

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
“ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ”

УДК 577.112.083+577.322.23+577.115.3

СВИРИД
АНДРЕЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

**ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ,
БЕЛОК-ЛИГАНДНЫЕ И БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
ТРОМБОКСАНСИНТАЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2018

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Государственного научного учреждения «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»

Научный руководитель:

Гилеп Андрей Александрович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси

Официальные оппоненты:

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

Фалетров Ярослав Вячеславович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация:

Белорусский государственный технологический университет

Защита состоится «22» ноября 2018 г. в 10⁰⁰ часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Институте биоорганической химии НАН Беларуси по адресу: 220141 г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 5/2, e-mail: litvin@iboch.bas-net.by; тел: +375(17) 267-85-53.

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

Автореферат разослан «17» октября 2018 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций Д 01.21.01,
доктор химических наук

Р.П. Литвиновская

ВВЕДЕНИЕ

Тромбоксансинтаза и простаглицинсинтаза представляют собой гем-содержащие ферменты, относящиеся к классу изомераз, принадлежащих к суперсемейству цитохромов P450 (CYP) – ферментов, играющих важнейшую роль в метаболизме целого ряда эндогенных и экзогенных веществ. Тромбоксансинтаза катализирует превращение субстрата (простаглицина H_2) в короткоживущее ($\tau_{1/2} = 30$ с), но обладающее высокой биологической активностью соединение – тромбоксан A_2 . Тромбоксан A_2 является одной из ключевых регуляторных молекул, запускающих каскад биологических реакций, ответственных за созревание и активацию тромбоцитов, изменение их формы, агрегацию, и, как следствие, формирование тромба. Кроме того, продукты реакции тромбоксансинтазы могут участвовать в тканеспецифичной активации различных биологических процессов.

Поскольку тромбоксансинтаза играет важную роль в развитии целого ряда заболеваний человека, таких как тромбозы, астма, инфаркт миокарда, атеросклероз, тромбоцитопения, интерес к поиску и разработке ингибиторов и модуляторов ее активности растет. Однако на данный момент отсутствует информация о аллостерических эффекторах активности тромбоксансинтазы, а также о ее возможных белковых партнерах, ответственных как за регуляцию активности фермента, так и за перенос метастабильных продуктов реакции (тромбоксана A_2 , 12-гидрокси-5,8,10-гептатриеновой кислоты). Недостаточно данных о субстратной специфичности и кинетических характеристиках фермента, отсутствуют сведения о его пространственной структуре, ограничена информация об ингибиторах и возможности неспецифического ингибирования «классическими» ингибиторами цитохромов P450 – азолами. Все это не позволяет понять молекулярные механизмы развития указанных патологий и разработать высокоспецифичные лекарственные средства, направленные на нейтрализацию негативных эффектов, связанных с нарушением регуляции синтеза высокоактивных простаглицидов.

Настоящая работа посвящена исследованию физико-химических, лиганд-связывающих и каталитических свойств рекомбинантной тромбоксансинтазы, а также определению спектра белок-белковых взаимодействий, в которых участвует этот фермент.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами. Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям фундаментальных и прикладных научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12.03.2015 г. № 190): 3. Биологические системы и технологии.

Диссертационное исследование выполнено в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, в соответствии с планом научно-исследовательских работ по темам: «Гетерологическая экспрессия, очистка и свойства тромбосансинтазы и простаглицинсинтазы человека» (проект, финансируемый из средств Национальной академии наук Беларуси, 2014 г., № г.р. 20143023); «Гетерологическая экспрессия, очистка и свойства тромбосансинтазы человека» (проект, финансируемый из средств Национальной академии наук Беларуси, 2015 г., № г.р. 20151109); «Молекулярная интерактомика системы биосинтеза тромбосанов» (проект, финансируемый из средств Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, 2016-2018 гг., № X16P-062, № г.р. 20163626); «Создание подхода к ферментативному *in vitro* биотинилированию белковых молекул» (проект, финансируемый из средств Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, 2017-2019 гг., № X17M-012, № г.р. 20171180).

Работа являлась частью Государственной программы научных исследований на 2011-2015 гг. «Конвергенция», подпрограмма 3 («Современное естествознание и технологии будущего»), задание 3.2.05 «Моделирование, предсказание, синтез и тестирование молекулярных структур, важных для разработки новых иммунохимических методов анализа и создания противовирусных и антибактериальных препаратов» (№ г.р. 20151349), частью Государственной программы научных исследований на 2011-2015 гг. «Химические технологии и материалы, природно-ресурсный потенциал», подпрограмма «Химфармсинтез», задание 4.14 «Структура, функции и полиморфизмы ферментативных систем человека, участвующих в биосинтезе и деградации аутокринных и паракринных биорегуляторов» (№ г.р. 20143313).

Цель и задачи исследования. Цель диссертационной работы – проведение комплексного исследования тромбосансинтазы человека по оценке лиганд-связывающих свойств и идентификации потенциальных белков-партнеров и модуляторов каталитической активности фермента.

Для достижения поставленной цели планировалось решить следующие задачи:

1. Усовершенствовать условия гетерологической экспрессии и выделения из бактериальных клеток рекомбинантных TXAS (тромбоксансинтаза человека) и ее физиологического антагониста PGIS (простаглицинсинтаза человека) и разработать способ получения указанных белков в препаративных количествах.

2. Провести скрининг лигандов активного центра TXAS.

3. Оценить возможность взаимодействия TXAS с известными редокс-партнерами митохондриальных цитохромов P450 и, при его наличии, оценить влияние на эффективность протекания ферментативной реакции.

4. Сконструировать плазмидные векторы, кодирующие рекомбинантные ферменты TXAS и PGIS с сайтами для ферментативного биотинилирования.

5. Разработать систему для оценки белок-белковых взаимодействий TXAS на основе аффинных сорбентов, несущих TXAS и PGIS в нативной конформации.

6. Идентифицировать потенциальные белковые партнеры TXAS в биологических образцах тканей млекопитающих с использованием аффинных сорбентов на основе изучаемого фермента.

Объект исследования – рекомбинантная тромбоксансинтаза человека

Предмет исследования – структура, функции и белок-белковые взаимодействия тромбоксансинтазы человека.

Научная новизна:

1. Разработаны способы гетерологической экспрессии и очистки рекомбинантных ферментов человека TXAS и PGIS, позволяющие получать указанные гемопротеиды в препаративных количествах с содержанием функционально-активной формы соответствующего фермента более 95%.

2. Проведен скрининг лигандов активного центра рекомбинантной TXAS и установлены ранее неизвестные лиганды активного центра, относящиеся к жирным кислотам и их производным, являющиеся потенциальными субстратами, а также азол-содержащие противогрибковые препараты и пестициды, способные выступать в качестве неселективных ингибиторов тромбоксансинтазы человека.

3. Впервые показан перенос электронов с восстановленной формы кофермента никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН) на TXAS с помощью НАДФН-цитохром P450 редуктазы (CPR). Присутствие CPR в реакционной смеси снижает изомеразную активность TXAS, при этом направляет реакцию по механизму, ответственному за образование основного продукта – тромбоксана A₂, что во внутриклеточных условиях может служить

дополнительным механизмом регуляции фермента.

4. Разработан способ получения в препаративных количествах рекомбинантной TEV-протеазы (протеаза вируса гравировки табака) и rBirA (рекомбинантной биотин лигазы) с содержанием функционально-активной формы соответствующего фермента более 95%.

5. Впервые сконструированы векторные конструкции, позволяющие получать сайт-специфично биотинилированные TXAS и PGIS посредством ферментативного *in vitro* биотинилирования rBirA биотин лигазой и показано, что данная модификация не влияет на гем-связывающие свойства данных ферментов. На основе этих препаратов разработана система для оценки белок-белковых взаимодействий TXAS.

6. Обнаружено, что CYP2E1 участвует в высокоаффинных белок-белковых взаимодействиях с TXAS, совместная локализация и олигомеризация TXAS и CYP2E1 может служить дополнительным механизмом регуляции эффективности катализируемых ими ферментативных реакций.

Положения, выносимые на защиту:

1. Способ получения высокоочищенных рекомбинантных тромбосансинтазы и простаглицлинсинтазы человека, позволяющий получать функционально-активные ферменты в препаративных количествах, заключающийся в особых условиях культивирования рекомбинантных штаммов *E. coli* и последовательном применении металл-аффинной и адсорбционной хроматографии.

2. Установление факта взаимодействия тромбосансинтазы с производными жирных кислот, пептидомиметиком тромбозина и НАДФН-цитохром P450 редуктазой, а также влияния НАДФН-цитохром P450 редуктазы на реакции, катализируемые тромбосансинтазой.

3. Установление ранее неизвестных высокоаффинных лигандов активного центра тромбосансинтазы среди замещенных производных имидазола и триазола, применяемых в качестве лекарственных средств и пестицидов.

4. Разработка системы для обнаружения возможных белковых партнеров тромбосансинтазы, включающей ферменты биотин лигазу и TEV-протеазу, а также аффинные сорбенты на основе биотинилированных тромбосансинтазы и простаглицлинсинтазы, биоспецифически иммобилизованных на функционализированной стрептавидином сефарозе 4В.

5. Идентификация с использованием интерактного подхода ряда потенциальных белков-партнеров тромбосансинтазы, включающих CYP2E1, НАДФН-цитохром *b*₅ редуктазу и кластерин.

Личный вклад соискателя ученой степени. Получение высокоочищенных белковых препаратов, физико-химическая и каталитическая

характеристика полученных гемопротеидов, а также подготовка научных публикаций проводились автором самостоятельно. Регистрация MALDI-TOF масс-спектров белков осуществлялась при участии н.с. Института биоорганической химии НАН Беларуси (ИБОХ) Шкель Т.С. Поиск пептидов, взаимодействующих с тромбосансинтазой человека, осуществлялся при участии с.н.с. ИБОХ Дормешкина Д.О. Синтез пептидов осуществлялся при участии н.с. ИБОХ Лущика А.Я.

Работа выполнена под руководством к.х.н. А.А. Гилепа, которым были сформулированы цель и основные задачи исследования. При выполнении работы соискатель пользовался консультационной помощью д.х.н., чл.-корр. НАН Беларуси, профессора С.А. Усанова и к.х.н. Н.В. Струшкевич. Соавторы работ, представленных в списке публикаций соискателя, участвовали в проведении отдельных экспериментов и обсуждении результатов.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов. Результаты работы представлены на международных и республиканских мероприятиях: III и IV Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов «Актуальные экологические проблемы» (Минск, Республика Беларусь, 2013 и 2014), 14-ой Международной научной конференции «Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века» (Минск, Республика Беларусь, 2014), Конференции молодых ученых-биохимиков с международным участием, посвященной 90-летию со дня рождения академика Ю.А. Островского (Гродно, Беларусь, 2015), Международной научной конференции молодых ученых «Молодежь в науке – 2015» (Минск, Республика Беларусь, 2015), 59-ой Научной конференции для молодых ученых по физике и естественным наукам «Open Readings 2016» (Вильнюс, Литва, 2016), VII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, Россия, 2015), Международной конференции «BIOMEMBRANES 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases» (Москва, Россия, 2016), Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2017), Объединенном научном форуме – Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Москва, Россия, 2017).

Опубликованность результатов диссертации. Основные результаты диссертации опубликованы в 20 научных работах, среди которых 7 статей в рецензируемых научных журналах, соответствующих пункту 18 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь» общим объемом 4,7 авторских листов, 1 статья в сборнике научных трудов, 10 статей в сборниках материалов научных конференций и тезисы 2 докладов.

Практическая значимость результатов работы подтверждена актом внедрения в лекционный курс «Химико-аналитические методы в экологии (БСП)» на кафедре экологической медицины и радиобиологии факультета экологической медицины Международного государственного экологического института им. А.Д. Сахарова при БГУ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения, библиографического списка, приложений. Полный объем диссертации составляет 151 страницу, в том числе 44 рисунка занимают 22 страницы, 16 таблиц занимают 8 страниц. Библиографический список состоит из 263 наименований цитируемой литературы и 20 публикации соискателя на 25 страницах.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В главе 1 обобщены и проанализированы литературные данные о структурных особенностях и механизме реакций, катализируемых типичными представителями суперсемейства цитохромов P450. Приведена информация о различных типах организации цитохром P450-зависимых ферментных систем. Описаны как монооксигеназные системы I (митохондриальный) и II (микросомальный) типов, так и сшитые белковые комплексы с цитохромами P450, а также ферменты, катализирующие внутримолекулярные превращения метастабильных соединений. Проанализирована имеющаяся информация о тромбоксансинтазе человека, катализирующей изомеразную реакцию, в том числе информация о существующих лекарственных средствах, направленных на модулирование различных этапов биосинтеза тромбксана A₂ и его связывания с рецептором. На основе критического анализа литературных данных определен ряд нерешенных вопросов по данной проблеме и поставлены задачи исследования.

В главе 2 описаны методики получения рекомбинантных белков, включающие комбинацию молекулярно-биологических методов для конструирования экспрессионных векторов, методов наработки, выделения и очистки рекомбинантных белков. Кроме того, описаны методы оценки физико-химических и каталитических свойств полученных рекомбинантных белков и методы оценки белок-белковых взаимодействий в изучаемой системе. Использовались как методы, описанные в литературе, так и оригинальные подходы, разработанные в процессе выполнения работы.

В работе использованы следующие методы исследования: электронная спектроскопия, различные виды колоночной хроматографии, электрофорез белков и нуклеиновых кислот, ВЭЖХ, масс-спектрометрия и другие методы. Для поиска потенциальных белковых партнеров тромбоксансинтазы человека использовался подход, заключающийся в их выделении из лизатов биологических тканей посредством применения аффинных сорбентов с иммобилизованной тромбоксансинтазой.

В главе 3 приведены основные экспериментальные результаты по получению рекомбинантной тромбоксансинтазы человека и исследованию ее физико-химических, лиганд-связывающих и каталитических свойств.

Получение рекомбинантных ферментов TXAS и PGIS. Для получения препаративных количеств TXAS (тромбоксансинтазы человека) и ее физиологического антагониста PGIS (простаглицинсинтазы человека) использовалась гетерологическая экспрессия в клетках *Escherichia coli*.

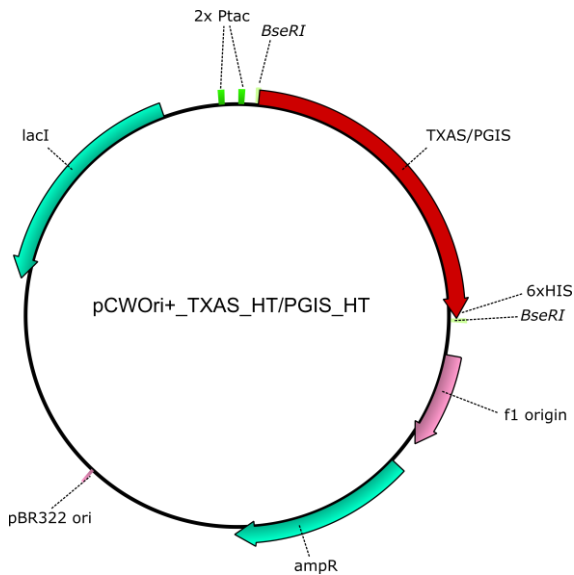


Рисунок 1. – Карта экспрессионных векторов pCWori+_TXAS_HT/PGIS_HT

Гены, кодирующие целевые белки, клонированы в экспрессионную плазмиду pCWori+_LIC, содержащую тройной tac промотор, ген устойчивости к ампициллину (*ampR*) и ген репрессора лактозного оперона (*lacI*) (рис. 1). Экспрессионные векторы содержали транскрированную последовательность с включением в N'-концевую часть МАККТ фрагмента. В C'-концевую часть включали полигистидиновый фрагмент (6xHis). В случае TXAS_avi и PGIS_avi в C'-концевую последовательность был добавлен фрагмент, содержащий сайт для ферментативного биотинилирования (avi-tag), сайт узнавания для TEV-протеазы и

полигистидиновую последовательность (10xHis).

Получить в достаточных количествах высокоочищенные гомогенные препараты ферментов TXAS, PGIS, TXAS_avi и PGIS_avi получилось в результате оптимизации условий культивирования и выделения. Показано, что для TXAS и PGIS оптимальное время экспрессии (согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле и данным спектров поглощения карбонильного комплекса восстановленных гемопротеидов) – 48 ч после индукции при концентрации ИПТГ 0,5 мМ. Оптимальное включение кофактора достигается добавлением в культуральную среду при индукции предшественника синтеза гема – δ -аминолевулиновой кислоты. Уровень экспрессии целевых белков значительно повышался в случае коэкспрессии ферментов с комплексом молекулярных шаперонов GroEL/ES.

Использование в качестве первой хроматографической стадии очистки белка Ni²⁺-NTA агарозы позволило добиться получения высокоочищенных препаратов белков уже после первой стадии хроматографии. Последующие хроматографические стадии использовались для удаления имидазола. В случае с TXAS применялась адсорбционная хроматография на гидроксиапатите, а в случае PGIS – гель-фильтрация. Выход высокоочищенных белков составил не менее 0,5 мкмоль на 1 л культуральной среды.

Препараты рекомбинантной TXAS и PGIS с ожидаемой молекулярной массой ($M_w=57,691$ и $56,005$ кДа, соответственно) были получены в гомогенном состоянии без следов протеолитической деградации.

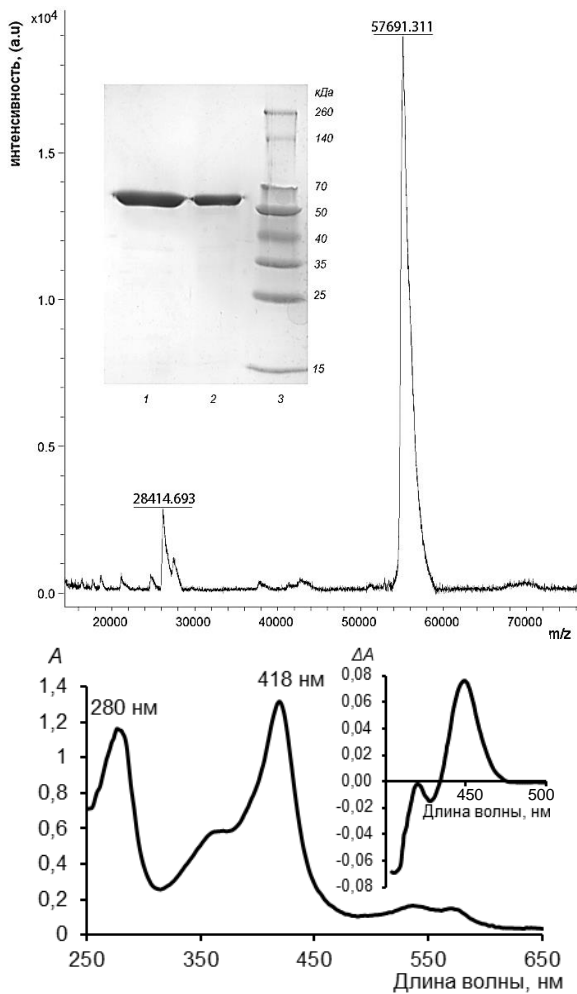


Рисунок 2. – Параметры, характеризующие чистоту и спектральные характеристики препарата рекомбинантной TXAS

метаноэпокси PGH_2 .) составляет $9,06 \pm 1,36$ мкМ, что согласуется с литературными данными для рекомбинантной TXAS в липидных нанодисках [A. Das, 2014].

Эксперименты показали, что арахидоновая кислота (природный предшественник PGH_2) обладает высоким сродством к активному центру фермента ($K_d = 1,46 \pm 0,12$ мкМ), в то время как N-арахидонилы проявляют меньшее сродство: этаноламид арахидоновой кислоты, N-арахидонил-дофамин и N-арахидонил-циклопропиламин образуют комплексы с TXAS с $K_d = 4,36 \pm 0,51$ мкМ, $4,09 \pm 0,39$ мкМ, $10,08 \pm 1,66$ мкМ, соответственно. Этот факт может быть объяснен нарушением стабилизации положения лиганда в активном центре фермента из-за отсутствия взаимодействия карбоксильной группы лиганда с Arg413.

Комбинация данных аналитических методов показывает, что чистота белкового препарата TXAS составляет более 95% (рис. 2). CO-спектр восстановленной дитионитом натрия TXAS имеет основной пик при 450 нм и незначительной пик при 420 нм. Аналогичный спектр характерен и для выделенной из тромбоцитов TXAS [M. Necker, 1987]. Препарат рекомбинантной PGIS в восстановленном дитионитом состоянии не образует комплекса с CO, что проявляется в отсутствии характерного пика при 450 нм.

Скрининг лигандов активного центра тромбосансинтазы. Для изучения лиганд-связывающих свойств рекомбинантного белка TXAS был проведен скрининг потенциальных лигандов активного центра фермента методом разностного спектрофотометрического титрования. Константа диссоциации (K_d) комплекса TXAS с U46619 (стабильный аналог простагландина H_2 (PGH_2), 9,11-

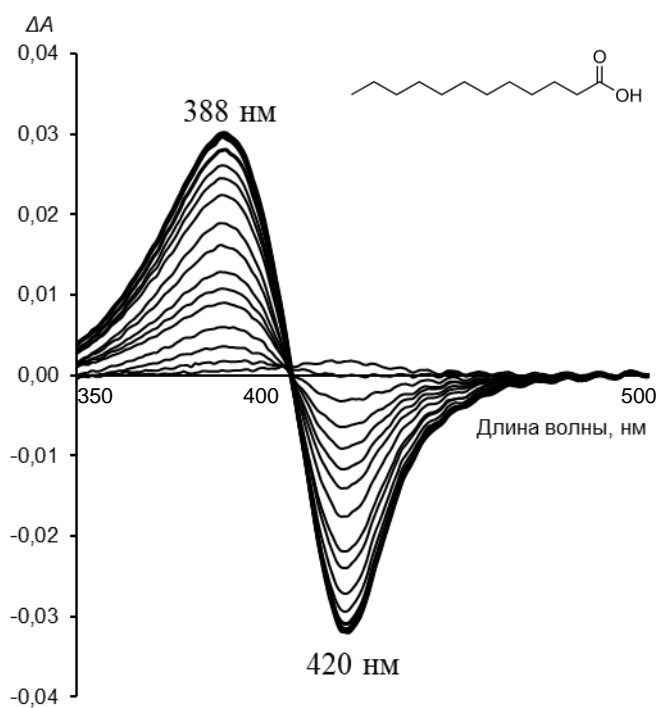


Рисунок 3. – Дифференциальный спектр, наблюдаемый при титровании TXAS лауриновой кислотой

Наибольшей аффинностью к активному центру TXAS среди насыщенных жирных кислот обладает стеариновая кислота ($K_d=0,29\pm0,04$ мкМ), меньшей – пальмитиновая ($K_d=0,65\pm0,09$ мкМ) и лауриновая ($K_d=4,09\pm0,54$ мкМ, рисунок. 3). Аффинность взаимодействия увеличивается с увеличением длины алифатической цепи, что говорит о том, что важным фактором в стабилизации лиганда является его взаимодействие с гидрофобными аминокислотными остатками активного центра. Метил-разветвленные жирные кислоты и их производные (фитановая кислота, гераниол, фарнезол, геранилгераниол) не вызывают

спектральных изменений.

Исходя из полученных результатов, можно сделать выводы, что активный центр TXAS способен связывать различные лиганды, близкие по структуре к R_2NH_2 , которые могут выступать как в качестве потенциальных субстратов фермента, так и конкурентных ингибиторов.

К известным конкурентным ингибиторам цитохромов P450 относятся соединения азольной природы. Установлено, что наибольшей аффинностью к ферменту обладают клотримазол, эконазол, тиокконазол, бифоназол и кетоконазол ($K_d = 0,26\pm0,05$ мкМ, $0,28\pm0,04$ мкМ, $0,29\pm0,06$ мкМ, $0,37\pm0,07$ мкМ и $1,19\pm0,07$ мкМ, соответственно). Аффинность этих соединений соразмерна или превышает таковую для озагрея ($K_d = 2,30\pm0,36$ мкМ) – ингибитора тромбосансинтазы, применяемого для снижения синтеза тромбосана A_2 . Наибольшая аффинность к активному центру TXAS характерна для производных имидазола, в то время как производные триазола имеют на порядок меньшую аффинность: K_d комплексов с флуконазолом и вориконазолом составляет $13,77\pm0,99$ мкМ и $18,71\pm4,50$ мкМ, соответственно. Среди азолов, применяющихся в сельском хозяйстве (пестицидов), наибольшим сродством к ферменту обладают флузилазол, прохлораз (обладает доказанным токсическим действием) и эпоксиконазол ($K_d = 0,18\pm0,03$ мкМ, $0,83\pm0,14$ мкМ, $1,68\pm0,19$ мкМ, соответственно).

Таким образом, полученные данные позволяют предположить возможное наличие у TXAS альтернативных субстратов, обладающих отличной от тромбосана A_2 (ТХА₂) биологической активностью. Кроме того, идентифицирован ряд соединений в ряду лекарственных средств и пестицидов с субмикромольной аффинностью к активному центру TXAS, которые могут нарушать работу фермента, находясь в незначительных количествах в организме.

Ферментативное восстановление тромбосансинтазы и реконструкция ее активности. Тромбосансинтаза традиционно рассматривается как исключительно «неклассический» представитель семейства цитохромов P450, не требующий для осуществления катализа переноса электронов с восстановительного эквивалента. Поэтому на данный момент не существует литературных данных о возможности восстановления TXAS в присутствии редокс-партнера.

В результате проведенных исследований впервые показана возможность переноса электронов с НАДФН на TXAS при участии CPR (рисунок 4). Скорость данного процесса характеризуется кинетической зависимостью реакции нулевого порядка ($k_{cat450} = 0,0024 \pm 0,0007 \text{ мин}^{-1}$). Одновременно с образованием карбонильного комплекса происходит образование комплекса с максимумом поглощения на 420 нм. Скорость образования данной формы подчиняется такой же кинетической зависимости ($k_{cat420} = 0,0006 \pm 0,0001 \text{ мин}^{-1}$). Следует отметить, что восстановлению подвергается $32 \pm 12\%$ фермента, находящегося в растворе – $0,32 \pm 0,12 \text{ мкмоль}$.

Способность связывать жирные кислоты предполагает наличие у TXAS структурных особенностей, характерных для представителей семейства CYP4, осуществляющих биосинтез гидроксированных жирных кислот, ответственных за передачу различных воспалительных, аллергических и регуляторных сигналов, обеспечивающих сосудистый тонус. Не исключено, что при определенных условиях в клетке TXAS будет осуществлять монооксигеназные реакции, что может приводить к образованию гидроксированных производных жирных кислот. Для проверки этой гипотезы в качестве возможных субстратов использовали насыщенные жирные кислоты и производные арахидоновой кислоты, однако анализ масс-спектров реакционной смеси не показал наличия гидроксированных продуктов реакции. Данный факт может быть объяснен как принципиальной невозможностью осуществления TXAS монооксигеназной реакции, так и необходимостью наличия дополнительного эффектора для протекания данного типа реакции.

С целью поиска возможного высокомолекулярного эффектора, необходимого для осуществления монооксигеназной реакции, методом пептидного фагового дисплея идентифицирована последовательность высокоаффинного пептида ТНРО_m_1 (аминокислотная последовательность SGVYKVLWDQH), взаимодействующего с тромбоксансинтазой и обладающего 60% идентичностью последовательности с пептидомиметиком тромбопоэтина.

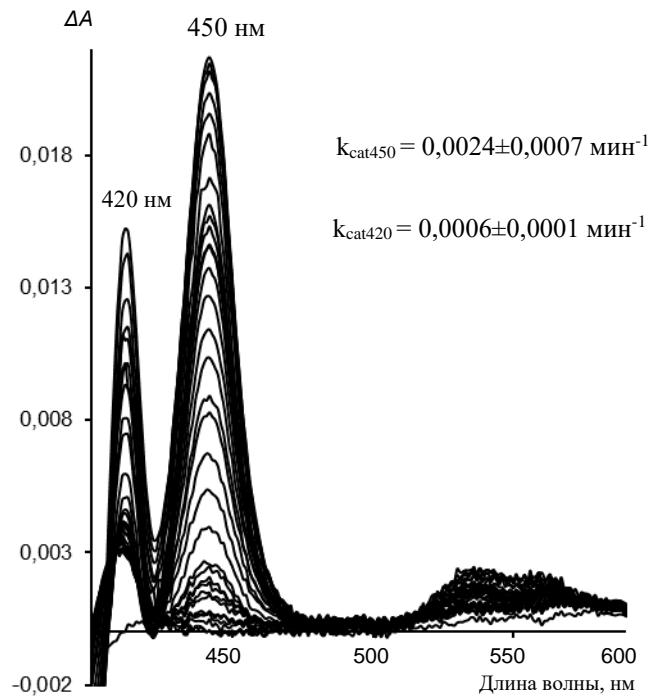
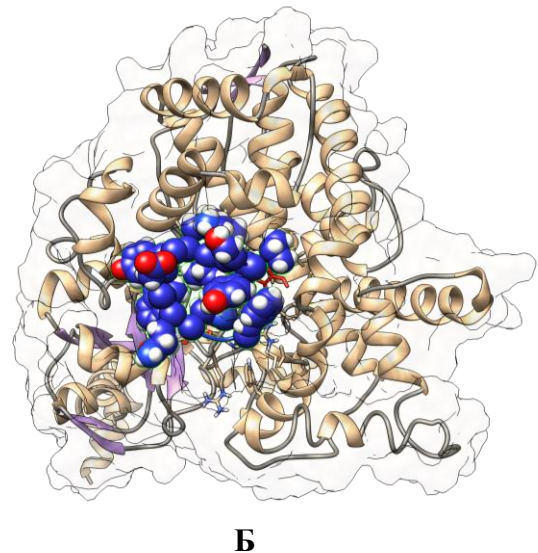
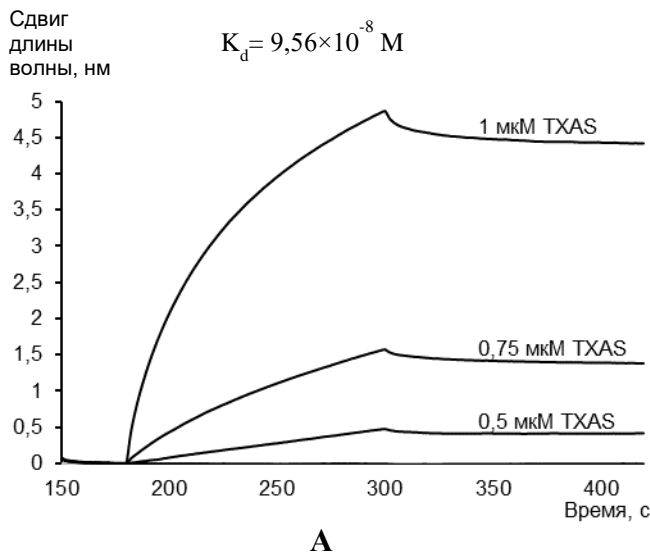


Рисунок 4. – Динамика разностного спектра (0 - 130 мин) карбонильного комплекса TXAS, восстановленной НАДФН цитохром Р450 редуктазой



А – кинетические кривые, полученные методом биослойной интерферометрии, характеризующие связывание TXAS с иммобилизованным на матрице пептидом; Б - трехмерная молекулярная модель комплекса TXAS-пептид, где синим цветом изображен пептид

Рисунок 5. – Образование комплекса TXAS с ТНРО_m_1

Константа диссоциации комплекса синтетического пептида с TXAS, рассчитанная исходя из данных биослойной интерферометрии, составила $9,56 \times 10^{-8}$ М (рисунок 5А). Данные молекулярного моделирования комплекса TXAS с THPO_m_1 показали преимущественную позицию для связывания пептида, находящуюся с проксимальной стороны гема (рисунок 5Б), в области, ответственной за связывание редокс-партнера у микросомальных СУР.

Для оценки влияния высокоаффинного пептида и CPR на активность TXAS была реконструирована ее специфическая ферментативная активность. Активность фермента оценивалась по образованию стабильного продукта гидролиза основного продукта реакции – тромбксана В₂ (ТХВ₂) и побочных продуктов реакции – 12-ННТ (12-гидрокси-5,8,10-гептадекатриеновая кислота) и МДА (малоновый диальдегид). Активность препарата рекомбинантной TXAS, оцениваемая по образованию основного продукта реакции, составляет $584,5 \pm 22,8$ мин⁻¹, $728,0 \pm 291,8$ мин⁻¹ по 12-ННТ, $1262,6 \pm 432,3$ мин⁻¹ по МДА, что сопоставимо с активностью тромбксансинтазы, полученной из тромбоцитов человека [M. Necker, 1987].

Анализ активности фермента в реконструированной системе показал (табл. 1), что в присутствии CPR и НАДФН наблюдается снижение активности на $52,8 \pm 3,9\%$, но при этом не детектируются побочные продукты реакции.

Таблица 1. – Сравнение показателей активности фермента в присутствии различных эффекторов, выраженных в % от активности TXAS без эффекторов

Условия реакции	Образование ТХВ ₂	Образование 12-ННТ	Образование МДА
Буфер + субстрат	продукт не детектируется	продукт не детектируется	продукт не детектируется
Буфер + субстрат + TXAS	100%	100%	100%
В присутствии CPR и НАДФН	$47,2 \pm 3,9\%$	продукт не детектируется	продукт не детектируется
В присутствии CPR	$121,9 \pm 10,5\%$	$103,6 \pm 1,2\%$	$114,1 \pm 1,7\%$
В присутствии высокоаффинного пептида	$93,3 \pm 7,3\%$	$87,3 \pm 0,5\%$	$83,6 \pm 0,5\%$

Взаимодействие с десятикратным молярным избытком высокоаффинного пептида, предположительно связывающегося с проксимальной (относительно гема) поверхностью TXAS, не влияет на специфическую активность фермента, но не исключает того, что белок, содержащий данный пептид, будет обладать эффекторным действием на TXAS.

В главе 4 приведены основные экспериментальные данные по исследованию белок-белковых взаимодействий в системе биосинтеза тромбоксанов.

Получение ферментных препаратов, применяемых для сайт-специфического ферментативного биотинилирования. Проведено молекулярное клонирование с целью получения рекомбинантных штаммов *E. coli* для экспрессии rBirA биотин лигазы и TEV-протеазы.

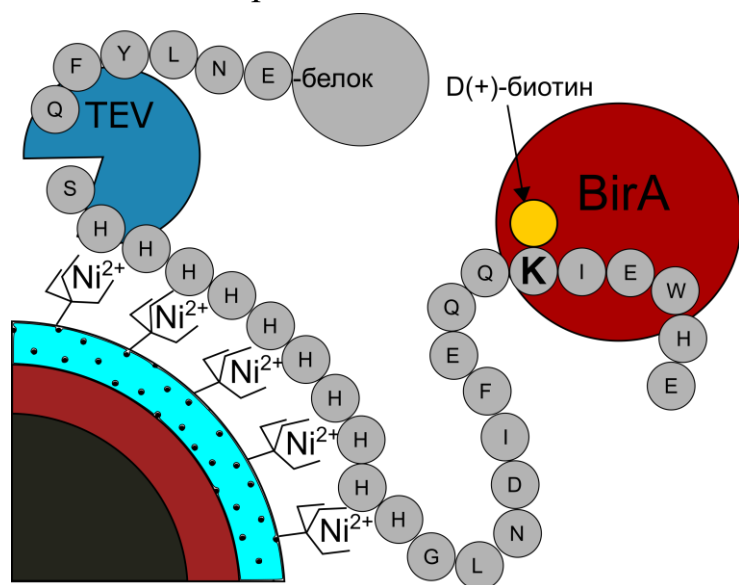


Рисунок 6. – Схема биотинилирования белковых молекул аффинно иммобилизованных на магнитных микрочастицах

Гетерологическая экспрессия и очистка позволила получить в препаративных количествах rBirA и TEV-протеазу со степенью очистки $\geq 95\%$. На их основе предложена схема сайт-специфического биотинилирования на магнитных частицах (рисунок 6).

Использование полученных биотинилированных ферментов (TXAS_avi и PGIS_avi) стало основой оригинального подхода для определения потенциальных белковых партнеров TXAS.

Подход заключался в их выделении с использованием аффинных сорбентов с сайт-специфично иммобилизованными на стрептавидине TXAS_avi и PGIS_avi.

Получение аффинных сорбентов с сайт-специфично иммобилизованными тромбоксан- и простаглицинсинтазой человека. Получение аффинного сорбента заключалось в иммобилизации на CNBr-активированной сефарозе 4В стрептавидина с последующей инкубацией стрептавидин-сефарозы в растворе биотинилированных TXAS_avi и PGIS_avi.

Эффективность иммобилизации TXAS_avi и PGIS_avi на стрептавидин-сефарозе составила ~ 90 нмоль/мл. Анализ данных аналитических методов указывает на то, что происходит насыщение трех из четырех центров связывания биотина на поверхности стрептавидина.

Применение сайт-специфического биотинилирования и добавление подвижной линкерной последовательности позволило произвести направленную иммобилизацию с сохранением нативной конформации белков, что выгодно отличает этот подход от традиционной прямой иммобилизации на CNBr-активированной агарозе по ϵ -аминогруппам поверхностных лизинов.

Полученные аффинные сорбенты предназначены для поиска белковых партнеров TXAS в лизате тромбоцитов человека.

Поиск белковых партнеров тромбоксансинтазы в лизатах клеток печени человека и тромбоцитов человека. Для поиска потенциальных белковых партнеров TXAS использовался комплексный подход, основанный на применении технологии аффинной хроматографии на сорбенте с иммобилизованными белками (TXAS, TXAS_avi и PGIS_avi), масс-спектрометрической идентификации выделенных белков и тестировании белковых комплексов с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (рисунок 7).

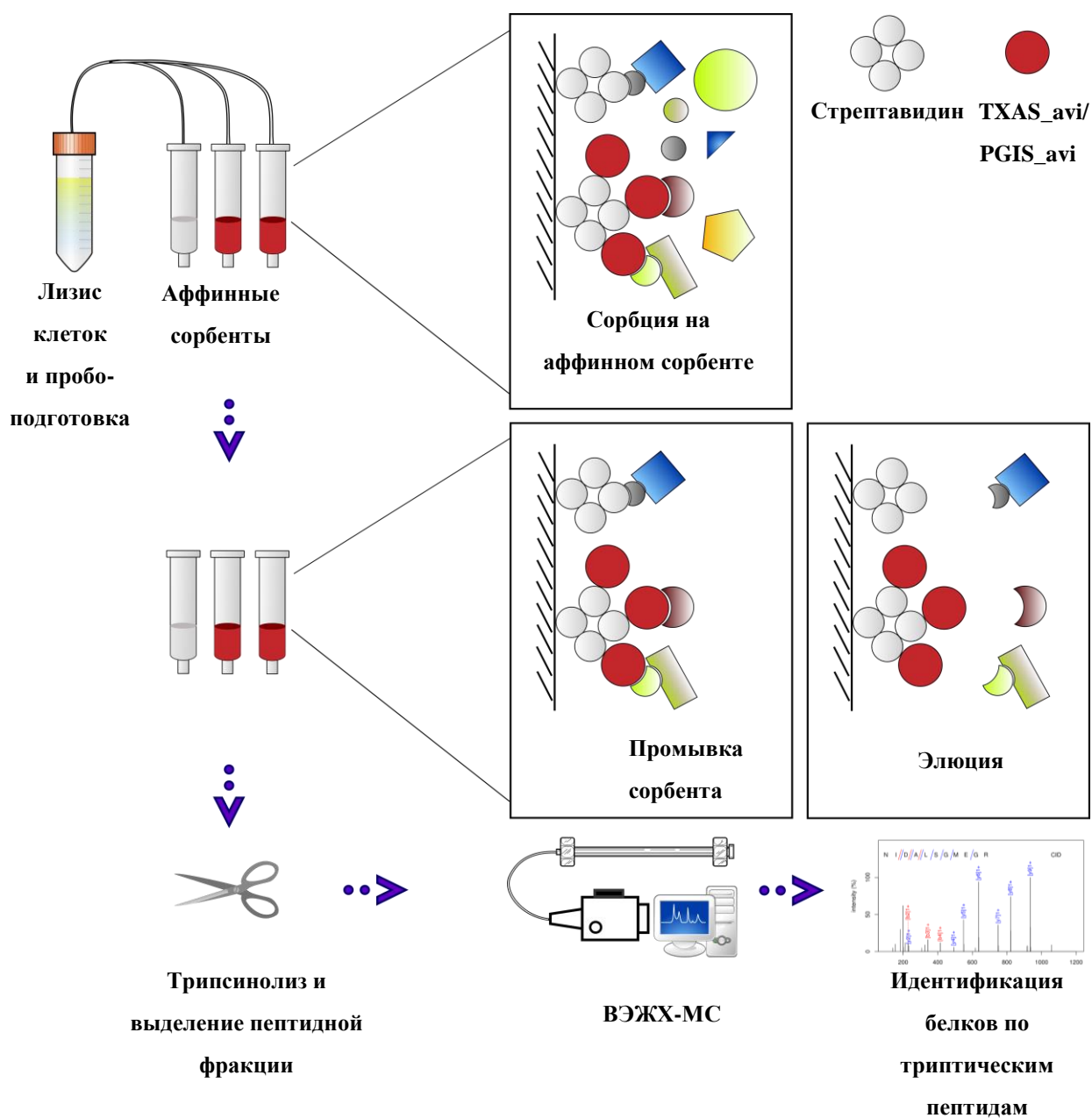


Рисунок 7. – Последовательность экспериментальных процедур для идентификации потенциальных белковых партнеров TXAS в лизате клеток и тканей человека

Для оценки неспецифической сорбции в качестве отрицательного контроля использовалась матрица, нефункционализированная целевыми белками. В список идентифицированных белков отбирались те молекулы, которые содержались только в элюате с колонок с TXAS_{avi}.

Идентифицировано 19 потенциальных белков-партнеров TXAS в лизате тромбоцитов человека и 11 белков в лизате тканей печени человека. Исходя из этого, можно предположить, что TXAS взаимодействует в *in vitro* системе с белками, относящимся к классу аполипопротеинов (APOA1 и др.); белками, участвующими в формировании цитоскелета (BBIP1 и др.); ферментами, ответственными за биосинтез низкомолекулярных биорегуляторов (CYP2E1, PON1); оксидоредуктазами (CYB5R3) и др. (CLU) (таблица 2).

Таблица 2. Потенциальные белки-партнеры тромбоксансинтазы человека, идентифицированные в лизате тканей печени и тромбоцитов человека

	Название гена (количество идентифицированных уникальных пептидов)	
Группа белков	Белки, идентифицированные в лизате тромбоцитов человека	Белки, идентифицированные в лизате печени человека
Аполипопротеины	APOA1(39), APOA2(6), APOA4(14), APOC1(7), APOC2(2), APOC3(3), APOD(2), APOM(5), SAA4(4)	APOH(7), SAA1(3)
Ферменты	CYB5R3(7), PON1(9)	CYP2E1(4), CP(5)
Компоненты цитоскелета и рецепторные белки	GP1BA(4), GP1BB(5), GP9(2), ITGA2B(21), PARVB(5), RAB27B(5)	ANKMY1(7), BBIP1(4), FN1(2)
Белки-транспортёры	SLC2A14(2)	HP(6)
Прочие белки	CLU(10)	SERPINA1(3), SERPINA3(3), FGA(2)

Не исключено, что отдельные образующиеся комплексы являются неспецифическими, однако эти белки не образовывали комплексов с PGIS_{avi}, близкой по структуре к TXAS, что значительно снижает вероятность ложноположительного результата.

На основе полученных экспериментальных данных предложена, в рамках существующей парадигмы о надмолекулярной организации систем биосинтеза и передачи сигнала биологически активных веществ, схема взаимосвязи белков, коэкспрессирующихся с TXAS (рисунок 8).

Биосинтез TXA₂ начинается с высвобождения арахидоновой кислоты из фосфолипидов мембраны с помощью PLA2, а затем COX катализирует

превращение арахидоновой кислоты в PGH_2 , который метаболизируется $TXAS$ с образованием TXA_2 , 12-ННТ и МДА. При этом известно, что $CYP2E1$ способен превращать PGH_2 в 12-ННТ и МДА и непосредственная колокализация или олигомеризация $TXAS$ и $CYP2E1$ может смещать профиль образующихся из PGH_2 продуктов в сторону 12-ННТ и МДА, снижая количество образуемого TXA_2 , что согласуется с полученными новыми экспериментальными данными.

TXA_2 , связываясь с $TXAR$, вызывает передачу сигнала по инозитолфосфатному пути с активацией фосфолипазы С (PLC) и мобилизацией

внутриклеточного Ca^{2+} , оказывая стимулирующее действие на фосфолипазу A_2 (PLA_2). 12-ННТ под

действием 15-гидрокси-простагландиндегидрогеназы образует 12-кето-ННТ, вызывающий частичный антагонистический эффект на $TXAR$.

Кроме того, высказано предположение о том, что $TXAS$ взаимодействует с $BBIP1$, который является компонентом белкового транспортного комплекса первичной реснички ($BBSome$). $BBIP1$, в свою очередь, способен влиять на стабильность микротубулинового цитоскелета, играющего важнейшую роль во вторичной агрегации тромбоцитов, опосредованно ингибируя $HDAC6$ (деацетилазу микротрубочек).

Функциональная связь и возможная совместная локализация $CYP2E1$ с $TXAS$ имеет важное значение в контексте осуществления взаимодополняющих ферментативных реакций превращения общих субстратов (PGH_2 в 12-ННТ), что может служить дополнительным внутриклеточным механизмом регуляции эффективности этих ферментативных реакций. С целью проверки возможности формирования комплекса методом SPR проведена оценка взаимодействия

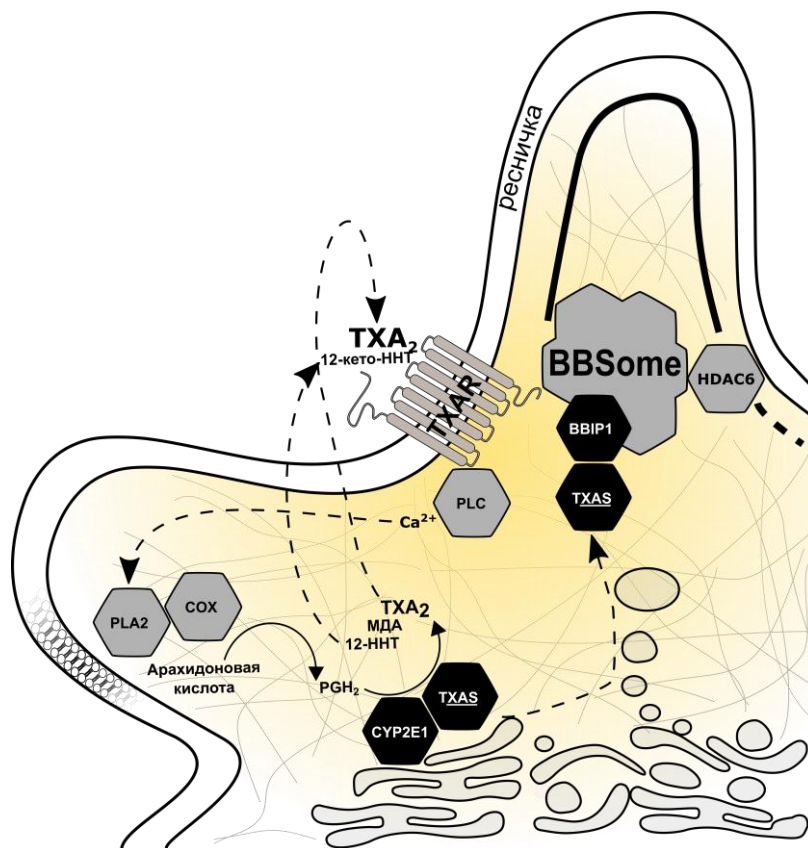


Рисунок 8. – Схематическое представление системы биогенеза TXA_2 , дополненное полученными экспериментальными данными

TXAS с рекомбинантным CYP2E1. Эксперимент подтвердил образование комплекса TXAS•CYP2E1 ($K_d=(4,3\pm 0,4)\times 10^{-7}$ М) (рисунок 9).

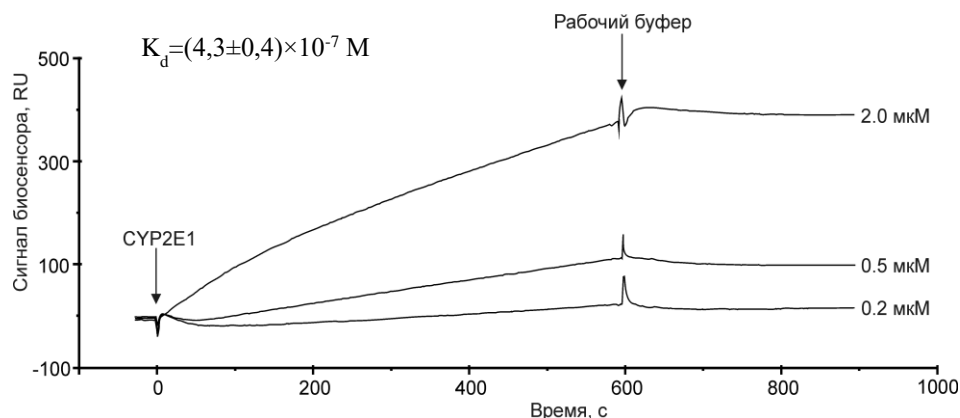


Рисунок 9. – Кинетические кривые, полученные методом SPR, характеризующие взаимодействия разных концентраций CYP2E1 с иммобилизованной на оптическом чипе CM5 TXAS

Таким образом, выдвинутая гипотеза нашла подтверждение не только исходя из функциональных особенностей исследованных ферментов, но и факта их прямого взаимодействия.

В перспективе, актуальной задачей является валидация белок-белковых взаимодействий TXAS с CYP5R3 (цитохром b_5 -редуктаза 3, участвует в ряде окислительно-восстановительных реакций) и CLU (кластерин, многофункциональный белок, секретируемый из α -гранул тромбоцитов), а также выяснение тонких молекулярных механизмов вовлечения этих белков в биосинтез, транспорт и передачу сигналов эйкозаноидами. Полученные результаты помогут в дальнейшем установить критические параметры организации и регуляции функционирования супрамолекулярных систем биосинтеза важнейших метастабильных метаболитов, ответственных за созревание и активацию тромбоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты исследования

1. Разработаны способы получения функционально активных препаратов рекомбинантных TXAS и PGIS, заключающиеся в особых условиях культивирования рекомбинантных штаммов *E. coli* и комбинации хроматографических методов, что позволило наработать данные ферменты в количестве не менее 0,5 мкмоль на 1 л культуральной среды с чистотой более 95% [1, 11].

2. Проведенный скрининг лигандов активного центра рекомбинантной TXAS позволил впервые показать взаимодействие TXAS как с арахидоновой кислотой, так и с ее производными (этаноламид арахидоновой кислоты, N-арахидонилдофамин, N-арахидонилциклопропиламин) и рядом насыщенных жирных кислот (лауриновая, пальмитиновая и стеариновая кислоты). Доказано, что метил-разветвленные липиды не способны образовывать комплексы с активным центром фермента [6, 20].

3. Скрининг лигандов активного центра TXAS среди производных имидазола и триазола выявил соединения, способные с высокой аффинностью связываться с ферментом. Наибольшей аффинностью характеризуются производные имидазола с гидрофобным заместителем по первому положению и объемом молекулы не более $0,5 \times 10^3 \text{ \AA}^3$: клотримазол, эконазол, тиоконазол, бифоназол и кетоконазол [6, 15].

4. Впервые показан перенос электронов с НАДФН на TXAS с помощью НАДФН-цитохром P450 редуктазы (CPR). Установлено, что присутствие CPR в реакционной смеси снижает удельную активность TXAS, но при этом направляет реакцию по пути, ответственному только за образование основного продукта. Монооксигеназная активность по отношению к идентифицированным лигандам активного центра TXAS (производные жирных кислот) в реконструированной системе в присутствии CPR и НАДФН отсутствует [6, 20].

5. Показано высокое сродство к TXAS пептида с аминокислотной последовательностью SGVYKVLVDWQHGGF ($K_d = 9,56 \times 10^{-8} \text{ M}$), обладающего 60% идентичностью последовательности с пептидомиметиком тромбозина. Построена компьютерная модель комплекса и определена предполагаемая область связывания, находящаяся на проксимальной поверхности TXAS [1, 6, 10, 12].

6. Разработан подход к получению сайт-специфически ферментативно биотинилированных TXAS и PGIS, включающий конструирование экспрессионного вектора, несущего сайт для биотинилирования (Avi-tag), экспрессию и выделение TXAS и PGIS с Avi-tag, получение рекомбинантной TEV-протеазы, rBirA биотин лигазы и последующую реакцию сайт-специфического биотинилирования. На основе биотинилированных белков с использованием функционализированной стрептавидином сефарозы 4B получены аффинные сорбенты, что в итоге позволило создать систему для обнаружения потенциальных белковых партнеров TXAS [2-4, 9, 13-14, 16].

7. Идентифицированы 11 потенциальных белков-партнеров TXAS человека в лизате тканей печени человека, в том числе CYP2E1 ($K_d = (4,3 \pm 0,4) \times 10^{-7} \text{ M}$). Совместная локализация TXAS и CYP2E1 может служить дополнительным механизмом регуляции эффективности

катализируемых ими ферментативных реакций. Идентифицировано 19 потенциальных белков-партнеров TXAS в лизате тромбоцитов человека и сделано предположение о возможной функциональной значимости взаимодействия TXAS с НАДН-цитохром *b*₅ редуктазой и кластерином [5, 7, 17-19].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Созданные в работе экспрессионные системы и комплекс методов по наработке, выделению и очистке применяются для получения препаративных количеств рекомбинантных TXAS и PGIS, а также их биотинилированных вариантов (TXAS_avi и PGIS_avi), TEV-протеазы и rBirA биотин лигазы. Эти белки используются для осуществления поиска модуляторов активности исследуемого фермента как низкомолекулярной, так и пептидно-белковой природы.

Информация об обнаруженных низкомолекулярных ингибиторах TXAS может быть использована для корректировки курсов противогрибковой терапии, для избежания нежелательных побочных эффектов фармпрепаратов на кровеносную систему.

Полученные данные о белок-белковых взаимодействиях помогут в дальнейшем уточнить организацию системы биосинтеза важнейших метастабильных метаболитов, ответственных за созревание и активацию тромбоцитов, что представляет интерес для лекарственной терапии целого ряда заболеваний.

На основе предложенных методик для ферментативного сайт-специфического биотинилирования рекомбинантных белков разработаны методические указания и опубликовано учебно-методическое пособие, которые используются при проведении лекционного курса и практических занятий в рамках курса «Химико-аналитические методы в экологии (БСП)» для студентов факультета экологической медицины Международного государственного экологического института им. А.Д. Сахарова при БГУ.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Пептидный фаговый дисплей в скрининге пептидомиметиков тромбоксан синтазы / Д.О. Дормешкин, А.В. Свирид, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2015. – Т. 59, № 2. – С. 53-60.
2. Получение и характеристика биотинилированного рекомбинантного Fab фрагмента антитела к кортизолу / Д.О. Дормешкин, О.С. Куприенко, А.В. Свирид, А.А. Гилеп, О.В. Свиридов, С.А. Усанов // Биоорганическая химия. – 2016, Т. 42, № 1. – С. 22-38.
3. Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия, выделение и очистка стабильной TEV протеазы / А.В. Свирид, Д.О. Дормешкин А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Молодежь в науке – 2015: прил. к журн. Известия Национальной академии наук Беларуси. – 2016. – № 1. – С. 69-73.
4. Сайт-специфичное биотинилирование белков и пептидов, иммобилизованных на микрочастицах, рекомбинантной биотин лигазой / А.В. Свирид, А.Я. Лущик, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. – 2017. – № 4. – С. 62-73.
5. Прямой молекулярный фишинг новых белков-партнеров тромбоксансинтазы человека / А.В. Свирид, П.В. Ершов, Е.О. Яблоков, Л.А. Калужский, Ю.В. Мезенцев, А.В. Флоринская, Т.А. Сушко, Н.В. Струшкевич, А.А. Гилеп, С.А. Усанов, А.Е. Медведев, А.С. Иванов // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 96-105.
6. Лиганд-связывающие и каталитические свойства рекомбинантной тромбоксансинтазы человека / А.В. Свирид, М.А. Шапиро, П.Г. Шагойко, Ю.Г. Походня, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 1. – С. 51-65.
7. Специфичность взаимодействия изатина с цитохромами P450 / П.В. Ершов, Ю.В. Мезенцев, Е.О. Яблоков, Л.А. Калужский, А.В. Флоринская, А.В. Свирид, А.А. Гилеп, С.А. Усанов, А.Е. Медведев, А.С. Иванов // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64, № 1 – Р. 61-65.

Статьи в сборниках научных трудов

8. Svirid, A.V. Combined approach to analysis of protein-protein interactions / A.V. Svirid, A.A. Gilep // EuroBiotech J. – 2017. – V. 1, № 2. – P. 180–181.

Тезисы докладов

9. Svirid, A.V. In vitro biotinylation on magnetic particles for bioorthogonal conjugation / A.V. Svirid, A.A. Gilep, S.A. Usanov // The 59th Scientific Conference for Young Scientists of Physics and Natural Sciences Open Readings 2016, Vilnius, Lithuania, March 15-18, 2016 / Vilnius University; ed. board: A. Aleksiškaitė [et al.]. – Vilnius, 2016. – P. 125.

10. Svirid, A.V. Identification of high-affinity binding peptides for human thromboxane synthase / A.V. Svirid, D.O. Dormeshkin, A.Y. Lushchyk // BIOMEMBRANES 2016: Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases International Conference, Dolgoprudny, Russia, September 26-30, 2016 / MIPT; ed. board: V. Borshchevskiy [et al.]. – Dolgoprudny, 2016. – P. 158.

Материалы конференций

11. Svirid, A.V. Heterologous expression and purification of human thromboxane synthase (CYP5A1) / A.V. Svirid, A.A. Gilep // Актуальные экологические проблемы: материалы III Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов, Минск, Республика Беларусь, 21–22 ноября 2013 г. / МГЭУ им. А.Д.Сахарова; под общ. ред. С.С. Позняка. – Минск, 2013. – С. 52-53.

12. Свирид, А.В. Гомологичное моделирование и анализ структуры тромбоксан синтазы / А.В. Свирид // Сахаровские чтения 2014 года: экологические проблемы XXI века : материалы 14-й междунар. науч. конф., г. Минск, Республика Беларусь, 29–30 мая 2014 г. / МГЭУ им. А.Д.Сахарова; под ред. В.И. Дуная, С.С. Позняка, Н.А. Лысухо. – Минск, 2014. – С. 116.

13. Svirid, A.V. Design and construction of an vector containing a complex integrated tag on the example of thromboxane synthase expression vector / A.V. Svirid // Актуальные экологические проблемы : материалы IV Международной научной конференции молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов (на англ. языке), Минск, Республика Беларусь, 20 ноября 2014 г. / МГЭУ им. А.Д.Сахарова; под общ. ред. С. С. Позняка. – Минск, 2014. – С. 67-68.

14. Свирид, А.В. Получение стабильной рекомбинантной TEV протеазы / А.В. Свирид, Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп // Современные проблемы биохимии

: сборник материалов конференции молодых ученых-биохимиков с международным участием, посвященный 90-летию со дня рождения академика Ю.М. Островского (29 июня 2015г.) / отв. ред. Л.И. Надольник. – Гродно: ГрГМУ, 2015. – С. 104-106.

15. Свирид, А.В. Характеристика параметров связывания ингибиторов цитохромов P450 с активным центром тромбоксан синтазы человека / А.В. Свирид, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Белки и пептиды. Материалы VII Российского симпозиума, Новосибирск, 12-17 июля 2015 г. / Новосибирск, ЗАО ИПШ «Офсет», 2015. – С. 346.

16. Свирид, А.В. Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия, выделение и очистка стабильной TEV протеазы / А.В. Свирид, Д.О. Дормешкин, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Молодежь в науке – 2015. Материалы X Международной научной конференции (1 – 4 декабря, 2015 г.) – Минск, 2015 – С. 344.

17. Свирид, А.В. Подход к определению белкового интерактома системы биосинтеза тромбоксанов и простаглицлинов методами аффинного обогащения и shotgun-протеомики / А.В. Свирид, М.А. Шапиро, В.Э. Сяхович, А.В. Флоринская, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Материалы IX международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 20-22 февраля 2017 г., г. Москва, Россия. / ООО «РЭД ГРУПП»; ред. колл. С.Д. Варфоломеев [и др.]. – Москва, 2017. – С. 530-532.

18. Свирид А.В. Прямой молекулярный фишинг новых белков-партнеров тромбоксансинтазы человека / А.В. Свирид, П.В. Ершов, Е.О. Яблоков, Л.А. Калужский, Ю.В. Мезенцев, А.В. Флоринская, Т.А. Сушко, Н.В. Струшкевич, А.А. Гилеп, С.А. Усанов, А.Е. Медведев, А.С. Иванов // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова» и VIII российский симпозиум «Белки и пептиды», 18-22 сентября 2017 г., г. Москва, ИБХ РАН, Россия. / Издательство «Перо»; под. ред. акад. В.Т. Иванова и акад. А.Г. Габитова. – Москва, 2017. С. 21.

19. Свирид, А.В. Определение белкового интерактома системы биосинтеза тромбоксанов методами аффинного обогащения и shotgun-протеомики / А.В. Свирид, М.А. Шапиро, А.А. Гилеп // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова» и VIII российский симпозиум «Белки и пептиды», 18-22 сентября 2017 г., г. Москва, ИБХ РАН, Россия. / Издательство «Перо»; под. ред. акад. В.Т. Иванова и акад. А.Г. Габитова. – Москва, 2017. С. 29.

20. Гилеп, А.А. Функциональный анализ цитохромов P450, участвующих в биосинтезе и метаболизме аутокринных и паракринных факторов / А.А.

Гилеп, Т.В. Шкель, С.А. Усанов, С.В. Смольская, Т.А. Сушко, А.М. Тумилович, А.В. Свирид, А.В. Василевская, М. Шевцов, В.И. Борщевский, П.В. Ершов, А.С. Иванов, Н.В. Струшкевич // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова» и VIII российский симпозиум «Белки и пептиды», 18-22 сентября 2017 г., г. Москва, ИБХ РАН, Россия. / Издательство «Перо»; под. ред. акад. В.Т. Иванова и акад. А.Г. Габиева. – Москва, 2017. С. 126.

РЕЗЮМЕ

Свирид Андрей Васильевич

Гетерологическая экспрессия, выделение, белок-лигандные и белок-белковые взаимодействия тромбоксансинтазы человека

Ключевые слова: тромбоксансинтаза человека, цитохром P450, эйкозаноиды, азолы, белок-белковые взаимодействия, интерактомика.

Цель работы: проведение комплексного исследования тромбоксансинтазы человека по оценке лиганд-связывающих свойств и идентификации потенциальных белков-партнеров и модуляторов каталитической активности фермента.

Методы исследования: молекулярно-биологические, биохимические, хроматографические и биосенсорные методы, разностное спектрофотометрическое титрование, масс-спектрометрия, молекулярный докинг и динамика.

Результаты работы и их новизна: разработаны способы гетерологической экспрессии и очистки рекомбинантной тромбоксан- и простаглицинсинтазы человека (TXAS, PGIS). Проведен скрининг лигандов активного центра рекомбинантной TXAS и идентифицирован ряд жирных кислот и их производных, а также азольных соединений, способных с высокой аффинностью связываться с TXAS. Впервые показан перенос электронов с НАДФН на TXAS с помощью НАДФН-цитохром P450 редуктазы, а также факт влияния этой оксидоредуктазы на эффективность протекания изомеразной реакции TXAS. Впервые получены аффинные сорбенты на основе сайт-специфично биотинилированных TXAS и PGIS. С использованием данных сорбентов обнаружен ряд ранее неизвестных потенциальных белков-партнеров TXAS и с учетом этих данных предложены дополнения в схему биогенеза тромбоксана A₂.

Рекомендации по использованию: информация об обнаруженных ингибиторах тромбоксансинтазы человека, может быть использована для корректировки курсов противогрибковой терапии. Полученные данные о белок-белковых взаимодействиях помогут в дальнейшем уточнить организацию системы биосинтеза важнейших метастабильных метаболитов, ответственных за созревание и активацию тромбоцитов, что в свою очередь представляет интерес для лекарственной терапии целого ряда заболеваний. Результаты работы внедрены в учебный процесс на кафедре экологической медицины и радиобиологии факультета экологической медицины Международного государственного экологического института им. А.Д. Сахарова при БГУ.

Свірыд Андрэй Васільевіч

Гетэралагічная экспрэсія, выдзяленне, бялок-лігандныя і бялок-бялковыя ўзаемадзеянні трамбаксансінтазы чалавека

Ключавыя словы: трамбаксансінтаза чалавека, цытахром P450, эйказаноіды, азолаы, бялок-бялковыя ўзаемадзеянні, інтэрактоміка.

Мэта даследвання: правядзенне комплекснага даследавання трамбаксансінтазы чалавека па ацэнцы ліганд-звязваючых уласцівасцяў і ідэнтыфікацыя патэнцыйных бялкоў-партнёраў і мадулятараў каталітычнай актыўнасці ферменту.

Метады даследвання: малекулярна-біялагічныя, біяхімічныя, храматаграфічныя і біясэнсорныя метады, рознаснае спектрафотаметрычнае тытраванне, мас-спектраметрыя, малекулярны докінг і дынаміка

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны спосабы гетэралагічная экспрэсіі і ачысткі рэкамбінантнай трамбаксан- і прастацыклінсінтазы чалавека (TXAS, PGIS). Праведзены скрынінг лігандаў актыўнага цэнтра рэкамбінантнай TXAS і ідэнтыфікаваны шэраг тлустых кіслот і іх вытворных, а таксама азольных злучэнняў, здольных з высокай афіннасцю злучацца з TXAS. Упершыню паказаны перанос электронаў з НАДФН на TXAS з дапамогай НАДФН-цытахром P450 рэдуктазы, а таксама факт уплыву гэтай аксідарэдуктазы на эфектыўнасць праходжання ізамеразнай рэакцыі TXAS. Упершыню атрыманы афінныя сарбенты на аснове сайт-спецыфічна біятыніліраваных TXAS і PGIS. З выкарыстаннем дадзеных сарбентаў выяўлены шэраг раней невядомых патэнцыйных бялкоў-партнёраў TXAS і з улікам гэтых дадзеных прапанаваны дадаткі ў схему біягенезу трамбаксану A₂.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: інфармацыя пра выяўленыя інгібітары трамбаксансінтазы чалавека, можа быць скарыстана для карэктавання курсаў супрацьгрыбковай тэрапіі. Атрыманыя дадзеныя аб бялок-бялковых узаемадзеяннях дапамогуць надалей удакладніць арганізацыю сістэмы біясінтэзу найважных метастабільных метабалітаў, адказных за паспяванне і актывацыю трамбацытаў, што ў сваю чаргу ўяўляе цікавасць для лекавай тэрапіі цэлага шэрага захворванняў. Вынікі працы ўкаранёны ў навучальны працэс на кафедры экалагічнай медыцыны і радыебіялогіі факультэта экалагічнай медыцыны Міжнароднага дзяржаўнага экалагічнага інстытута ім. А.Д. Сахарава пры БДУ.

SUMMARY

Svirid Andrey Vasilievich

Heterologous expression, extraction, protein-ligand and protein-protein interactions of human thromboxane synthase

Keywords: human thromboxane synthase, cytochrome P450, eicosanoids, azoles, protein-protein interactions, interactomics.

Aim of the work: a comprehensive study of human thromboxane synthase, aimed at assessing ligand-binding properties and identification of potential partner proteins and modulators of enzyme catalytic activity.

Methods of the research: molecular biology, biochemical, chromatographic and biosensor methods, differential spectrophotometric titration, mass spectrometry, molecular docking and dynamics.

Results and their novelty: methods for heterologous expression and purification of recombinant human thromboxane and prostacyclin synthase (TXAS, PGIS) have been developed. Active center ligands screening of the of recombinant TXAS was conducted and a number of fatty acids and their derivatives, as well as azole compounds capable of high affinity binding to TXAS, was identified. The transfer of electrons from NADPH to TXAS with NADPH-cytochrome P450 reductase is shown for the first time, as well as the effect of this oxidoreductase on the efficiency of the isomerase reaction of TXAS. Affinity sorbents based on site-specific biotinylated TXAS and PGIS were obtained for the first time. With the use of these sorbents, a number of previously unknown potential TXAS partner proteins were discovered and, taking into account these data, additions were proposed to the thromboxane A₂ biogenesis scheme.

Application guidelines: information on identified inhibitors of human thromboxane synthase can be used to adjust courses of antifungal therapy. The obtained data on protein-protein interactions will help to further clarify the organization of the biosynthesis system of the most important metastable metabolites responsible for the maturation and activation of platelets, which in turn is of interest for drug therapy of a number of diseases. The results of the work are used in the educational process at the Department of Ecological Medicine and Radiobiology of the Faculty of Environmental Medicine of the International Sakharov Environmental Institute (Belarusian State University).