

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра биохимии

ТВЕРДЯКОВА
Елена Викторовна

ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМОВ P450 ПАТОГЕНА
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Дипломная работа

Научный руководитель:
ведущий научный сотрудник
лаборатории молекулярной
диагностики и биотехнологии
Института биоорганической химии
НАН Беларуси,
кандидат химических наук
Гилеп Андрей Александрович

Допущена к защите
«__» _____ 2022 г.
Зав. кафедрой биохимии

кандидат биологических наук, доцент
_____ И.В. Семак

Минск, 2022

РЕФЕРАТ

Дипломная работа, 53 страницы, 16 рисунков, 4 таблицы, 49 источников.

ЦИТОХРОМЫ P450, ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, МЕТАЛЛ-АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ, АЗОЛЫ.

Объект исследования: рекомбинантная монооксигеназа Rv2266 патогена человека *M. tuberculosis*.

Цель исследования: изучение физико-химических и лиганд-связывающих свойств цитохрома P450 *M. tuberculosis* Rv2266.

Методы исследования: микробиологические, хроматографические, спектрофотометрические, метод гель-электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях, масс-спектрометрия.

В результате проведенных исследований была экспрессирована и получена рекомбинантная монооксигеназа Rv2266 патогена человека *M. tuberculosis*. С помощью метода гель-электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и MALDI-TOF масс-спектрометрии было подтверждено, что рекомбинантный белок является продуктом гена *Rv2266c*. Белок Rv2266 обладает типичными спектральными характеристиками цитохромов P450 и связывает лиганды активного центра фермента. Было проведено спектрофотометрическое титрование рекомбинантной монооксигеназы Rv2266 *M. tuberculosis* потенциальными ингибиторами фермента. Обнаружены 2 вещества, связывающиеся по типу субстрата, и 9 веществ, связывающихся по типу ингибитора, с активным центром белка Rv2266.

Определены параметры связывания фермент-лигандного комплекса рекомбинантного фермента Rv2266 (ΔA_{\max} , K_d). Из исследованных лигандов наибольшую аффинность к белку Rv2266 проявили следующие соединения: бензимидазол – $K_d = 0,28 \pm 0,03$ мкМ, эргостерол – $K_d = 0,11 \pm 0,02$ мкМ.

Практическая значимость исследования и область применения: исследуемый белок Rv2266 является потенциальной мишенью для действия противотуберкулезных препаратов. Установленные лиганды активного центра белка Rv2266 могут быть использованы для дальнейшей модификации при разработке препаратов нового поколения для лечения туберкулеза. Область применения – биохимия, медицина.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа, 53 старонкі, 16 малюнкаў, 4 табліцы, 49 крыніц.

ЦЫТАХРОМЫ P450, ГЕТЭРАЛАГІЧНАЯ ЭКСПРЭСІЯ, МЕТАЛ-АФІННАЯ ХРАМАТАГРАФІЯ, ІЁНААБМЕННАЯ ХРАМАТАГРАФІЯ, АЗОЛЫ.

Аб'ект даследавання: рэкамбінантная монааксігеназа Rv2266 патагена чалавека *M. tuberculosis*.

Мэта даследавання: вывучэнне фізіка-хімічных і ліганд-звязваючых уласцівасцей цытахрома P450 *M. tuberculosis* Rv2266.

Метады даследавання: мікрабіялагічныя, храматаграфічныя, спектрафотаметрычныя, метады гель-электрафарэзу ў паліакрыламіднаму гелі ў дэнатурыруючых умовах, мас-спектраметрыя.

У выніку праведзеных даследаванняў была экспрэсавана і атрымана рэкамбінантная монааксігеназа Rv2266 патагена чалавека *M. tuberculosis*. З дапамогай метады гель-электрафарэзу ў паліакрыламіднаму гелі ў дэнатурыруючых умовах і MALDI-TOF мас-спектраметрыі было пацверджана, што рэкамбінантны бялок з'яўляецца прадуктам гена Rv2266с. Бялок Rv2266 валодае тыповымі спектральнымі характарыстыкамі цытахромаў P450 і звязвае ліганды актыўнага цэнтра фермента. Было праведзена спектрафотаметрычнае тытраванне рэкамбінантнай монааксігеназы Rv2266 *M. tuberculosis* патэнцыйнымі інгібітарамі фермента. Выяўлены 2 рэчывы, якія злучаюцца па тыпу субстрата, і 9 рэчываў, якія злучаюцца па тыпу інгібітару, з актыўным цэнтрам бялку Rv2266.

Вызначаны параметры звязвання фермент-ліганднага комплексу рэкамбінантнага фермента Rv2266 (ΔA_{\max} , K_d). З даследаваных лігандаў найбольшую афінасць да бялку Rv2266 паказалі наступныя злучэнні: бензімідазол – $K_d = 0,28 \pm 0,03$ мкМ, эргастэрол – $K_d = 0,11 \pm 0,02$ мкМ.

Практычнае значэнне даследавання і вобласць выкарыстоўвання: даследаваны бялок Rv2266 з'яўляецца патэнцыйнай мішэнню для дзеяння супрацьсухотных прэпаратаў. Устаноўленыя ліганды актыўнага цэнтра бялку Rv2266 могуць быць выкарыстаны для далейшай мадыфікацыі пры распрацоўцы прэпаратаў новага пакалення для лячэння туберкулёзу. Вобласць прымянення – біяхімія, медыцына.

ABSTRACT

Graduate work, 53 pages, 16 figures, 4 tables, 49 sources.

CYTOCHROMES P450, HETEROLOGICAL EXPRESSION, METAL AFFINITY CHROMATOGRAPHY, ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY, AZOLES.

The object of the research: recombinant monooxygenase Rv2266 of the human pathogen *M. tuberculosis*.

The aim of the research: to study the physicochemical and ligand-binding properties of *M. tuberculosis* cytochrome P450 Rv2266.

Research methods: microbiological, chromatographic, spectrophotometric, denaturing polyacrylamide gel electrophoresis, mass-spectrometry.

As a result of the research, the recombinant monooxygenase Rv2266 of the human pathogen *M. tuberculosis* was expressed and obtained. Using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, it was confirmed that the recombinant protein is a product of the *Rv2266c* gene. Rv2266 has typical spectral characteristics of cytochromes P450 and binds the ligands of the active center of the enzyme. Spectrophotometric titration of the recombinant *M. tuberculosis* Rv2266 monooxygenase with potential inhibitors of the enzyme was carried out. It was observed that 2 substances bind by the type of substrate and 9 substances bind by the type of inhibitor to the active center of Rv2266 protein.

The binding parameters of the enzyme-ligand complex of the recombinant Rv2266 enzyme (ΔA_{\max} , K_d) were determined. Among the researched ligands, the following compounds showed the highest affinity for the Rv2266 protein: benzimidazole – $K_d = 0.28 \pm 0.03 \mu\text{M}$, ergosterol – $K_d = 0.11 \pm 0.02 \mu\text{M}$.

The practical value of the research and spheres of application: the researched protein Rv2266 is a potential target for antitubercular drugs action. Obtained ligands of the Rv2266 active center can be used for further modification in the development of new generation drugs for tuberculosis treatment. Spheres of application are biochemistry and medicine.

