

**БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ**  
**BIOORGANIC CHEMISTRY**

УДК 577.112+577.151  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-4-327-337>

Поступила в редакцию 26.02.2025  
Received 26.02.2025

**М. И. Шаладонова, Я. В. Диченко, В. В. Щур, М. Травкина, С. А. Усанов**

*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

**ГАРМОНИЗАЦИЯ КОДОНОВ КАК СПОСОБ УВЕЛИЧЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ  
ФУНКЦИОНАЛЬНО-АКТИВНОГО CYP17A1 ЧЕЛОВЕКА**

**Аннотация.** CYP17A1 является ключевым ферментом в биосинтезе глюкокортикоидов и андрогенов, а дисфункция данного фермента сопровождается тяжелыми нарушениями в организме, в том числе гормон-зависимыми злокачественными новообразованиями (рак предстательной железы, рак молочной железы). Впервые проведена гармонизация нуклеотидной последовательности гена CYP17A1 человека и осуществлена оптимизация методики его выделения и очистки из бактериальных клеток различных штаммов. Установлено, что гармонизация кодонов гена, кодирующего CYP17A1 человека, позволяет увеличить уровень экспрессии целевого белка на 28 %. Проведенный анализ гармонизации кодонов позволил выявить, что редкими кодонами представлены только определенные аминокислоты (A, C, D, G, I, V, Y), также редкие кодоны встречаются в аминокислотных остатках активного центра белка. В ходе исследования доказано, что гармонизированный белок взаимодействует с природным субстратом CYP17A1 – прогестероном аналогично оптимизированному белку и обладает функциональной активностью. Полученные результаты дают основание считать, что гармонизация кодонов для CYP17A1 человека является методом, способным оптимизировать получение препаративных количеств терапевтически значимого фермента с сохранением его каталитической активности.

**Ключевые слова:** CYP17A1 человека, гармонизация кодонов, оптимизация кодонов, гетерологическая экспрессия, каталитическая активность, спектрофотометрическое титрование

**Для цитирования.** Гармонизация кодонов как способ увеличения уровня экспрессии функционально-активного CYP17A1 человека / М. И. Шаладонова, Я. В. Диченко, В. В. Щур [и др.] // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2025. – Т. 61, № 4. – С. 327–337. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-4-327-337>

**M. I. Shaladonova, Ya. V. Dzichenka, V. V. Shchur, M. Trawkina, S. A. Usanov**

*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus*

**CODON HARMONIZATION AS A WAY TO INCREASE THE EXPRESSION LEVEL  
OF FUNCTIONALLY ACTIVE HUMAN CYP17A1**

**Abstract.** CYP17A1 is a key enzyme in the biosynthesis of glucocorticoids and androgens, and its dysfunction is associated with severe disorders, including hormone-dependent malignant neoplasms (prostate cancer and breast cancer). In this study, the codon harmonization of the human CYP17A1 gene was performed for the first time, and the method for its expression and purification from bacterial cells of various strains was optimized. It was found that harmonization of codons of the gene encoding human CYP17A1 increases the expression level of the target protein by 28 %. The analysis of codon harmonization revealed that only certain amino acids (A, C, D, G, I, V, Y) are represented by rare codons, and rare codons are also found in the amino acid residues of the active center of the protein. The study demonstrated that the harmonized protein interacts with the natural substrate of CYP17A1, progesterone, similarly to the optimized protein and exhibits functional activity. The results obtained indicate that codon harmonization for human CYP17A1 is an effective approach for producing preparative quantities of the therapeutically significant enzyme while maintaining its catalytic activity.

**Keywords:** human CYP17A1, codon harmonization, codon optimization, heterologous expression, catalytic activity, spectrophotometric titration

**For citation.** Shaladonova M. I., Dzichenka Ya. V., Shchur V. V., Trawkina M., Usanov S. A. Codon harmonization as a way to increase the expression level of functionally active human CYP17A1. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2025, vol. 61, no. 4, pp. 327–337 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-4-327-337>

**Введение** CYP17A1 человека (17 $\alpha$ -гидроксилаза/17,20-лиаза, EC 1.14.14.19/EC 1.14.14.32) представляет собой фермент-монооксигеназу, относится к суперсемейству цитохромов P450 и участвует в реакциях биосинтеза стероидных гормонов в мембранах эндоплазматической сети стероидогенных органов и тканей. CYP17A1 является ключевым ферментом в биосинтезе глюкокортикоидов и андрогенов, а дисфункция данного фермента сопровождается такими тяжелыми нарушениями в организме, как гормон-зависимые злокачественные новообразования (рак предстательной железы, рак молочной железы, синдром Кушинга, синдром поликистозных яичников). В литературе описаны ингибиторы CYP17A1 для лечения рака предстательной железы (абиратерона ацетат) и синдрома Кушинга (левокетоназол), позволяющие снизить уровень андрогенов и глюкокортикоидов в крови соответственно. Однако для вышеуказанных лекарственных препаратов свойственны серьезные побочные эффекты: артериальная гипертензия, гепатотоксичность, гипокалиемия, периферические отеки, что может приводить к сердечной недостаточности. В связи с этим является перспективным изучение новых селективных ингибиторов фермента [1]. Для проведения высокопроизводительного лабораторного скрининга новых ингибиторов CYP17A1 человека необходимо достаточное количество белка, который получают методом гетерологической экспрессии в клетках *Escherichia coli*. Согласно литературным данным максимальный уровень экспрессии «растворимой» (транскированной) формы CYP17A1 человека составляет около 25 мг на 1 л культуральной жидкости. Для полноразмерного фермента уровень экспрессии более низкий в связи с трудностью выделения и очистки белка, содержащего гидрофобный трансмембранный сегмент [2, 3].

Гармонизация кодонов представляет собой замену кодонов в соответствующем гене таким образом, чтобы их частоты встречаемости в микроорганизме, который используется для гетерологической экспрессии, были приблизительно такие же, как и в организме, из которого получен ген [4]. Наличие редких кодов в последовательности приводит к снижению скорости трансляции. В свою очередь, снижение скорости трансляции позволяет корректно сформировать вторичную и третичную структуры кодируемого белка, обеспечивающую его функцию, и повысить выход функционально-активного фермента [5, 6]. В научной литературе имеются неоднократные сведения о том, что использование гармонизации кодонов в генах, кодирующих мембранные белки, позволяет увеличить уровень экспрессии белка по сравнению с оптимизированной либо нативной последовательностью. Однако также было показано, что в некоторых случаях уровень экспрессии, наоборот, снижается [7]. В литературе представлена информация о том, что гармонизация по сравнению с оптимизацией кодонов обеспечивает получение наиболее стабильной формы белка [8], а также способствует сохранению или модификации биологической активности белка, например повышению его иммуногенности [9, 10]. Были получены данные об увеличении уровня экспрессии как цитозольных, так и мембранных белков [11, 12]. Исследования по влиянию гармонизации кодонов на уровень экспрессии и функциональную активность проводились с белками вирусов (НТН1), микроорганизмов (*K. pneumonia*, *B. xenovorans*, *P. falciparum*), грызунов (*M. musculus*), аллергенов растений (*B. verrucosa*), экспрессируемых в клетках *E. coli*. Исследования о влиянии гармонизации кодонов на экспрессию и функциональную активность цитохромов P450 человека в клетках *E. coli* в научной литературе не описаны.

Цель настоящей работы заключается в изучении влияния гармонизации нуклеотидной последовательности гена транскированного мембранного белка CYP17A1 человека на уровень его экспрессии в клетках *E. coli*, функциональную активность в сравнении с транскированным белком CYP17A1 человека с оптимизированной последовательностью.

**Материалы и методы исследования.** Гармонизация кодонов CYP17A1 человека. Нуклеотидную последовательность, кодирующую CYP17A1 человека, брали из базы данных UniProt (P05093). Для получения конструкции транскированного белка (CYP17TR) проводили множественное выравнивание последовательностей с использованием инструмента BLAST (алгоритм blastp) с аминокислотными последовательностями CYP17A1 человека из базы данных PDB (PDB ID: 3RUK, 3SWZ, 4NKV, 4NKW, 4NKX, 4NKY, 4NKZ, 5IRQ, 5IRV, 5UYS, 6CHI, 6CIR, 6CIZ, 6WR0, 6WR1, 6WW0). По результатам множественного выравнивания были удалены 23 аминокислотных остатка трансмембранного сегмента для улучшения растворимости белка и снижения его агрегации

при очистке. Для имитации трансмембранного сегмента со стороны N-конца добавлена оптимизирующая аминокислотная последовательность МАККТ [13]. Ввиду того что в дальнейшем очистку фермента планируется осуществлять с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, со стороны C-концевой последовательности добавляли последовательность, кодирующую гексагистиридиновый кластер.

Нуклеотидную последовательность гена, кодирующую СYP17TR, далее оптимизировали и гармонизировали с использованием инструмента Codon Harmonizer [6] для экспрессии в клетках *E. coli*. Для этого использовали следующие параметры: глобальный метод оптимизации кодонов (global\_codons), исходный организм – Homo Sapiens (93487), организм для экспрессии – Escherichia coli (8087). В результате получена гармонизированная нуклеотидная последовательность (СYP17TR\_H).

*Молекулярное клонирование и создание плазмид.* К гену, кодирующему СYP17TR\_H, длиной 1488 п. н. добавляли стоп-кодон и сайты узнавания рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III. Ген получали синтетическим путем. Для этого кодирующую последовательность разбивали на олигонуклеотиды с использованием программ DNABworks [14, 15] и SnapGene 2.3.2 (GSL Biotech, США). На олигонуклеотидном синтезаторе H32 (K&A, Германия) получили 39 олигонуклеотидов, длиной преимущественно 65 п. н. Осуществили полимеразную цепную сборку двух фрагментов гена длиной 722 и 773 п. н. из смесей олигонуклеотидов, совместно очищенных методом твердофазной экстракции [16]. Фрагменты клонировали в вектор pJET1.2 blunt из набора CloneJET PCRCloningKit (ThermoFisherScientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Нуклеотидную последовательность секвенировали по методу Сэнгера на генетическом анализаторе 3500 xL (AppliedBiosystems, США) с набором реагентов BrilliantDye™ Terminator (v3.1) Cycle Sequencing Kit (NimaGen, Нидерланды). Амплифицировали верные последовательности с концевыми праймерами. Далее два фрагмента объединили способом overlap extension ПЦР, а затем полученную центральную часть гена (1 474 п. н.) дорастили до 1 488 п. н. с использованием ПЦР, добавив на оба конца соответствующие сайты рестрикции и стоп-кодон. Данную конструкцию клонировали в вектор pJET1.2 blunt и снова убедились в корректности последовательности по результатам секвенирования. Для всех ПЦР использовали высокоточную ДНК полимеразу Q5 с горячим стартом (New England Biolabs, Великобритания). Затем плазмиду, несущую ген, кодирующий СYP17TR\_H, обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III (NEB, Великобритания) и разделяли получившиеся фрагменты методом электрофореза в агарозном геле. Далее фрагмент нужной длины вырезали из геля, очищали и клонировали в экспрессионную плазмиду pCW-LIC по соответствующим сайтам рестрикции. Продукты лигирования трансформировали в компетентные клетки *E. coli* DH5α, из которых проводили выделение плазмидной ДНК, несущей гармонизированную нуклеотидную последовательность (pCWori\_СYP17TR\_H). Синтезированную рекомбинантную плазмиду проверяли рестрикционным картированием и секвенированием.

*Выбор оптимальной экспрессионной системы и оптимальных условий экспрессии для СYP17TR\_H.* Для выбора оптимальной экспрессионной системы хозяин–вектор с использованием экспрессионных тестовых систем 1-6 (табл. 1) проводили аналитическую экспрессию.

Т а б л и ц а 1. Экспрессионные тестовые системы для проведения аналитической экспрессии

Table 1. Expression test systems for analytical expression

Образец	Экспрессионная тестовая система
1	Плазмида pCWori_СYP17A1TR, клетки <i>Escherichia coli</i> штамм BL21
2	Плазмида pCWori_СYP17A1_TR, клетки <i>Escherichia coli</i> штамм C41
3	Плазмида pCWori_СYP17A1_TR, клетки <i>Escherichia coli</i> штамм C43
4	Плазмиды pCWori_СYP17A1_TR и pGroEL/ES, клетки <i>Escherichia coli</i> штамм BL21
5	Плазмиды pCWori_СYP17A1_TR и pGroEL/ES, клетки <i>Escherichia coli</i> штамм C41
6	Плазмиды pCWori_СYP17A1_TR и pGroEL/ES, клетки <i>Escherichia coli</i> штамм C43

Ночную культуру (5 мл) клеток необходимого штамма (BL21, C41 или C43) инокулировали в 0,1 л питательной среды TB (Conda, Испания), содержащей ампициллин (100 мкг/мл), микро-элементы, для образцов 4–6 – дополнительно канамицин (35 мкг/мл). Культивирование проводили в орбитальном термостатируемом шейкере при температуре 37 °С и интенсивности перемешивания 180 об/мин до достижения оптической плотности ~0,8–1,0 на длине волны 600 нм. Затем температуру снижали и добавляли индуктор синтеза белка ИПТГ (0,5 мМ – здесь и далее указана конечная концентрация компонента в среде), предшественник синтеза гема δ-аминолевулиновую кислоту (δ-АЛК) (0,65 мМ), индуктор синтеза шаперонов GroEL/ES (для образцов 4–6), арабинозу (4 мг/мл). Через 48 ч экспрессии из каждой колбы (образцы 1–6) отбирали по 1 мл клеточной культуры, затем клетки осаждали при 1 400 g в течение 5 мин, осадок ресуспендировали в 200 мкл SDS-восстанавливающего буфера. Оценку оптимальной экспрессионной системы проводили методом вестерн-блоттинга. Для интерпретации результатов применяли программу GelAnalyzer 23.1.1.

Далее использовали оптимальную экспрессионную систему для определения оптимальных условий из различных тестовых (температура экспрессии – 22, 26, 30 °С и время экспрессии – 24 или 48 ч). Оценку условий осуществляли с использованием метода вестерн-блоттинга, результаты которого анализировали в программе GelAnalyzer 23.1.1.

*Гетерологическая экспрессия и очистка рекомбинантного CYP17TR\_H человека.* Экспрессионную плазмиду pCWori\_CYP17TR\_H совместно с плазмидой, кодирующей шапероны GroEL/ES, трансформировали в клетки *E. coli* (штамм C43), единичные колонии инокулировали в 5 мл среды LB и растили в течение ночи. Далее клеточную культуру добавляли в 1 л питательной среды TB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и канамицин (35 мкг/мл). Клеточную культуру наращивали в колбах Эрленмейера при 37 °С до OD<sub>600</sub> ~0,8–1,0. Затем температуру уменьшали до 26 °С и индуцировали экспрессию добавлением ИПТГ (0,5 мМ), скорость перемешивания уменьшали до 120 об/мин и инкубировали клеточную культуру в течение 48 ч. В экспрессионную среду также добавляли δ-АЛК (0,65 мМ) и арабинозу (4 мг/мл). Затем клетки осаждали центрифугированием (3500 g, 20 мин, 4 °С), ресуспендировали в буферном растворе А (50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,3 М NaCl и 20 % глицерин) в соотношении 3 мл раствора на 1 г клеточной массы. К суспензии клеток добавляли ингибитор сериновых протеаз ФМСФ (0,4 мМ) и замораживали при –80 °С до процедуры очистки.

Для выделения белка клетки размораживали, после чего разрушали на гомогенизаторе высокого давления Emulsiflex C3 (Avestin, Канада). Для солиubilизации фермента к полученному гомогенату добавляли Эмульген-913 (1 %), бензоназу (10 U/мл клеточной суспензии) и перемешивали при 4 °С в течение 1 ч. Затем клеточные мембраны осаждали центрифугированием (100 000 g, 1 ч, 4 °С). Клеточный супернатант использовали для нанесения на колонку для металл-хелатной аффинной хроматографии HisTrap HP (Cytiva, США) (хроматограф Unique AutoPure 25-M604, Китай) с сорбентом Ni-NTA-Сефарозой (скорость потока 4 мл/мин), уравновешенную буфером В (50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,3 М NaCl, 0,2 % Эмульген-913, 1,4 мМ β-меркаптоэтанол). После промывки тем же буфером белок элюировали в градиентном режиме буфером W (50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4), 0,3 М NaCl, 0,2 % Эмульген-913, 1,4 мМ β-меркаптоэтанол, 250 мМ имидазола). Полученные белковые фракции с наиболее высоким спектрофотометрическим индексом чистоты (отношение поглощения на длинах волн 417 и 280 нм > 0,7) объединяли и концентрировали на мембране AmiconUltra-4 (MWCO 30 кДа). Полученные фракции наносили на колонку с гидроксипатитом кальция, уравновешенную в 10 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4). Колонку промывали 10 объемами 10 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 20 % глицерина, 0,3 М NaCl, 0,2 % Эмульген-913 и 1,4 мМ β-меркаптоэтанол. Белки элюировали с колонки увеличением концентрации фосфата до 600 мМ. Очищенный белок хранили при температуре –80 °С до использования. Чистоту рекомбинантного CYP17TR\_H оценивали по результатам электрофореза в 12%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Электрофореграмму анализировали с применением программы GelAnalyzer 23.1.1. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически (Nanodrop 2000, Thermo Fisher Scientific, США) по поглощению

в максимуме полосы Core на 417 нм (коэффициента молярной экстинкции  $\varepsilon_{417} = 117 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для гемопротейна в низкоспиновом состоянии).

**Масс-спектрометрия.** Запись спектров MALDI-TOF осуществляли на масс-спектрометре Microflex LRF system (Bruker Daltonics, Германия), в качестве матрицы использовали раствор синяпиновой кислоты (Bruker Daltonics, Германия) с концентрацией 10 мг/мл в 50 % об. ацетонитриле, 0,1 % об. трифторуксусной кислоте. Раствор матрицы готовили с использованием деионизированной воды, ацетонитрила (Fisher Chemical, США), трифторуксусной кислоты (Acros Organics, Франция). В ходе анализа на мишень наносили 1 мкл раствора матрицы и смешивали с 1 мкл раствора образца в 70 % об. муравьиной кислоты. Параметры работы масс-спектрометра использовали следующие: линейный режим, диапазон детектируемых масс 9 900–100 800  $m/z$ , калибровочный стандарт Protein Calibration Standard II. Запись масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения flexControl (Bruker Daltonics, Германия), анализ спектров осуществляли с помощью программного обеспечения flexAnalysis (Bruker Daltonics, Германия).

**Оценка уровня экспрессии белков.** Уровень экспрессии рекомбинантных СУР17TR\_Н (гармонизированный) и СУР17TR\_О (оптимизированный) оценивали по результатам вестерн-блоттинга с интерпретацией полученных результатов в программе GelAnalyzer 23.1.1.

**Спектрофотометрическое титрование белков с природным субстратом – прогестероном.** Спектрофотометрическое титрование проводили по стандартному протоколу [17] на спектрофотометре Cary5000 UV-Vis NIR (Agilent Technologies, США) при 20 °С путем добавления к растворам очищенных белков СУР17TR\_Н и СУР17TR\_О увеличивающейся концентрации субстрата (прогестерона) с последующей записью спектра. Разностные спектры использовались для расчета разницы поглощения при каждой концентрации субстрата. График зависимости полученных значений изменения поглощения от концентрации прогестерона применяли для определения равновесных констант диссоциации комплекса фермент–субстрат при помощи программы Origin Pro 9.1, аппроксимируя данные спектрофотометрического титрования нелинейной функцией по алгоритму Левенберга–Марквардта с использованием формулы:

$$A = A_{\max} \frac{[L] + [E] + K_d - \sqrt{([L] + [E] + K_d)([L] + [E] + K_d)^2 - 4[E][L]}}{2[E]},$$

где  $A$  – наблюдаемое изменение поглощения при концентрации лиганда  $[L]$ ;  $A_{\max}$  – изменение поглощения при концентрации лиганда  $[L]$ , при которой происходит насыщение;  $[L]$  – общая концентрация лиганда;  $[E]$  – общая концентрация белка;  $K_d$  – константа диссоциации для комплекса белок–лиганд.

**Определение функциональной активности белков.** 17 $\alpha$ -гидроксилазную активность СУР17TR\_Н и СУР17TR\_О определяли по стандартному протоколу [17] в реконструированной системе, содержащей 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,05 % Tween-20, 25 мМ Hepes, 0,5 мкМ СУР17A1, 1 мкМ NADPH-цитохром P450 редуктазы, 50 мкМ прогестерона, 8 мМ изоцитрата натрия и 1 U/мл изоцитрат дегидрогеназы. Реакцию запускали добавлением NADPH в конечной концентрации 0,25 мМ. Аликвоты отбирали из инкубационной смеси через 0, 2, 5, 10 и 30 мин. Реакцию останавливали добавлением дихлорметана. Органическую фазу высушивали, растворяли в метаноле для HPLC-UV анализа на хроматографе (Agilent, США). Ферментативная активность рассчитывалась исходя из количества, образованного в ходе реакции продукта (мкмоль) в единицу времени (мин) на 1 мкмоль цитохрома P450 и выражалась в  $\text{мин}^{-1}$ . Кинетику реакций образования 17 $\alpha$ -ОН прогестерона оценивали при помощи программного обеспечения GraphPad Prism.

**Результаты и их обсуждение.** *Гармонизация кодонов СУР17A1 человека.* При гармонизации произведена замена 326 (29 % от общего количества) нуклеотидов и 292 кодонов (58,9 % от общего количества) в сравнении с изначальной оптимизированной последовательностью белка. Аминокислотные остатки и принимающие участие в формировании вторичной структуры белка отображены на рис. 1, а. Общее количество аминокислот в белке, соответствующих редким кодонам, составляет 159 (32 % от общего количества аминокислот в белке). Редкие кодоны в элементах вторичной структуры белка составляют 61 %, а в неструктурированных белковых фрагментах – 39 %, причем 30 % аминокислотного состава белка, отвечающего за формирование вторичной

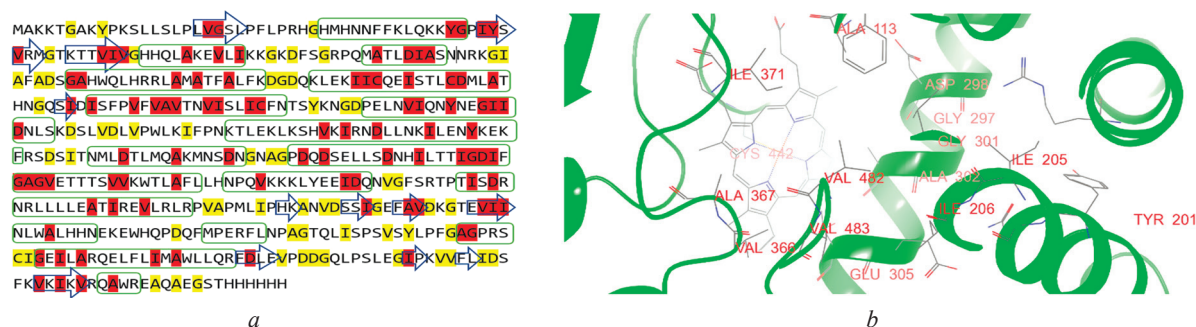


Рис. 1. Редкие кодоны в структуре гармонизированного CYP17A1 человека: *a* – аминокислотная последовательность CYP17A1 (элементы вторичной структуры представлены в виде скругленных прямоугольников ( $\alpha$ -спирали) и в виде стрелок ( $\beta$ -слои); темным цветом выделены аминокислотные остатки (представленные редкими кодонами) вторичной структуры, светлым – аминокислотные остатки (содержащие редкие кодоны) неструктурированных фрагментов; *b* – активный центр CYP17A1 человека с обозначением аминокислотных остатков, представленными редкими кодонами

Fig. 1. Rare codons in the structure of harmonized human CYP17A1: *a* – amino acid residues of CYP17A1 (elements of the secondary structure are shown as rounded rectangles ( $\alpha$ -helices) and as arrows ( $\beta$ -sheets); amino acid residues (represented by rare codons) of the secondary structure are highlighted in dark color, and amino acid residues (containing rare codons) of unstructured fragments are highlighted in light color; *b* – active site of human CYP17A1 with the designation of amino acid residues represented by rare codons

структуры, представлено редкими кодонами. Анализ рис. 1, *b* показывает, что редкие кодоны также содержатся в аминокислотных остатках активного центра CYP17A1 (65 % аминокислот активного центра). Выявлено, что в белке с гармонизированными последовательностями редкие кодоны соответствуют только определенным аминокислотам: А (аланин) – 16,9 %, С (цистеин) – 2,51 %, D (аспарагиновая кислота) – 16,9 %, G (глицин) – 18,2 %, I (изолейцин) – 22,6 %, V (валин) – 18,2 %, Y (тирозин) – 4,4 %. Из них 73 % аминокислот являются гидрофобными (А, I, V), 21 % – полярными (С, G, Y) и 16 % – гидрофильными с отрицательным зарядом (D). Определено, что 82 % от количества аминокислот, соответствующих редким кодонам вторичной структуры, приходится на  $\alpha$ -спирали, а 18 % – на  $\beta$ -слои. Из них 17,5 % аминокислот находится в начале или конце элемента вторичной структуры, а 80 % – в середине. Следует отметить, что редкие кодоны преимущественно соответствуют гидрофобным остаткам и это необходимо для формирования гидрофобных контактов сразу после трансляции на рибосоме, что снижает агрегацию белка и вероятность формирования телец включения при экспрессии [10]. В научной литературе отмечены данные о том, что гидрофобные аминокислотные остатки А, I, V, представленные редкими кодонами в гармонизированной последовательности, являются важными для формирования стабильной корректной структуры белка при фолдинге [18]. Необходимо заметить, что редкие кодоны преимущественно расположены в середине  $\alpha$ -спиралей, что, по-видимому, необходимо для правильной укладки сформированной  $\alpha$ -спирали в структуре белка [19].

*Выбор оптимальной экспрессионной системы и оптимальных условий экспрессии для гармонизированного CYP17TR\_H человека. Оценка и сравнение уровня экспрессии белков CYP17TR\_H и CYP17TR\_O.* Анализ графика нормализованных величин для CYP17TR\_H (рис. 2, *a*) показывает, что на 1 мл препарата наилучшие и достаточно сходные показатели наблюдаются для экспрессионных тестовых систем 3, 5 и 6. На 1 г клеток лучший показатель зафиксирован для экспрессионной системы 6.

Исходя из результатов тестовой экспрессии, оцененной с использованием метода вестерн-блоттинга (рис. 2, *b*), можно сделать вывод о том, что система под номером 6 (клетки штамма С43 *E. coli*) является наилучшей. Стоит отметить, что для достижения оптимальных показателей необходимо наличие плазмиды, обеспечивающей экспрессию белков-шаперонов GroEL/ES для регуляции фолдинга. Экспериментально установлено, что оптимальными условиями экспрессии для белка CYP17TR\_H является температура 26 °С и время 48 ч (образец 4, рис. 2, *c*). Выявлено, что уровень экспрессии гармонизированного белка превышает уровень экспрессии оптимизированного при тех же условиях на 28 % (из оценки по результатам вестерн-блоттинга (рис. 2, *d*)).

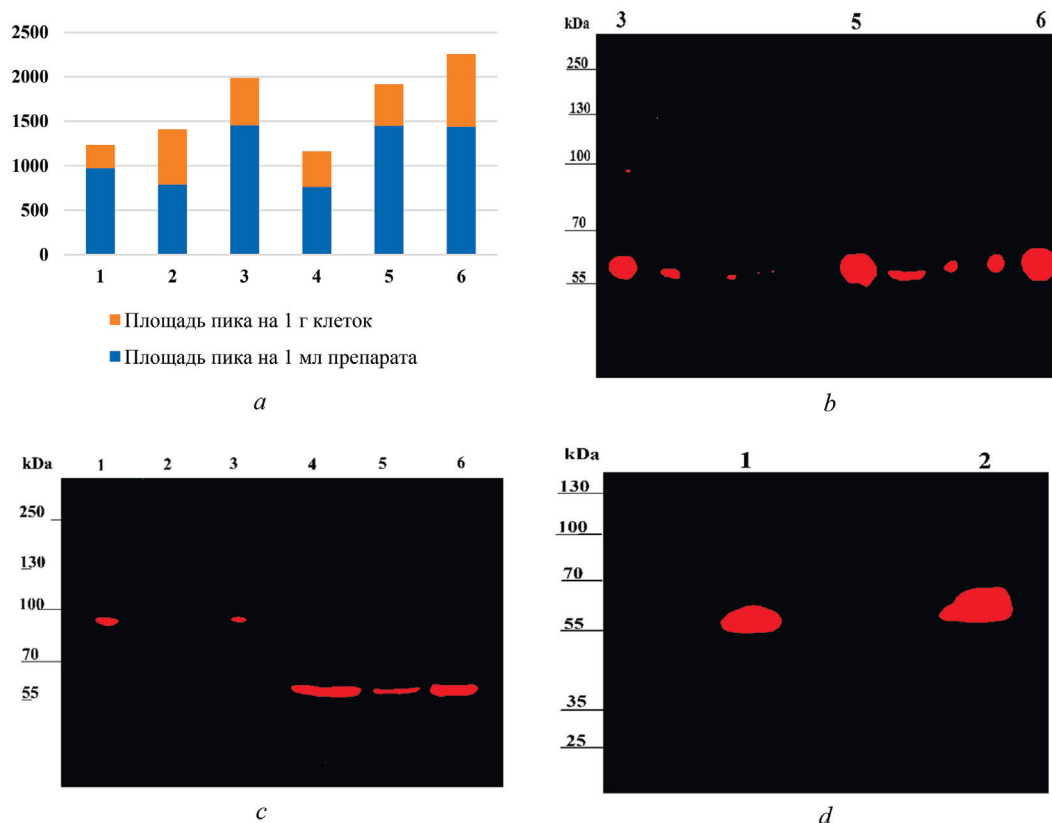


Рис. 2. Оценка экспрессионных тестовых систем и сравнение уровня экспрессии: *a* – нормализованные величины, оцененные исходя из площади хроматографического пика для образцов экспрессионных тестовых систем 1–6; *b* – результаты вестерн-блоттинга для экспрессионных систем 3, 5, 6, имеющих наиболее приемлемые показатели; *c* – результаты вестерн-блоттинга для различных условий экспрессии (1 – 26 °C, 24 ч; 2 – 22 °C, 24 ч; 3 – 30 °C, 24 ч; 4 – 26 °C, 48 ч; 5 – 22 °C, 48 ч; 6 – 30 °C, 48 ч; *d* – результаты вестерн-блоттинга для оценки уровня экспрессии оптимизированного (1) CYP17TR\_O и гармонизированного (2) CYP17TR\_H белков человека

Fig. 2. Evaluation of expression test systems and comparison of expression levels: *a* – normalized values, estimated based on the chromatographic peak area for samples of expression test systems 1–6; *b* – western blotting results for expression systems 3, 5, 6, which have the most acceptable indicators; *c* – western blotting results for different expression conditions (1 – 26 °C, 24 hours; 2 – 22 °C, 24 hours; 3 – 30 °C, 24 hours; 4 – 26 °C, 48 hours; 5 – 22 °C, 48 hours; 6 – 30 °C, 48 hours); *d* – western blotting results for assessing the expression level of optimized (1) CYP17TR\_O and harmonized (2) CYP17TR\_H human proteins

*Гетерологическая экспрессия и очистка CYP17TR\_H.* При использовании двух последовательных очисток методами металл-хелатной аффинной хроматографии на сорбенте Ni<sup>2+</sup>-NTA и адсорбционной хроматографии на гидроксипатите получен CYP17TR\_H, для абсолютного спектра которого характерно наличие двух основных пиков: на 280 нм (апофермент) и на 417 нм (гемовая группа в составе белка), что соответствует низкоспиновой форме цитохрома P450 (рис. 3, *a*). Электрофоретический анализ белка в денатурирующих условиях показал наличие полосы с молекулярной массой около 55 кДа (рис. 3, *b*), значение степени чистоты CYP17TR\_H составило не менее 90 %. Анализ MALDI-TOF указывает на наличие основного пика с массой 55,8 кДа, что соответствует расчетной теоретической массе фермента (рис. 3, *c*).

*Спектрофотометрическое титрование белков CYP17TR\_H и CYP17TR\_O с природным субстратом – прогестероном.* Связывание прогестерона с активным центром цитохрома CYP17A1 сопровождается переходом из шестикоординированного низкоспинового состояния в пятикоординированное высокоспиновое, что приводит к увеличению поглощения на 393 нм и уменьшению на 419 нм в разностном спектре. Разностные спектры поглощения для оптимизированного и гармонизированного белков представлены на рис. 4. Анализ рисунка свидетельствует о том, что существенных отличий в спектральном ответе для двух белков не выявлено, а значения  $K_d$  для оптимизированного и гармонизированного белков составляют  $1,93 \pm 0,61$  и  $1,05 \pm 0,35$  мкМ

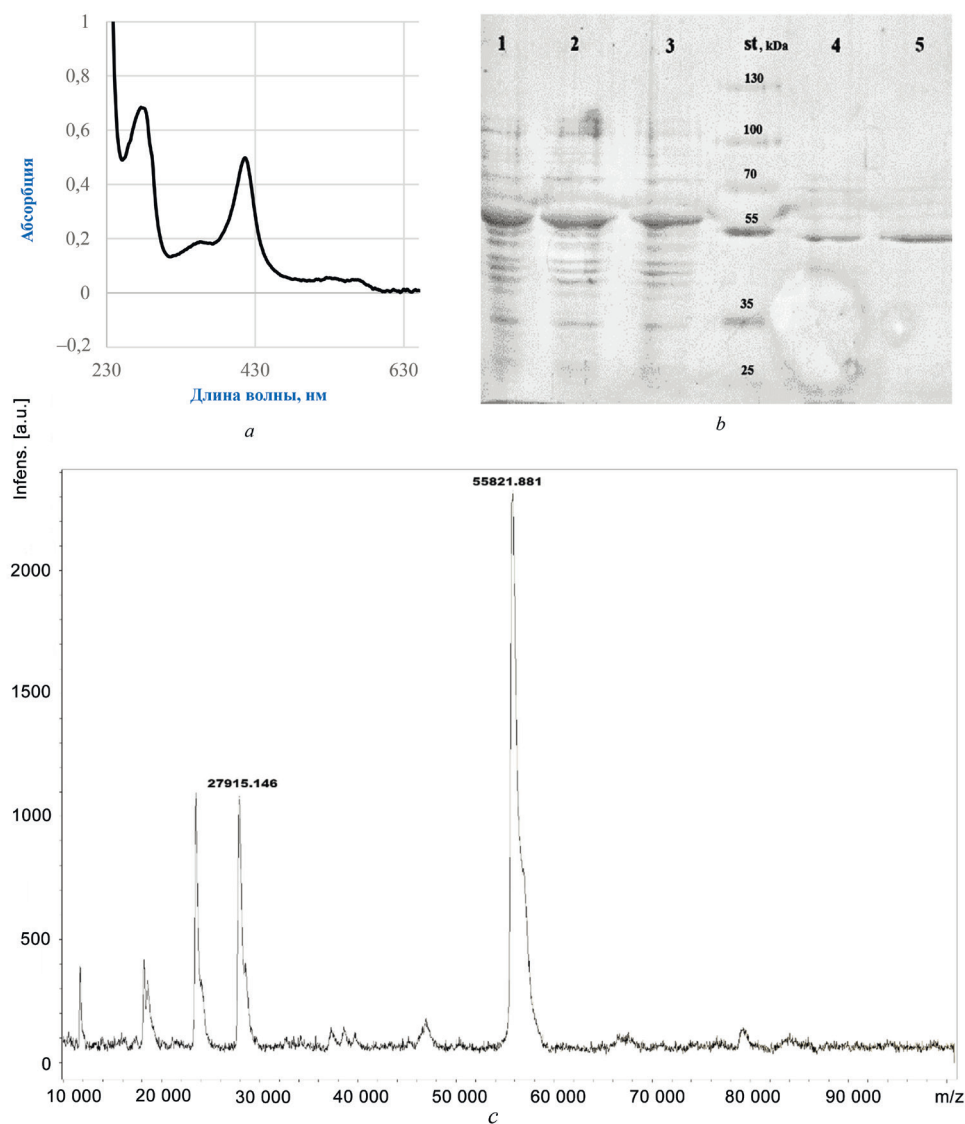


Рис 3. Физико-химические характеристики полученного препарата CYP17TR\_H: *a* – абсолютный спектр поглощения фракции CYP17TR\_H после двухстадийной очистки; *b* – результаты электрофореза фракций, содержащих CYP17TR\_H: **1** – клеточный гомогенат после разморозки, **2** – клеточный гомогенат после солюбилизации с детергентом, **3** – фракция после очистки на сорбенте Ni<sup>2+</sup>-NTA, **st** – стандарт молекулярных масс, **4** – фракция после ультрафильтрации через мембрану 30 кДа, **5** – фракция после адсорбционной хроматографии; *c* – MALDI-TOF масс-спектр очищенного препарата белка

Fig. 3. Physicochemical characteristics of the obtained CYP17TR\_H preparation: *a* – absolute absorption spectrum of the CYP17TR\_H fraction after two-stage purification; *b* – results of electrophoresis of fractions containing CYP17TR\_H: **1** – cell homogenate after defrosting, **2** – cell homogenate after solubilization with detergent, **3** – fraction after purification on Ni<sup>2+</sup>-NTA sorbent, **st** – molecular weight standard, **4** – fraction after ultrafiltration through a 30 kDa membrane, **5** – fraction after adsorption chromatography; *c* – MALDI-TOF mass spectrum of purified protein preparation

соответственно. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что гармонизированный белок взаимодействует с субстратом аналогично оптимизированному.

*Определение функциональной активности белков.* Функциональная активность для гармонизированного и оптимизированного белков изучалась путем определения каталитической способности фермента осуществлять реакцию гидроксилирования прогестерона (рис. 5).

Каталитическая активность составила  $0,385 \pm 0,027$  мин<sup>-1</sup> для оптимизированного белка и  $0,37 \pm 0,018$  мин<sup>-1</sup> для гармонизированного. Полученные результаты свидетельствуют о том, что функциональная активность изучаемых белков является сопоставимой и существенно не отличается в реконструированной системе.

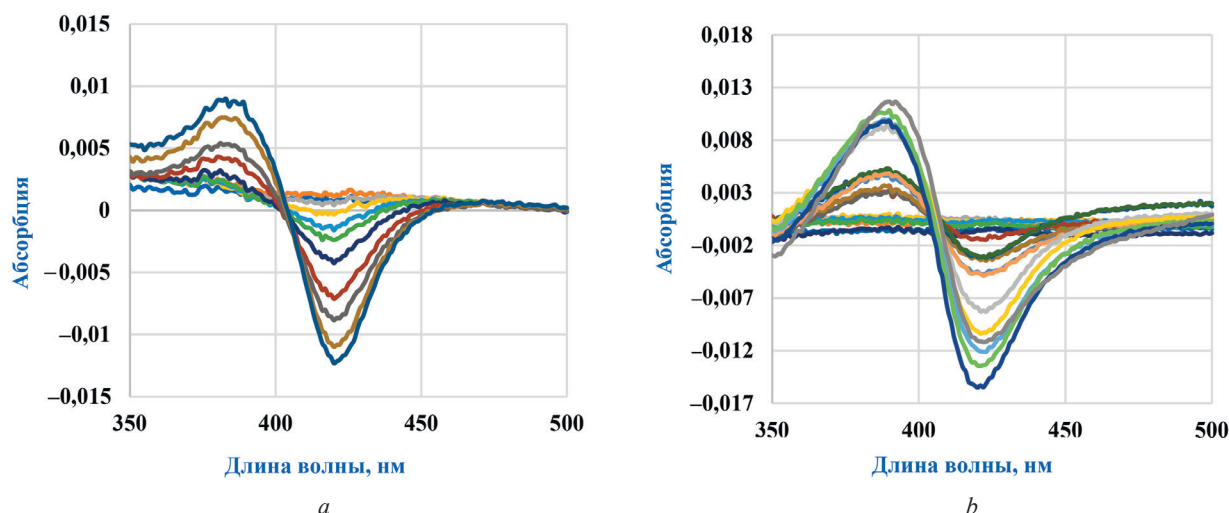


Рис. 4. Разностные спектры, полученные при титровании прогестероном, для оптимизированного (а) и гармонизированного (b) CYP17A1 человека

Fig. 4. Difference spectra obtained by titration with progesterone for optimized (a) and harmonized (b) human CYP17A1

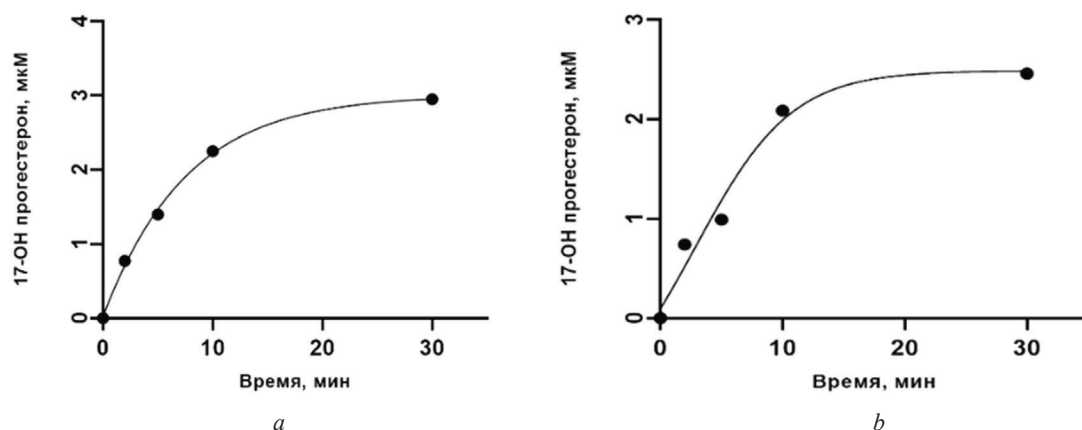


Рис 5. Кинетика реакций образования 17-ОН прогестерона, катализируемых CYP17A1 человека с оптимизированной (а) и гармонизированной (b) последовательностью

Fig. 5. Kinetics of 17-OH progesterone formation reactions catalyzed by human CYP17A1 with optimized (a) and harmonized (b) sequence

**Заклучение.** В результате работы впервые проведена гармонизация последовательности гена CYP17A1 человека и осуществлена оптимизация методики его выделения и очистки из бактериальных клеток. Установлено, что гармонизация кодонов гена, кодирующего CYP17A1 человека, позволяет увеличить уровень экспрессии целевого белка на 28 %, причем редкими кодонами представлены только определенные аминокислоты (A, C, D, G, I, V, Y), составляющие 30 % аминокислот, обеспечивающих формирование вторичной структуры белка. В ходе исследования доказано, что гармонизированный белок взаимодействует с природным субстратом CYP17A1 – прогестероном аналогично оптимизированному белку и обладает сходной каталитической активностью. Из этого следует вывод о том, что гармонизация нуклеотидных последовательностей позволяет корректно сформировать пространственную структуру кодируемого белка, обеспечивающую его функцию, и повысить выход функционально-активного фермента. Полученные результаты дают основание считать, что гармонизация кодонов для CYP17A1 человека является методом, способным оптимизировать условия получения больших количеств терапевтически значимого фермента с сохранением его каталитической активности.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Non-steroidal CYP17A1 Inhibitors: Discovery and Assessment / T. Wrobel, F. S. Jorgensen, A. V. Pandey [et al.] // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2023. – Vol. 66. – P. 6542–6566. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00442>
2. Tight binding of cytochrome b5 to cytochrome P450 17A1 is a critical feature of stimulation of C21 steroid lyase activity and androgen synthesis / D. Kim, V. Kim, K. D. McCarty, F. P. Guengerich // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 296. – Art. 100571. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100571>
3. Heterologous Expression of Human Cytochrome P450 (CYP) in *Escherichia coli*: N-Terminal Modification, Expression, Isolation, Purification, and Reconstitution / T. Shang, C. M. Fang, C. E. Ong, Y. Pan // *Biotech (Basel (Switzerland))*. – 2023. – Vol. 12, № 1. – Art. 17. <https://doi.org/10.3390/biotech12010017>
4. Codon Harmonization: going beyond the speed limit for protein expression / C. Mignon, N. Mariano, G. Stadthagen [et al.] // *FEBS Letters*. – 2018. – Vol. 592, № 9. – P. 1554–1564. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13046>
5. Angov, E. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding / E. Angov, P. Legler, R. M. Mease // *Methods in molecular biology*. – 2011. – Vol. 75. – P. 1–13. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-967-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-967-3_1)
6. Codon Harmonizer. – URL: <http://biocatalysis.uni-graz.at/sites/codonharmonizer.html> (date of access: 17.12.2022).
7. Improving heterologous membrane protein production in *Escherichia coli* by combining transcriptional tuning and codon usage algorithms / N. J. Claassens, M. F. Siliakus, S. K. Spaans [et al.] // *PLOS One*. – 2017. – Vol. 12, № 9. – Art. e0184355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184355>
8. Exploring Codon Adjustment Strategies towards *Escherichia coli*-Based Production of Viral Proteins Encoded by HTH1, a Novel Prophage of the Marine Bacterium *Hypnocyclicus* / H. Arsin, A. Jasilionis, H. Dahle [et al.] // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13, № 7. – Art. 1215. <https://doi.org/10.3390/v13071215>
9. Codon harmonization reduces amino acid misincorporation in bacterially expressed *P. falciparum* proteins and improves their immunogenicity / N. Pundeб J. Kooken, D. Leary [et al.] // *AMB Express*. – 2019. – Vol. 9, № 1. – Art. 167. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0890-6>
10. Codon Harmonization of a Kir3.1-KirBac1.3 Chimera for Structural Study Optimization / E. van Aalst, M. Yekefallah, A. K. Mehta [et al.] // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, № 3. – Art. 430. <https://doi.org/10.3390/biom10030430>
11. Harmonization of the Genetic Code Effectively Enhances the Recombinant Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 / C. Asam, A. Roulias, M. A. Parigiani [et al.] // *International Archives of Allergy and Immunology*. – 2018. – Vol. 177, № 2. – P. 116–122. <https://doi.org/10.1159/000489707>
12. Van Aalst, E. Cholesterol Is a Dose-Dependent Positive Allosteric Modulator of CCR3 Ligand Affinity and G Protein Coupling / E. van Aalst, B. J. Wylie // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – Vol. 8. – Art. 724603. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.724603>
13. Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in *Escherichia coli* following modification of its N-terminus / C. von Wachenfeldt, T. H. Richardson, J. Cosme, E. F. Johnson // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1997. – Vol. 339, № 1. – P. 107–114. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9859>
14. Hoover, D. M. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis / D. M. Hoover, J. Lubkowski // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – Vol. 30, № 10. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e43>
15. DNAWorks (v3.2.4). – URL: <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/> (date of access: 28.03.2022).
16. Yantsevich, A. V. Oligonucleotide Preparation Approach for Assembly of DNA Synthons / A. V. Yantsevich, V. V. Shchur, S. A. Usanov // *SLAS Technology*. – 2019. – Vol. 24, № 6. – P. 556–568. <https://doi.org/10.1177/2472630319850534>
17. Modified bile acids and androstanes – novel promising inhibitors of human cytochrome P450 17A1 / Y. Dzichenka, M. Shapira, A. Yantsevich [et al.] // *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. – 2021. – Vol. 205. – Art. 105777. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105777>
18. Important amino acid residues involved in folding and binding of protein-protein complexes / A. Kulandaisamy, V. Lathi, K. ViswaPoorani [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2017. – Vol. 94. – P. 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.045>
19. Комар, А. А. Распределение синонимических кодонов в мРНК определяет путь котрансляционного сворачивания белка в клетке / А. А. Комар // *Молекулярная биология*. – 2019. – Т. 53, № 6. – С. 883–898. <https://doi.org/10.1134/s0026898419060090>

## References

1. Wrobel T., Jorgensen, F. S., Pandey A., Grudzinska A., Sharma K., Yakuby J., Bjorkling F. S. Non-steroidal CYP17A1 Inhibitors: Discovery and Assessment. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004, vol. 23, pp. 6542–6566. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00442>
2. Kim D., Kim V., McCarty K. D., Guengerich F. P. Tight binding of cytochrome b5 to cytochrome P450 17A1 is a critical feature of stimulation of C21 steroid lyase activity and androgen synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2023, vol. 296, art. 100571. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100571>
3. Shang T., Fang C. M., Ong C. E., Pan Y. Heterologous Expression of Human Cytochrome P450 (CYP) in *Escherichia coli*: N-Terminal Modification, Expression, Isolation, Purification, and Reconstitution. *Biotech (Basel (Switzerland))*, 2023, vol. 12, no. 1, art. 17. <https://doi.org/10.3390/biotech12010017>
4. Mignon C., Mariano N., Stadthagen G., Lugari A., Lagoutte P., Donnat S., Chenavas S., Perot C., Sodoyer R., Werle B. Codon Harmonization: going beyond the speed limit for protein expression. *FEBS Letters*, 2018, vol. 592, no. 9, pp. 1554–1564. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13046>

5. Angov E., Legler P., Mease R. M. Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding. *Methods in molecular biology*, 2011, vol. 75, pp. 1–13. [https://doi.org/10.1007/978-1-61737-967-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-61737-967-3_1)
6. *Codon Harmonizer* (2024). Available at: <https://biocatalysis.uni-graz.at/sites/codonharmonizer.html> (Accessed 17 December 2024).
7. Claassens N. J., Siliakus M. F., Spaans S. K., Creutzburg S. C. A., Nijssse B., Schaap P. J., Quax T. E. F., van der Oost J. Improving heterologous membrane protein production in *Escherichia coli* by combining transcriptional tuning and codon usage algorithms. *PLOS One*, 2017, vol. 12, no. 9, art. 0184355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184355>
8. Arsin H., Jasilionis A., Dahle H., Sandaa R.-A., Stokke R., Karlsson E. N., Steen I. H. Exploring Codon Adjustment Strategies towards *Escherichia coli*-Based Production of Viral Proteins Encoded by HTH1, a Novel Prophage of the Marine Bacterium *Hypnocyclus*. *Viruses*, 2021, vol. 13, no. 7, art. 1215. <https://doi.org/10.3390/v13071215>
9. Punde N., Kookan J., Leary D., Legler P. M., Angov E. Codon harmonization reduces amino acid misincorporation in bacterially expressed *P. falciparum* proteins and improves their immunogenicity. *AMB Express*, 2019, vol. 9, no. 1, art. 167. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0890-6>
10. Van Aalst E., Yekefallah M., Mehta A. K., Eason I., Wylie B. Codon Harmonization of a Kir3.1-KirBac1.3 Chimera for Structural Study Optimization. *ACS Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 3, art. 430. <https://doi.org/10.3390/biom10030430>
11. Asam C., Roulias A., Parigiani M. A., Haab A., Wallner M., Wolf M., Briza P., Bohle B., Ferreira F., Hauser M. Harmonization of the Genetic Code Effectively Enhances the Recombinant Production of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1. *International archives of allergy and immunology*, 2018, vol. 177, no. 2, pp. 116–122. <https://doi.org/10.1159/000489707>
12. Van Aalst E., Wylie B. J. Cholesterol Is a Dose-Dependent Positive Allosteric Modulator of CCR3 Ligand Affinity and G Protein Coupling. *Frontiers in molecular biosciences*, 2021, vol. 8, art. 724603. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.724603>
13. von Wachenfeldt C., Richardson T. H., Cosme J., Johnson E. F. Microsomal P450 2C3 is expressed as a soluble dimer in *Escherichia coli* following modification of its N-terminus. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1997, vol. 339, no. 1, pp. 107–114. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.9859>
14. Hoover D. M., Lubkowski J. DNAWorks: an automated method for designing oligonucleotides for PCR-based gene synthesis. *Nucleic Acids Research*, 2002, vol. 30, iss. 10, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e43>
15. *DNAWorks (v3.2.4)*. Available at: <https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks> (Accessed 28 March 2022).
16. Yantsevich A. V., Shchur, V. V., Usanov, S. A. Oligonucleotide Preparation Approach for Assembly of DNA Synthons. *SLAS Technology*, 2019, vol. 24, iss. 6, pp. 556–568. <https://doi.org/10.1177/2472630319850534>
17. Dzichenka Y., Shapira M., Yantsevich A., Cherkesova T., Grbovic L., Savic M., Usanov S., Jovanovic-Santa S. Modified bile acids and androstanes – novel promising inhibitors of human cytochrome P450 17A1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, vol. 205, art. 105777. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105777>
18. Kulandaisamy A., Lathi V., ViswaPoorani K., Yugandhar K., Gromiha M. Important amino acid residues involved in folding and binding of protein-protein complexes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, vol. 94, pp. 438–444. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.045>
19. Komar A. A. Synonymous codon usage – a guide for co-translational protein folding in the cell. *Molecular Biology*, 2019, vol. 53, no. 6, pp. 883–898 (in Russian).

## Информация об авторах

*Шаладонова Марина Игоревна* – аспирант, младший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [m.shaladonova@gmail.com](mailto:m.shaladonova@gmail.com)

*Диченко Ярослав Владимирович* – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [dichenko@iboch.by](mailto:dichenko@iboch.by)

*Щур Вероника Владимировна* – кандидат химических наук, старший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [shchur931@gmail.com](mailto:shchur931@gmail.com)

*Травкина Мария* – научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). Email: [maria\\_trawkina@iboch.by](mailto:maria_trawkina@iboch.by)

*Усанов Сергей Александрович* – член-корреспондент, доктор химических наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [usanov@iboch.by](mailto:usanov@iboch.by)

## Information about the authors

*Shaladonova Marina I.* – Postgraduate Student, Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [m.shaladonova@gmail.com](mailto:m.shaladonova@gmail.com)

*Dzichenka Yaroslau V.* – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [dichenko@iboch.by](mailto:dichenko@iboch.by)

*Shchur Veronika V.* – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [shchur931@gmail.com](mailto:shchur931@gmail.com)

*Trawkina Maria* – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). Email: [maria\\_trawkina@iboch.by](mailto:maria_trawkina@iboch.by)

*Usanov Sergei A.* – Corresponding Member, Dr. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [usanov@iboch.by](mailto:usanov@iboch.by)