150 nmol from 1 liter of bacterial culture. Utilizing two steps of column chromatography has allowed to obtain highly purified protein. Steroids have been screened as potential substrates for the enzyme. CYP21 showed typical spectral change (type I of spectral response) when binding with progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone and 11-hydroxyprogesterone. In addition, it has been shown that cytochrome *b*₅ does not affect hydroxylase activity of CYP21 toward progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone and 11-hydroxyprogesterone.