

ISSN 1561-8323 (Print)  
ISSN 2524-2431 (Online)

**ХИМИЯ**  
**CHEMISTRY**

УДК 577.151.4  
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-4-423-431>

Поступило в редакцию 25.04.2018  
Received 25.04.2018

**Я. В. Диченко<sup>1</sup>, Е. С. Гудный<sup>2</sup>, член-корреспондент С. А. Усанов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*  
<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЦИТОХРОМА P450 7B1 ЧЕЛОВЕКА  
С АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНОЙ Phe470Ile**

**Аннотация.** С целью изучения влияния аминокислотной замены Phe470Ile, коррелирующей с возникновением спастической параплегии типа 5, на пространственную структуру цитохрома P450 7B1 человека построены компьютерные модели данного фермента и его варианта с соответствующей мутацией. Установлено, что Phe470 не влияет напрямую на каталитические свойства фермента в силу того, что он локализован далеко от активного центра фермента. Однако расположение 470 остатка в высоко консервативной области белка свидетельствует о его важной роли в формировании корректной пространственной структуры исследуемой стероид 7 $\alpha$ -гидроксилазы. В частности, аминокислотная замена Phe470Ile приводит к увеличению жесткости и, как следствие этого, стабильности пространственной структуры CYP7B1, что может являться причиной изменения профиля гидроксилазной активности фермента по отношению к нейростероидам.

**Ключевые слова:** цитохром P450 7B1 человека (CYP7B1), спастическая параплегия типа 5, ускоренная молекулярная динамика, стабильность белковой глобулы, метод главных компонент

**Для цитирования.** Диченко, Я. В. Структурные особенности цитохрома P450 7B1 человека с аминокислотной заменой Phe470Ile / Я. В. Диченко, Е. С. Гудный, С. А. Усанов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2018. – Т. 62, № 4. – С. 423–431. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-4-423-431>

**Yaraslau V. Dzichenka<sup>1</sup>, Eugene S. Gudny<sup>2</sup>, Corresponding Member Sergei A. Usanov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*  
<sup>2</sup>*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

**STRUCTURAL FEATURES OF HUMAN CYTOCHROME P450 7B1  
WITH AN AMINO ACID SUBSTITUTION OF Phe470Ile**

**Abstract.** To study the influence of the amino acid substitution of Phe470Ile, correlating with the spastic paraplegia of type 5, on the structure of human cytochrome P450 7B1, the spatial full-atomic models of this enzyme and its mutant form were created. It was found that Phe470 does not influence directly the catalytic properties of the enzyme because of its localization far from the active site. It was shown that the residue under investigation belongs to a highly conservative region of the protein structure and can influence the CYP7B1 correct folding. In particular, the amino acid substitution of Phe470Ile increases rigidity and stability of sterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. This can be a reason of changes in the CYP7B1 hydroxylase activity in relation to neurosteroids.

**Keywords:** human cytochrome P450 7B1 (CYP7B1), spastic paraplegia type 5, accelerated molecular dynamics, stability of protein structure, principal component analysis

**For citation:** Dzichenka Y. V., Gudny E. S., Usanov S. A. Structural features of human cytochrome P450 7B1 with an amino acid substitution Phe470Ile. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 4, pp. 423–431 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2018-62-4-423-431>

**Введение.** Цитохром P450 7B1 (CYP7B1, EC 1.14.13.100) – гем-содержащий митохондриальный фермент, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме клеток [1] и катализирующий  $\alpha$ - и 7 $\alpha$ -гидроксилирование стероидов. CYP7B1 экспрессируется клетками многих тканей и орга-

нов, при этом больше всего CYP7B1 синтезируется в печени и мозге, в то же время уровень фермента в клетках почек, сердца, селезенки, семенников, предстательной железы, толстого и тонкого кишечника значительно ниже [2]. Локализация данного гемопротеида в организме связана с многообразием функций, осуществляемых им в различных тканях – альтернативный путь биосинтеза желчных кислот, метаболизм нейростероидов, половых гормонов, регуляция активности макрофагов [3–6].

Мутации в гене, кодирующем CYP7B1, приводят к возникновению патологий печени и нервной системы [1]. Всего к настоящему времени известно 12 точечных аминокислотных замен CYP7B1, из которых 4 несмысловые (R63X, R112X, Y275X, R388X) и 8 смысловые (G57R, F216S, T297A, S363F, R417H, R417C, F470I, R486C) [7]. В результате некоторых из этих мутаций повышается уровень гепатотоксичных желчных кислот, не содержащих гидроксильной группы в 7 положении, что приводит к повреждению печени и летальному исходу [8]. Другие замены приводят к нейродегенеративным процессам в центральной нервной системе, результатом которых является спастическая параплегия 5-го типа (SPG5) [7] – наследственное ауточномное рецессивное заболевание, характеризующееся прогрессирующим спастическим парапарезом нижних конечностей и общей слабостью, вызванной дегенерацией нейронов пирамидного пути [9]. Кроме того, в ряде работ показана взаимосвязь между уровнем экспрессии CYP7B1 и развитием болезни Альцгеймера [10], рака простаты [11] и ревматоидного артрита [12].

Причины возникновения данных заболеваний на молекулярном уровне до сих пор не установлены. Во многом это связано с недостатком информации о механизме функционирования CYP7B1 в норме и при патологии, в частности, до сих пор не разрешена пространственная структура данного белка. Однако ранее уже были попытки изучить лиганд-связывающие свойства стероид 7 $\alpha$ -гидроксилазы с использованием современных методов компьютерного моделирования [13; 14], что является разумной инициативой в условиях недостатка или невозможности получения экспериментальных данных. Недостатком упомянутых работ является то, что в них рассматривалось только влияние точечных аминокислотных замен на каталитические свойства стероид 7-гидроксилазы. В то же время связь структурных особенностей с определенными мутациями CYP7B1 выявлена не была.

Цель данной работы заключается в анализе структурных особенностей цитохрома P450 7B1 и его варианта с аминокислотной заменой Phe470Ile (CYP7B1\_F470I) с использованием методов компьютерного моделирования.

**Материалы и методы исследования.** Компьютерную модель CYP7B1 строили с использованием сервера I-TASSER [15]. Пространственную структуру мутантной формы фермента конструировали заменой соответствующего аминокислотного остатка и последующим уравниванием системы по протоколу, описанному ниже.

Предсказание влияния точечной мутации на стабильность пространственной структуры CYP7B1 осуществляли с использованием сервера SDM [16], а также молекулярной динамики. Для моделирования 200 нс эволюции системы использовали метод ускоренной молекулярной динамики (accelerated Molecular Dynamics – aMD), суть которого заключается в изменении потенциала взаимодействия для ускорения перехода системы в новое состояние и покрытия большего конформационного пространства молекулы. Протокол эксперимента включал в себя следующие стадии: подготовка системы, минимизация, нагрев, уравнивание, свободная динамика, ускоренная динамика.

Для уравнивания системы, а также для расчета параметров aMD, полученные *in silico* структуры вначале минимизировали в течение 4000 шагов (2000 шагов с наложением пространственных ограничений на движение атомов белка (10 ккал/(моль · Å<sup>2</sup>)) и 2000 шагов без ограничений) и нагревали до температуры 298 К в течение 500 пс (NVT ансамбль). После этого моделировали свободную динамику на временном промежутке 5,5 нс (NPT ансамбль), причем 500 пс не учитывали при расчете параметров aMD, так как в это время происходило уравнивание системы.

Эксперимент проводили с использованием программного пакета Amber 16 (силовое поле ff14SB). Имитацию растворителя и физиологических условий осуществляли путем помещения молекулы белка в октаэдр, заполненный молекулами воды (трехточечная модель TIP3P), и добав-

ления в систему ионов натрия и хлора. Объем растворителя моделировали с использованием периодических граничных условий. Эксперимент проводили в изотермических условиях при  $T = 298$  К (для этого применяли коллизионный термостат с частотой столкновений  $1 \text{ ps}^{-1}$ ). Постоянное давление  $p = 1$  атм поддерживалось при помощи внешнего баростата. На всех этапах граничный радиус учета невалентных взаимодействий составлял  $10 \text{ \AA}$ .

Анализ траекторий молекулярной динамики осуществляли с использованием собственных сценариев, написанных на языке Python3: для непосредственной обработки данных молекулярного моделирования применяли библиотеку `ruTraj v.2.0.2.`; для визуализации результатов использовали библиотеку `matplotlib v.2.2.2.` Визуализацию пространственных структур белков и лигандов осуществляли в программе `Chimera v.1.11.2` [16].

**Результаты и их обсуждение.** Phe470 является консервативным аминокислотным остатком, представленным у всех стероид  $7\alpha$ -гидроксилаз [17]. Анализ пространственной структуры CYP7B1 (рис. 1, *a*) свидетельствует о том, что данный остаток локализован в  $\beta$ -слое 3–3 достаточно далеко от активного центра фермента: расстояние между  $C_\alpha$  атомом Phe470 и атомом  $\text{Fe}^{3+}$  гема составляет  $29 \text{ \AA}$ . Phe470 образует внутримолекулярные контакты с Leu169, Leu466, Tyr469, Asp471, Leu472, Lys503, Val504, Lys505 и Tyr502 (рис. 1, *b*, остатки выделены синим цветом), причем в последнем случае реализуется стэкинг-взаимодействие, которое сохраняется в процессе  $200 \text{ ns}$  молекулярной динамики: среднее значение величины двугранного угла между плоскостями ароматических фрагментов составляет  $5,7^\circ$ , а расстояния –  $5,5 \text{ \AA}$ . Все указанные аминокислотные остатки, за исключением Val504, являются консервативными (табл. 1), причем Tyr502, Lys503 и Lys505 сохраняются у всех стероид  $7\alpha$ -гидроксилаз, а Leu466, Asp471, Leu472 только

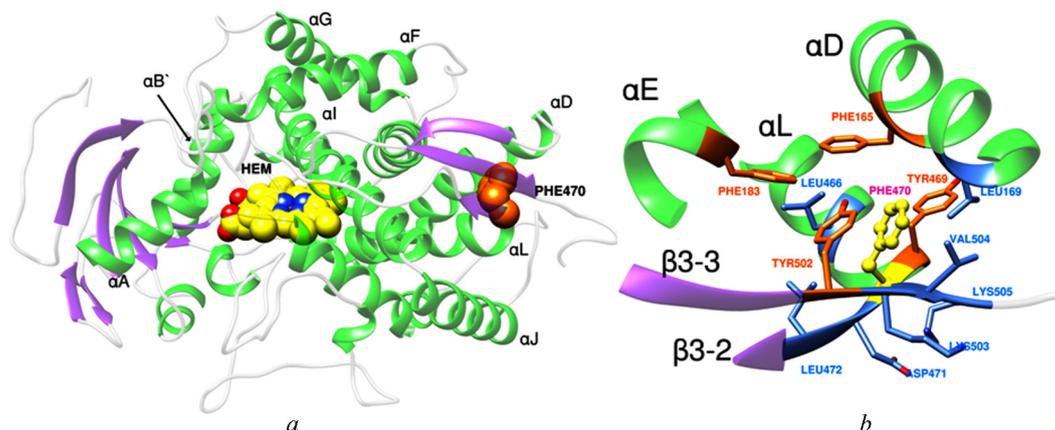


Рис. 1. Пространственная структура CYP7B1 (*a*) и фрагмент пространственной структуры (*b*), содержащий Phe470, с обозначением аминокислотных остатков, образующих с ним контакты

Fig. 1. Spatial structure of CYP7B1 (*a*) and fragment of the structure of the enzyme (*b*), which contains Phe470. Residues that form contacts with Phe470 are marked

Т а б л и ц а 1. Аминокислотные остатки, образующие контакты с Phe470

T a b l e 1. Amino acid residues forming contacts with Phe470

Аминокислотный остаток Amino acid residue	Локализация Localization	Сохраняется у Conserved for	Расстояние, $\text{\AA}$ Distance, $\text{\AA}$	
			CYP7B1	CYP7B1_F470I
Leu169	$\alpha$ -спираль D	CYP7B1, CYP39A1	$8,3 \pm 0,6$	$8,0 \pm 0,7$
Leu466	$\alpha$ -спираль L	CYP7B1	$5,8 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,3$
Tyr469	$\alpha$ -спираль L	CYP7	$3,9 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$
Asp471	$\beta$ -слой 3–2	CYP7B1	$3,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$
Leu472	$\beta$ -слой 3–2	CYP7B1	$6,2 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,2$
Tyr502	$\beta$ -слой 3–3	Стероид $7\alpha$ -гидроксилаз	$6,4 \pm 0,3$	$6,7 \pm 0,2$
Lys503	$\beta$ -слой 3–3	Стероид $7\alpha$ -гидроксилаз	$5,5 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$
Val504	$\beta$ -слой 3–3	–	$4,5 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,2$
Lys505	$\beta$ -слой 3–3	Стероид $7\alpha$ -гидроксилаз	$5,0 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,4$

у СУР7В1. Кроме того, следует отметить, что Tyr469 и Tyr502 вместе с Phe165 ( $\alpha$ -спираль, сохраняется у СУР7В1) и Phe183 ( $\alpha$ -спираль E, сохраняется у СУР7) образуют кластер ароматических аминокислотных остатков (выделены оранжевым цветом на рисунке) вокруг С-конца  $\alpha$ -спирали L (рис. 1, b). Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что аминокислотная замена в 470 положении может иметь значительное влияние на пространственную структуру СУР7В1.

Для оценки локальных изменений физико-химических свойств белка в результате замены Phe на Pe проводили анализ факторов Кайдера (Kidera factors) [18] – минимальный набор параметров, описывающих физико-химические и конформационные свойства аминокислотных остатков (табл. 2). Расчет осуществляли для  $k$ -мер (подпоследовательностей длины  $k$ , в данной работе  $k = 9$ ) аминокислотных последовательностей обоих белков.

Т а б л и ц а 2. Факторы Кайдера и соответствующие им евклидовы метрики, рассчитанные для СУР7В1 и СУР7В1\_F470I

Table 2. Kaidera's factors and their appropriate Euclidean metrics calculated for СУР7В1 and СУР7В1\_F470I

Фактор Factor	Евклидова метрика Euclidean metric
1. Тенденция к формированию $\alpha$ -спирали/ $\beta$ -цепи	0,17
2. Размер боковой цепи	0,38
3. Тенденция к формированию $\beta$ -слоя	0,72
4. Гидрофобность	0,22
5. Тенденция к формированию двойного изгиба	0,25
6. Парциальный объем	0,28
7. Тенденция к формированию плоской структуры	0,50
8. Частота встречаемости в $\alpha$ -спирали	0,20
9. рК диссоциации карбоксильной группы	0,35
10. Гидрофобность аминокислоты в белковом окружении	0,45

Согласно полученным данным, замена Phe470Pe является причиной локального изменения ряда физико-химических и конформационных свойств белка (табл. 2). Так, в результате мутации молекулярный объем 470 аминокислотного остатка уменьшается на 14 % (фактор 2), что приводит к появлению полости внутри белковой глобулы и для Pe470 становится возможным движение «внутри» белка. Также очевидно, что у мутантной формы СУР7В1 пропадает стэкинг-взаимодействие с Tyr502. Помимо этого, установлено, что в случае изолейцина, по сравнению с фенилаланином, выше тенденция к формированию  $\beta$ -слоя (фактор 3) – элемента вторичной структуры, увеличивающего стабильность белка в целом. В результате анализа также показано, что для Pe470 снижается рК диссоциации карбоксильной группы (фактор 9) и уменьшается параметр его гидрофобности при локализации внутри белка (фактор 10).

Предсказание влияния исследуемой мутации на структуру СУР7В1 осуществляли также с использованием сервера SDM. Полученные результаты свидетельствуют о том, что замена Phe470 на Pe приводит к увеличению стабильности белка (псевдо  $\Delta\Delta G = 0,36$ , относительно нулевого уровня для исходного белка). Кроме того, также увеличивается процент поверхности аминокислотного остатка, доступной растворителю: 0,9 % для СУР7В1 и 1,3 % для СУР7В1\_F470I.

Анализ особенностей пространственной укладки СУР7В1 и СУР7В1\_F470I, проведенный с использованием метода ускоренной молекулярной динамики, показал, что в целом структуры обоих ферментов остаются стабильными в течение всего времени эксперимента. На это указывают кривые изменения полной энергии молекулы (рис. 2, a) и среднеквадратичного отклонения (СКО) относительно начального положения (рис. 2, b), при этом на графике зависимости СКО от времени соответствующая кривая для мутантной формы лежит ниже кривой для дикого типа, что свидетельствует о большей жесткости структуры в первом случае. Интересно, что значимых различий в величине полной энергии (рис. 2, a) в процессе динамики при этом не наблюдается.

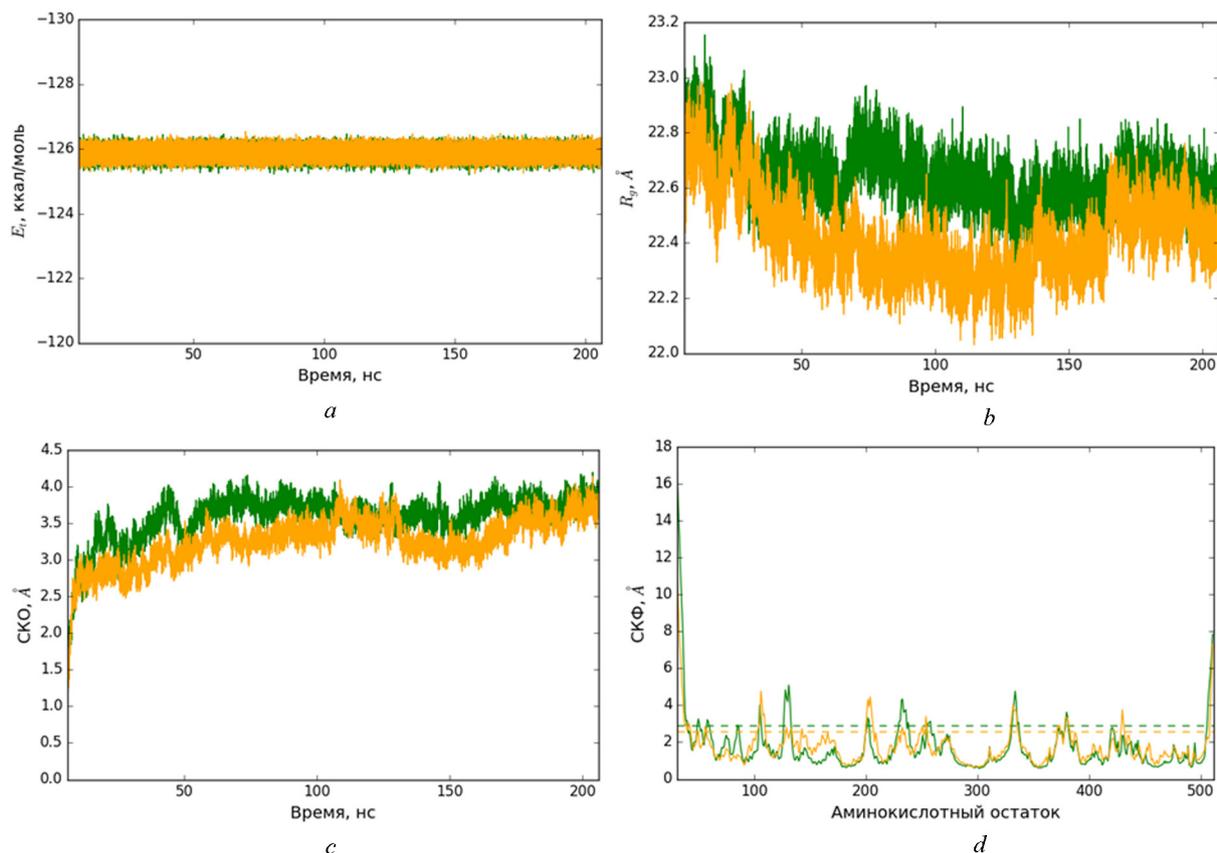


Рис. 2. Результаты расчета полной энергии молекул (а), среднеквадратичного отклонения, относительно начального положения аМД (b), радиуса гирации (с) и среднеквадратичной флуктуации атомов (d) для СYP7B1 (зеленый) и СYP7B1\_F470I (оранжевый)

Fig. 2. Results of calculation of total molecule energy (a), root-mean-square deviation towards first frame of aMD (b), radius of gyration (c) and root-mean-square fluctuation of atoms (d) for CYP7B1 (green) and CYP7B1\_F470I (orange)

В пользу стабильности построенных моделей свидетельствуют также результаты расчета радиусов гирации (рис. 2, c) для СYP7B1\_WT и СYP7B1\_F470I: соответствующие величины снижаются в обоих случаях с течением времени. Однако, согласно полученным результатам, введение мутации в структуру СYP7B1 приводит к увеличению компактности молекулы: для СYP7B1\_F470I радиус гирации на большей части траектории меньше, чем для исходного белка.

Наибольшей подвижностью, согласно рассчитанным величинам среднеквадратичной флуктуации (СКФ)  $C_{\alpha}$  атомов основной цепи (рис. 2, d), обладают аминокислотные остатки, формирующие N- и C-концевые фрагменты белков (31–41, 507–512 для СYP7B1\_WT и 31–42, 508–512 для СYP7B1\_F470I, нумерация здесь и далее согласно положениям соответствующих аминокислотных остатков в полноразмерном белке). Так как данные мажорные движения могут давать существенный вклад в результаты анализа МД траектории, все расчеты проводились без их учета. Относительно большие значения величин СКФ (больше стандартного отклонения от медианного значения) также наблюдаются для атомов аминокислотных остатков 127–134, 230–239, 331–338 (СYP7B1\_WT) и 104–111, 200–208, 330–337, 375–379 (СYP7B1\_F470I) соответственно. Согласно структурным данным, указанные остатки принадлежат петлям, экспонированным на поверхности соответствующих белков, что и обуславливает их высокую подвижность.

Как было указано выше, Phe470 взаимодействует с рядом аминокислотных остатков в структуре СYP7B1. Сравнение расстояний между атомами  $C_{\alpha}^{470}-C_{\alpha}^i$  ( $i$  – номер аминокислотного остатка, с которым Phe470 образует контакты) для исходного белка и мутантной формы свидетельствует о том, что замена Phe470Ile не приводит к значительному изменению расстояния между рассматриваемыми остатками (табл. 1), что свидетельствует в пользу стабильности струк-

тур CYP7B1\_F470I и CYP7B1\_WT. Однако тот факт, что расстояние между  $C_{\alpha}^{470}$  и  $C_{\alpha}^{169}$ ,  $C_{\alpha}^{466}$  и атомом железа гема меньше для CYP7B1\_F470I, указывает на увеличение компактности белковой глобулы. Интересно отметить, что для мутантной формы величина расстояния  $C_{\alpha}^{470}$ –Fe ( $28,1 \pm 0,8 \text{ \AA}$ ) ближе к начальному значению, приведенному выше, чем для исходного фермента ( $31,7 \pm 0,7 \text{ \AA}$ ), что свидетельствует в пользу большей жесткости структуры CYP7B1\_F470I.

Для получения представления о способности белков существовать в различных конформациях, результаты молекулярной динамики дополнительно анализировали с использованием метода главных компонент. Исходя из графиков полной дисперсии собственных значений установлено, что основная часть всех движений (не менее 90 %) в моделях как CYP7B1, так и CYP7B1\_F470I в процессе динамики описываются при помощи 2 первых главных компонент (рис. 3, *a*). Проекция снимков траектории на плоскость, сформированную этими компонентами (рис. 3, *a* на вставке) представляет собой набор точек, имеющий U-образную форму. Это означает, что как для CYP7B1, так и для CYP7B1\_F470I в процессе молекулярной динамики отсутствуют значительные структурные изменения, способные привести к заикливанию модели в глубокой потенциальной яме. Это также подтверждают результаты, полученные при анализе поверхности потенциальной энергии (ППЭ) (рис. 3, *b*) для обеих структур и парного среднееквдратичного отклонения (рис. 3, *c*) в процессе молекулярной динамики. Так, формы потенциальной ямы на ППЭ практически совпадают как для CYP7B1, так и для CYP7B1\_F470I: присутствует только один глубокий минимум, однако путь к нему, а также конечное состояние немного отличаются в силу изменения подвижности частей белка друг относительно друга в результате мутации. Согласно результатам расчетов парного среднееквдратичного отклонения, также можно заключить о стабильности моделей CYP7B1 и CYP7B1\_F470I, но в то же время можно говорить о том, что структура мутантного белка менее подвержена внутримолекулярным движениям на начальных этапах динамики.

Анализ вклада отдельных аминокислотных остатков позволяет заключить, что в случае CYP7B1 наибольший вклад в первые две главные компоненты вносят движения аминокислотных остатков (рис. 4), принадлежащие, в основном, неструктурированным участкам последовательности. Соотнесение полученных результатов с пространственной структурой фермента

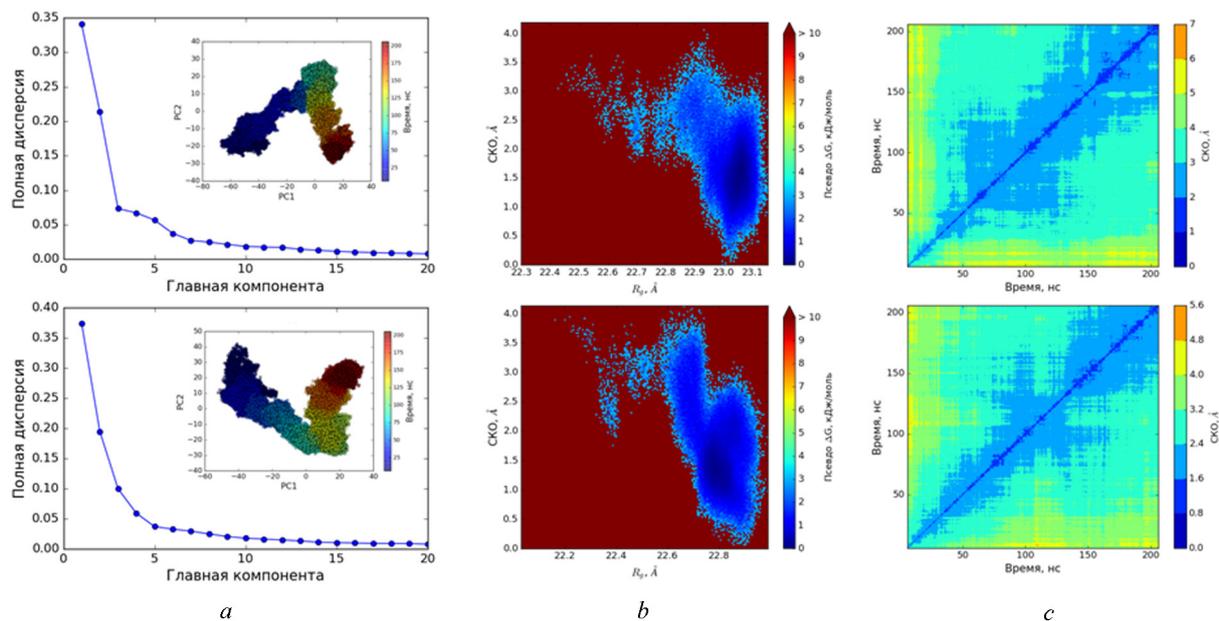


Рис. 3. Результаты анализа траекторий молекулярной динамики для CYP7B1 (верхний ряд) и CYP7B1\_F470I (нижний ряд) с использованием метода главных компонент (*a*), поверхности потенциальной энергии молекул (*b*) и парного среднееквдратичного отклонения относительно начального этапа aMD (*c*)

Fig. 3. Results of the analysis of molecular dynamics simulation for CYP7B1 (upper) and CYP7B1\_F470I (lower) by using of principal component analysis approach (*a*), free energy surface approach (*b*) and pairwise root-mean-square deviation towards first frame of aMD (*c*)

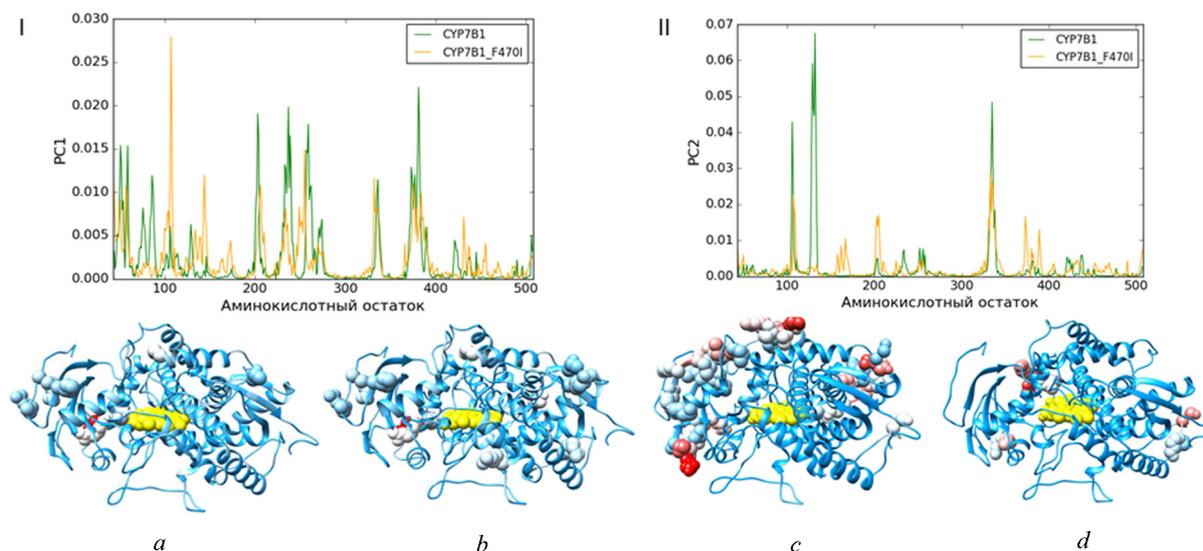


Рис. 4. Вклад отдельных аминокислотных остатков CYP7B1 (*a, c*) и CYP7B1\_F470I (*b, d*) в первую (I) и вторую (II) главные компоненты. Структуры белков раскрашены исходя из вклада отдельных аминокислотных остатков в соответствующую главную компоненту (минимум – синий цвет, максимум – красный). Желтым цветом выделен гем  
 Fig. 4. Contribution of individual amino acid residues of CYP7B1 (*a, c*) and CYP7B1\_F470I (*b, d*) in first (I) and second (II) principal components. Structures of the enzymes are colored according to this contribution (blue – min, red – max). Heme is colored in yellow

(рис. 4) указывает на то, что во всех рассматриваемых движениях участвуют структурные элементы стероид 7 $\alpha$ -гидроксилазы, локализованные на внешней поверхности белка. Причем наибольшей амплитудой обладают остатки, формирующие канал доступа в активный центр CYP7B1. В случае же мутантной формы амплитуда соответствующих движений меньше, чем для исходного белка (рис. 4). Кроме того, анализ полученных результатов показывает, что у CYP7B1\_F470I некоторые аминокислотные остатки не дают вклад в соответствующую главную компоненту, в отличие от CYP7B1 (120–130, 230–240 и т. д.). Все это позволяет сделать вывод об увеличении жесткости пространственной структуры фермента с аминокислотной заменой Phe470Ile.

**Заключение.** В результате проведенной работы построены компьютерные модели цитохрома P450 7B1 и его мутантной формы с аминокислотной заменой Phe470Ile. Показано, что Phe470 локализован далеко от активного центра CYP7B1 и, таким образом, не может напрямую влиять на каталитические свойства фермента. В то же время установлено, что он образует сеть внутримолекулярных контактов с высоко консервативными остатками и, следовательно, является важным для формирования правильной пространственной укладки исследуемой стероид 7 $\alpha$ -гидроксилазы.

С использованием статистического подхода для анализа влияния точечной мутации на структуру белка, а также метода ускоренной молекулярной динамики показано, что мутация Phe470Ile увеличивает стабильность CYP7B1. При этом исследуемая замена не приводит к значительным изменениям пространственной структуры фермента: молекула CYP7B1\_F470I более компактная по сравнению с CYP7B1, а также обладает меньшей подвижностью отдельных элементов белка друг относительно друга. Полученный результат свидетельствует об увеличении жесткости и, как следствие этого, стабильности пространственной структуры стероид 7 $\alpha$ -гидроксилазы.

Полученные результаты могут быть использованы для изучения каталитических свойств цитохрома P450 7B1 человека с аминокислотной заменой Phe470Ile, ответственной за возникновение спастической парализации типа 5.

**Благодарности.** Коллектив авторов выражает благодарность мл. науч. сотр. лаборатории белковой инженерии М. А. Шапиро за помощь в анализе полученных данных.

**Acknowledgments.** Authors acknowledge M. A. Shapira for assistance in analyzing the data obtained.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. CYP7B1: one cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions / A. R. Stiles [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284, N 42. – P. 28485–28489. <https://doi.org/10.1074/jbc.r109.042168>
2. Structure and functions of human oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1 / Z. Wu [et al.] // *J. Lipid. Res.* – 1999. – Vol. 40, N 12. – P. 2195–2203.
3. Cyp7b1 catalyses the 7 $\alpha$ -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate / C. Martin [et al.] // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 355, N 2. – P. 509–515. <https://doi.org/10.1042/bj3550509>
4. Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy pregnenolone / K. A. Rose [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94, N 10. – P. 4925–4930. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4925>
5. Immunohistochemical detection of the human cytochrome P4507B1: production of a monoclonal antibody after cDNA immunization / C. Trap [et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 2005. – Vol. 159, N 1–2. – P. 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.09.019>
6. An endocrine pathway in the prostate, ER $\beta$ , AR, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol, and CYP7B1, regulates prostate growth / Z. Weihua [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2002. – Vol. 99, N 21. – P. 13589–13594. <https://doi.org/10.1073/pnas.162477299>
7. Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration / M. K. Tsaousidou [et al.] // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. – Vol. 82, N 2. – P. 510–515. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.001>
8. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease / K. D. Setchell [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1998. – Vol. 102, N 9. – P. 1690–1703. <https://doi.org/10.1172/jci2962>
9. Analysis of CYP7B1 in non-consanguineous cases of hereditary spastic paraplegia / R. Schule [et al.] // *Neurogenetics.* – 2009. – Vol. 10, N 2. – P. 97–104. <https://doi.org/10.1007/s10048-008-0158-9>
10. Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease / J. L. Yau [et al.] // *Neuroscience.* – 2003. – Vol. 121, N 2. – P. 307–314. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00438-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00438-x)
11. Regulation and expression of human CYP7B1 in prostate: overexpression of CYP7B1 during progression of prostatic adenocarcinoma / M. Olsson [et al.] // *Prostate.* – 2007. – Vol. 67, N 13. – P. 1439–1446. <https://doi.org/10.1002/pros.20630>
12. CYP7B expression and activity in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis: regulation by proinflammatory cytokines / J. Dulos [et al.] // *Arthritis Rheum.* – 2005. – Vol. 52, N 3. – P. 770–778. <https://doi.org/10.1002/art.20950>
13. Siam, A. Comparative modeling of 25-hydroxycholesterol-7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7B1): ligand binding and analysis of hereditary spastic paraplegia type 5 CYP7B1 mutations / A. Siam, A. Brancale, C. Simons // *J. Mol. Model.* – 2011. – Vol. 18, N 2. – P. 441–453. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1084-6>
14. Structural and dynamic basis of human cytochrome P450 7B1: a survey of substrate selectivity and major active site access channels / Y. L. Cui [et al.] // *Chemistry.* – 2012. – Vol. 19, N 2. – P. 549–557. <https://doi.org/10.1002/chem.201202627>
15. Zhang, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction / Y. Zhang // *BMC Bioinformatics.* – 2008. – Vol. 9, N 1. – P. 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
16. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2004. – Vol. 25, N 13. – P. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
17. Human steroid and oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase CYP7B1: substrate specificity, azole binding and misfolding of clinically relevant mutants / A. V. Yantsevich [et al.] // *FEBS J.* – 2014. – Vol. 281, N 6. – P. 1700–1713. <https://doi.org/10.1111/febs.12733>
18. Statistical analysis of the physical properties of the 20 naturally occurring amino acids / A. Kidera [et al.] // *J. Prot. Chem.* – 1985. – Vol. 4, N 1. – P. 23–55. <https://doi.org/10.1007/bf01025492>

## References

1. Stiles A. R., McDonald J. G., Bauman D. R., Russell D. W. CYP7B1: one cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no. 42, pp. 28485–28489. <https://doi.org/10.1074/jbc.r109.042168>
2. Wu Z., Martin K. O., Javitt N. B., Chiang J. Y. Structure and functions of human oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. *Journal of Lipid Research*, 1999, vol. 40, no. 12, pp. 2195–2203.
3. Martin C., Bean R., Rose K., Habib F., Seckl J. Cyp7b1 catalyses the 7 $\alpha$ -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate. *Biochemical Journal*, 2001, vol. 355, no. 2, pp. 509–515. <https://doi.org/10.1042/bj3550509>
4. Rose K. A., Stapleton G., Dott K., Kiény M. P., Best R., Schwarz M., Russell D. W., Björkhem I., Seckl J., Lathe R. Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 $\alpha$ -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 $\alpha$ -hydroxy pregnenolone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997, vol. 94, no. 10, pp. 4925–4930. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4925>
5. Trap C., Nato F., Chalbot S., Kim S. B., Lafaye P., Morfin R. Immunohistochemical detection of the human cytochrome P4507B1: production of a monoclonal antibody after cDNA immunization. *Journal of Neuroimmunology*, 2005, vol. 159, no. 1–2, pp. 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.09.019>

6. Weihua Z., Lathe R., Warner M., Gustafsson J. A. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2002, vol. 99, no. 21, pp. 13589–13594. <https://doi.org/10.1073/pnas.162477299>
7. Tsaousidou M. K., Ouahchi K., Warner T. T., Yang Y., Simpson M. A., Laing N. G., Wilkinson P. A., Madrid R. E., Patel H., Hentati F., Patton M. A., Hentati A., Lamont P. J., Siddique T., Crosby A. H. Sequence alterations within CYP7B1 implicate defective cholesterol homeostasis in motor-neuron degeneration. *American Journal of Human Genetics*, 2008, vol. 82, no. 2, pp. 510–515. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.10.001>
8. Setchell K. D., Schwarz M., O'Connell N. C., Lund E. G., Davis D. L., Lathe R., Thompson H. R., Weslie Tyson R., Sokol R. J., Russell D. W. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7alpha-hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, vol. 102, no. 9, pp. 1690–1703. <https://doi.org/10.1172/jci2962>
9. Schüle R., Brandt E., Karle K. N., Tsaousidou M., Klebe S., Klimpe S., Auer-Grumbach M., Crosby A. H., Hübner C. A., Schöls L., Deufel T., Beetz C. Analysis of CYP7B1 in non-consanguineous cases of hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics*, 2009, vol. 10, no. 2, pp. 97–104. <https://doi.org/10.1007/s10048-008-0158-9>
10. Yau J. L., Rasmuson S., Andrew R., Graham M., Noble J., Olsson T., Fuchs E., Lathe R., Seckl J. R. Dehydroepiandrosterone 7-hydroxylase CYP7B: predominant expression in primate hippocampus and reduced expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2003, vol. 121, no. 2, pp. 307–314. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(03\)00438-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(03)00438-x)
11. Olsson M., Gustafsson O., Skogastierna C., Tolf A., Rietz B. D., Morfin R., Rane A., Ekström L. Regulation and expression of human CYP7B1 in prostate: overexpression of CYP7B1 during progression of prostatic adenocarcinoma. *Prostate*, 2007, vol. 67, no. 13, pp. 1439–1446. <https://doi.org/10.1002/pros.20630>
12. Dulos J., van der Vleuten M. A., Kavelaars A., Heijnen C. J., Boots A. M. CYP7B expression and activity in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis: regulation by proinflammatory cytokines. *Arthritis & Rheumatism*, 2005, vol. 52, no. 3, pp. 770–778. <https://doi.org/10.1002/art.20950>
13. Siam A., Brancale A., Simons C. Comparative modeling of 25-hydroxycholesterol-7alpha-hydroxylase (CYP7B1): ligand binding and analysis of hereditary spastic paraplegia type 5 CYP7B1 mutations. *Journal of Molecular Modeling*, 2011, vol. 18, no. 2, pp. 441–453. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1084-6>
14. Cui Y. L., Zhang J. L., Zheng Q. C., Niu R. J., Xu Y., Zhang H. X., Sun C. C. Structural and dynamic basis of human cytochrome P450 7B1: a survey of substrate selectivity and major active site access channels. *Chemistry*, 2012, vol. 19, no. 2, pp. 549–557. <https://doi.org/10.1002/chem.201202627>
15. Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9, no. 1, pp. 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
16. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C., Ferrin T. E. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
17. Yantsevich A. V., Dichenko Y. V., MacKenzie F., Mukha D. V., Baranovsky A. V., Gilep A. A., Usanov S. A., Strushkevich N. V. Human steroid and oxysterol 7alpha-hydroxylase CYP7B1: substrate specificity, azole binding and misfolding of clinically relevant mutants. *FEBS Journal*, 2014, vol. 281, no. 6, pp. 1700–1713. <https://doi.org/10.1111/febs.12733>
18. Kidera A., Konishi Y., Oka M., Ooi T., Scheraga H. A. Statistical analysis of the physical properties of the 20 naturally occurring amino acids. *Journal of Protein Chemistry*, 1985, vol. 4, no. 1, pp. 23–55. <https://doi.org/10.1007/bf01025492>

### Информация об авторах

Диченко Ярослав Владимирович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dichenko@iboch.by.

Гудный Евгений Сергеевич – студент. Белорусский государственный университет (ул. Курчатова, 10, 220045, Минск, Республика Беларусь). E-mail: etry@list.ru.

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

### Information about the authors

Dzichenka Yaraslau Uladzimiravich – Ph. D. (Chemistry), Senior Research. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dichenko@iboch.by.

Gudnyy Eugene Sergeevich – Student. Belarusian State University (10, Kurchatov Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: etry@list.ru.

Usanov Sergei Aleksandrovich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.