

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**

Кафедра биохимии

Берговина
Яна Сергеевна

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ, ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ
ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И ОЦЕНКА ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИХ
СВОЙСТВ СТЕРОЛ-14-А-ДЕМЕТИЛАЗЫ (CYP51) КЛИНИЧЕСКИ
ЗНАЧИМОГО ГРИБА *CANDIDA KRUSEI***

Дипломная работа

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
ведущий научный сотрудник
государственного научного
учреждения «Институт
биоорганической химии
Национальной академии наук
Беларуси»
А.А. Гилеп

Допущена к защите
« ____ » _____ 2020 г.
Зав. кафедрой биохимии,

кандидат биологических наук, доцент
_____ И.В. Семак

Минск, 2020

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 56с, 16 рисунков, 10 таблиц, 36 источников литературы.

ЦИТОХРОМ P450, CYP51 КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМОГО ГРИБА *C. KRUSEI*, АЗОЛЫ, СТЕРОЛЫ, МИКОЗЫ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ, СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ.

Объект исследования: стерол-14- α -деметилаза (CYP51) клинически значимого гриба *C. krusei*.

Цель: получить высокоочищенный препарат рекомбинантной стерол-14- α -деметилазы (CYP51) клинически значимого гриба *Candida krusei* и изучить его лиганд-связывающие свойства.

Методы исследования: микробиологические (трансформация, гетерологическая экспрессия), биохимические (горизонтальный и вертикальный электрофорез, металл-аффинная хроматография), молекулярно-генетические методы (метод полимеразной цепной реакции, выделение плазмидной ДНК, секвенирование, рестрикционный анализ, лигирование в плазмидный вектор), аналитические (определение спектральных характеристик рекомбинантного CYP51, спектрофотометрическое титрование) и масс-спектрометрический анализ.

Использование методов молекулярного клонирования, гетерологической экспрессии, выделения и очистки позволило получить рекомбинантный белок CYP51 азолрезистентного штамма клинически значимого гриба *C. krusei* в гомогенном виде и без следов протеолитической дегградации, массой 61кДа. Была проведена оценка взаимодействия CYP51 клинически значимого гриба *C. krusei* с ингибиторами азолового ряда и гетероциклическими аналогами стероидных гормонов. Среди 7 использованных азолов наиболее эффективное связывание наблюдалось для клотримазола и эконазола, которые являются антимикотиками широкого спектра действия. Среди 14 использованных гетероциклических аналогов стероидных гормонов наиболее сильное связывание демонстрировало соединение 99 (3 β , 20-дигидрокси-24-гидроксииминохолест-5,22-диен), которое может быть использовано для дальнейшего поиска и разработки селективных ингибиторов CYP51. Полученный белок является важным инструментом для дальнейших исследований в области оценки взаимодействия существующих лекарственных

препаратов с данной формой фермента, а также для поиска новых эффективных ингибиторов стерол-14 α -деметилазы клинически значимых микромицетов.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 56с, 16рысункаў, 10 табліц, 36 крыніц літаратуры.

ЦЫТАХРОМ P450, СYP51 КЛІНІЧНА ЗНАЧНАГА ГРЫБА *C. KRUSEI*, АЗОЛЫ, СТЭРОЛЫ, МІКОЗЫ, МАЛЕКУЛЯРНАЕ КЛАНАВАННЕ, ЭКСПРЭСІЯ, СПЕКТРАФОТАМЕТРЫЧНАЕ ТЫТРАВАННЕ.

Аб'ект даследвання: стэрал-14- α -дэметылаза (СYP51) клінічна значнага грыба *C. krusei*.

Мэта: атрымаць высокаачышчаны прэпарат рэкамбінантнай стэрал-14- α -дэметылазы (СYP51) клінічна значнага грыба *Candida krusei* і вывучыць яго ліганд-звязваючыя ўласцівасці.

Метады даследвання: мікрабіялагічныя (трансфармацыя, гетэралагічная экспрэсія), біяхімічныя (гарызантальны і вертыкальны электрафарэз, метал-афінная хроматаграфія), малекулярна-генетычныя метады (метад палімеразнай ланцужковай рэакцыі, вылучэнне плазміднай ДНК, секвеніраванне, рэстрыкцыйны аналіз, лігаванне ў плазмідны вектар), аналітычныя (вызначэнне спектральных характарыстак рэкамбінантнага СYP51, спектрафотаметрычнае тытраванне) і маспектраметрычны аналіз.

Выкарыстанне метадаў малекулярнага кланавання, гетэралагічнай экспрэсіі, вылучэнні і ачысткі дазволілі атрымаць рэкамбінантны бялок СYP51 азолрэзістэнтнага штаму клінічна значнага грыба *C. krusei* ў гамагенным выглядзе і без слядоў пратэалітычнай дэградацыі, масай 61кДа. Была праведзена адзнака ўзаемадзеяння СYP51 клінічна значнага грыба *C. krusei* з інгібітарамі азолавага шэрагу і гетэрацыклічнымі аналагамі стэроідных гармонаў. Сярод 7 скарыстаных азолаў найболей эфектыўнае злучэнне назіралася для клатрымазола і эконазола, якія з'яўляюцца антымікотыкамі шырокага спектра дзеяння. Сярод 14 гетэрацыклічных аналагаў стэроідных гармонаў найбольш моцнае злучэнне дэманстравала злучэнне 99 (3 β , 20-дыгідрокси-24-гідроксиімінахалест-5,22-дыен), якое можа быць скарыстана для далейшага пошуку і распрацоўкі селектыўных інгібітараў СYP51. Атрыманы бялок з'яўляецца важнай прыладай для далейшых даследванняў у вобласці адзнакі ўзаемадзеяння існуючых лекавых прэпаратаў з дадзенай формай фермента, а таксама для пошуку новых эфектыўных інгібітараў стэрал-14- α -дэметылазы клінічна значных мікраміцэтаў.

ABSTRACT

Graduate work 56 p., 16 fig., 10 tables, 36 sources.

CYTOCHROME P450, CYP51 OF THE CLINICALLY SIGNIFICANT FUNGUS *C. KRUSEI*, ASOLES, STEROLS, MYCOSES, MOLECULAR CLONING, EXPRESSION, SPECTROPHOTOMETRIC TITRATION.

Object of research: sterol-14- α -demethylase (CYP51) of the clinically significant fungus *C. krusei*.

Aim of work: to obtain a highly purified recombinant sterol-14- α -demethylase (CYP51) preparation of the clinically significant *Candida krusei* fungus and study its ligand-binding properties.

Research methods: microbiological (transformation, heterologous expression), biochemical (horizontal and vertical electrophoresis, metal affinity chromatography), molecular genetic methods (polymerase chain reaction method, isolation of plasmid DNA, sequencing, restriction analysis, ligation into a plasmid vector), analytical (determination of the spectral characteristics of recombinant CYP51, spectrophotometric titration) and mass spectrometric analysis.

Using molecular cloning, heterologous expression, isolation and purification methods, the recombinant protein CYP51 of an azole-resistant strain of clinically significant fungus *C. krusei* was obtained in a homogeneous form and without traces of proteolytic degradation, with molecular weight 61 kDa. The interaction of CYP51 clinically significant fungus *C. krusei* with azole inhibitors and heterocyclic analogues of steroid hormones was evaluated. Among 7 azoles tested the most effective binding was observed for clotrimazole and econazole, which are broad-spectrum antimycotics. Compound 99 (3 β ,20-dihydroxy-24-hydroxyiminocholest-5,22-diene) showed the strongest binding among the 14 heterocyclic analogues of steroid hormones and can be used to further search and develop of selective CYP51 inhibitors. The obtained recombinant protein is an important tool for subsequent research in the field of the interaction evaluating of existing drugs with this enzyme form, as well as for the search for new effective sterol-14 α -demethylase inhibitors of clinically significant micromycetes.