

На правах рукописи

ГРИЩУК Юлия Владимировна



**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ СТЕРОИД 21-
ГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА У БОЛЬНЫХ С АДРЕНОГЕНИТАЛЬНЫМ
СИНДРОМОМ**

03.00.03-молекулярная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2006

Работа выполнена в лаборатории молекулярной эндокринологии Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

Научный руководитель:

кандидат химических наук

С.Н. Белжеларская

Научный консультант:

доктор биологических наук, проф.

П.М. Рубцов

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, проф., чл.-корр. РАН

С.Н. Кочетков

(Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта, РАН)

кандидат биологических наук

С.Б. Акопов

(Институт биоорганической химии

им. М.М.Шемакина и Ю.А.Овчинникова, РАН)

Ведущая организация:

Центр «Биоинженерия», РАН

Защита состоится « 21 » декабря 2006 г в 11⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.235.01 при Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН по адресу 119991 г.Москва, ул.Вавилова, д.32.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН

Автореферат разослан «20» ноября 2006г

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



А.М. Крицын

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Адреногенитальный синдром (АГС; врожденная дисфункция коры надпочечников, ВДКН) - группа наследственных заболеваний человека с аутосомно-рецессивным характером наследования, обусловленных нарушением биосинтеза стероидных гормонов в коре надпочечников. Врожденным дефицитом стероид 21-гидроксилазы вызвано 90-95% всех случаев адреногенитального синдрома.

Фермент стероид 21-гидроксилаза (21-гидроксилаза, CYP21A2) катализирует монооксигеназные реакции превращения 17-гидроксипрогестерона (17-ОН прогестерона, 17 ОНП) в дезоксикортизол и прогестерона в дезоксикортикостерон, участвуя в биосинтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов, соответственно, и относится к семейству цитохромов P450. Белки этого семейства обнаружены у всех изученных эукариот и некоторых прокариот и широко участвуют в окислительном метаболизме эндогенных соединений (стероидогенезе, поддержании гомеостаза витамина Д), а также разнообразных ксенобиотиков (лекарств, химических канцерогенов, растительных метаболитов и пр.). Учитывая широкое распространение цитохромов P450 и разнообразие катализируемых ими реакций, исследование белков этого семейства имеет большое значение для фармакологии (разработки новых лекарственных средств, определения индивидуальной переносимости лекарственных препаратов и т.д.), анализа экологических загрязнений, а также молекулярной генетики человека.

Недостаточность стероид 21-гидроксилазы является одним из наиболее распространенных генетических дефектов человека. Частота классических форм заболевания оценивается в среднем как 1:15000 новорожденных, тогда как неклассические случаи составляют 1% в общей популяции. Причина высокой частоты встречаемости дефицита 21-гидроксилазы объясняется особенностями организации области генома, в которой находится ген *CYP21A2*. Он расположен в коротком плече шестой хромосомы (6p21.3) в локусе генов главного комплекса гистосовместимости третьего класса (называемого также областью HLA – Human Leukocyte Antigen- III класса). Длина гена *CYP21A2* составляет 3,4 т.п.н, он содержит 10 экзонов и 9 интронов. На расстоянии 30 т.п.н. от активного гена *CYP21A2* между генами 4-го компонента комплемента *C4A* и *C4B* расположен псевдоген *CYP21A1P*. Степень гомологии гена и псевдогена составляет 98% в экзонах и 96% в интронах (Higashi, et al, 1986; White, et al, 1986; Rodrigues, et al, 1987). Рекомбинация между высокогомологичными *CYP21A2* и *CYP21A1P* по механизму неравного кроссинговера или генойной конверсии является основной причиной дефицита 21-гидроксилазы. Наряду с этим, по мере проведения молекулярно-генетического

скрининга мутаций в разных популяциях мира, накапливаются сведения о спонтанно возникающих мутациях, происхождение которых не связано с псевдогеном. Эти редкие или уникальные мутации характерны для отдельных семей или небольших по численности популяций. К настоящему моменту описано 60 таких мутаций.

Молекулярно-генетический анализ пациентов с адреногенитальным синдромом, проводимый в разных популяциях, выявляет хорошее соответствие между генотипом и клиническими проявлениями, которые в случае сочетанной гетерозиготности связаны с наименее поврежденным аллелем *CYP21A2*. Отмеченная корреляция генотипа и фенотипа позволяет классифицировать мутации в зависимости от степени инактивации 21-гидроксилазы, что крайне важно для прогнозирования тяжести заболевания в ходе пренатальной диагностики и своевременной пренатальной или ранней постнатальной терапии. Вовремя начатая пренатальная терапия помогает предупредить осложнения, связанные с нарушением стероидогенеза *in utero*, такие как повреждения репродуктивной функции, низкорослость, трансформация пола, а также водно-электролитный дисбаланс в случае наиболее тяжелой соль-теряющей формы заболевания.

При классификации редких и уникальных мутаций, когда статистический анализ клинических проявлений невозможен, наиболее надежным подходом является функциональная характеристика мутаций *in vitro* с последующим анализом модели пространственной структуры *CYP21A2* и установление соответствия между эффектами, обнаруженными *in vitro*, и фенотипом пациента.

Для проведения функционального анализа мутаций *CYP21A2 in vitro* наиболее часто используемой системой экспрессии является система на основе клеток млекопитающих линии *COS-1* и *COS-7*. Имеются также данные по экспрессии гена *CYP21A2* в дрожжах, а также в клетках млекопитающих с использованием вируса осповакцины. Однако одним из наиболее перспективных подходов к получению высокого уровня экспрессии (в среднем 3-10% от общего количества белка клетки) функционально-активных белков зукариот, в большинстве случаев прошедших все стадии посттрансляционной модификации и созревания, для проведения функционального анализа и кристаллографии является бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых. Несколько цитохромов P450 были успешно синтезированы в клетках насекомых, однако данных по экспрессии гена 21-гидроксилазы до настоящего времени не было.

Цель и задачи исследования.

Целью работы является функциональная характеристика уникальных миссенс-мутаций C169R, G178R, W302R, R426C, выявленных при проведении молекулярно-

генетического тестирования российских пациентов в рамках совместного проекта Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН и Эндокринологического научного центра РАМН. Для этого было необходимо решить следующие задачи:

- 1 - введение миссенс-мутаций в кДНК гена 21-гидроксилазы человека для изучения свойств мутантных вариантов фермента *in vitro*;
- 2 - получение рекомбинантных векторов для экспрессии кДНК стероид 21-гидроксилазы дикого типа и анализируемых мутантных вариантов в клетках млекопитающих линии *COS-7* и клетках насекомых линий *Sf9* и *Hi5*;
- 3 - определение влияния мутаций на биосинтез и ферментативную активность 21-гидроксилазы и ее свойства в клетках *COS-7*;
- 4 - получение функционально-активной стероид 21-гидроксилазы в клетках насекомых и изучение влияния одной из мутаций - C169R - на функциональную активность фермента в микросомных фракциях клеток насекомых;
- 5 - анализ модели пространственной структуры 21-гидроксилазы, определение структурно-функциональных последствий аминокислотных замен, определяемых изучаемыми мутациями.

Научная новизна и практическая ценность работы.

- 1 - Охарактеризованы четыре новых миссенс-мутации гена 21-гидроксилазы, выявленные у больных с классическими формами адреногенитального синдрома. Данные о влиянии этих мутаций на свойства 21-гидроксилазы, полученные *in vitro*, могут иметь важное значение для прогнозирования тяжести заболевания в случае их выявления у детей при молекулярно-генетической диагностике в неонатальном периоде.
- 2 - С использованием рекомбинантных бакуловирусов в клетках насекомых впервые получена 21-гидроксилаза человека. Предложены условия эффективной продукции (28% от суммарного количества белка микросом) функционально-активной 21-гидроксилазы в линии клеток *Hi5*. Уровень синтеза рекомбинантной 21-гидроксилазы в клетках *Hi5* значительно превышает показатели, достигнутые в системах экспрессии на основе клеток млекопитающих и дрожжей. Это делает возможным получение в достаточных количествах рекомбинантного белка для функционального анализа, а также его кристаллизации.
- 3 – Использована модель трехмерной структуры CYP21A2 для интерпретации результатов функционального анализа мутаций *in vitro*, что важно для установления структурно-функциональных взаимодействий 21-гидроксилазы, а также других стероидогенных цитохромов P450.

Апробация работы. Результаты исследований представлены на VII Международной Энгельгардтовской конференции по молекулярной биологии (Суздаль, 2004), XVII Зимней школе для молодых ученых (Москва, 2005), XI Международной конференции для молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2005), 30-ом Конгрессе FEBS (Будапешт, 2005).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, из них статьи - 3, тезисы конференций – 4.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на страницах машинописного текста, содержит рисунков, таблиц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы из источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования.

В ходе молекулярно-генетического анализа 104 неродственных пациентов с классическими формами недостаточности 21-гидроксилазы, обследованных в Институте детской эндокринологии ЭНЦ РАМН, выявлены новые мутации в гене *CYP21A2*. Недостаточность 21-гидроксилазы диагностирована на основании общепринятых клинических и гормональных критериев (Joint LWPES/ESPE CAN Working Group, 2002). Скрининг общераспространенных мутаций в гене *CYP21A2* проводили по методике A.Wedell и H.Luthman (1993). Делеции и крупные перестройки гена *CYP21A2* выявляли методом MLPA¹ согласно протоколам производителя (MRC-Holland, The Netherlands). Идентификацию новых точечных мутаций осуществляли прямым секвенированием продуктов полимеразной цепной реакции после аллель-специфической амплификации гена *CYP21A2*. Мутации названы согласно рекомендациям Nomenclature Working Group (Antonarakis, 1998; den Dunnen & Antonarakis, 2000).

Пациент К (46, XX²). Диагностирована простая вирильная форма недостаточности 21-гидроксилазы со степенью вирилизации 2 по Прадеру в возрасте 2,5 месяца. Часто встречающихся мутаций при анализе методом аллель-специфической ПЦР обнаружено не было. Методом MLPA выявлена делеция с 1 по 6 экзон в одной копии гена *CYP21A2*. Полное секвенирование гена *CYP21A2* позволило обнаружить замену Т на С в положении 989 в экзоне 4 в гемизиготном состоянии у пациента и в гетерозиготном состоянии у отца.

¹ multiplex ligation-dependent probe amplification, множественная лигаз-зависимая амплификация.

² нормальный кариотип человека, XX - набор половых хромосом женского организма, XY- мужского организма.

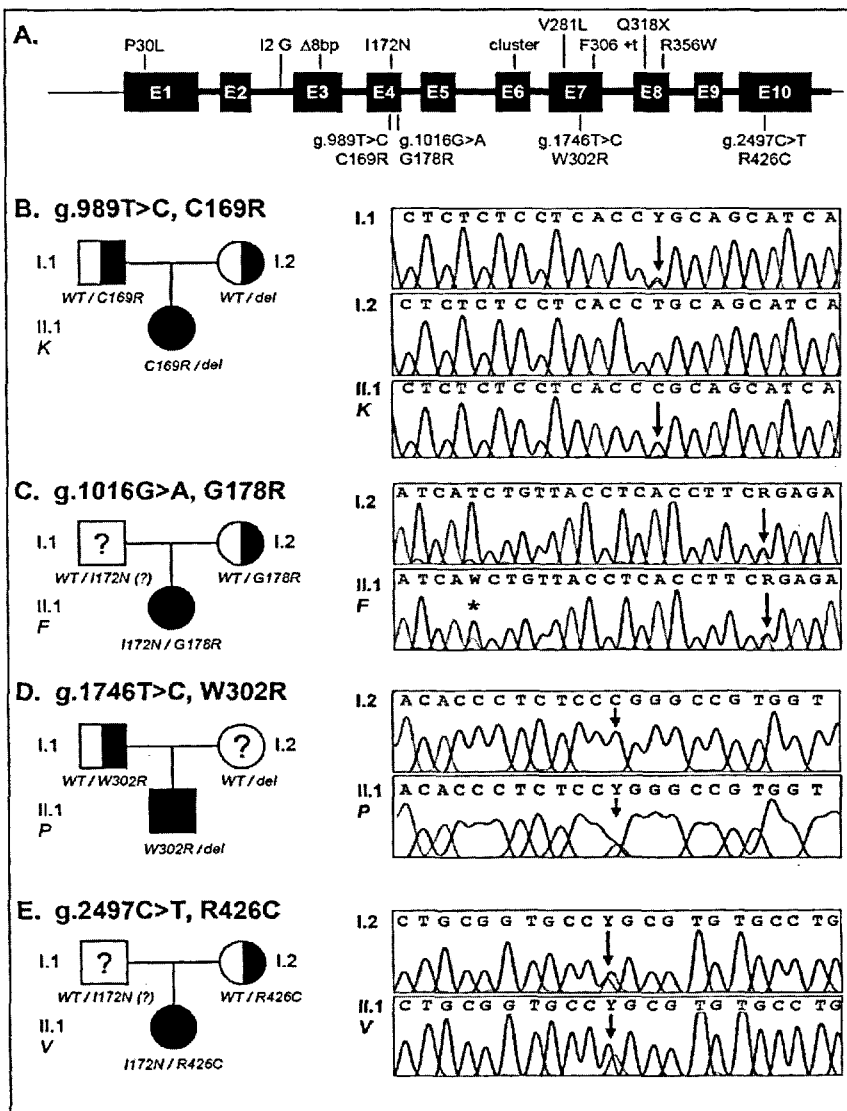


Рис. 1. Мутации в гене *CYP21A2*, обнаруженные у пациентов с адреногенитальным синдромом. А,- схематическое изображение гена *CYP21A2*, сверху показаны наиболее распространенные мутации, вызывающие дефицит 21-гидроксилазы, снизу- новые мутации, исследуемые в настоящей работе; В, С, D, Е – анализ мутаций у пациентов К, F, P, V, соответственно, (описание в тексте).

Замена нуклетидов привела к замене цистеина на аргинин в положении 169 (C169R) в полипептидной цепи CYP21A2 (рис. 1 А). Мутация отсутствовала в гене *CYP21A2* матери. Т.о. генотип пациента К можно представить как гемизиготу с делецией гена *CYP21A2* в материнском аллеле и миссенс-мутацией C169R в отцовском.

Пациент F (46, XX). Диагностирована простая вирильная форма недостаточности 21-гидроксилазы в возрасте 6 лет. Методом MLPA крупных перестроек и делеций гена *CYP21A2* обнаружено не было. Аллель-специфической ПЦР выявлена мутация I172N в экзоне 4 в гетерозиготном состоянии. Полное секвенирование гена *CYP21A2* позволило обнаружить вторую гетерозиготную мутацию в экзоне 4 – замену G на A в положении 1016. В результате обнаруженной нуклеотидной замены глицин 178 замещается на аргинин (G178R) (рис. 1 С). Мутация унаследована от матери. ДНК отца недоступна для анализа. Генотип пациента F - I172N (отцовский аллель)/G178R (материнский аллель).

Пациент P (46, XY). Диагностирована соль-теряющая форма недостаточности 21-гидроксилазы на второй неделе жизни. Анализом MLPA выявлена делеция с 1 по 6 экзон в одной копии гена *CYP21A2*. При секвенировании обнаружена замена T на C в позиции 1746 в экзоне 7, ведущая к замене триптофана 302 на аргинин (рис. 1 D). Мутация выявлена как гомизиготная у пациента и гетерозиготная у его отца. Генотип пациента P – W302R (отцовский аллель)/del (материнский аллель).

Пациент V (46, XX). Диагностирована простая вирильная форма с вирилизацией по Прадеру 4 степени. При рождении был определен мужской пол. Недостаточность 21-гидроксилазы диагностирована в возрасте 6 лет. Методом MLPA крупных нарушений гена *CYP21A2* выявлено не было. Аллель-специфической ПЦР обнаружена мутация I172N в гетерозиготном состоянии. При прямом секвенировании обнаружена замена C на T в положении 2497 п.о в десятом экзоне, сопровождающаяся заменой аргинина 426 на цистеин (R426C) (рис. 1 E). У матери мутация R426C выявлена как гетерозиготная, мутация I172N отсутствовала. ДНК отца для анализа недоступна. Генотип пациента был определен как I172N (отцовский аллель)/ R426C (материнский аллель).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональный анализ CYP21A2 дикого типа и мутантных вариантов в клетках COS-7.

Для определения функционального значения новых мутаций, выявленных у пациентов с классическими формами дефицита стероид 21-гидроксилазы, кДНК *CYP21A2* дикого типа и исследуемых мутантных вариантов транзигентно экспрессировали в клетках COS-7. Каталитическую активность по отношению к двум субстратам CYP21A2 – 17-ОН

прогестерону (17ОНП) и прогестерону – определяли в интактных клетках. Результаты (табл.2) свидетельствуют о практически полной инактивации CYP21A2 в случае всех исследуемых мутаций и позволяют классифицировать их как тяжелые. Активность по отношению к 17ОНП и прогестерону была измерена и для мутантного варианта R426H. Мутация R426H была ранее описана у больных с адреногенитальным синдромом (Baumgartner-Parzer, et al, 2001; Barbaro, et al, 2006), и по нашим данным приводит к почти полной инактивации 21-гидроксилазной активности (табл. 2).

Форма CYP21A2	17ОНП	Прогестерон
WT	100 ± 6.0	100 ± 8.5
C169R	0.1 ± 0.2	0.0 ± 1.2
G178R	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.6
W302R	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.5
R426C	0.0 ± 0.5	0.0 ± 0.6
R426H	0.4 ± 0.7	0.6 ± 2.1

Таблица 2. Остаточная каталитическая активность мутантных вариантов CYP21A2. Активность мутантных вариантов выражена в процентах от активности CYP21A2 дикого типа. Показаны средние значения эффективности превращения 17ОНП в дезоксикортизол и прогестерона в дезоксикортикостерон при инкубации клеток в течение 90 мин в среде, содержащей 2 мкМ субстрата через 24 часа после трансфекции клеток; ± стандартное отклонение после 6 трансфекций.

Из результатов иммуноблотинга следует, что уровень экспрессии кДНК всех изученных мутантных вариантов *CYP21A2* в клетках *COS-7* примерно одинаков (рис. 2). Слабая полоса, мигрирующая в ПААГ-ДСН геле медленнее, вероятнее всего, представляет гликозилированную форму CYP21A2, что было отмечено в литературе ранее (Lajic, et al, 1999).

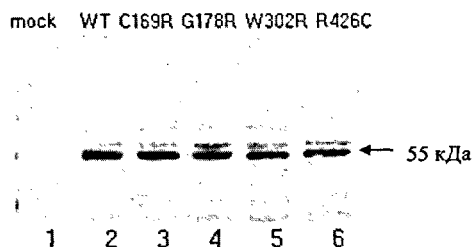


Рис.2. Сравнение уровня экспрессии кДНК *CYP21A2* с мутациями и дикого типа в клетках *COS-7*. В каждую дорожку ПААГ-ДСН геля вносили 2 мкг общего клеточного белка. Дорожка 1 – лизат клеток, трансфицированных исходным вектором рсDNA3.1(+); дорожки 2 – 6 – лизаты клеток, продуцирующих CYP21A2 дикого типа (WT) и мутантных вариантов.

Влияние мутаций на внутриклеточную локализацию CYP21A2 определяли методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Результаты свидетельствуют о правильной локализации всех исследуемых мутантных форм CYP21A2 в гладком эндоплазматическом ретикулуме клеток (рис. 3). Таким образом, можно сделать вывод, что мутации C169R, G178R, W302R, R426C не влияют на трансляцию и внутриклеточную локализацию стероид 21-гидроксилазы.

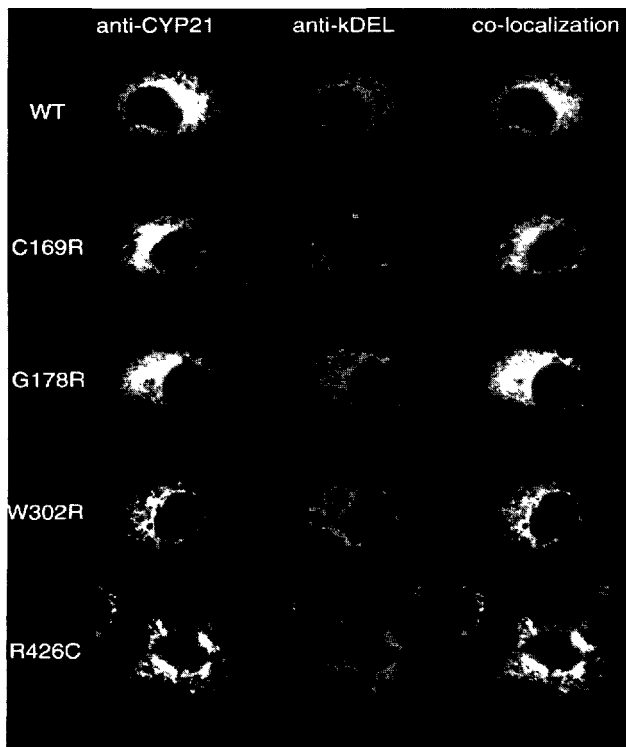


Рис.3. Влияние мутаций на локализацию CYP21A2 человека в клетках *COS-7*. Слева показано окрашивание клеток *COS-7* вторичными антителами ALEXA Fluor 488 против иммуноглобулинов кролика после обработки поликлональными антителами кролика против CYP21A2 человека. В центре – окрашивание клеток вторичными антителами ALEXA Fluor 594 против иммуноглобулинов мыши после обработки первичными антителами мыши против KDEL, маркера гладкого эндоплазматического ретикулума. Справа – совмещение изображений.

Экспрессия кДНК *CYP21A2* и мутантного варианта *C169R* в клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы.

Для получения функционально-активной стероид 21-гидроксилазы, локализованной в мембране эндоплазматического ретикулаума клеток насекомых, использовали бакуловирусный вектор pFastBacHTaΔ, модифицированный путем делеции последовательности, кодирующей 6 остатков гистидина, надстраивающихся к N-концу рекомбинантного белка. На основе вектора pFastBacHTaΔ получены бакуловирусы bv-CYP21A2 и bv-CYP21A2-C169R. Белки, выявленные с помощью вестерн-блотинга в лизатах и препаратах микросом инфицированных клеток насекомых, мигрировали при электрофорезе в 12%-ном денатурирующем ПААГ в виде одной полосы с молекулярной массой 55 кДа, что соответствует молекулярной массе CYP21A2 (рис. 4, 5, 6). Присутствие CYP21A2 дикого типа и CYP21A2-C169R во фракции микросом свидетельствует о встраивании рекомбинантных белков в мембраны эндоплазматической сети клеток насекомых.

Уровень синтеза CYP21A2 зависит от длительности инфекции (24 – 96 часов) и множественности заражения клеток вирусом (0.1 - 8 бляшкообразующих единиц на клетку (БОЕ/кл)). Оптимальные условия продукции CYP21A2 подбирали по результатам иммуноблотинга. Количество синтезирующейся в клетках насекомых стероид 21-гидроксилазы значительно увеличивается на третий день (72 часа) после заражения клеток вирусом, что связано с использованием промотора позднего бакуловирусного гена полиэдрина. В этот период клетки содержат максимальное количество спектрально- и функционально-активных форм практически всех полученных в бакуловирусной системе экспрессии цитохромов P450 (Asseffa, et al, 1989; Lee, et al, 1995; Paine, et al, 1996; Chen, et al, 1997). С помощью иммуноблотинга CYP21A2 удается выявить в лизате клеток при множественности заражения 1 БОЕ/кл. При повышении множественности заражения до 2 БОЕ/кл количество CYP21A2 существенно возрастает, а в дальнейшем повышении (3 - 8 БОЕ/кл) увеличивается незначительно (рис. 4). Известно, что в условиях высокой

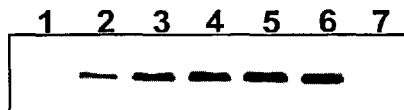


Рис.4. Влияние множественности заражения клеток *S9* рекомбинантным бакуловирусом на уровень продукции CYP21A2 *S9*: дорожки 1 – 6 - множественность инфекции вируса 0,1; 1; 2; 3; 4; 8 БОЕ/кл; дорожка 7 - лизат ложноинфицированных клеток.

множественности инфекции активность цитохромов P450 может снижаться (Lee, et al, 1995; Wang, et al, 1996), поэтому в дальнейшем для получения рекомбинантной 21-гидроксилазы мы использовали множественность инфекции 2 БОЕ/кл.

Эффективность продукции гетерологичных белков в разных линиях клеток насекомых сильно различается. Показано, что в клеточных линиях *T. ni* выход рекомбинантных P450 гораздо выше, чем в линиях клеток *S. frugiperda* (Lee, et al, 1995). Сходные результаты получены нами при экспрессии гена *CYP21A2*. По данным иммуноблоттинга содержание CYP21A2 во фракции микросом клеток Hi5 в 4 раза превышает его содержание в микросомах клеток Sf9. Таким образом, для получения большого количества рекомбинантного белка CYP21A2 использование линии клеток Hi5 предпочтительно.

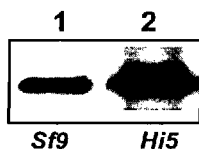


Рис. 5. Анализ продукции CYP21A2 в клетках Sf9 и Hi5: в среду культивирования добавляли 3 мкг/мл хлорида гемина.

Для получения микросомных фракций и определения активности 21-гидроксилазы синтез белков CYP21A2 и CYP21A2-C169R проводили в инфицированных клетках насекомых линии Hi5 при множественности инфекции 2 БОЕ/кл. в течение 72 часов в среде Sf900-II, содержащей 20% сыворотки телянка и 3 мкг/мл хлорида гемина. Добавление гемина в среду культивирования клеток насекомых важно для получения гемопротеинов, в том числе цитохромов P450, ввиду недостаточной эффективности эндогенной гем-синтезирующей системы клеток (Asseffa, et al, 1989; Lee, et al, 1995). Увеличение содержания сыворотки в среде позволяет избежать токсичного действия гемина на клетки. По нашим данным добавление гемина в концентрации 3 мкг/мл не снижало жизнеспособность клеток Sf9 и Hi5 (97-98% жизнеспособных клеток).

Уровень синтеза CYP21A2 в клетках Hi5 составил примерно 28% от суммарного микросомного белка (5 нмоль/мг микросомного белка). Для сравнения можно привести опубликованные данные об уровне продукции спектрально-активного CYP21A2 в клетках дрожжей - 0.076 нмоль/мг микросомного белка (Wu, et al, 1991). Учитывая, что в клетках насекомых в форме спектрально- и функционально-активного гемопротеина находится от 50 до 90% синтезированного рекомбинантного P450 (Asseffa, et al, 1989; Buters, et al, 1994), выход спектрально-активного CYP21A2 в полученной нами бакуловирусной

системе экспрессии превышает уровень продукции сходных белков в клетках дрожжей по меньшей мере в 33 раза.

Как следует из результатов иммуноблотинга (рис.6), CYP21A2-C169R синтезировался столь же эффективно и так же встраивался в мембрану эндоплазматической сети, как и CYP21A2 дикого типа.

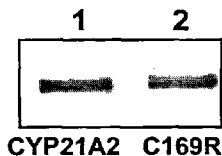


Рис. 6. Сравнение уровня продукции CYP21A2 и CYP21A2-C169R в клетках *Hi5*.

Ферментативная активность CYP21A2 и CYP21A2-C169R в препаратах микросом из клеток *Hi5*.

Активность CYP21A2 и CYP21A2-C169R в клетках насекомых определяли по отношению к двум субстратам – 17ОНР и прогестерону. Известно, что содержание NADPH-P450-оксидоредуктазы (CYPOR) в клетках насекомых недостаточно для поддержания активности рекомбинантных цитохромов P450. По нашим данным микросомы из клеток *Hi5* с высоким уровнем экспрессии гена CYP21A2 дикого типа обладают эндогенной активностью CYPOR, способной частично поддерживать активность рекомбинантного фермента. Активность по отношению к 17ОНР составила 10.45 ± 0.8 пмоль/(мг микросомного белка $\times$ мин), тогда как активность по отношению к прогестерону была ниже в 7.3 раза и составила 1.43 ± 1.05 пмоль/(мг белка $\times$ мин). У мутантного варианта C169R активность по отношению к обоим субстратам полностью отсутствовала. Наблюдаемые нами расхождения в активности рекомбинантного CYP21A2 дикого типа на прогестероне и 17ОНР, по-видимому, связаны с особенностями биосинтеза минерало- и глюкокортикоидных гормонов *in vivo*. В норме уровень секреции в коре надпочечников альдостерона, предшественником которого является прогестерон, в 100 - 1000 раз меньше по сравнению с уровнем секреции кортизола, в пути биосинтеза которого задействован 17ОНР (White, et al, 1992). Это согласуется и с ранее опубликованными результатами анализа кинетики реакций 21-гидроксилирования прогестерона и 17ОНР в клетках млекопитающих, инфицированных рекомбинантным вирусом осповакцины (Tusie-Luna, et al, 1990). В этой системе каталитическая эффективность (V_{max}/K_m) рекомбинантной 21-гидроксилазы в реакции с прогестероном была в 5 раз ниже, чем в реакции с 17ОНР.

Для компенсации недостатка CYPOR используются три подхода: 1) добавление очищенной НАДФН-Р450-оксидоредуктазы в реакционную смесь при измерении каталитической активности, 2) коэкспрессия генов цитохрома Р450 и НАДФН-Р450-оксидоредуктазы с помощью одного рекомбинантного бакуловируса или 3) заражают клетки одновременно двумя рекомбинантными бакуловирусами, обеспечивающими продукцию цитохрома Р450 и НАДФН-Р450-оксидоредуктазы (Lee, et al, 1995; Chen, et al, 1997). В представленной работе недостаток НАДФН-Р450-оксидоредуктазы в микросомах клеток насекомых компенсировали добавлением очищенной CYPOR кролика в среду измерения. Добавление НАДФН-Р450-оксидоредуктазы кролика к микросомным частицам из клеток *Hi5*, синтезирующих 21-гидроксиллазу, в молярном соотношении CYP21A2: CYPOR = 1:1 приводило к увеличению эффективности превращения 17-ОНпрогестерона в 11-дезоксикортизол в 1.7 раза (рис. 7 а), тогда как превращение прогестерона в дезоксикортикостерон в этих условиях увеличивается в 5.3 раза (рис. 7 б).

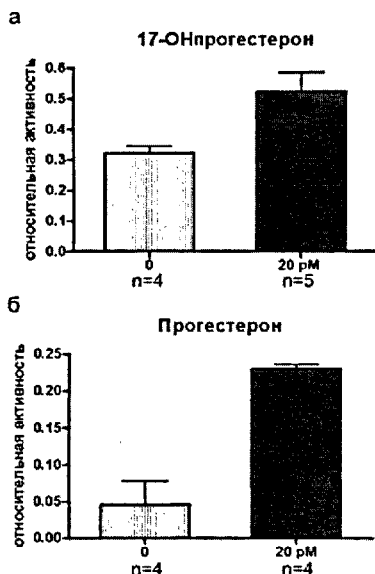


Рис. 7. Ферментативная активность CYP21A2 в микросомах из клеток *Hi5*. Относительная активность представлена как отношение радиоактивности продукта к суммарной радиоактивности субстрата и продукта. Используемая концентрация субстратов 0.01 мкМ. Показаны средние значения $\pm$ стандартное отклонение, n – число экспериментов. Заштрихованные столбцы показывают значения активности в микросомных препаратах в отсутствие, а серые - в присутствии экзогенной НАДФН-Р450-оксидоредуктазы кролика; а - относительная активность CYP21A2 по отношению к 17ОНП; б - по отношению к прогестерону.

Данные по измерению каталитической активности CYP21A2 и мутантного варианта C169R в системе с добавлением НАДФН-Р450-оксидоредуктазы кролика приведены в таблице 3. Результаты свидетельствуют о практически полном отсутствии активности мутантного белка по отношению к двум субстратам CYP21A2 – прогестерону и 17ОНП.

Таким образом, данные по функциональной характеристике миссенс-мутации C169R 21-гидроксилазы в микросомной фракции инфицированной клеточной линии насекомых *Hi5* свидетельствуют о полной инактивации фермента и согласуются с данными, полученными на клетках *COS-7*. Полученные нами результаты позволяют считать экспрессию в бакуловирусной системе удобным способом синтеза CYP21A2 с большим выходом, что очень важно для функционального анализа мутаций.

Субстрат	Удельная активность, пмоль/(мг микросомного белка x мин)		Относительная активность, %	
	WT	C169R	WT	C169R
17-ОНпрогестерон	17.0 ± 2.1 (n=5)	0.1 ± 1.0 (n=6)	100 ± 12.4 (n=5)	0.44 ± 9.6 (n=6)
прогестерон	7.6 ± 0.5 (n=4)	0.0 ± 0.4 (n=4)	100 ± 6.5 (n=4)	0.0 ± 4.6 (n=4)

Таблица 3. Ферментативная активность стероид 21-гидроксилазы дикого типа и мутантного варианта C169R в микросомной фракции из клеток *Hi5*. Относительная активность выражена в процентах от удельной активности фермента дикого типа. Приведены средние значения ± стандартное отклонение, (n - количество измерений).

Анализ модели трехмерной структуры.

Для анализа наблюдаемого инактивирующего эффекта миссенс-мутаций C169R, G178R, W302R и R426C на функцию стероид 21-гидроксилазы человека была создана модель трехмерной структуры (рис. 8) на основе расшифрованной методом рентгеновской дифракции структуры CYP2C5 кролика (Krone, et al, 2004).

За последние несколько лет успешно расшифрованы структуры нескольких эукариотических P450: CYP2C5 (PDB код: 1DT6) (Wester, et al, 2003), CYP2C8 (PDB код: 1PQ2) (Schoch, et al, 2003), CYP2C9 (PDB код: 1OG5) (Williams, et al, 2003), CYP2B4 (PDB код: 1PO5) (Scott, et al, 2003) and CYP3A4 (PDB код: 1W0E and 1TQN) (Williams, et al, 2004; Yano, et al, 2004). Анализ полученных структур свидетельствует о консерватизме организации молекул белков, относящихся к семейству цитохромов P450, что позволяет использовать расшифрованные структуры для создания моделей других цитохромов P450, в том числе стероидогенных.

Выравнивание последовательностей CYP21A2 и CYP2C5, выполненное с учетом пространственной конфигурации CYP2C5, показало, что молекула CYP21A2 состоит из четырех β-слоев и шестнадцати α-спиралей. Высоким консерватизмом отличается участок молекулы в гидрофобном ядре, который координирует гем - спирали I и L, а также область цистеинового кармана. В последовательности CYP21A2 присутствуют высоко консервативные для всех расшифрованных структур P450 аминокислотные остатки:

Cys428, пятый (аксиальный) лиганд железа гема, Thr295 и Glu294, расположенные по середине спирали I и участвующие в катализе, а также элементы «ERR-триады» Glu351, Arg354, расположенные в спирали K, и Arg408, - в «меандре». В координации пропионатных групп гема у CYP21A2 участвуют консервативные аминокислотные остатки: Arg426, расположенный в цистеиновом кармане перед спиралью L, Trp116 и Lys120 на C-конце спирали C, а также His365 в составе β 1-4. К консервативным участкам относятся также спираль J, β -лист 1, спираль C, E, K, образующие внутреннюю часть молекулы. Присутствует спираль J', которая является характерным элементом в структуре цитохромов P450 второго класса. Наиболее вариативные участки расположены на N-конце молекулы. К ним относится отрезок, соединяющий спирали B и C, а также последовательность в области спиралей F и G и петли, которая их соединяет, т.е. элементы, ответственные за взаимодействие с субстратами.

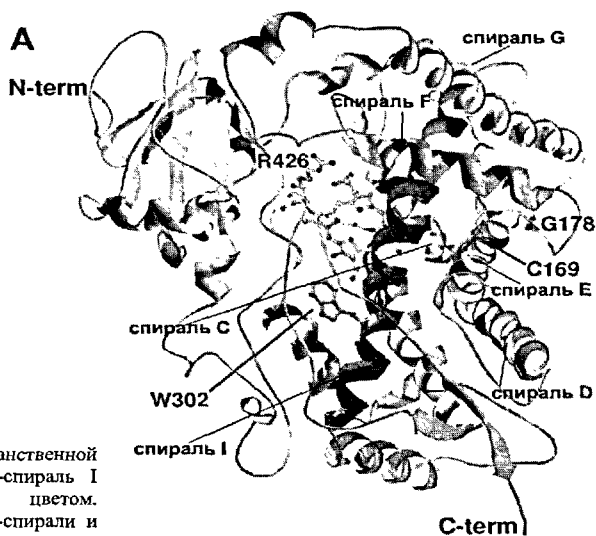


Рис. 8. Модель пространственной структуры CYP21A2. α -спираль I показана темно-серым цветом. Отмечены некоторые α -спирали и аминокислотные остатки C169, G178, W302, R426.

О роли цистеина 169 свидетельствует высокий консерватизм этого положения в аминокислотной последовательности CYP21A2 у разных видов млекопитающих - свиньи (GenBank P15540), коровы (GenBank P00191), крысы (GenBank Q64562), мыши (GenBank P03940), собаки (GenBank Q8WNW0) и гидрофобный характер этого положения в других стероидогенных цитохромах P450 человека – CYP17A1 (GenBank P05093, треонин),

CYP11A1 (GenBank P05108, фенилаланин), CYP11B2 (GenBank NP_000489, изолейцин), CYP19A1 (GenBank P11511, валин), и P450 млекопитающих с установленной структурой (рис. 9). Цистеин в положении 169 расположен в спирали E в гидрофобном ядре молекулы (рис. 8, 10). Замена цистеина на аминокислотный остаток аргинина с

а

CYP21	162	EEFSLLTCSIICYLTFGDKIKD-D	184	295	TTANTLSWAVVFLIH	309	419	LAFGGARGVCLGEPL	433
CYP2C5	168	FILGCAFCNVICSVIFHNRFDYKD	190	298	TTSTTLRAYSLLLLIK	312	422	MPFSAGKRCVCEGL	436
CYP2C8	168	FILGCAFCNVICSVVFEKRFDYKD	190	301	TTSTTLRAYSLLLLIK	315	426	MPFSAGKRICAGEGL	440
CYP2C9	168	FILGCAFCNVICSIIFHNRFDYKD	190	301	TTSTTLRAYSLLLLIK	315	426	MPFSAGKRICVGEAL	440
CYP2B4	170	LLFHSITSNICSVIFGKRFDYKD	192	302	TTSTTLRAYSLLLLIK	316	427	MPFSLGKRICLSEGI	441
CYP3A4	175	DVFGAYSMDVITSTSEFVNIDSLN	197	309	TTSSVLSFMYELAT	323	433	TPFGSGERNICIGMEF	447

б

CYP21human	162	EEFSLLTCSIICYLTFGDKIKDEN	185	295	TTANTLSWAVVFLIH	309	419	LAFGGARGVCLGEPL	433
CYP21p.g	163	KEFSVLTCSIICCLTFGD--KEDT	184	294	TTANTLSWAVVFLIH	308	418	LAFGGARGVCLGEPL	432
CYP21cow	163	KEFSLLTCSIICYLTFGN--KEDT	184	294	TTASTLSWAVAFLLH	308	418	LAFGGARGVCLGEPL	432
CYP21dog	162	KEFSLLTCAIICHLTFGD--KEDT	183	293	TTATLSWAVAFLLH	307	417	LAFGGARGVCLGEPL	431
CYP21rat	161	KEFSLLTCSIICCLTFGD-KQDST	183	293	TTAATLSWAVAFLLH	307	414	PTFGGARGVCLGEPL	428
CYP21mouse	159	KEFSVLTCSIICCLTFGD-K-DST	180	290	TTATLSWAVAFLLH	304	411	PSFGGARGVCLGEPL	425

в

CYP21	162	EEFSLLTCSIICYLTFGDK--IKD	183	295	TTANTLSWAVVFLIH	309	419	LAFGGARGVCLGEPL	433
CYP17	169	FFVEVAVNVISLICFNTSYKNGD	192	306	TTTSVVKWTLAFLLH	320	433	LPFGAGPRSCIGEL	447
CYP11A1	200	DDLRFASFESITNVIFGERQGMLE	223	330	TTSMTLQWHLVEMAR	344	453	LGFGWGVRCQLGRRI	467
CYP11B2	121	PSIHNTTIEASNLALFGERLGLVG	144	248	TTAFELMLTLEFELAR	262	371	VPFEGGVRCQLGRRL	385
CYP19A1	187	VLTLRLRVMLDSTNTLFLRLPEDE	210	310	TMSVLSLFMLLELAK	324	427	QPFEGGVRCGAGKYI	441

Рис. 9. Множественные выравнивания аминокислотных последовательностей P450, образующих α-спирали E и I и область цистенинового кармана. Слева показана область α-спирали E, посередине - α-спирали I, справа - цистенинового кармана. Аминокислотные остатки в положениях, соответствующих C169, G178, W302, R426, выделены жирным шрифтом и отмечены на рисунке сверху; а- множественное выравнивание CYP21A2 человека и цитохромов P450 млекопитающих с установленной пространственной структурой; б- множественное выравнивание стероидогенных P450 человека; в- множественное выравнивание CYP21A2 разных видов млекопитающих.

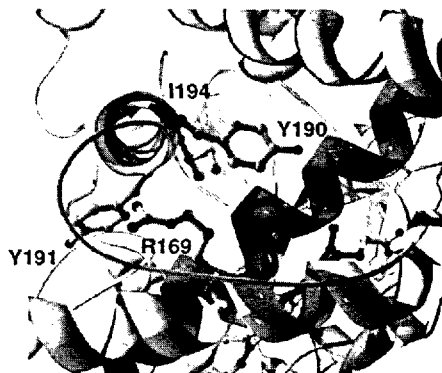


Рис. 10. Замена цистеина 169 на аргинин в составе α-спирали E. Показано взаимодействие с тирозином 191, расположенным на α-спирали F, отмечены аминокислотные остатки Y190 и I194, расположенные по соседству.

длинной боковой цепью, несущей положительный заряд, способна сильно нарушить конформацию гидрофобного ядра. В частности, аргинин в положении 169 может нарушать правильное расположение тирозина 191 в спирали F (рис. 10), способствуя тем самым закрытию канала, образуемого между спиралями I и F, который служит для выхода образованной во время катализа молекулы воды (Wester, et al, 2003). Другой вероятный эффект аргинина 169 связан с изменением взаимного расположения спиралей E и I, находящихся рядом и образующих осто́в гидрофобного ядра молекулы 21-гидроксилазы. Оба предположения указывают на то, что сильная инактивация CYP21A2 в результате замены C169R связана с нарушением конформации элементов белковой молекулы, важных для ее функционирования.

Глицин в положении 178 высоко консервативен в аминокислотной последовательности CYP21A2 млекопитающих, однако заменен другими аминокислотами в некоторых других P450 (рис. 9). Тем не менее, показано, что замена глицина 178 на близкий по свойствам аланин снижает активность CYP21A2 до 20% от активности фермента дикого типа (Nunez, et al, 1999). G178 расположен на поверхности белковой молекулы, в петле, соединяющей спирали E и F (рис. 8, 11). Появление аргинина в этом положении может нарушать конформацию аминокислотных остатков I131, R132, D133, расположенных в петле между α -спиралями D и C, изменяя расположение α -спиралей D и C относительно остальной части молекулы. В связи с этим можно высказать два предположения. Поскольку, как известно, N-концевая часть α -спирали C цитохромов P450 участвует в связывании гема (Hasemann, et al, 1995), изменение стерических взаимодействий в результате замены G178R может приводить к нарушению связывания и координации гема. Известно также, что участок последовательности между спиралями B-B'-C задействован в процессах связывания субстрата и высвобождения продукта (Wester,

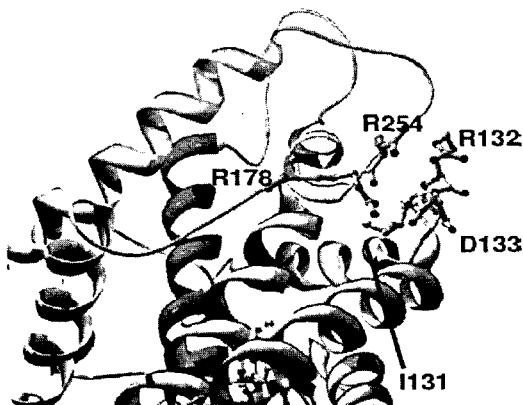


Рис.11. Замена глицина 178 на аргинин. Аргинин в положении 178 нарушает конформацию аминокислотных остатков I131, R132, D133, расположенных в петле между α -спиралями C и D. R254 расположен на N-конце α -спирали H.

et

al, 2003). Помимо этого, взаимодействие аргинина в положении 178 с аргинином 254, расположенным на N-конце α -спирали H, способно изменять конформацию спирали I, определенно связанной с координацией гема и катализом. Все обсуждаемые эффекты, вероятно, могут объяснять отсутствие ферментативной активности мутанта G178R, наблюдаемые *in vitro*.

Триптофан в положении 302 локализован в α -спирали I (рис 8, 12). α -спираль I высококонсервативна, пронизывает всю молекулу и участвует в распознавании субстрата и координации гема. Гидрофобность положения 302 характерна для разнообразных представителей семейства P450, а триптофан консервативен у CYP21A2 млекопитающих (рис. 9). Замена ароматической аминокислоты триптофана на полярный и заряженный аргинин непосредственно в ядре молекулы может сильно мешать правильному положению α -спирали I относительно протестической группы – гема. Поэтому можно предположить, что аргинин 302 может затруднять катализ CYP21A2 за счет нарушения координации гема. Отсутствие каталитической активности, обнаруженное при анализе мутации W302R *in vitro*, согласуется с ее фенотипическим проявлением – развитием теряющей формы недостаточности 21-гидроксилазы.

Аргинин 426 расположен в цистеиновом кармане, который отличается высоким консерватизмом среди цитохромов P450 (рис 8, 13), и является одним из четырех аминокислотных остатков, участвующих в координации пропионатных групп гема (Haesmann, et al, 1995; Mornet & Gibrat, 2000). Аргинин в соответствующем положении присутствует в молекулах эукариотических P450 (рис. 9), тогда как у некоторых прокариотических P450 соответствующей аминокислотой является гистидин (P450terp (CYP108), P450eryf (CYP107A1), P450cam (CYP101), P450nor (CYP55A1)). Замена аргинина на цистеин сильно инактивирует CYP21A2, по всей видимости, за счет нарушения координации гема в активном центре молекулы. Ранее у пациентов с адреногенитальным синдромом была описана мутация R426H (Baumgartner-Parzer, et al, 2001; Barbaro, et al, 2006). Измерение активности мутанта R426H в условиях, когда нет насыщения системы по субстрату, выявило почти полное отсутствие ферментативной активности по отношению к двум субстратам (0.5% и 0.4% от активности дикого типа по отношению к 17ОНП и прогестерону, соответственно), что хорошо сочетается с данными, полученными нами (табл. 2) и подчеркивает важность аргинина в положении 426 CYP21A2 для осуществления катализа. Помимо этого, известно, что замена аргинина в соответствующем положении на цистеин или гистидин инактивирует и другие стероидогенные цитохромы P450: CYP11B1 - замена R448H (White, et al, 1991; Curnow, et al, 1993) и R448C (Geley, et al, 1996), и CYP17A1- замена R440H (Fardella, et al, 1994).

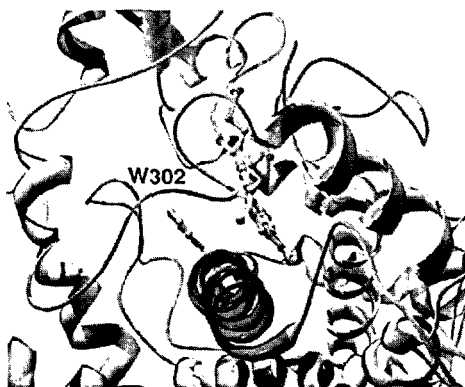


Рис. 12. Расположение триптофана 302 в ядре молекулы. Введение полярного аргинина с длинной алифатической боковой цепью нарушает конформацию молекулы CYP21A2.

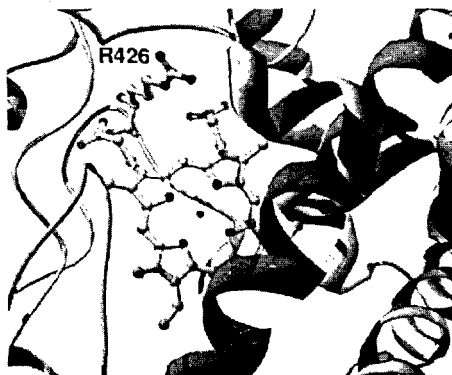


Рис. 13. Расположение аргинина 426 и его взаимодействие с пропионатными группами гема, нарушаемое при введении цистеина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В настоящей работе проведен функциональный анализ четырех новых, не описанных ранее мутаций C169R, G178R, W302R, R426C, обнаруженных у пациентов с классическими формами недостаточности 21-гидроксилазы. Показано, что все мутации приводят к потере активности фермента по отношению к двум субстратам – 17-ОНП и прогестерону. При этом исследуемые замены аминокислот не влияют на биосинтез CYP21A2 и внутриклеточную локализацию в эндоплазматическом ретикулуме. Мутации G178R и R426C обнаружены в гетерозиготном состоянии у пациентов с простой вирильной формой дефицита 21-гидроксилазы совместно с хорошо охарактеризованной и часто встречающейся мутацией I172N в другом аллеле. Мутация I172N относится к группе мутаций средней тяжести и чаще всего ассоциирована с простой вирильной

формой. Поскольку известно, что в подавляющем большинстве случаев фенотип при adrenogenitalном синдроме определяется наименее поврежденным аллелем, клинические проявления пациентов F и V находятся в соответствии с установленным генотипом. Ожидаемое генотип-фенотипическое соответствие обнаружено и для пациента P. Мутация W302R, по нашим данным полностью инактивирующая фермент, представлена в гемизиготном состоянии, и приводит к наиболее тяжелой соль-теряющей форме АГС у пациента. Мутация C169R обнаружена у пациента с простой вирильной формой дефицита 21-гидроксилазы совместно с делецией большого участка гена во втором аллеле. При этом наблюдаемые в большинстве случаев клинические проявления напрямую зависят от повреждающего эффекта мутации, обнаруживаемой в сохранившемся аллеле. Мутации, ассоциированные с простой вирильной формой заболевания, как правило, при измерении *in vitro* проявляют остаточную активность 1-5 % от активности 21-гидроксилазы дикого типа. Однако данные по измерению активности CYP21A2-C169R на целых клетках COS-7 свидетельствуют о полной утрате ферментативной активности мутантным ферментом по отношению к двум субстратам CYP21A2. Сходные результаты были получены и в более эффективной системе измерения - в микросомных препаратах из клеток насекомых *Hi5*. Таким образом, мутация C169R может быть классифицирована как тяжелая, а исследуемый случай, вероятно, можно отнести к одному из редких примеров несоответствия генотипа и проявляемого фенотипа при дефиците 21-гидроксилазы.

Стероид 21-гидроксилаза человека получена нами в клетках насекомых с использованием рекомбинантных бакуловирусов. Высокий выход активного фермента позволяет рассматривать бакуловирусную систему экспрессии как перспективную для синтеза CYP21A2 в культивируемых клетках насекомых и функционального анализа мутаций.

ВЫВОДЫ

1. Анализ каталитической активности мутантных вариантов стероид 21-гидроксилазы человека C169R, G178R W302R и R426C, проведенный в системе клеток млекопитающих *COS-7*, показал, что все они неактивны в отношении двух субстратов фермента – 17ОНП и прогестерона.
2. Установлено, что инактивирующий эффект в случае всех исследуемых миссенс-мутаций не связан с нарушением биосинтеза, внутриклеточной локализации и общей укладки молекулы стероид 21-гидроксилазы в клетках *COS-7*.
3. Получена рекомбинантная функционально-активная стероид 21-гидроксилаза с высоким уровнем экспрессии в клетках насекомых *Sf9* и *Hi5* с использованием рекомбинантных бакуловирусов.
4. Проведен анализ каталитической активности мутантного варианта C169R в микросомных препаратах из клеток *Hi5*. Результаты исследования совпадают с результатами, полученными на интактных клетках *COS-7*, и свидетельствуют о практически полном отсутствии активности в отношении двух субстратов фермента - 17ОНП и прогестерона, не связанном со снижением уровня синтеза мутантного белка или нарушением его внутриклеточной локализации.
5. В результате моделирования влияния миссенс-мутаций на трехмерную структуру молекулы стероид 21-гидроксилазы предложены возможные механизмы инактивации фермента, наблюдаемой *in vitro*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи:

1. Королева Н.Н., Гришук Ю.В., Кочеткова С.В., Прасолов В.С., Рубцов П.М. и Белжеларская С.Н. Оптимизация бакуловирусной системы доставки генов в клетки насекомых и млекопитающих.// Молекулярная биология.- 2006.-Т.40.-№6.-С.1074-1081.
2. Yu.Grischuk, P.Rubtsov, F.Riepe, J.Grotzinger, S.Beljelarskaya, V.Prassolov, N.Kalintchenko, T.Semitcheva, V.Peterkova, A.Tiulpakov, W. G. Sippell and N.Krone. Four novel missense mutations in the *CYP21A2* gene in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH): identification, functional characterization and structural analysis.// J Clin Endocrin & Metab.- 2006.-V.91.-I.12.-P.4976-4980.
3. Гришук Ю.В, П.М. Рубцов и С.Н. Белжеларская. Экспрессия гена стероид 21-гидроксилазы человека и его мутантного варианта C169R в клетках насекомых и функциональный анализ продуктов экспрессии.// Молекулярная биология.- 2007.-Т.41.-№1.-С.71-78.

Тезисы конференций:

S. N. Beljelarskaya, Yu.V. Grischuk, N.N. Koroleva, S.N. Kochetkov and P.M. Rubtsov. Efficient gene transfer into insect and mammalian cells by baculovirus vectors for production of functional human steroid-21-hydroxylase and hepatitis C virus proteins in insect and mammalian cells. 7th International Engelhardt Conference on Molecular Biology, Susdal, 2004.

Белжеларская СН, Гришук ЮВ, Королева НН, Кочетков СН и Рубцов ПМ. Оптимизация бакуловирусной системы доставки генов в клетки насекомых и млекопитающих. XVII Зимняя школа для молодых ученых, Институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва, 2005, с. 56.

Гришук ЮВ, Белжеларская СН, Иванов ДС, Прасолов ВС, Рубцов ПМ. Изучение мутаций в гене стероид 21-гидроксилазы с использованием систем экспрессии на основе клеток насекомых и млекопитающих. 9 международная конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2005, с.15.

Y.V.Grischuk, D.S. Ivanov, V.S. Prassolov, S.N. Beljelarskaya and P.M.Rubtsov. Two novel disease-causing mutations in the CYP21 gene in Russian patients with 21-hydroxylase deficiency: affect on functional enzyme activity. 30th FEBS Congress-9th IUBMB Conference, Budapest, 2005.

Заказ № 136/11/06 Подписано в печать 15.11.2006 Тираж 100 экз. Усл. п.л. 1,5



ООО "Цифровичок", тел. (495) 797-75-76; (495) 778-22-20
www.cfr.ru ; [e-mail: info@cfr.ru](mailto:info@cfr.ru)

