**Гармонизация кодонов как способ оптимизации гетерологической экспрессии терапевтически значимого CYP17A1 человека**

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

*Аспирант, 2 год обучения*

*Институт биоорганической химии Национальной Академии Наук Беларуси, Минск, Беларусь*

*E-mail: m.shaladonova@gmail.com*

CYP17A1 человека является ключевым ферментом в биосинтезе глюкокортикоидов и андрогенов, а его дисфункция сопровождается тяжелыми нарушениями в организме. Для проведения высокопроизводительного лабораторного скрининга новых ингибиторов CYP17A1 человека необходимо достаточное количество фермента, который получают методом гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*. Гармонизация кодонов представляет собой способ замены кодонов в соответствующем гене на синонимичные, преимущественно редко встречаемые кодоны и, согласно научной литературе, зачастую влияет на уровень экспрессии целевого белка [1].

Цель работы заключалась в изучении влияния гармонизации нуклеотидной последовательности гена мембранного белка CYP17A1 человека на уровень его экспрессии и функциональную активность в сравнении с белком CYP17A1 человека из оптимизированной последовательности гена.

В результате проведенной работы впервые проведена гармонизация последовательности гена СYP17A1 человека и осуществлена оптимизация методики его выделения и очистки из бактериальных клеток. В работе применяли экспресcионную тестовую систему с векторами pCWori CYP17A1\_TR и pGro12 в клетках штамма С43 *E. coli.* Очистку белка осуществляли способами аффинной металл-хелатной и адсорбционной хроматографии. Установлено, что гармонизация кодонов гена СYP17A1 человека позволяет увеличить уровень экспрессии целевого белка на 28 %, причем редкими кодонами представлены только определенные аминокислоты (A, C, D, G, I, V, Y), которые составляют 30 % аминокислот вторичной структуры белка. Функциональная активность белков изучалась путем определения каталитической способности фермента осуществлять реакцию гидроксилирования прогестерона (рисунок 1).

|  |  |
| --- | --- |
| А | В |

Рис. 1. Кинетика реакций образования 17-ОН прогестерона, катализируемых CYP17A1 человека с оптимизированной (А) и гармонизированной (В) последовательностью

Каталитическая активность составила 0.385±0.027 мин-1 для оптимизированного белка и 0.37±0.018 мин-1 для гармонизированного. Данные свидетельствуют о том, что функциональная активность изучаемых ферментов является сопоставимой и существенно не отличается в реконструированной системе.

Полученные результаты дают основание считать, что гармонизация кодонов для СYP17A1 человека является методом, способным оптимизировать условия получения больших количеств терапевтически-значимого фермента c сохранением его каталитической активности.

**Литература**

1. Claassens N. J., Siliakus M.F. Improving heterologous membrane protein production in *Escherichia coli* by combining transcriptional tuning and codon usage algorithms // PLoS ONE. 2017. Vol. 12. P.1-17.