

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАЦИОНАЛЬНОЙ
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 577.112.083+577.212.3+577.322.23

ШКЕЛЬ
ТАТЬЯНА ВЛАДИМИРОВНА

**ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА И БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ CYP51 ЧЕЛОВЕКА И АЗОЛ-РЕЗИСТЕНТНЫХ
ШТАММОВ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA***

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2022

Работа выполнена в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Государственного научного учреждения «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси».

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

Официальные оппоненты: **Андрианов Александр Михайлович**, доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории белковой инженерии Института биоорганической химии НАН Беларуси
Владыко Александр Станиславович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций РНПЦ эпидемиологии и микробиологии

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Белорусский государственный технологический университет»

Защита состоится «28» апреля 2022 г. в 10⁰⁰ часов на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.21.01 в Институте биоорганической химии НАН Беларуси по адресу: 220141 г. Минск, ул. акад. В.Ф. Купревича, 5/2, e-mail: tbozhok@iboch.by; тел: +375(17)3979612.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан «25» марта 2022 г.

Ученый секретарь Совета по защите диссертаций Д 01.21.01, кандидат химических наук



Т.С. Божок

ВВЕДЕНИЕ

Микоз представляет собой любое инфекционное заболевание, которое вызывается паразитическими грибами (преимущественно родами *Candida*, *Aspergillus*, *Trichophyton* и *Cryptococcus*). В виду того, что заболеваемость и летальность, связанные с грибковыми инфекциями, постоянно возрастают, а широкий спектр патогенных грибковых агентов обуславливает сложности в определении их родовой и видовой принадлежности, наблюдаются затруднения в проведении адекватной противогрибковой терапии.

Одной из приоритетных мишеней противогрибковой терапии является ключевой фермент биосинтеза эргостерола – стероид-14 α -деметилаза (CYP51), принадлежащая к суперсемейству цитохромов P450 (**P450**). Один из основных механизмов устойчивости к азолам обусловлен накоплением мутаций гена *CYP51*. Поэтому, важной задачей является анализ первичной структуры стероид-14 α -деметилаз резистентных штаммов грибов, которые выступают возбудителями внутрибольничных инфекций в ряде белорусских клиник, и выявление мутаций, вызывающих снижение чувствительности к противогрибковым препаратам.

Возникновение устойчивости патогенных грибов к существующим антимикотикам приводит к необходимости поиска новых эффективных лекарственных веществ, обладающих высокой специфичностью в отношении действия на резистентные штаммы грибов. Получение ферментных препаратов для скрининга потенциальных ингибиторов CYP51 может быть перспективным направлением в области терапии микозов. Особый интерес представляет изучение лиганд-связывающих свойств и взаимодействия с ингибиторами CYP51 ряда клинически значимых грибов рода *Candida*, поскольку данные микромицеты являются причиной развития около 80% системных микозов у людей с ослабленным иммунитетом. Накопление информации о цитохромах P450 патогенных грибов будет способствовать упрощению процесса создания новых противогрибковых лекарственных средств, механизм действия которых связан с данными ферментами.

Настоящая работа посвящена анализу первичной структуры стероид-14 α -деметилаз резистентных штаммов клинически значимых грибов, а также получению, определению лиганд-связывающих свойств и белок-белковых взаимодействий CYP51.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами. Работа является частью плановых исследований лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси, выполненных в рамках ГП «Инновационные биотехнологии», подпрограмма «Малотоннажные биотехнологии», задание 2.2.1 «Разработка технологий получения высокоочищенных препаратов рекомбинантных ферментов и создание производственно-технологического участка по их выпуску»; гранта на выполнение научно-исследовательских работ докторантами и аспирантами Национальной академии наук Беларуси «Молекулярное клонирование и характеристика стероид-14-дегидрогеназ патогенных грибов отдела *Ascomycota*» (2013 г.), № госрегистрации 20132238; гранта БРФФИ, договор № X17-013 «Синтез, структурный и биохимический анализ стероидов с гетероциклическим фрагментом в цикле D» (2017-2019 гг.), № госрегистрации 20171270; ГП «Научоемкие технологии и техника» на 2016-2020 годы, подпрограмма 1 «Инновационные биотехнологии – 2020», мероприятие 40 «Разработать протокол идентификации грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции» (2016-2018 гг.), № госрегистрации 20170199.

Тема диссертационной работы соответствует **приоритетным направлениям научно-технической деятельности** в Республике Беларусь на:

- 2011-2015 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 22.07.2010 г. № 378): «Медицина, медицинская техника и технологии, фармацевтика», 21. Макротехнология «Диагностика и лечение заболеваний», критические технологии: диагностика и лечение инфекционных заболеваний; 23. Макротехнология «Лекарственные, лечебно-диагностические препараты и тест-системы», критические технологии: производство диагностикумов, средств иммунохимического микроанализа, тест-систем нового уровня;

- 2016-2020 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 22.04.2015 г. № 166): «Медицина, фармацевтика, медицинская техника» – технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы.

- 2021-2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 07.05.2021 г. № 156): «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства» – биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные); диагностика, медицинская профилактика и лечение инфекционных, включая вирусной этиологии, и неинфекционных заболеваний, экспертиза качества медицинской

помощи; фармацевтические субстанции, диагностические препараты и системы, лекарственные средства и иммуномодуляторы.

Цель и задачи исследования. Цель работы – комплексный молекулярный анализ клинически значимых грибов, определение лиганд-связывающих свойств и проведение интерактивных исследований стероид-14 α -деметилаз человека и грибов.

Задачи исследования:

1) Провести молекулярный анализ гена *CYP51* клинически значимых штаммов грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции, и выявить изменения в структуре фермента, которые могут приводить к развитию устойчивости.

2) Разработать новые подходы к диагностике микозов и внедрить их в клиническую практику.

3) Сконструировать экспрессионные плазмидные вектора, содержащие в своем составе ген, кодирующий стероид-14 α -деметилазу (*CYP51*) клинически значимых грибов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*.

4) Провести гетерологическую экспрессию и получить в препаративных количествах функционально активные *CYP51* клинически значимых грибов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* (*CaCYP51*, *CglCYP51* и *CkrCYP51*, соответственно), которые в дальнейшем могут быть использованы для поиска новых эффективных ингибиторов *CYP51*.

5) Оценить лиганд-связывающие свойства *CYP51* клинически значимых грибов в отношении противогрибковых соединений азолового ряда.

6) Изучить взаимодействие *CYP51* человека и азол-резистентных штаммов клинически значимых грибов с производными стероидов и выявить соединения, которые могут быть использованы для последующего поиска селективных ингибиторов стероид-14 α -деметилазы человека и грибов.

7) Изучить белок-белковые взаимодействия *CYP51* с белками-партнерами.

8) Изучить взаимодействие олигонуклеотидных аптамеров с поверхностью *CYP51* в качестве альтернативного подхода к созданию высокоспецифичных ингибиторов данного фермента.

Объект исследования – ДНК грибов из клинических образцов, проявляющих резистентность к противогрибковым лекарственным средствам; нуклеотидные последовательности генов *CYP51* грибов; *CYP51* человека и резистентных штаммов клинически значимых грибов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*.

Предмет исследования – молекулярный анализ гена *CYP51* резистентных штаммов грибов в клинических образцах; исследование лиганд-

связывающих свойств CYP51 клинически значимых грибов и человека и поиск потенциальных ингибиторов данных ферментов; изучение белок-белковых взаимодействий стероид-14 α -деметилаз.

Научная новизна:

1. Разработан алгоритм для быстрого и эффективного определения видовой и родовой принадлежности дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов с использованием культуральных, ПЦР-диагностических и масс-спектрометрических исследований.

2. Разработан способ получения в препаративных количествах высокоочищенных рекомбинантных белков CYP51 клинически значимых грибов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* с содержанием функционально-активной формы вышеуказанных ферментов более 95%. Впервые получен CYP51 *C. krusei*, а также формы рекомбинантных белков CYP51 *C. albicans*, содержащая мутации Lys-179-Glu, Leu-224-Ile, Gly-307-Cys, Met-372-Thr, и CYP51 *C. glabrata*, содержащая мутации Ser-440-Cys, Gly-450-Asp.

3. Установлено взаимодействие активного центра рекомбинантных CYP51 человека и клинически значимых грибов с производными стероидов животного происхождения, а также синтезированными 17-изоксазолстероидами, которые могут быть использованы при конструировании новых селективных ингибиторов CYP51. Обнаружены соединения, которые проявляют специфичность к CYP51 человека, а также соединения, которые проявляют высокую селективность и эффективность по отношению к CYP51 клинически значимых грибов (для большинства соединений константы диссоциации (K_d) находятся на микромолярном уровне).

4. Охарактеризовано взаимодействие между CYP51A1 человека и двумя изоформами цитохрома b_5 (CYB5A и CYB5B), а также двумя редокс-партнерами – НАДФН-цитохром P450-редуктазой (CPR) и адренодоксином (Adx). Показано, что обе изоформы цитохрома b_5 имеют низкую аффинность к CYP51 человека ($K_d = 75,3 \pm 6,8$ мкМ для CYB5A и $K_d = 103,0 \pm 18,7$ мкМ для CYB5B). Обнаружено, что CYP51 человека не может быть эффективно восстановлен с помощью митохондриальной пары Adx/AdR, хотя он имеет почти одинаковое сродство к Adx и CPR ($K_d = 0,45 \pm 0,03$ мкМ и $K_d = 0,30 \pm 0,05$ мкМ, соответственно).

5. Установлено специфическое взаимодействие сконструированных олигонуклеотидных аптамеров с поверхностью CYP51 человека. Это впервые полученные и исследованные аптамеры для белков, принадлежащих к суперсемейству P450.

Положения, выносимые на защиту:

1) Выявление мутаций гена *CYP51* грибов и создание алгоритма для быстрого установления таксономической принадлежности грибов, заключающегося в применении культуральных, ПЦР-диагностических и масс-спектрометрических методов, что в совокупности необходимо для повышения эффективности клинической диагностики и терапии микозов.

2) Получение новых форм рекомбинантных высокоочищенных препаратов белков *CYP51* резистентных штаммов клинически значимых грибов: *CYP51 C. krusei*, *CYP51 C. albicans*, содержащей мутации Lys-179-Glu, Leu-224-Ile, Gly-307-Cys, Met-372-Thr, и *CYP51 C. glabrata*, содержащей мутации Ser-440-Cys, Gly-450-Asp, необходимых для разработки новых противогрибковых соединений и анализа их эффективности.

3) Установление параметров взаимодействия *CYP51* грибов с противогрибковыми соединениями и выявление новых селективных лигандов стероид-14 α -деметилазы среди производных стероидов животного происхождения, а также синтезированных производных 17-изоксазолилстероидов, перспективных для конструирования селективных ингибиторов *CYP51*.

4) Комплексная оценка взаимодействий *CYP51* с редокс-партнерами, цитохромом *b₅* и специфическими олигонуклеотидными аптамерами позволила выявить новые молекулярные механизмы взаимодействия компонентов P450-содержащих монооксигеназных систем, важные для регуляции активности указанных систем в интересах создания терапевтических средств нового поколения.

Личный вклад соискателя. Планирование эксперимента, постановка задач и подготовка материалов к публикации осуществлялась совместно с научным руководителем – к.х.н. Гилепом А.А. Соискателем проведена экспериментальная работа по анализу нуклеотидных последовательностей гена *CYP51* резистентных штаммов грибов в клинических образцах (подобраны праймеры для исследования первичной структуры *CYP51* грибов, оптимизированы условия амплификации гена *CYP51* методом ПЦР, а также проведено секвенирование нуклеотидных последовательностей гена); осуществлена масс-спектрометрическая идентификация клинически значимых грибов; проведены клонирование, гетерологическая экспрессия и очистка Ca*CYP51*, Cgl*CYP51* и Sckr*CYP51*, исследование их лиганд-связывающих и каталитических свойств; гетерологическая экспрессия и очистка Hs*CYP51*; проведено одноэлектронное ферментативное восстановление Hs*CYP51* в присутствии редокс-партнеров (Adx/AdR и CPR получены н.с. Тумилович А.М.); анализ и оценка полученных экспериментальных данных, анализ и систематизация литературных данных. Плазмидная конструкция Hs*CYP51* получена от к.х.н. Струшкевич Н.В. Компьютерное моделирование

проводилось при участии к.х.н. Диченко Я.В. Работы по дизайну аптамеров и проведению SPR-анализа проводились в рамках научной кооперации на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича». Составление инструкции по применению метода идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов проводилось совместно с сотрудниками РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии к.б.н. Белевцевым М.В., Кондауровой С.Л., Скоповец Е.Я. Написание научно-технической документации происходило при помощи в.н.с., к.б.н. Башко Н.П., к.х.н., в.н.с. Гилепа А.А. Работы по ВЭЖХ анализу и последующему масс-спектрометрическому анализу продуктов реакции, катализируемой СУР51, проводились при участии в.н.с., к.б.н. Шабуня П.С. и н.с. Грабовец И.П.

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований, выполненных в рамках диссертационной работы, представлены и доложены на 8 научных конференциях, симпозиумах, конгрессах: 11-ый Международный симпозиум «Цитохромы P450», Торино, 22-26 июня 2012 г.; IV Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 17-19 октября 2012 г.; VI Российский симпозиум «Белки и пептиды», Уфа, 11-15 июня 2013 г.; конференция «Успехи медицинской микологии», Москва, 26 сентября 2013 г.; VI Всероссийский конгресс по медицинской микологии «Успехи медицинской микологии», Москва, 8-10 апреля 2014 г.; V Международная конференция «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 4-6 июня 2014 г.; Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 20-22 февраля 2017 г.; Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова» и VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды», Москва, 18-22 сентября 2017 г.

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ, в том числе 9 статей в научных журналах, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении учёных степеней и присвоении учёных званий в Республике Беларусь (6,2 авторских листа), 2 статьи в других научных журналах (1,0 авторский лист), тезисы 9 докладов (0,95 авторского листа), разработаны и утверждены 1 нормативный документ РБ и 1 инструкция по применению. Общий объем опубликованных материалов составляет 8,15 авторских листа.

Структура и объём работы. Диссертация состоит из перечня сокращений и условных обозначений, введения, общей характеристики работы, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, анализа и обсуждения полученных результатов, заключения, библиографического списка

(включающего 293 процитированные работы и 20 публикаций соискателя) и 7 приложений. Работа изложена на 192 страницах, содержит 55 рисунков и 19 таблиц.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

В **главе 1** объединены и проанализированы литературные данные о классификации микозов и существующих методах идентификации клинически значимых грибов, а также о классификации противогрибковых средств, используемых при терапии микозов. Описана роль стероид-14 α -деметилазы в биосинтезе стероидов, механизм катализируемой CYP51 реакции, а также значение данного фермента в качестве мишени для действия антимикотиков на основе ингибиторов CYP51. Рассмотрены механизмы возникновения резистентности к противогрибковым средствам. Проанализирована информация о структуре и функциях CYP51 среди организмов, относящихся к различным биологическим царствам и выявлены особенности пространственной организации, определяющие субстратную селективность стероид-14 α -деметилаз.

На основе научного анализа литературных данных выделен ряд нерешенных вопросов по данной проблеме и поставлены задачи исследования.

В **главе 2** приведены использованные при выполнении работы материалы и методы, включающие молекулярно-биологические методы для конструирования экспрессионных векторов и молекулярного анализа гена *CYP51*, методики наработки, выделения и очистки рекомбинантных белков. Описаны методы оценки физико-химических, лиганд-связывающих и каталитических свойств полученных рекомбинантных белков. Использовались как методы, описанные в литературе, так и подходы, разработанные в процессе выполнения работы.

В работе использованы следующие методы исследования: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и другие методы молекулярной биологии, электрофоретический анализ белков и нуклеиновых кислот, электронная спектроскопия, различные виды колоночной хроматографии, ВЭЖХ, масс-спектрометрия.

В **главе 3** приведены полученные экспериментальные результаты по анализу нуклеотидной последовательности гена *CYP51* клинически значимых грибов, получению рекомбинантных форм стероид-14 α -деметилазы грибов рода *Candida* и оценке их лиганд-связывающих свойств и межбелковых взаимодействий.

Молекулярный анализ гена *CYP51* клинически значимых грибов и определение их видовой принадлежности. В ходе создания алгоритма для

быстрого и эффективного определения таксономической принадлежности дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов с использованием культуральных, ПЦР-диагностических и масс-спектрометрических исследований (с применением технологии MALDI-TOF) проведена экспериментальная идентификация клинических изолятов 15 культур дрожжевых и 10 культур мицелиальных патогенных грибов, вызвавших инвазивные микозы у детей с онкологическими и гематологическими заболеваниями. Установленная нами на базе ИБОХ НАН Беларуси видовая идентификация 25 культур грибов согласно данным масс-спектрометрического анализа совпадала с данными, полученными на базе Центра детской онкологии, гематологии и иммунологии с использованием классических методов лабораторной диагностики. Исследование 10 образцов занимает около 30 минут, учитывая проведение пробоподготовки для масс-спектрометрии и последующий компьютерный анализ данных (фенотипическая диагностика дрожжевых грибов занимает около 5 дней, а плесневых грибов – около 7-10 дней). Использование масс-спектрометрического анализа для идентификации грибов сокращает сроки исследования на 3-4 суток, что позволяет оптимизировать диагностику микозов и способствует раннему назначению этиотропной терапии.

В ходе работы был проведен комплексный биоинформационный анализ мутаций гена *CYP51* грибов вида *C. albicans*. Выделены 4 группы аминокислотных замен, разделенных по вкладу в развитие резистентности к лекарственным средствам азолового ряда. Идентифицированы мутации гена *CYP51* в клинических изолятах *C. albicans* (Lys-179-Glu, Leu-224-Ile, Gly-307-Cys, Met-372-Thr, Val-488-Ile, Lys-128-Thr, Val-404-Leu). Показано, что аминокислотные замены Val-488-Ile, Lys-128-Thr и Val-404-Leu не вызывали развития резистентности к азолосодержащим лекарственным средствам. Также выявлены мутации в резистентных клинических изолятах других грибов – *Candida guilliermondii* (Cys-37-Trp), *Aspergillus fumigatus* (Tyr-46-Glu, Thr-248-Asn, Glu-255-Asp), *Candida glabrata* (Ser-440-Cys, Gly-450-Asp) – которые, возможно, играют роль в развитии резистентности к противогрибковым средствам азолового ряда. Для выявления взаимосвязи между наличием мутаций и развитием резистентности необходимы дальнейшие исследования.

Молекулярное клонирование, экспрессия и очистка CYP51 клинически значимых грибов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Для получения препаративных количеств CglCYP51, содержащего мутации Ser-440-Cys, Gly-450-Asp; CaCYP51, содержащего мутации Lys-179-Glu, Leu-224-Ile, Gly-307-Cys, Met-372-Thr; и CkrCYP51 кДНК цитохромов встраивали в экспрессионный вектор pCW-lic. В N'-концевую часть включали

полигистидиновый фрагмент (6xHis) для упрощения процедуры выделения белка методом металло-аффинной хроматографии. Гетерологическая экспрессия проводилась в клетках *Escherichia coli* (штаммы DH5 α и C41(DE3)). В результате оптимизации условий культивирования и выделения удалось получить высокоочищенные препараты ферментов CglCYP51, CaCYP51 и CkrCYP51 в количествах, достаточных для проведения анализа (рисунок 1).

Разработанная система получения рекомбинантных цитохромов P450, включающая металл-аффинную и адсорбционную хроматографии, позволяет достичь выхода фермента – 50-100 нмоль (3,1-6,2 мг) белка на 1 л культуральной среды.

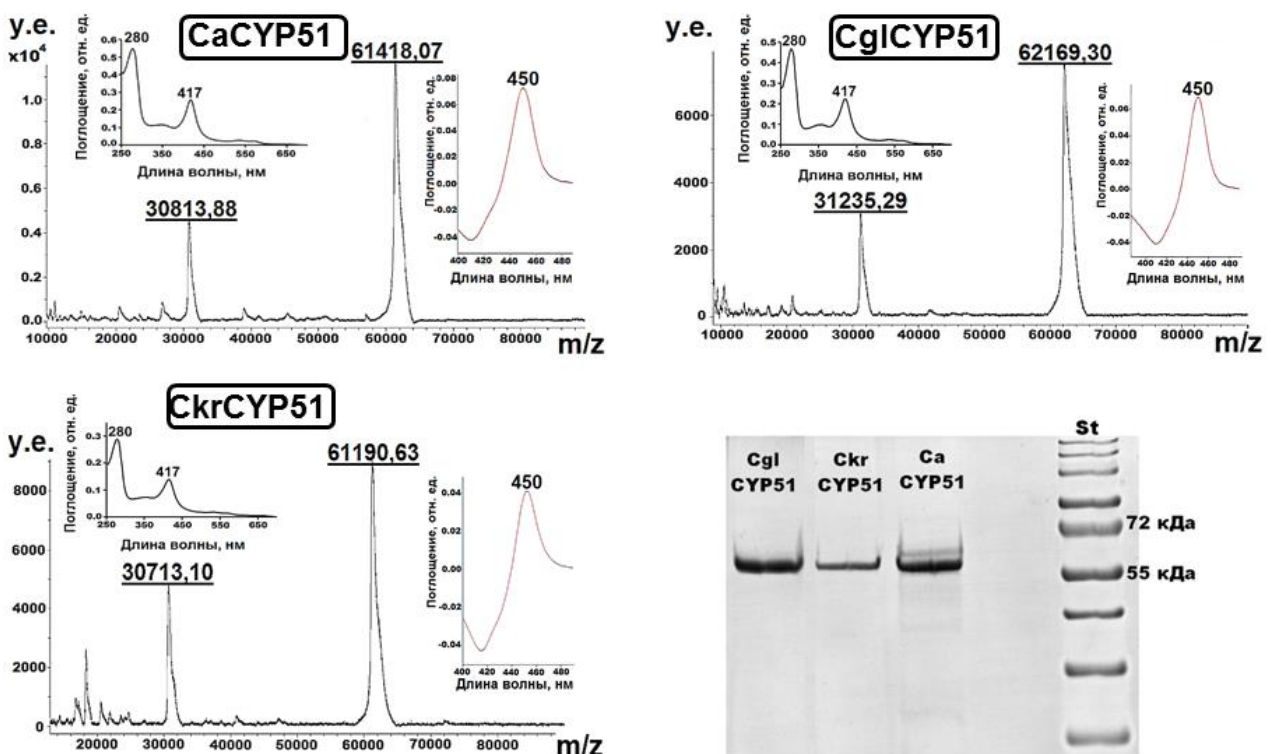


Рисунок 1. – Спектральные характеристики, масс-спектры и электрофореграмма препаратов рекомбинантных CYP51 грибов рода *Candida*

Препараты CYP51 были получены с ожидаемой молекулярной массой без следов протеолитической деградации (согласно данным электрофореза в полиакриламидном геле и MALDI-масс-спектрометрии). CO-спектр восстановленных дитионитом натрия CYP51 имеет характерный пик с максимумом поглощения на 450 нм (рисунок 1). В реконструированной *in vitro* системе полученные CYP51 проявляли 14- α -деметилазную каталитическую активность с образованием деметилированного продукта ланостерола – 4,4-диметилхолесто-8,14,24-триенола (FF-MAS), что подтверждает каталитические способности ферментов и эффективность белок-белковых взаимодействий с редокс-партнерами.

Связывание стероид-14 α -деметираз с противогрибковыми средствами. Оценку лиганд-связывающих свойств CYP51 резистентных штаммов клинически значимых грибов в отношении основных ингибиторов (азолов) проводили методом спектрофотометрического титрования. Полученные данные позволили определить параметры взаимодействия и вычислить константу диссоциации комплексов CYP51–азол.

CaCYP51 наиболее эффективно связывался с препаратом I-го поколения имидазолов – бифоназолом ($K_d = 0,0048 \pm 0,0011$ мкМ). Кроме того, высокой аффинностью к CaCYP51 обладали антимикотики – клотримазол, миконазол, эконазол, кетоконазол ($K_d = 0,048 \pm 0,006$ мкМ; $0,31 \pm 0,07$ мкМ; $0,62 \pm 0,23$ мкМ; $0,68 \pm 0,18$ мкМ, соответственно); и пестициды – эпоксиконазол и триадимефон ($K_d = 0,6 \pm 0,1$ мкМ и $0,40 \pm 0,06$ мкМ, соответственно). Относительно невысокая аффинность отмечена для используемых в агрохимии фунгицидов – пропиконазола и ципроконазола ($K_d = 10,9 \pm 0,8$ мкМ и $11,6 \pm 3,4$ мкМ, соответственно). Не наблюдалось связывания данной формы фермента с широко используемыми в противогрибковой терапии препаратами – флуконазолом и вориконазолом, что говорит о развитии резистентности у патогенных агентов как форме адаптации к воздействию ингибиторов данного фермента. При этом возникновение мутаций приводит к развитию резистентности в отношении близких по химической структуре молекул.

В случае CglCYP51 наиболее эффективное связывание фермента наблюдалось для бифоназола ($K_d = 0,020 \pm 0,005$ мкМ). Не выявлено взаимодействия CglCYP51 с фунгицидами – триадименолом, пенконазолом, эпоксиконазолом, триадимефоном, тиабендазолом. Все остальные азолы обладали довольно высокой аффинностью к CglCYP51 (K_d в диапазоне 0,1 – 1,2 мкМ). CglCYP51, в отличие от CaCYP51, проявлял достаточно высокую аффинность к лекарственным средствам, которые в настоящее время широко используются в противогрибковой терапии, что, возможно, обусловлено другими, не связанными с CYP51, механизмами возникновения резистентности.

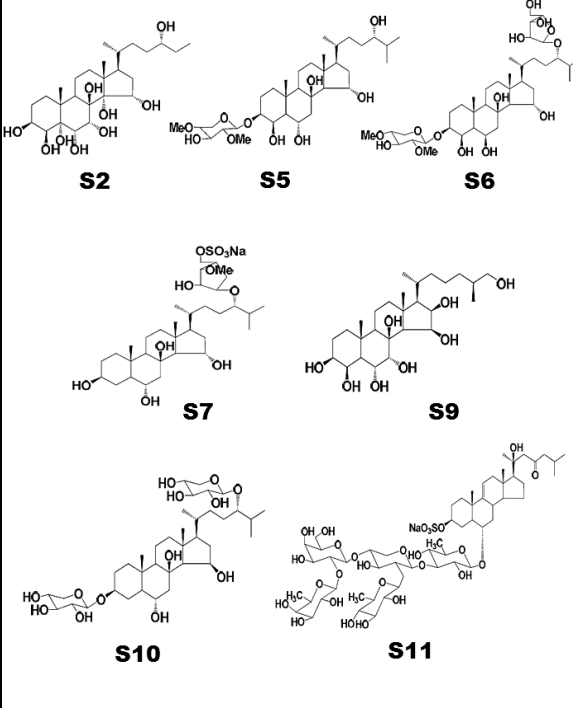
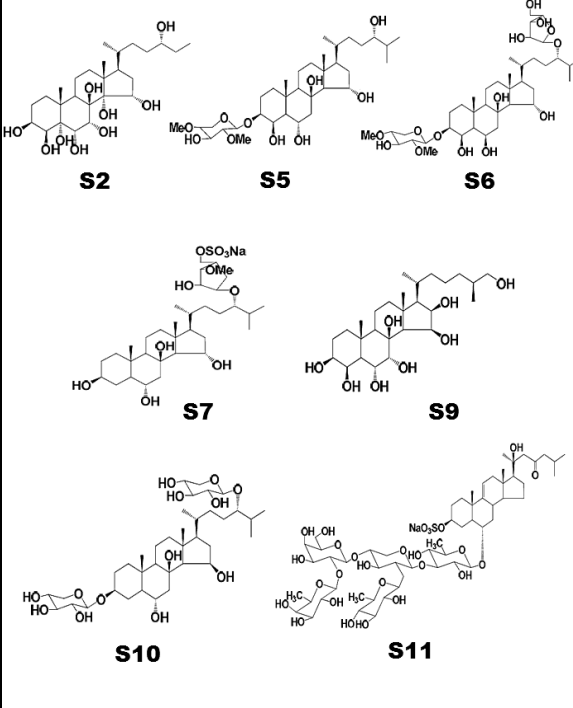
Связывание стероид-14 α -деметираз с производными стероидов. Нами были проведены исследования по изучению взаимодействия CYP51 человека (HsCYP51) и азол-резистентных штаммов клинически значимых грибов с производными стероидов животного происхождения, а также синтезированными 17-изоксазолстероидами и их производными как потенциальными и селективными ингибиторами CYP51.

Нами был проведен поиск возможных новых ингибиторов HsCYP51, CaCYP51 и CglCYP51 среди производных стероидов, выделенных из морских организмов класса *Asterioidea*. С использованием метода спектрофотометрического титрования мы обнаружили соединения, способные

взаимодействовать с активным центром HsCYP51 (**S5-S7**), CaCYP51 (соединения **S2, S5, S7, S9-S11**) и CglCYP51 (соединения **S6, S9-S11**) (таблица 1).

Соединения **S6** и **S7** взаимодействовали с HsCYP51 гораздо более афинно, чем с CYP51 грибов. Соединение **S5** проявляло более высокое сродство к CaCYP51.

Таблица 1. – Равновесные константы диссоциации (K_d) комплексов исследованных соединений с HsCYP51, CaCYP51 и CglCYP51

№ соединения	K_d , мкМ			
	HsCYP51	CaCYP51	CglCYP51	
S2	н.с.и.*	$0,16 \pm 0,01$	н.с.и.	
S5	$0,77 \pm 0,21$	$0,03 \pm 0,01$	н.с.и.	
S6	$0,08 \pm 0,02$	н.с.и.	$1,5 \pm 0,3$	
S7	$0,03 \pm 0,01$	$1,88 \pm 0,03$	н.с.и.	
S9	н.с.и.	$1,05 \pm 0,12$	$27,1 \pm 2,1$	
S10	н.с.и.	$3,29 \pm 0,38$	$5,1 \pm 1,0$	
S11	н.с.и.	$0,61 \pm 0,05$	$14,4 \pm 2,8$	
* н.с.и. - нет спектральных изменений				

Соединения **S2, S9-S11** демонстрировали связывание с CYP51 грибов с одновременным отсутствием спектральных изменений в экспериментах с HsCYP51. Причем соединения **S9-S11** проявляли большую аффинность к CaCYP51, чем к CglCYP51. Это позволяет рассматривать данные производные стероидов в качестве новых ведущих соединений для создания селективных ингибиторов цитохромов семейства CYP51, обладающих менее выраженными побочными эффектами, благодаря избирательному действию на данные ферменты у различных организмов.

В ИБОХ НАН Беларуси были синтезированы структурные аналоги стероидных 17-изоксазолов и изоксазолинов. Проведено их тестирование на цитохромах P450 HsCYP51 и CglCYP51. Обнаружены соединения (**2b, 4a, 7a, 16a-2, 13a, 6a-2** и **19a-2**), которые демонстрируют высокое сродство к активному центру HsCYP51 (K_d в диапазоне $0,87 - 3,28$ мкМ) и проявляют специфичность к ферменту (рисунок 2). Эта группа соединений выглядит перспективной для создания селективных ингибиторов CYP51 человека

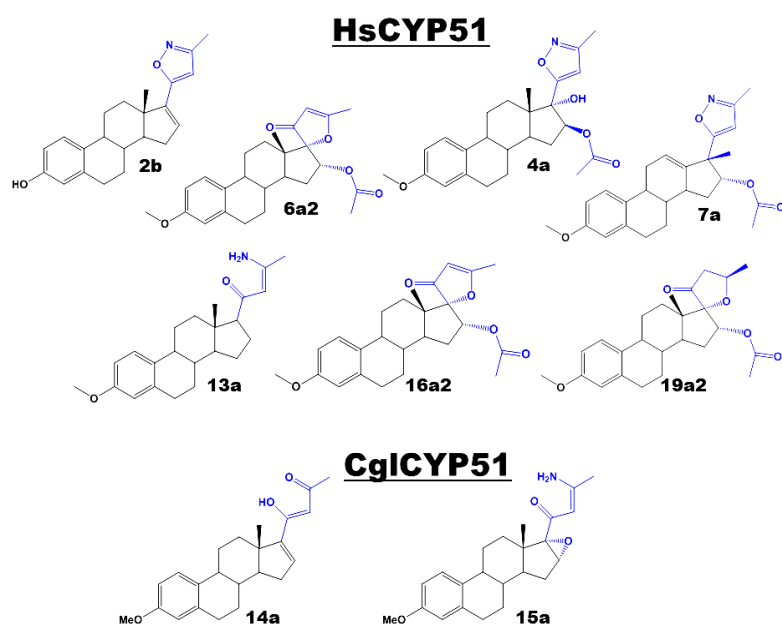


Рисунок 2. – Стероиды, которые проявляют высокое сродство к активному центру HsCYP51 и CglCYP51 к активному центру CYP51 человека дает возможность рассматривать эту группу лигандов как перспективную для разработки противогрибковых препаратов нового поколения, эффективных против азолрезистентных штаммов патогенных грибов.

Белок-белковые взаимодействия стероид-14 α -деметилазы человека. С целью изучения механизмов, лежащих в основе молекулярных взаимодействий между компонентами монооксигеназной системы, нами была проведена оценка парных взаимодействий между CYP51A1 человека и двумя изоформами цитохрома *b*₅ (CYB5A и CYB5B), а также двумя редокс-партнерами – НАДФН-цитохром Р450-редуктазой (CPR) и адренодооксином (Adx) методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Нами обнаружено, что CYP51A1 образует энтропийно-зависимые ($-T\Delta S < 0$) комплексы с обеими изоформами CYB5 (таблица 2). Это может быть связано с гидрофобными взаимодействиями и десольватацией гидрофобных областей в зоне контакта. В этом случае положительные значения энтальпийного фактора ($\Delta H > 0$) могут быть обусловлены конформационными изменениями в молекулах CYP51A1 и CYB5.

Таблица 2. – Значения констант равновесной диссоциации (K_d , при 25 °С), изменения термодинамических параметров при комплексообразовании между CYP51A1 и двумя изоформами CYB5 человека

Комплекс CYB5-CYP	K_d (мкМ)	ΔG (ккал/моль)	ΔH (ккал/моль)	$-T\Delta S$ (ккал/моль)
CYB5A-CYP51A1	$75,3 \pm 6,8$	$-5,6 \pm 0,8$	$76,6 \pm 9,5$	$-82,3 \pm 12,3$
CYB5B-CYP51A1	$103,0 \pm 18,7$	$-5,4 \pm 0,8$	$32,1 \pm 3,8$	$-37,6 \pm 5,6$

(мишени для антихолестеринемических и подавляющих сперматогенез препаратов).

Соединения **14a** и **15a** проявляют селективность по отношению к CYP51 клинически значимых грибов и характеризуются микромолярной аффинностью ($K_d = 2,9 \pm 0,5$ мкМ и $5,2 \pm 0,7$ мкМ, соответственно).

Отсутствие сродства соединений **14a** и **15a** к

Показанное нами довольно низкое сродство CYP51 к CYP5A/CYP5B ($K_d \sim 70-100$ мкМ) согласуется с тем, что цитохром b_5 не требуется для переноса электронов в каталитическом цикле с участием CYP51A1 и, соответственно, не влияет на каталитическую активность данного фермента.

Нами были рассчитаны параметры образования комплексов между CYP51A1 и двумя редокс-партнерами - CPR и Adx (таблица 3).

Таблица 3. – Значения констант равновесной диссоциации (K_d , при 25 °C) и изменения термодинамических параметров в результате образования комплексов CYP51A1 с CPR и Adx

CYP51A1/ПП	K_d (мкМ)	ΔG , (ккал/моль)	ΔH , (ккал/моль)	$-\Delta S$, (ккал/моль)
CYP51A1/CPR	$0,30 \pm 0,05$	$-8,8 \pm 0,7$	$26,0 \pm 3,0$	$-35,0 \pm 5,0$
CYP51A1/Adx	$0,45 \pm 0,03$	$-8,7 \pm 0,3$	$34,0 \pm 4,0$	$-43,0 \pm 6,0$

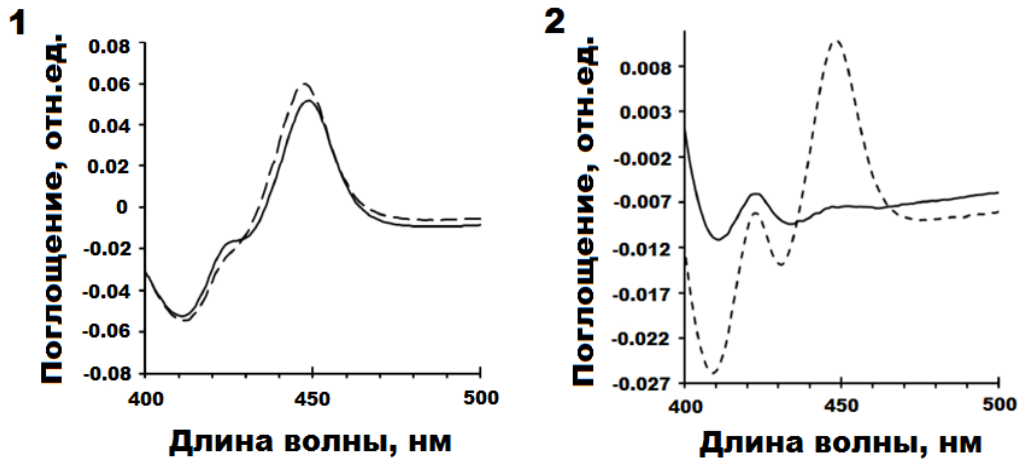
Как видно из таблицы 3, CYP51A1 образует энтропийно-зависимые комплексы с CPR и Adx ($-\Delta S < 0$). Образование энтропийно-зависимого комплекса CYP51A1/CPR можно объяснить тем, что молекула CPR претерпевает значительные структурные перестройки при образовании комплекса с CYP. При формировании комплексов CYP/CPR положительные значения ΔH могут быть связаны с разрушением внутримолекулярных водородных связей и солевых мостиков, наблюдающимся при конформационных изменениях редуктазы. Помимо конформационных перестроек в энтропийную составляющую ΔG вносят вклад гидрофобные взаимодействия между мембранными доменами CYP и CPR.

Мы показали, что в ходе каталитической реакции в присутствии митохондриальной пары Adx/AdR (адренодоксин / адренодоксин редуктаза) не происходит образования продукта реакции, хотя CYP51A1 имеет почти одинаковое сродство к Adx и CPR (таблица 4).

Таблица 4. – Функциональная оценка взаимодействия CYP51A1 с редокс-партнерами

	Перенос первого электрона		Каталитическая активность		Субстрат
	Adx/AdR	CPR	Adx/AdR, мин ⁻¹	CPR, $\cdot 10^{-3}$ мин ⁻¹	
CYP51A1	-	+	-	10,0	ланостерол

Это согласуется с данными, полученными при проведении одноэлектронного ферментативного восстановления CYP51A1 в присутствии Adx/AdR и CPR (рисунок 3).



Сплошная линия отражает ферментативное восстановление СУР51А1 (1 – в паре с СРР, 2 – в паре с Аdх/АdR), пунктирная – химическое восстановление СУР51А1 с использованием дитионита натрия

Рисунок 3. – Одноэлектронное восстановление СУР51А1

Анализ результатов взаимодействия Аdх и СРР с СУР51А1 говорит о высокой консервативности сайта межмолекулярного узнавания данных белков.

Полученная в ходе проведенных исследований информация о белок-белковых взаимодействиях СУР51 в совокупности с данными по другим Р450 обеспечит комплексную оценку взаимодействия различных Р450 с редокс-партнерами и белками-модуляторами, что позволит дополнить понимание молекулярных механизмов межбелковых взаимодействий в Р450 зависимых монооксигеназных системах.

Связывание олигонуклеотидных аптамеров с поверхностью стероид-14 α -деметилаз. В сотрудничестве с Институтом биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича нами осуществлен дизайн, синтез и анализ аптамеров для СУР51А1 человека в качестве мишени. На первых этапах были применены методы молекулярного докинга и моделирования молекулярной динамики для идентификации олигонуклеотидов, специфических в отношении поверхностных участков СУР51А1.

Экспериментальная оценка синтезированных аптамеров с использованием метода ППР показала, что они взаимодействуют с СУР51 со значениями K_d в диапазоне $1,4 \cdot 10^{-7}$ М до $1,3 \cdot 10^{-6}$ М.

Оценка селективности сконструированных аптамеров показала их неспособность взаимодействовать с другими компонентами митохондриальной монооксигеназной системы цитохрома Р450 (НАДФН-цитохром Р450-редуктазой, цитохромом b_5) и с основными белками крови (сывороточный альбумин и тромбин).

Тем не менее, эти аптамеры могут связываться с СУР3А4, который имеет идентичность аминокислотной последовательности с СУР51 ~ 20%. Аптамеры,

сконструированные для CYP51A1, могут взаимодействовать с CYP3A4, поскольку оба фермента обогащены ароматическими и положительно заряженными аминокислотными остатками, предположительно локализованными в относительно консервативной области связывания с редокс-партнерми. Оптимизация аптамерных структур или разработка двухвалентных аптамерных конструкций может повысить их селективность и аффинность.

Аптамеры, разработанные в отношении цитохромов P450, могут быть использованы для модуляции белок-белковых взаимодействий в монооксигеназных системах, изменяя активность этих сложных ферментных систем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты исследования

1. В результате комплексного биоинформационного анализа мутаций *CYP51* *C. albicans*, обуславливающих возникновение устойчивости к противогрибковым лекарственным соединениям азолового ряда, в клинических изолятах *C. albicans* были идентифицированы мутации гена *CYP51*: Lys-179-Glu, Leu-224-Ile, Gly-307-Cys, Met-372-Thr, Val-488-Ile, Lys-128-Thr, Val-404-Leu. Показано, что аминокислотные замены Val-488-Ile, Lys-128-Thr и Val-404-Leu не приводили к развитию резистентности к азолам (вориконазолу, флуконазолу, итраконазолу). Молекулярный анализ генов стероид-14 α -деметилаз резистентных штаммов других грибов, которые часто вызывают грибковые инфекции в белорусских клиниках, позволил выявить мутации, которые могут играть роль в возникновении устойчивости к противогрибковым средствам азолового ряда – *Candida guilliermondii* (Cys-37-Trp), *Aspergillus fumigatus* (Tyr-46-Glu, Thr-248-Asn и Glu-255-Asp), *Candida glabrata* (Ser-440-Cys, Gly-450-Asp). В результате комплексного применения культуральных, ПЦР-диагностических и масс-спектрометрических методов был разработан алгоритм для быстрого и эффективного установления таксономической принадлежности дрожжевых и мицелиальных грибов, включающий MALDI-TOF анализ совокупности клеточных белков и определение таксономической принадлежности грибов с использованием известных баз данных и компьютерных программ [8, 10, 11, 12, 14, 15].

2. Создание экспрессионных конструкций в ходе молекулярного клонирования, проведение гетерологической экспрессии в бактериальных клетках и применение металл-аффинной хроматографии и хроматографии на гидроксипатите позволило получить CYP51 азол-резистентных штаммов

грибов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*. Впервые получен рекомбинантный CYP51 *C. krusei*, а также CYP51 *C. albicans*, содержащий мутации Lys-179-Glu, Leu-224-Ile, Gly-307-Cys, Met-372-Thr, и CYP51 *C. glabrata*, содержащий мутации Ser-440-Cys, Gly-450-Asp. Разработанная система получения рекомбинантных CYP51 грибов обеспечивает высокий выход фермента - 50-100 нмоль (3,1 - 6,2 мг) белка на 1 л культуральной среды [1, 6, 9, 10, 13, 15].

3. Изучение специфичности CaCYP51 и CglCYP51 к связыванию соединений азолового ряда показало, что резистентность у патогенных грибов развивается как форма адаптации к действию ингибиторов данного типа. Появление мутаций вызывает устойчивость к схожим по химической структуре молекулам. CglCYP51, в отличие от CaCYP51, проявлял высокую аффинность к азолам, используемым в противогрибковой терапии. Не исключено, что это обусловлено другими, не связанными с CYP51, механизмами возникновения резистентности [1, 16, 17, 20].

4. В результате изучения взаимодействия CYP51 человека и грибов с окисленными стероидными соединениями животного происхождения, а также синтезированными 17-изоксазолилстероидами и их производными обнаружены соединения, специфичные к CYP51 человека, а также соединения, которые селективно и с высоким сродством взаимодействуют с CYP51 резистентных штаммов грибов (для большинства соединений значения K_d находятся на микромолярном уровне). Благодаря избирательному действию на CYP51 различных организмов, данные лиганды могут быть использованы для создания селективных ингибиторов CYP51 человека (мишени для антихолестеринемических и подавляющих сперматогенез препаратов) и разработки противогрибковых средств нового поколения, эффективных против азолрезистентных штаммов патогенных грибов [2, 5, 9, 16, 18, 19, 20].

5. Установление параметров взаимодействия между CYP51 человека и белками-партнерами выявило низкую аффинность обеих изоформ цитохрома *b5* к CYP51 человека ($K_d = 75,3 \pm 6,8$ мкМ для CYP51A и $K_d = 103,0 \pm 18,7$ мкМ для CYP51B) и образование прочных комплексов с редокс-партнерами - НАДФН-цитохром P450-редуктазой (CPR) и адренодоксином (Adx). Обнаружено, что CYP51 человека не может быть эффективно восстановлен с помощью митохондриальной пары Adx/AdR, хотя он имеет почти одинаковое сродство к Adx и CPR ($K_d = 0,45 \pm 0,03$ мкМ и $K_d = 0,30 \pm 0,05$ мкМ, соответственно) [4, 7].

6. Впервые установлено связывание олигонуклеотидных аптамеров с CYP51 человека. Аптамеры, специфичные к ферментам суперсемейства цитохрома P450, могут быть использованы для регуляции активности монооксигеназных систем по механизму изменения белок-белковых взаимодействий их компонентов [3].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Видовая идентификация дрожжевых и плесневых микромицетов при помощи масс-спектрометрического анализа с применением технологии MALDI-TOF является частью разработанной и внедренной в клиническую практику инструкции по применению «Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь от 20.12.2019 г., регистрационный № 008-1119.

2. Полученные CYP51 клинически значимых грибов могут быть использованы в научно-исследовательской работе при проведении комплексного структурно-функционального анализа ферментов грибов и их аналога в организме человека с целью создания новых противогрибковых лекарственных средств, направленных на подавление роста резистентных штаммов грибов, механизм действия которых связан с P450. На основании данных по получению рекомбинантных CYP51 грибов был разработан и утвержден опытно-промышленный регламент на производство препарата ферментного «Рекомбинантный цитохром CYP51 грибов».

3. Аптамеры, разработанные в отношении цитохромов P450, могут быть использованы для создания специфических ингибиторов белок-белковых взаимодействий в монооксигеназных системах.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1) Молекулярное клонирование, экспрессия, очистка и определение лиганд-связывающих свойств цитохрома P450₅₁ *Candida albicans* / **Т.В. Шкель**, А.В. Василевская, А.А. Гилеп, М.А. Черновецкий, И.Г. Лукьяненко, С.А. Усанов // Доклады НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, №5. – С. 64–71.

2) Поиск ингибиторов цитохрома P450(51) человека (CYP51A1): структурные аналоги ланостерола растительного и животного происхождения / О.В. Гнеденко, Н.В. Иванчина, А.А. Кича, А.А. Гилеп., Н.В. Струшкевич, **Т.В. Шкель**, М.А. Черновецкий, А.С. Иванов, А.В. Лисица, С.А. Усанов, В.А. Стоник, А.И. Арчаков // Биомедицинская химия. – 2014. – Т. 60, вып. 5. – С. 528–537.

3) Computer-aided design of aptamers for cytochrome p450 / D.S. Shcherbinin, O.V. Gnedenko, S.A. Khmeleva, S.A. Usanov, A.A. Gilep, A.V. Yantsevich, **T.V. Shkel**, I.V. Yushkevich, S.P. Radko, A.S. Ivanov,

A.V. Veselovsky, A.I. Archakov // Journal of structural biology. – 2015. – Vol. 191, № 2. – P. 112–119.

4) 4. Thermodynamics of interactions between mammalian cytochromes P450 and b5 / E. Yablokov, A. Florinskaya, A. Medvedev, G. Sergeev, N. Strushkevich, A. Luschik, **T. Shkel**, I. Haidukevich, A. Gilep, S. Usanov, A. Ivanov // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol. 619, № 1. – P. 10–15.

5) Structural Analogues of Lanosterol from Marine Organisms of the Class *Asteroida* as Potential Inhibitors of Human and *Candida albicans* Lanosterol 14 α -demethylases / L.A. Kaluzhskiy, **T.V. Shkel**, N.V. Ivanchina, A.A. Kicha, I.P. Grabovec, A.A. Gilep, N.V. Strushkevich, M.A. Chernovetsky, A.E. Medvedev, S.A. Usanov, A.S. Ivanov // Natural Product Communications. – 2017. – Vol. 12, №. 12. – P. 1843–1846.

6) Белок-лигандные взаимодействия CYP51 *Candida glabrata* и CYP11B1 человека с 7-замещенными производными 19-нортестостеронов / **Т.В. Шкель**, И.П. Грабовец, А.А. Гилеп, Т.С. Варакса, Н.В. Струшкевич, В.И. Долгопалец, Ю.Г. Чернов // Известия НАН Беларуси. Серия химических наук. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 450–454.

7) A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners / E.O. Yablokov, T.A. Sushko, P.V. Ershov, A.V. Florinskaya, O.V. Gnedenko, **T.V. Shkel**, I.P. Grabovec, N.V. Strushkevich, L.A. Kaluzhskiy, S.A. Usanov, A.A. Gilep, A.S. Ivanov // Biochimie. – 2019. – Vol. 162. – P. 156–166.

8) Современные подходы к видовой идентификации и оценке антимикотикорезистентности грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции / С.Л. Кондаурова, **Т.В. Шкель**, А.А. Гилеп, А.И. Ковалевская, М.В. Белевцев, Т.Е. Секацкая, Т.Т. Кульбицкая, Т.В. Райко // Вестник Фонда фундаментальных исследований. – 2020. – № 3. – С. 122–139.

9) Transformations, NMR Studies and Biological Testing of Some 17 β -Isoxazolyl steroids and Their Heterocyclic Ring Cleavage Derivatives / A. Baranovsky, A. Ladyko, **T. Shkel**, S. Sokolov, N. Strushkevich, A. Gilep // Steroids. – 2021. – Vol. 166. – P. 1–6.

Статьи в других научных журналах:

10) Молекулярный анализ стерол 14 α -деметираз (*cyp51*) патогенных грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции / **Т.В. Шкель**, А.В. Василевская, А.А. Гилеп, М.А. Черновецкий, И.Г. Лукьяненко, С.А. Усанов // Труды БГУ. – 2013. – Т. 8, ч.1. – С. 152–158.

11) Молекулярная диагностика патогенных грибов и разработка препаратов для лечения микозов / **Т.В. Шкель**, А.А. Гилеп, Н.В. Струшкевич, С.А. Усанов, М.А. Черновецкий, В.А. Стоник, Л.А. Калужский, А.С. Иванов // Биорегуляторы: исследование и применение. – 2014. – С. 249–261.

Тезисы докладов и материалы конференций:

12) Molecular analysis of CYP51 of pathogenic fungi causing nosocomial infections (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida guilliermondii*) / **T.V. Shkel**, A.V. Vasilevskaya, A.A. Gilep, S.A. Usanov // Biodiversity & Biotechnology: 11th International Symposium on Cytochrome P450, 22-26 June 2012, Torino, Italy. – P. 67.

13) **Шкель, Т.В.** Молекулярный анализ, клонирование, экспрессия, очистка и определение лиганд-связывающих свойств CYP51 патогенных грибов отдела *Ascomycota* / Т.В. Шкель, А.В. Василевская, А.А. Гилеп // Химия, структура и функция биомолекул: материалы IV междунар. науч. конф., Минск, 17-19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии, редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2012. – С. 239–240.

14) Структурно-функциональный анализ CYP51 патогенных грибов родов *Aspergillus* и *Candida*, являющихся причиной нозокомиальных инфекций / **Т.В. Шкель**, А.В. Василевская, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // VI Российский симпозиум «Белки и пептиды»: Материалы симпозиума, Уфа Республики Башкортостан, 10-15 июня 2013 г. / ИСЭИ УНЦ РАН, редкол.: В.Т. Иванов [и др.]. – Уфа, 2013. – С. 249.

15) Молекулярный анализ CYP51 патогенных грибов родов *Aspergillus* и *Candida*, являющихся причиной нозокомиальных инфекций / **Т.В. Шкель**, А.В. Василевская, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Успехи медицинской микологии: материалы конференции, Москва, 26 сентября 2013 г. / Национальная академия микологии, Ю.В. Сергеев (гл. ред.) [и др.]. – Москва, 2013. – С. 59–60.

16) Структурно-функциональный анализ стерол-14 α -деметилаз из азол-резистентных штаммов патогенных грибов / **Т.В. Шкель**, Н.В. Струшкевич, Я.В. Диченко, С.А. Усанов, М.А. Черновецкий, Л.А. Калужский, Н.В. Иванчина, А.А. Кича, В.А. Стоник, А.С. Иванов, А.А. Гилеп // Успехи медицинской микологии: материалы VI Всероссийского конгресса по медицинской микологии, Москва, 8-10 апреля 2014 г. / Национальная академия микологии, Ю.В. Сергеев (гл. ред.) [и др.]. – Москва, 2014. – Т. 12. – С. 64-66.

17) Молекулярный анализ стерол-14 α -деметилаз патогенных грибов, вызывающих внутрибольничные инфекции / **Т.В. Шкель**, А.В. Василевская, С.А. Усанов, М.А. Черновецкий, И.Г. Лукьяненко, В.А. Стоник, Л.А. Калужский, А.С. Иванов, А.А. Гилеп // Химия, структура и функция биомолекул: материалы V междунар. науч. конф., Минск, 4-6 июня 2014 г. /

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, редкол.: Ф.А. Лахвич [и др.]. – Минск, 2014. – С. 204–205.

18) Исследование взаимодействия структурных аналогов ланостерола со стерин-14 α -деметилазой патогенных грибов, вызывающих внутрибольничные инфекции / **Т.В. Шкель**, Л.А. Калужский, А.А. Гилеп, С.А. Усанов, М.А. Черновецкий // Материалы международного конгресса: Биотехнология: состояние и перспективы развития, Москва, 20-22 февраля 2017 г. / ООО «РЭД ГРУПП». – Москва, 2017. – Т. 2. – С. 574–575.

19) Структурные аналоги ланостерола из морских организмов класса *Asteroida* – потенциальные ингибиторы ланостерол-14- α -деметилаз человека и *Candida albicans* / Л.А. Калужский, **Т.В. Шкель**, Н.В. Иванчина, А.А. Кича, И.П. Грабовец, А.А. Гилеп, Н.В. Струшкевич, М.А. Черновецкий, А.Е. Медведев, С.А. Усанов, А.С. Иванов // XII чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова: материалы междунар. науч. конф. по биоорганической химии и Белки и пептиды: материалы VIII российского симпозиума, Москва, 18–22 сентября 2017 г. / ИБХ РАН, редкол.: В.Т. Иванов, А.Г. Габибов. – Москва, 2017. – С. 127.

20) Изучение взаимодействия 14,17,19-замещенных производных ланостерола со стерин-14 α -деметилазой патогенных грибов, вызывающих нозокомиальные инфекции / **Т.В. Шкель**, С.А. Усанов, А.В. Барановский, Г.Ю. Чернов, М.А. Черновецкий, В.А. Стоник, Л.А. Калужский, А.С. Иванов, А.А. Гилеп // XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова: материалы междунар. науч. конф. по биоорганической химии и Белки и пептиды: материалы VIII российского симпозиума, Москва, 18–22 сентября 2017 г. / ИБХ РАН, редкол.: В.Т. Иванов, А.Г. Габибов. – Москва, 2017. – С. 141.

Работы, подтверждающие практическую значимость результатов диссертации:

– Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов: инструкция по применению № 008-1119 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 20.12.2019 г. / сост. С.А. Усанов, А.А. Гилеп, М.В. Белевцев, **Т.В. Шкель**, Т.Е. Секацкая, Т.Т. Кульбицкая, С.Л. Кондаурова, Т.В. Райко, Е.Я. Скоповец. – Минск : Институт биоорганической химии НАН Беларуси; РНПЦ детской онкологии, гематологии и иммунологии, 2019. – 17 с.

– Опытнo-промышленный регламент № ОПР-04/2021 на производство препарата ферментного «Рекомбинантный цитохром CYP51 грибов» / А.А. Гилеп, Н.П. Башко, **Т.В. Шкель**, И.П. Грабовец // Институт биоорганической химии НАН Беларуси – Минск, 2021. – 31 с.



РЕЗЮМЕ

Шкель Татьяна Владимировна

Лиганд-связывающие свойства и белок-белковые взаимодействия CYP51 человека и азол-резистентных штаммов грибов рода *Candida*

Ключевые слова: стероид-14 α -деметилаза (CYP51) человека и грибов, производные стероидов, азолы, белок-белковые взаимодействия, выявление мутаций.

Цель работы: комплексный молекулярный анализ клинически значимых грибов, определение лиганд-связывающих свойств и проведение интерактомных исследований стероид-14 α -деметилаз человека и грибов.

Методы исследования: биохимические, молекулярно-биологические, хроматографические и биосенсорные методы, разностное спектрофотометрическое титрование, масс-спектрометрия, структурная биоинформатика.

Результаты работы и их новизна: разработан алгоритм для быстрого и эффективного определения таксономической принадлежности грибов. Разработан способ получения в препаративных количествах рекомбинантных белков CYP51 грибов *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* (получен впервые). Установлено взаимодействие CYP51 человека и грибов с производными стероидов животного происхождения и синтезированными 17-изоксазолилстероидами. Показано специфическое взаимодействие сконструированных олигонуклеотидных аптамеров с поверхностью CYP51 человека. Определены параметры взаимодействия CYP51 с редокс-партнерами. Установлено, что обе изоформы CUB5 имеют низкую аффинность к CYP51 человека. Обнаружено, что CYP51 человека не может быть эффективно восстановлен с помощью митохондриальной пары Adx/AdR.

Рекомендации по использованию:

Данные об обнаруженных ингибиторах стероид-14 α -деметилазы человека и грибов могут быть использованы при создании новых селективных противогрибковых лекарственных средств. Полученная информация о белок-белковых взаимодействиях CYP51 в совокупности с данными по другим P450 позволит дополнить понимание молекулярных механизмов межбелковых взаимодействий в P450-зависимых монооксигеназных системах. Результаты работы по идентификации микромицетов при помощи масс-спектрометрического анализа являются частью разработанной и внедренной в клиническую практику инструкции по применению «Метод идентификации дрожжевых и мицелиальных патогенных грибов».

РЭЗЮМЭ

Шкель Таццяна Уладзіміраўна

Ліганд-звязваючыя ўласцівасці і бялок-бялковыя ўзаемадзеянні CYP51 чалавека і азол-рэзістэнтных штамаў грыбоў роду *Candida*

Ключавыя словы: стэроід-14 α -дэметылаза (CYP51) чалавека і грыбоў, вытворныя стэроідаў, азолы, бялок-бялковыя ўзаемадзеянні, выяўленне мутацый.

Мэта даследвання: комплексны малекулярны аналіз клінічна значных грыбоў, вызначэнне ліганд-злучаючых уласцівасцей і правядзенне інтэрактомных даследаванняў стэроід-14 α -дэметылаз чалавека і грыбоў.

Метады даследвання: біяхімічныя, малекулярна-біялагічныя, храматаграфічныя і біясэнсорныя метады, рознаснае спектрафотаметрычнае тытраванне, мас-спектраметрыя, структурная біяінфарматыка.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: распрацаваны алгарытм для хуткага і эфектыўнага вызначэння таксанамічнай прыналежнасці грыбоў. Распрацаваны спосаб атрымання ў прэпаратыўных колькасцях рэкамбінантных бялкоў CYP51 грыбоў *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* (атрыманы ўпершыню). Устаноўлена ўзаемадзеянне CYP51 чалавека і грыбоў з вытворнымі стэроідаў жывёльнага паходжання і сінтэзаванымі 17-ізаксазалілстэроідамі. Паказана спецыфічнае ўзаемадзеянне сканструяваных алігануклеатыдных аптамераў з паверхняй CYP51 чалавека. Вызначаны параметры ўзаемадзеяння CYP51 з рэдокс-партнёрамі. Устаноўлена, што абедзве ізаформы CYP5 маюць нізкую афіннасць да CYP51 чалавека. Выяўлена, што CYP51 не можа быць эфектыўна адноўлены з дапамогай мітахандрыяльнай пары Adx/AdR.

Рэкамендацыі па выкарыстанні:

Дадзеныя аб выяўленых інгібітарых стэроід-14 α -дэметылазы чалавека і грыбоў могуць быць выкарыстаны пры стварэнні новых селектыўных супрацьгрыбковых лекавых сродкаў. Атрыманая інфармацыя аб бялок-бялковых узаемадзеяннях CYP51 у сукупнасці з дадзенымі па іншых P450 дазволіць дапоўніць разуменне малекулярных механізмаў міжбялковых узаемадзеянняў у P450-залежных монааксігеназных сістэмах. Вынікі работы па ідэнтыфікацыі мікраміцэтаў пры дапамозе мас-спектраметрычнага аналізу з'яўляюцца часткай распрацаванай і укаранёнай у клінічную практыку інструкцыі па ўжыванні «Метад ідэнтыфікацыі дражджавых і міцэліяльных патагенных грыбоў».

SUMMARY

Shkel Tatsiana Vladimirovna

Ligand-binding properties and protein-protein interactions of CYP51 of human and azole-resistant fungal strains of the genus *Candida*

Keywords: human and fungal sterol-14 α -demethylase (CYP51), steroid derivatives, azoles, protein-protein interactions, identification of mutations.

Aim of the work: complex molecular analysis of clinically significant fungi, determination of ligand-binding properties and interactomic studies of human and fungal sterol-14 α -demethylases.

Methods of the research: biochemical, molecular biology, chromatographic and biosensor methods, differential spectrophotometric titration, mass spectrometry, structural bioinformatics.

Results and their novelty: an algorithm for quick and efficient determination of taxonomic affiliation of fungi has been developed. A method for isolation recombinant CYP51 proteins in preparative quantities of fungi *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* (obtained for the first time) has been developed. The interaction of human and fungi CYP51 with derivatives of animal origin steroids and synthesized 17-isoxazolyl steroids has been established. The specific interaction of the designed oligonucleotide aptamers with the surface of human CYP51 has been shown. The parameters of CYP51 interaction with redox partners have been determined. It is defined that both CYB5 isoforms have low affinity for human CYP51. It is revealed that CYP51 cannot be efficiently reduced by the mitochondrial Adx/AdR pair.

Application guidelines: the data on the discovered inhibitors of human and fungal sterol-14 α -demethylase can be used to create new selective antifungal drugs. The information obtained on protein-protein interactions of CYP51 in combination with the data on other P450s will help to understand molecular mechanisms of protein-protein interactions in P450-dependent monooxygenase systems. The results of the work on the identification of micromycetes using mass spectrometric analysis are the part of the developed and advanced into clinical practice instruction for use «Method for the identification of yeast and filamentous pathogenic fungi».