

- species of *Allium* and allied genera of Alliaceae: a synonymic enumeration. Ann. Mus. Goulandris. 1978. Vol. 4. P. 83–198 (in Engl.).
8. Sojak J. Rozšíření plemen *Allium ursinum* L. v Československu // Preslia. 1968. Vol. 40. P. 294–298 [Sojak J. Rozšíření plemen *Allium ursinum* L. v Československu. Preslia. 1968. Vol. 40. P. 294–298 (in Engl.)].
9. Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4, № 4. P. 406–425 [Saitou N., Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4, No. 4. P. 406–425 (in Engl.)]
10. Van de Peer, Y. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment / Y. Van de Peer, R. De Wachter // Comput. Applic. Biosci.— 1994.— Vol. 10.— P. 569–570.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ СВОЙСТВ ЦИТОХРОМОВ P450 *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (CYP121 И CYP128)

А. А. Добыш

Туберкулёз – хроническая инфекция, приводящая к поражениям органов дыхания, костей, суставов, кожи, мочеполовых органов и др. По данным Всемирной организации здравоохранения около двух миллионов человек в год умирает от этого заболевания. Возбудителями туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Этот патогенный микроорганизм на данный момент является одним из наиболее опасных, несмотря на наличие вакцин и различных эффективных противомикробных препаратов.

На данный момент для лечения туберкулеза используются рифампицин и изониазид. Однако хотя эти препараты и снизили частоту заболеваний, появление новых устойчивых штаммов *Mtb* приводит к тому, что эти методы становятся неэффективными.

Поэтому актуальным направлением является выявление биохимических путей и макромолекул в *Mtb*, которые могут служить в качестве мишеней для новых анти-микобактериальных препаратов. В связи с этим, цитохромы P450 (CYP), которые содержатся в геноме *Mtb*, (около 20) позволяют предположить, что, по крайней мере, некоторые из них играют важную роль в жизнеспособности и вирулентности. Следовательно, изучение структуры и функций P450 (пространственная структура, метаболический профиль, поиск изоферментных различий резистентных и нерезистентных микобактерий), является перспективным направлением в области разработки новых лекарственных средств для лечения туберкулеза.

Изоформа CYP121 (микоциклозинсинтаза) – первый микобактериальный фермент из группы цитохромов P450 с идентифицированным

субстратом. CYP121 катализирует образование внутримолекулярной C-C связи между орто-положениями двух тирозинов в циклодитиозинес образованием микоциклозина. В то время как физиологические функции циклодитиозина и микоциклозина еще предстоит определить, считается, что уникальные свойства CYP121 приведут к селективным ингибиторам.

CYP128 участвует в гидроксировании дигидроменахинона-9 [МК-9(H₂)], молекулы, которая является основным переносчиком электронов хинола в дыхании *Mtb*. Продукт смежного с CYP128 гена, Rv2269c (также известный как фермент сульфотрансфераза), участвует в образовании сульфатов дигидроменахинона-9 на конце полиизопреноидной цепи. Для запуска этой реакции, предшествующее гидроксирование в том же атоме углерода является, вероятно, необходимостью, и CYP128 становится очевидным кандидатом на роль этого катализатора.

Таким образом, целью работы является сравнительная характеристика лиганд-связывающих свойств микобактериальных цитохромов P450 121 и 128 для понимания особенностей активных центров этих ферментов.

Используя трансформацию векторов, кодирующих белки *Mtb* в клетки *E. coli*, получили рекомбинантные штаммы, экспрессирующие целевые белки. Полученные трансформанты успешно использовались для получения белков. Проводилась гетерологическая экспрессия.

Выделение и осаждение белка проводили с помощью метода металл-аффинной хроматографии на сорбенте Ni²⁺-NTA-агароза.

Анализ полученных препаратов с целью определить количественное содержание белка проводили с использованием методов белкового электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Полученные белки характеризуются высокой степенью чистоты и по физико-химическим характеристикам (молекулярная масса, спектральные свойства) соответствуют нативным ферментам *Mtb*.

Для определения константы диссоциации комплексов белок-лиганд использовали метод спектрофотометрического титрования.

Вещества добавляли в опытную кювету, в контрольную кювету добавляли такой же объем растворителя. Регистрировали спектр поглощения на спектрофотометре при длине волны 350–500 нм. Наблюдали увеличение/уменьшение поглощения на длине волны 390 нм и уменьшение/увеличение, соответственно, поглощения на длине волны 420 нм.

По результатам спектрофотометрического титрования рассчитывали константу диссоциации (K_d) путем аппроксимации экспериментальных данных уравнением 1 с помощью программы SigmaPlot:

$$dA = \frac{dA_{\max}}{2 \times P_0} \times \left(B_0 + P_0 + K_d - \sqrt{(B_0 + P_0 + K_d)^2 - 4 \times B_0 \times P_0} \right), \quad (1)$$

где B_0 – концентрация субстрата,
 P_0 – концентрация цитохрома P450,
 dA – наблюдаемая величина поглощения,
 $dA_{\max}$ – максимальное изменение поглощения,
 K_d – константа диссоциации для комплекса субстрат (ингибитор)-фермент.

Константа диссоциации является мерой устойчивости образуемого комплекса, которая позволяет оценивать эффективность конкурентного ингибирования фермента данным веществом.

Таблица 1

Результаты спектрофотометрического титрования для CYP121

Название вещества	$\Delta A_{\max}$	K_d
Кетоконазол	0,052	$7,17 \pm 1,26$
Клотримазол	0,054	n/y
Эконазол	0,043	$4,73 \pm 0,82$
Бифоназол	0,131	$2,34 \pm 0,44$
Прохлораз	0,106	$8,14 \pm 0,82$
Флуконазол	-	-
Тиабендазол	-	-
Геранилгераниол	-	-
25ОН-холестерол	-	-
Пальмитиновая кислота	-	-
Триадимефон	-	-
Триадименол	-	-

Среди 12 проверенных веществ только 5 веществ азольной природы взаимодействовали с CYP121 (кетоконазол, клотримазол, эконазол, бифоназол, прохлораз). Для бифоназола характерна наименьшая константа диссоциации. С клотримазолом образовывался комплекс, однако K_d нельзя было точно установить из-за высокой стандартной ошибки, возникающей в результате плохой растворимости данного вещества. Для всех титруемых веществ был характерен II тип ответа.

Отсутствие образования комплекса белок-лиганд помогает нам в понимании структуры активного центра, т.к. можно увидеть, какие струк-

турные компоненты препятствуют взаимодействию. Это так называемые зонды сканирования активного центра.

Таблица 2

Результаты спектрофотометрического титрования для CYP128

Название вещества	$\Delta A_{\max}$	Kd
Клотримазол	0,018	0,05±0,02
Эконазол	0,020	0,013±0,035
Флуконазол	0,013	22,48±4,17
Тиабендазол	-	-

Из 4 азолов с CYP128 взаимодействовали 3. Из них только клотримазол и эконазол характеризуются достаточно низкими значениями K_d .

Таким образом, полученная информация дает ключ к пониманию механизмов связывания лигандов в активном центре монооксигеназ патогена и может быть использована для направленного дизайна высокоспецифичных структур-ингибиторов данных молекулярных мишеней.

Литература

1. Василевская А.В. [и др.] Цитохром P450 124 *Mycobacterium tuberculosis*: лиганд-связывающие и каталитические свойства // Известия НАН Беларуси. Сер.хим. наук. – 2011. – №2. – С.78–96.
2. Driscoll, M.D. Investigating orphan cytochromes P450 from *Mycobacterium tuberculosis*: The search for potential drug targets // University of Manchester. – 2011. – Vol.12, №8. –P.55–56.
3. Hudson S.A. [et al.]Application of Fragment Screening and Merging to the Discovery of Inhibitors of the *Mycobacterium tuberculosis* Cytochrome P450 CYP121// Angewandte Communications. – 2012. – Vol. 3, № 19. – P. 129–136.
4. McLean K.J. [et al.]The *Mycobacterium tuberculosis* cytochromes P450: physiology, biochemistry & molecular intervention// Future Med. Chem. – 2010. – Vol. 2, № 8. – P. 1339–1353.
5. Ouellet, H. The *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450 system / H. Ouellet, J.B. Johnston, P.R. Ortiz de Montellano // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2010. – Vol. 493, № 1. – P. 82–95.