

УДК 612.853-205
© Коллектив авторов

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ЦИТОХРОМА CYP51 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS В ESCHERICHIA COLI.

А.С.Шавкунов¹, В.Н.Лазарев¹, В.Г.Згода², В.М.Говорун¹, П.Леви³, П.Янссен³,
А.И.Арчаков²

¹ НИИ физико-химической медицины МЗ РФ, 119828, Москва, ул.Малая Пироговская, 1а; факс (095) 246-45-01;
эл. почта: a_s_shavkunov@hotmail.ru

² ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН
119832, Москва, ул. Погодинская, д.10; факс (095) 245-08-57

³ Center for Molecular Design, Turhoutseweg 30, 2340 Beerse, Belgium

Стерол-14 α -деметилаза CYP51 *Mycobacterium tuberculosis* в настоящее время рассматривается как одна из перспективных мишеней для противотуберкулезных препаратов нового поколения. По аналогии с эукариотическими стерол-14 α -деметилазами, в качестве селективных ингибиторов CYP51 *M. tuberculosis* (MT CYP51) предполагается использовать препараты группы азолов, представляющие собой N-замещенные производные имидазола и триазола. Для первичного скрининга веществ данной группы *in vitro* по критерию специфического сродства к белковой мишени нами была сконструирована высокоэффективная система гетерологичной экспрессии MT CYP51 в *E. coli*. Рекombинантный белок выделяли металлоаффинной хроматографией; его выход составил около 1,5 мкмоль на 1 л культуры. Было показано, что рекombинантный белок взаимодействует с кетоконазолом с константой диссоциации 7,7 мкМ, соответствующей описанной в литературе. Таким образом, рекombинантный белок MT CYP51, полученный с помощью разработанной нами системы экспрессии в *E. coli*, может быть использован для тестирования новых антимикобактериальных препаратов, создаваемых на основе азолов.

Ключевые слова: цитохром P450, CYP 51, стерол-14 α -деметилаза, *Mycobacterium tuberculosis*, экспрессия.

ВВЕДЕНИЕ. В последние годы в мире все более широкое распространение получают штаммы *M. tuberculosis*, обладающие резистентностью к одному или нескольким из традиционно используемым противотуберкулезным препаратам. Часто встречаются мультирезистентные штаммы, обладающие устойчивостью как минимум к двум из основных противотуберкулезных препаратов, рифампину и изониазиду [1]; известны также штаммы, спектр лекарственной резистентности которых включает 11 и более препаратов [2]. По результатам исследования, проведенного ВОЗ в 1994-1997 гг., во всех 35 странах, включенных в исследование (в том числе в США), были отмечены случаи лекарственно-резистентного туберкулеза, составлявшие от 2 до 42% общей заболеваемости туберкулезом [3]. Среди факторов возникновения и широкого распространения резистентных и мультирезистентных штаммов *M. tuberculosis* следует отметить: 1) неполную или неадекватную терапию, связанную с отсутствием врачебного контроля, либо недоступностью эффективных препаратов; 2) мощные миграционные потоки

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *MT CYP51* В *E. COLI*

населения из стран третьего мира, где особенно велика частота встречаемости резистентных штаммов; 3) глобальную пандемию ВИЧ-инфекции, которая вызывает существенно ускоренное развитие и осложненное течение туберкулеза [4-7]. Очевидно, что в сложившейся ситуации особую актуальность приобретает разработка эффективных противотуберкулезных препаратов, обладающих принципиально новым механизмом действия.

Одной из перспективных молекулярных мишеней для противотуберкулезных препаратов нового поколения является белковый продукт гена Rv0764 *M. tuberculosis*, представляющий собой стерол-14 α -деметилазу CYP51 из надсемейства цитохромов P450 (MT CYP51) [8, 9]. Показано, что специфические ингибиторы CYP51 группы азолов обладают антимикобактериальной активностью *in vitro* [10-12]. Кроме того, как показали наши предыдущие исследования [13], нуклеотидная последовательность гена *CYP51* у клинических изолятов *M. tuberculosis* высококонсервативна, и, следовательно, сравнительно невелика вероятность возникновения штаммов, резистентных к новым препаратам.

Важно отметить, что при связывании с белками семейства CYP51 азолы, представляющие собой производные имидазола и триазола, вызывают характерные спектральные изменения (спектр связывания типа IIa). Это позволяет использовать сканирующую абсорбционную спектрофотометрию для изучения взаимодействия белка с ингибиторами [14, 15]. Представляется целесообразным создание системы для первичного скрининга противотуберкулезных препаратов на основе азолов *in vitro* с использованием рекомбинантного MT CYP51. Такая система позволила бы существенно ускорить и удешевить процесс скрининга.

МЕТОДИКА. В работе использовали геномную ДНК, выделенную из *M. tuberculosis* штамма H37Rv, любезно предоставленного Л.Н. Черноусовой (ЦНИИ Туберкулеза РАМН). В работе использовали следующие штаммы *E. coli*: DH5a, B834, BL21 (DE3) pLysS, BL21 "gold", AD494 (DE3), M15[pRep4].

Конструирование рекомбинантных плазмид проводили с использованием следующих векторов: pGEM-T/easy ("Promega", США), pET-15b, pET-32a(+) ("Novagen", США), и pQE-32 ("QUIAGEN", Германия).

Клетки *M. tuberculosis* лизировали в буфере TTE (1% Тритон X-100, 0,2 М трис-HCl, pH 8,3, 0,2 М ЭДТА), инкубируя при 95°C в течение 20 минут. ДНК из лизатов выделяли с использованием набора для выделения из тест-системы "Политуб" (ООО НПФ "Литех").

Для ПЦР-амплификации полноразмерной кодирующей последовательности гена *MT CYP51* (Rv0764c) были выбраны специфические праймеры и температурные условия амплификации. Для амплификации использовали праймеры: 5'-CATATGAGCGCTGTTGCACTACCC, 5'-CATATGCCATCGT-TAAACTCCCGTTC, 5'-AAGCTTGCCCATCGTTCAACTCCCGTTC. Температурные условия амплификации: 95°C - 5 мин; 95°C - 30 с, 65°C - 30 с, 72°C - 2 мин (25 циклов); 72°C - 15 мин. Электрофоретическое разделение ампликонов в 1,5 % агарозном геле проводили по стандартной методике [16]. Для клонирования целевых фрагментов вырезали соответствующие участки геля и выделяли ДНК с помощью набора Wizard PCR Preps DNA Purification System ("Promega") согласно инструкции производителя.

Гидролиз ДНК рестрикционными эндонуклеазами осуществляли по стандартной методике [16].

Для лигирования амплифицированных фрагментов ДНК использовали набор pGEM-T Easy Vector System, DNA Labeling Kit ("Promega") согласно инструкции производителя. Для лигирования рестрикционных фрагментов плазмидной ДНК использовали ДНК-лигазу фага T4 производства "Fermentas MBI" (Латвия). Реакцию проводили по стандартной методике [16].

Первичную структуру гена определяли с использованием автоматического секвенатора ABI Prism Genetic Analyzer ("Applied Biosystems", США) и набора для термоциклического секвенирования Big DyeTM Terminator v.3.0 Cycle Sequencing

("Applied Biosystems") согласно инструкции производителя. Для определения нуклеотидной последовательности предварительно очищенных ПЦР-фрагментов использовали те же праймеры, что и для амплификации, для определения последовательности фрагментов, клонированных в pGEM-T/easy, - стандартные универсальные праймеры к последовательностям промоторов T7 и SP6, фланкирующих место встраивания фрагмента.

Получение компетентных клеток лабораторных штаммов *E. coli* DH5 α , B834, BL21 (DE3) [pLysS], BL21 "gold", AD494 (DE3) и трансформацию рекомбинантной плазмидной ДНК проводили по методу Hanahan [17]. При клонировании фрагментов ДНК в плазмидных векторах для поиска рекомбинантов использовали методы контрселекции на средах с антибиотиками и скрининга рекомбинантов с использованием IPTG и X-gal.

Клетки *E. coli* штамма M15[pRep4], B834 (DE3), BL21 (DE3) [pLysS], BL21 "gold" (DE3), AD494 (DE3) трансформировали плазмидой pQE-32, pET-15b или pET-32a(+), содержащей полноразмерную кодирующую последовательность CYP51MT. Двумя-тремя рекомбинантными колониями инокулировали 10 мл среды ТВ (1,2% бактотриптон, 2,4% бактодрожжевой экстракт, 4% глицерин, 17 мМ КН₂РО₄, 72 мМ К₂НРО₄), содержащей ампициллин (50 мкг/мл), и растили в течение ночи при температуре 37°C. 1 мл полученной культуры инокулировали 100 мл среды ТВ, содержащей ампициллин (50 мкг/мл), предварительно прогретой до 37°C, и растили при температуре 28°C и постоянном встряхивании до достижения культурой оптической плотности OD₆₀₀=0,6. Экспрессию целевого белка индуцировали добавлением изопропил- β -D-тиогалактозида до конечной концентрации 1 мМ и δ -аминолевулиновой кислоты до концентрации 2 мМ. Культуру инкубировали в течение 24-48 ч при температуре 28-30°C и постоянном встряхивании. Наличие целевого белка проверяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях согласно стандартной методике [16].

Образцы белка для масс-спектрометрической идентификации получали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Из геля вырезали интересующие пятна и измельчали до фрагментов размером 1×1 мм. В пробирки помещали по 1-2 фрагмента, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре в 150 мкл раствора состава: 40% метанол, 5% уксусная кислота. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 150 мкл H₂O и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. После удаления надосадочной жидкости к осадку добавляли 150 мкл раствора следующего состава: 50% ацетонитрил, 50 мМ NH₄HCO₃. Инкубировали в течение 20 мин при 56°C для удаления красителя; при необходимости данную процедуру повторяли. К осадку добавляли 150 мкл ацетонитрила, инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего высушивали в течение 30 минут в вакуумном эксикаторе. К сухим фрагментам геля добавляли раствор трипсина (10 нг/мкл) в растворе состава: 20 мМ NH₄HCO₃, 50 мМ дитиотреитол, из расчета 1-1,5 мкл на фрагмент геля. Инкубировали в течение 10 мин при 5°C, после чего добавляли H₂O из расчета 1-1,5 мкл на фрагмент геля и инкубировали при 37°C в течение 15 часов. Отбирали надосадочную жидкость, высушивали при 56°C в течение 30 мин, ресуспендировали в 0,1% растворе трифторуксусной кислоты и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Смешивали на мишени 0,5 мкл надгелевой жидкости с равным объемом раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (20 мг/мл, 20% ацетонитрил, 0,1% трифторуксусная кислота), высушивали на воздухе. Масс-спектрометрию проводили на аппарате MALDI-TOF Bruker Reflex III (Германия), УФ лазер - 336 нм, в режиме положительных ионов, с использованием отражателя.

Операции по выделению MT CYP51 проводили на холоду. Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантный белок, осаждали центрифугированием (6000 g, 4°C, 20 мин), промывали буфером TE (10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0) и

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *MT CYP51* В *E. COLI*

ресуспендировали в ФСБ (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl), содержащем 10 мМ имидазол, 20% глицерин и 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (буфер для выделения). Добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали на льду в течение 30 мин. Клетки *E. coli* штамма BL21 (DE3) [pLysS] подвергали двукратному замораживанию-оттаиванию. После этого клетки подвергали ультразвуковой дезинтеграции (22 кГц, 3×10 с), добавляли рибонуклеазу и дезоксирибонуклеазу и инкубировали в течение 10 минут на льду. Фрагменты разрушенных клеток осаждали центрифугированием (310 000 g, 4°C, 1 ч). Осадок ресуспендировали в буфере для выделения, содержащем 1% Emulgen-913, инкубировали в течение 2 часов при температуре 4°C и медленном покачивании, после чего повторно центрифугировали при указанных выше условиях. Полученную в обоих случаях надосадочную жидкость пропускали через фильтр и наносили на колонку HisTrap™ Chelating ("Pharmacia Biotech", Швеция), предварительно уравновешенную буфером ФСБ того же состава, что описан выше. Колонку промывали 10 мл буфера аналогичного состава, но содержащим 20 мМ имидазол. Элюцию проводили 5 мл ФСБ, содержащего 500 мМ имидазол, 20% глицерин и 1 мМ фенилметилсульфонилфторид. Элюат собирали в виде фракций объемом 1 мл и анализировали состав с помощью электрофореза белков в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Фракции, содержащие целевой белок, диализовали при 4°C в течение ночи против 1 л ФСБ, содержащего 20% глицерин и 1 мМ фенилметилсульфонилфторид.

Содержание *MT CYP51* определяли спектрофотометрически по образованию карбоксикомплекса восстановленной формы гемопротеина по методу Omura и Sato [18] на спектрофотометре Hitachi 557 ("Hitachi"). Опытная и контрольная кюветы содержали 600 мкг суммарного белка фракции в конечном объеме 700 мкл ФСБ, содержащего 20% глицерин, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 1 мМ дитиотреитол. Гемопротеин в опытной и контрольной кювете переводили в восстановленное состояние добавлением нескольких кристаллов дитионита натрия. После насыщения опытной кюветы СО в течение 1 мин, записывали разностный спектр поглощения. Концентрацию цитохрома *CYP51* определяли по разности величин оптической плотности при 450 и 490 нм. Коэффициент молярной экстинкции восстановленного *CYP450* считали равным $91 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Взаимодействие *CYP51MT* с лигандом оценивали по методу Jefcoate и соавт. [19]. Препарат *CYP51MT* помещали в две отдельные кварцевые кюветы и регистрировали нулевой спектр поглощения в диапазоне 350-500 нм. В одну из кювет вносили кетоконазол, растворенный в диметилсульфоксиде; в контрольную кювету вносили равное количество диметилсульфоксида и измеряли дифференциальный спектр поглощения в указанном выше диапазоне длин волн. Далее в опытную и контрольную кювету последовательно вносили новые порции кетоконазола и диметилсульфоксида и регистрировали дифференциальные спектры поглощения при возрастающей концентрации лиганда. Константу диссоциации вычисляли по формуле $A = A_{\text{max}}[I]/(K_d + [I])$, где A - изменение оптического поглощения при данной концентрации лиганда, $[I]$ - концентрация лиганда, A_{max} - максимальное изменение оптического поглощения при насыщающей концентрации лиганда [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полноразмерная кодирующая последовательность гена *MT CYP51* (Rv0764c) для создания экспрессирующих конструкций была получена путем ПЦР-амплификации соответствующего участка геномной ДНК *M. tuberculosis* H37Rv. В последовательность праймеров были введены участки узнавания соответствующими рестриктазами для клонирования в экспрессирующие плазмидные векторы по выбранным сайтам рестрикции: Sma I и Hind III в плазмиде pQE-32, Nde I и Hind III в плазмиде pET-15b и Hind III в плазмиде pET32a(+). Амплифицированные последовательности клонировали в вектор pGEM-T Easy; полученные гибридные конструкции наращивали в *E. coli* DH5α. Из выделенных плазмид кодирующую последовательность гена *MT CYP51*

субклонировали в перечисленные выше плазмидные векторы, выбранные для экспрессии, по соответствующим сайтам рестрикции. На каждой стадии проверяли соответствие клонированного фрагмента целевому, а также правильность его встраивания в вектор путем определения нуклеотидной последовательности фрагмента и прилегающих участков вектора. Полученные экспрессирующие конструкции получили название pQE-2N, pET15/Cyp51 и pET32/Cyp51, соответственно.

При экспрессии эукариотических Р450 в *E. coli* под контролем высокоэффективных промоторов, в частности, промотора фага Т7, большая часть рекомбинантного белка может образовывать тельца включения [21]; поэтому чаще всего для этой цели используют векторы, несущие один или два гибридных промотора *plac* (-10 область промотора *placUV5*, -35 область промотора *p_{trp}*) [22, 23], обеспечивающих более умеренный уровень экспрессии рекомбинантного белка. Однако сравнительно недавно были опубликованы результаты успешных экспериментов по экспрессии Р450 в *E. coli* под контролем "сильного" промотора фага Т7 [24, 25]. Это обусловило выбор плазмидных векторов, несущих "сильные" промоторы фагов Т7 и Т5. Кроме того, во всех трех векторах к последовательности клонируемого фрагмента с 5'-конца примыкает последовательность, кодирующая пептид из 6 остатков гистидина; экспрессия данного пептида в составе гибридной конструкции позволяет осуществлять быструю и эффективную очистку рекомбинантного белка металлоаффинной хроматографией.

Электрофорез белков в ПААГ в денатурирующих условиях показал наличие в лизатах клеток, несущих рекомбинантную плазмиду, мажорной фракции с молекулярной массой, соответствующей предсказанной для рекомбинантного СТУР51 МТ (~ 50 кДа для pQE-2N и pET15/Cyp51, ~ 60 кДа для pET32/Cyp51); данная фракция не обнаруживалась в лизатах клеток, несущих соответствующий исходный плазмидный вектор. Поскольку интенсивность соответствующей полосы на электрофореграмме была заметно выше в случае использования конструкций с Т7-промотором, эти конструкции были выбраны для дальнейших экспериментов. Наиболее высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка наблюдали при использовании штамма *E. coli* BL21(DE3)[pLysS]. Масс-спектрометрический анализ фрагментов белка, полученных в результате гидролиза трипсином, показал полное соответствие их последовательности соответствующим участкам полипептидной цепи МТ СУР51 (рис. 1).

Предварительные эксперименты по фракционированию показали, что МТ СУР51 присутствует в значительном количестве как в водорастворимой, так и в водонерастворимой фракциях. Полученный результат отличался от ранее опубликованных Belamine и соавт. [9] и Guardiola-Diaz и соавт. [12], у которых весь рекомбинантный МТ СУР51 был локализован в водорастворимой фракции. Данное отличие можно объяснить тем, что при высоком уровне экспрессии рекомбинантный белок может образовывать тельца включения. Значительную часть белка из водонерастворимой фракции удавалось перевести в растворимую форму при ресуспендировании осадка в буфере для выделения, содержащем 1% Emulgen-913.

Очистка белка из водорастворимой фракции осуществлялась с использованием аффинной хроматографии на колонках HisTrap™ Chelating ("Pharmacia Biotech") с Ni²⁺-диацетатагарозой. Как и в работе Guardiola-Diaz и соавт. [12], одностадийная очистка металлоаффинной хроматографией позволяла получить электрофоретически гомогенный МТ СУР51 (рис. 2).

Измерение оптического поглощения препаратов рекомбинантного белка, полученных после аффинной очистки из водорастворимой белковой фракции на колонках с Ni²⁺-агарозой, показало наличие характерного спектра с максимумом поглощения при 449 нм, характерным для Р450 в нативной восстановленной СО-связанной форме (рис. 3, А).

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *MT CYP51* В *E. COLI*

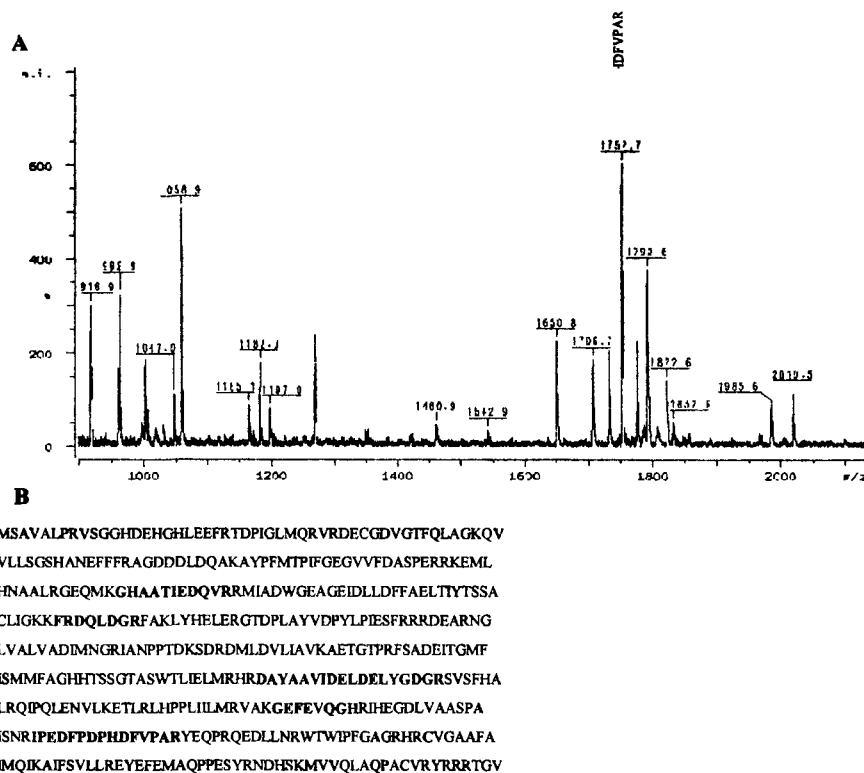


Рисунок 1.

Масс-спектрометрический анализ фрагментов трипсинолиза рекомбинантного белка *MT CYP51*.

А - масс-спектр фрагментов трипсинолиза; В - аминокислотная последовательность белка *MT CYP51*; выделены фрагменты, идентифицированные масс-спектрометрией.

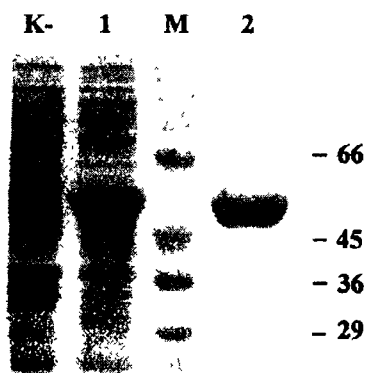


Рисунок 2.

Электрофоретический анализ очистки рекомбинантного белка *MT CYP51*: К- лизат клеток *E. coli*, трансформированных рекомбинантным вектором *pET15/Cyp51*, рост на среде без индуктора; 1 - лизат клеток *E. coli*, трансформированных вектором *pET15/Cyp51*, индукция 1 мМ изопропил-β-D-тиогалактозидом; М - маркеры молекулярной массы; 2 - препарат рекомбинантного белка *MT CYP51*, очищенного с помощью аффинной хроматографии на Ni^{2+} -диацетатагарозе.

Содержание спектрально активного *CYP51 MT* в препарате, полученном после очистки с помощью металлоаффинной хроматографии, составляло 25-30 нмоль/мл препарата, что соответствует 1,3-1,5 мкмоль на 1 л культуры. Кроме того, очистка *CYP51 MT*, солюбилизованного из водонерастворимой фракции с помощью детергента, позволяла дополнительно получить до 0,6 мкмоль белка из 1 л культуры, что является достаточно высоким показателем [9, 12].

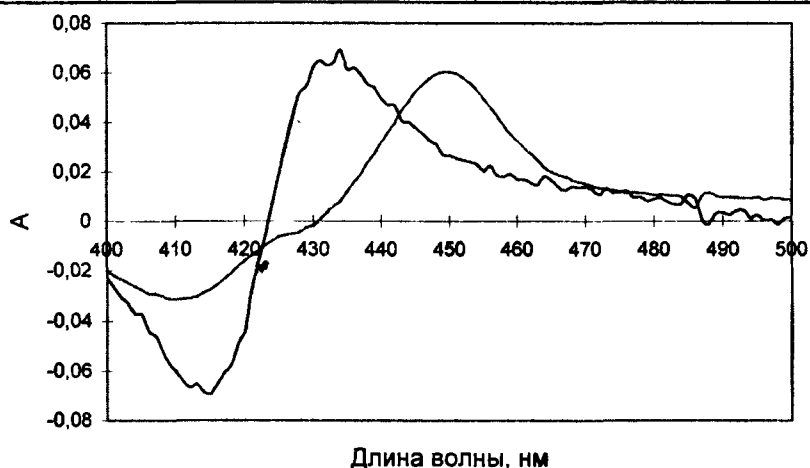


Рисунок 3.

Дифференциальный спектр поглощения препарата рекомбинантного МТ CYP51: А - после очистки с помощью металлоаффинной хроматографии (разведение исходного препарата 1:50); В - при добавлении кетоконазола (5 мкМ МТ CYP51; 70 мкМ кетоконазол).

Изучена способность рекомбинантного МТ CYP51 связываться с кетоконазолом - препаратом из группы азолов, обладающим антимикотическим и антимикобактериальным действием [10, 12]. Полученный дифференциальный спектр поглощения характеризовался наличием максимума в области 433-438 нм и минимума в области 408-415 нм (спектр связывания II типа), амплитуда которого была пропорциональна концентрации лиганда (рис.3, В). Константа диссоциации комплекса МТ CYP51 с кетоконазолом составляла $7,7 \pm 2$ мкМ. Полученное значение K_d кетоконазола существенно выше, чем в случае CYP51 *C. albicans* [15]; при этом немаловажно отметить, что наблюдаемой разнице значений K_d для CYP51 *C. albicans* и *M. tuberculosis* соответствует разница значений минимальной ингибирующей концентрации (МИК) кетоконазола, определенная для этих микроорганизмов Jackson и соавт. [10]. Это указывает, что прочность связывания ингибитора с ферментом хорошо коррелирует с его биологической активностью.

Таким образом, препараты полученной рекомбинантной стерол-14 α -деметилазы CYP51 *M. tuberculosis* применимы для первичного скрининга противотуберкулезных препаратов на основе азолов и изучения закономерностей их взаимодействия с молекулярной мишенью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rattan A., Kalia A., Ahmad N. (1998) Emerg. Infect. Dis., **4**, 195-209.
2. Nitta A. T., Iseman M. D., Newell J. D., Madsen L. A., Goble M. (1993) Clin. Infect. Dis., **16**, 219-222.
3. Pablos-Mendez A., M. C. Raviglione, A. Laszlo, N. Binkin, H. L. Rieder, F. Bustreo, D. L. Cohn, C. S. Lambregts-van Weezenbeek, S. J. Kim, P. Chau-let, P. Nunn. (1998) N. Engl. J. Med., **338**, 1641-1649.
4. Sepkowitz K.A., Raffalli J., Riley L., Kiehn T.E., Armstrong D. (1995) Clin. Microbiol. Rev., **8**, 180-199.
5. Becerra M.C., Farmer P.E., Kim J.Y. (1999) Global Impact of Drug-Resistant Tuberculosis, Program in Infectious Disease and Social Change, Harvard Medical School, pp. 1-39.
6. Havlir D.K., Barnes P.F. (1999) N. Engl. J. Med., **340**, 367-373.
7. Lawn S.D., Butera S.T., Shinnick T.M. (2002) Microbes Infect., **4**, 635-646.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА MT CYP51 в E. COLI

8. Aoyama Y., Horiuchi T., Gotoh O., Noshiro M., Yoshida Y. (1998) J. Biochem. (Tokyo), **124**, 694-696.
9. Bellamine A., Mangla A.T., Nes W.D., Waterman M.R. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 8937-8942.
10. Jackson C.J., Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L. (2000) FEMS Microbiol. Lett., **192**, 159-162.
11. Bhat A.R., Bhat G.V., Shenoy G.G. (2001) J. Pharm. Pharmacol., **53**, 267-272.
12. Guardiola-Diaz H.M., Foster L.A., Mushrush D., Vaz A.D. (2001) Biochem. Pharmacol., **61**, 1463-1470.
13. Шавкунов А.С., Лазарев В.Н., Черноусова Л.Н., Кузьмин А. В., Говорун В.М. (2002) Вопр. мед. химии, **48**, 361-367.
14. Wiggins T., Baldwin B.C. (1984) Pesticide Sci., **15**, 206-209.
15. Lamb D.C., Kelly D.E., Waterman M.R., Stromstedt M., Rozman D., Kelly S.L. (1999) Yeast, **15**, 755-763.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. (1984) М.: Мир, 480 с.
17. Hanahan D. (1983) J. Mol. Biol., **166**, 557-580.
18. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol. Chem., **239**, 2370-2378.
19. Jefcoate CR, Gaylor JL, Calabrese RL. (1969) Biochemistry, **8**, 3455-3463.
20. McLean K.J., Marshall K.R., Richmond A., Hunter I.S., Fowler K., Kieser T., Gurcha S.S., Besra G.S., Munro A.W. (2002), Microbiology **148**, 2937-2949.
21. Barnes H.J. (1996) Methods in Enzymol., **272**.
22. Barnes H.J., Arlotto M.P., Waterman M.R. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 5597-5601.
23. Pikuleva I.A., Bjorkhem I., Waterman M.R. (1997) Arch. Biochem. Biophys., **343**, 123-130.
24. Жгун А.А., Эльдаров М.А., Солодарь Л.И., Соколов Н.Н., Арчаков А.И., Скрябин К.Г. (2001) Вопр. мед. химии, **47**, 382-392.
25. Saribas A.S., Gruenke L., Waskell L. (2001) Protein Expr. Purif., **21**, 303-309.

Поступила 18.02.03.

EXPRESSION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS CYTOCHROME CYP51 GENE IN ESCHERICHIA COLI.

A.S.Shavkunov¹, V.N.Lazarev¹, V.G.Zgoda², V.M.Govorun¹, P.Lew³, P. Janssen³, A. I. Archakov¹

¹Institute of Physico-Chemical Medicine, Malaya Pirogovskaya ul. 1a, Moscow 119828 Russia. Fax: (095) 246-45-01, e-mail: a_s_shavkunov@hotmail.ru

²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya 10, Moscow 119832 Russia; tel/fax: (095) 246-33-80/(095) 245-08-57

³Center for Molecular Design, Turhoutseweg 30, 2340 Beerse, Belgium

Mycobacterium tuberculosis sterol 14 α -demethylase CYP51 is currently considered a promising target for a new generation of antitubercular drugs. Similarly to eucaryotic sterol 14 α -demethylases, candidate selective inhibitors of *M. tuberculosis* CYP51 belong to azoles, the N-substituted derivatives of imidazole and triazole. We have constructed a highly effective system for heterologous expression of MT CYP51 in *E. coli*. The recombinant protein was purified by metalloaffinity chromatography for primary *in vitro* screening of novel antitubercular azole compounds for their high affinity to the molecular target. Yield of the purified recombinant MT CYP51 was about 1,5 micromoles of the purified native protein per 1 l of *E. coli* cell culture. The recombinant protein interacted with ketoconazole with a K_d of 7,7 μ M. MT CYP51 produced by our system for heterologous expression in *E. coli* may be used for initial testing of novel antimycobacterial azole drugs.

Key Words: cytochrome P450, CYP51, sterol-14 α -demethylase, *Mycobacterium tuberculosis*, expression.