

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 577.322.23
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-190-196>

Поступила в редакцию 19.09.2017
Received 19.09.2017

**А. М. Тумилович, А. А. Ковалевский, Т. С. Варакса, А. В. Василевская,
Т. С. Черкесова, И. П. Грабовец, Т. В. Шкель, Я. В. Диченко, А. А. Гилеп**

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВОССТАНОВЛЕНИЯ CYP124 M. TUBERCULOSIS РАЗЛИЧНЫМИ РЕДОКС-ПАРТНЕРАМИ

Аннотация. С целью определения оптимальных редокс-партнеров CYP124 *M. tuberculosis* в *in vitro* реконструированной системе осуществлена гетерологическая экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных цитохрома CYP124 *M. tuberculosis* и потенциальных редокс-партнеров: Fdx, FdR, FprA, Adx, AdR, CPR, Arh1_A18G, Etp^{fd}. Показано, что CYP124 проявляет наибольшую каталитическую активность в системе с митохондриальными электрон-транспортными белками *S. pombe*: Etp1^{fd} и Arh1_A18G.

Ключевые слова: цитохромы P450, редокс-партнеры, туберкулез, гетерологическая экспрессия

Для цитирования. Сравнительный анализ восстановления CYP124 *M. tuberculosis* различными редокс-партнерами / А. М. Тумилович [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2018. – Т. 54, № 2. – С. 190–196. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-190-196>

**A. M. Tumilovich, A. A. Kavaleuski, T. S. Varaksa, A. V. Vasilevskaya, T. S. Cherkeso
va, I. P. Grabovets, T. V. Shkel, Y. V. Dichenko, A. A. Gilep**

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

COMPARATIVE ANALYSIS OF M. TUBERCULOSIS CYP124 REDUCTION WITH DIFFERENT REDOX PARTNERS

Abstract. In order to determine the optimal redox partners of CYP124 *M. tuberculosis* in reconstituted *in vitro* system we carried out heterologous expression, isolation and purification of recombinant CYP124 *Mycobacterium tuberculosis* and candidate redox partners: Fdx, FdR, FprA, Adx, AdR, CPR, Arh1_A18G, Etp^{fd}. CYP124 was shown to exhibit the highest catalytic activity in system with *S. pombe* mitochondrial electron transfer proteins: Etp1^{fd} and Arh1_A18G.

Keywords: cytochromes P450, redox partners, tuberculosis, heterologous expression

For citation. Tumilovich A. M., Kavaleuski A. A., Varaksa T. S., Vasilevskaya A. V., Cherkeso
va T. S., Grabovets I. P., Shkel T. V., Dichenko Y. V., Gilep A. A. Comparative analysis of *M. tuberculosis* CYP124 reduction with different redox partners. *Vesti Natsyunal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk=Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2018, vol. 54, no. 2, pp. 190–196 (In Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-2-190-196>

Введение. Геном *Mycobacterium tuberculosis*, основного возбудителя туберкулеза, содержит 20 генов, кодирующих различные формы цитохромов P450, функции большинства из которых не установлены. Тем не менее, цитохромы P450 выполняют ключевые функции в метаболизме микобактерий, участвуют в деградации ряда лекарственных средств и являются потенциальными мишенями для лекарственной терапии [1]. Изучение физиолого-биохимических свойств данных ферментов способствует более полному пониманию их роли в метаболических процессах в клетках микобактерий, а также позволит использовать данные о функциях и структуре цитохромов P450 для создания новых лекарственных препаратов.

Цитохром P450 124 *Mycobacterium tuberculosis* (CYP124) – 27-стероидгидроксилаза, обладает ω-гидроксилазной активностью по отношению к метил-разветвленным липидам. Данный фермент состоит из 428 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 47,8 кДа. Участие в катаболических процессах клетки и в биосинтезе стероидных компонентов клеточной мембраны микобактерий делает CYP124 перспективной мишенью противотуберкулезной терапии [2]. Тем не менее изучение данного цитохрома ограничено малым количеством информации о его редокс-партнерах и соответственно невозможностью полноценной реконструкции ферментативной активности *in vitro*.

Большинство прокариотических цитохромов P450 осуществляют ферментативные реакции с участием двух редокс-партнеров. В большинстве случаев это железосерный белок ферредоксин и ФАД-содержащая ферредоксин-редуктаза, получающая электроны от НАД(Ф)Н. В ряде случаев цитохромы P450 способны принимать электроны от альтернативных доноров электронов.

Цель данной работы – получение высокоочищенных препаратов рекомбинантных редокс-партнеров цитохромов P450 и определение оптимальной системы доноров электронов для восстановления CYP124 *M. tuberculosis* в реконструированной системе.

Материалы и методы исследования

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков. Получение рекомбинантной редуктазы Arh1_A18G (мутант) осуществлялось, согласно методике, описанной в статье К. М. Ewen и др. Использование мутантного варианта A18G обусловлено лучшим связыванием ФАД по сравнению с белком дикого типа [3]. Очистку и выделение белка проводили методом металл-аффинной хроматографии с использованием хроматографической колонки с сорбентом TALON™.

Получение рекомбинантного ферредоксинподобного домена белка Etp1 *S. pombe* осуществляли по методике [4]. Двухстадийную очистку белка производили методами ионообменной и гель-фильтрационной хроматографий. Экспрессию и очистку рекомбинантного цитохрома P450 CYP124 *M. tuberculosis* проводили по методике [5]. Получение рекомбинантных адренодоксин-редуктазы (AdR) и адренодоксина (Adx) человека осуществляли, согласно работе [6].

Получение рекомбинантной цитохром P450 редуктазы (CPR) крысы, содержащей N-концевую гистидиновую метку, осуществляли по методике [7]. Очистку рекомбинантного белка проводили методами металл-аффинной и ионообменной хроматографий.

Экспрессию рекомбинантных FprA, FdR и Fdx проводили в соответствии со стандартной методикой, описанной в руководстве по pET системам [8]. Очистку рекомбинантных белков проводили в две стадии с помощью FPLC-системы ÄKTApurifier 10 с использованием металл-аффинной (HisTrap HP) и анионообменной (SP FF) хроматографий по стандартным методикам.

Аналитические методы. Концентрацию белков рассчитывали спектрофотометрически, используя соответствующие коэффициенты молярной экстинкции (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Сводная таблица характеристик белков с указанием результатов масс-спектрометрического анализа

Table 1. Summary of the characteristics of proteins including the results of mass spectrometric analysis

Белок	Характеристика	Показания масс-спектрометрии, m/z	Теоретически рассчитанная молекулярная масса, Да	Локальные максимумы поглощения в UV-VIS спектре ¹ , нм	Коэффициенты молярной экстинкции ¹ $\frac{1}{M \times c}$
CYP124	27-стероидгидроксилаза <i>M. tuberculosis</i>	48891,32	48718,93	(421, 538, 571) ²	$\epsilon_{450-490} = 91000^3$
Fdx	Ферредоксин <i>M. tuberculosis</i> , содержит один [3Fe4S] кластер	8761,70	8739,24 (с учетом [3Fe4S] кластера)	283, 412	$\epsilon_{412} = 11300$
FdR	НАДН:ферредоксин оксидоредуктаза <i>M. tuberculosis</i> , содержит один ФАД	43826,24	43780,52	272, 371, 454	$\epsilon_{450} = 13000$
Adx	Ферредоксин матрикса митохондрий человека, содержит один [2Fe2S] кластер	14465,28	14559,79 (с учетом [2Fe2S] кластера)	276, 320, 414, 455	$\epsilon_{414} = 9800$
AdR	НАДФН:ферредоксин оксидоредуктаза матрикса митохондрий человека, содержит один ФАД	50575,91	50818,23	272, 375, 450	$\epsilon_{450} = 10900$

Окончание табл. 1

Белок	Характеристика	Показания масс-спектрометрии, m/z	Теоретически рассчитанная молекулярная масса, Да	Локальные максимумы поглощения в UV-VIS спектре ¹ , нм	Коэффициенты молярной экстинкции ¹ $\frac{1}{M \times c}$
FprA	НАДФН:ферредоксин оксидоредуктаза <i>M. tuberculosis</i> , содержит один ФАД	50146,82	50103,78	272, 381, 452	$\epsilon_{452} = 10600$
CPR	НАДФН:Р450 оксидоредуктаза крысы, содержит один ФАД и один ФМН на молекулу белка	77378,81	77654,53	276, 384, 456	$\epsilon_{455} = 21200$
Arh1 (A18G)	НАДФН:ферредоксин оксидоредуктаза <i>S. pombe</i> , содержит один ФАД	52438,92	52227,86	272, 376, 450	$\epsilon_{450} = 11300$
Etp1 ^{fd}	Ферредоксин-подобный домен белка Etp1 митохондрий <i>S. pombe</i> , содержит один [2Fe2S] кластер	11664,09	11675,86 (с учетом [2Fe2S] кластера)	276, 342, 415, 458	$\epsilon_{414} = 9800$

¹ Данные для окисленной формы белка.² Данные для низкоспиновой формы цитохрома Р450.³ Коэффициент для разностного СО-спектра после восстановления 1 мМ дитионитом натрия: $\Delta(A_{450} - A_{490})$.

Гомогенность белковых препаратов определяли с помощью денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ). Молекулярные массы белков верифицировали с помощью ДСН-ПААГ, используя белковые стандарты (PageRuler Prestained Protein Ladder, «ThermoFisher Scientific»), а также масс-спектрометрии (MALDI-TOF).

Определение каталитической активности рекомбинантного белка с различными редокс-партнерами. Определение каталитической активности цитохрома СYP124 в реконструированной системе проводили при 25 °С в объеме 0,5 мл. СYP124 (0,5 мкМ) инкубировали с субстратом (100 мкМ холест-4-ен-3-он) в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,4). В систему добавлялись редокс-партнеры в молярном соотношении 1:1:4 (СYP124:ферредоксин:ферредоксин-редуктаза). В случае системы СYP124–СPR молярное соотношение – 1:1. Запуск реакции осуществляли добавлением в пробирки с белками раствора НАДФН до финальной концентрации 0,4 мМ и регенерирующей системы (1 мМ глюкозо-6-фосфат; 1 ед./мл глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа). В системе СYP124–Fdx–FdR использовали 5-кратный избыток НАДН без регенерирующей системы. В качестве контроля использовали аналогичные системы, в которых отсутствовал НАД(Ф)Н. Реакцию останавливали через определенные временные интервалы добавлением 5 мл дихлорметана.

Субстрат (холест-4-ен-3-он) и образовавшийся продукт (26-гидроксихолест-4-ен-3-он) реакции экстрагировали метанолом и анализировали с помощью ВЭЖХ-МС. Активность (a) рассчитывали из количества образовавшегося в ходе реакции продукта (нмоль) в единицу времени (мин) на 1 нмоль цитохрома Р450:

$$a = \frac{kA_p c_s}{(A_p + A_s)c_e t},$$

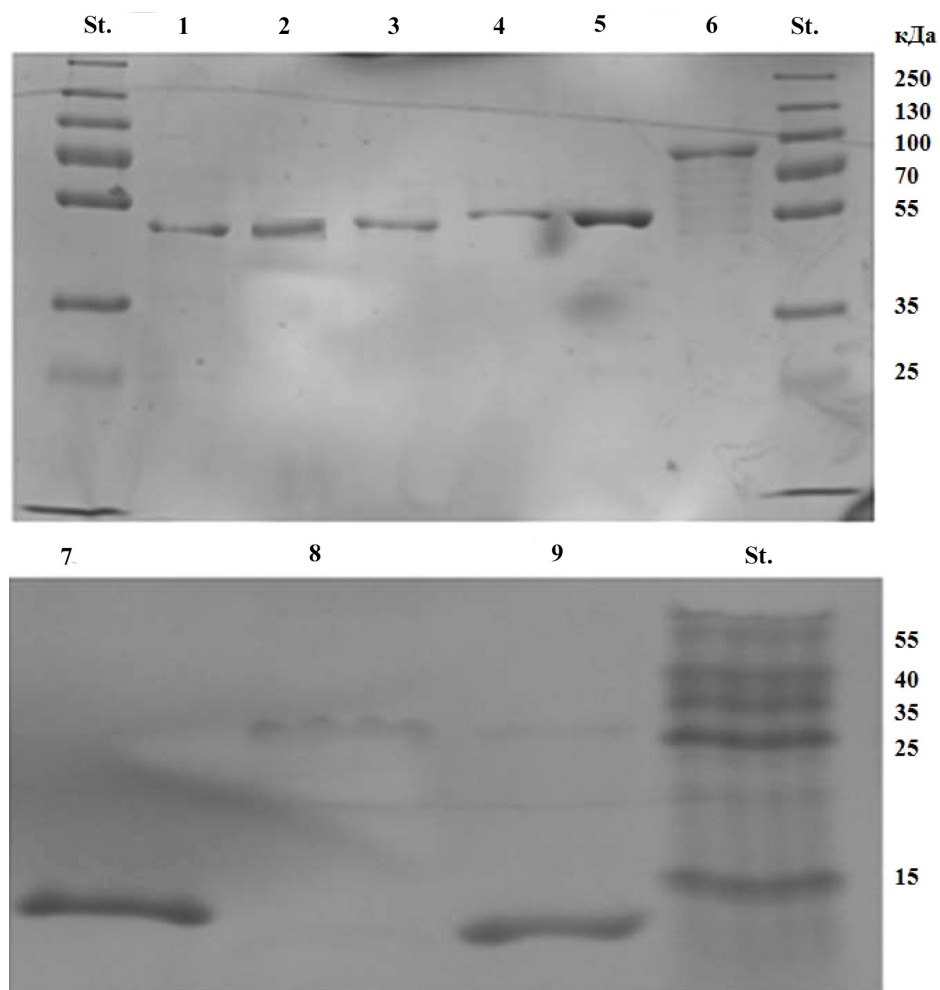
где k – поправочный коэффициент (в данном случае 1, так как коэффициенты молярной экстинкции субстрата и продукта на длине волны детекции равны); A_s – площадь хроматографического пика субстрата; c_s – концентрация субстрата; A_p – площадь хроматографического пика продукта реакции; c_e – концентрация фермента в реакционной смеси; t – время с момента начала реакции до остановки.

Результаты и их обсуждение. *M. tuberculosis* экспрессирует ряд ферредоксинов. Тем не менее только для [3Fe4S] ферредоксина Fdx (Rv0763c) показана способность поставлять электроны одному из микобактериальных цитохромов Р450 – СYP51 [9]. Данный ферредоксин состоит из 67 аминокислот и имеет молекулярную массу 7,5 кДа.

Из ферредоксин-редуктаз наиболее изучена НАДФН:ферредоксин оксидоредуктаза (FprA) – гомолог эукариотической аденодоксин-редуктазы (AdR), редокс-партнера митохондриальных цитохромов P450. Белок имеет молекулярную массу 49 кДа и на 40 % идентичен аденодоксин-редуктазе млекопитающих [10]. Другая известная ферредоксин-редуктаза FdR (Rv0688) – белок с молекулярной массой 43 кДа, который использует НАДН в качестве источника электронов. Обе вышеупомянутые ферредоксин-редуктазы показали способность поддерживать каталитическую активность CYP51 *M. tuberculosis* в системе с ферредоксином Fdx (Rv0763c) [1].

Аденодоксин (Adx) и аденодоксин-редуктаза (AdR) *Homo sapiens* обеспечивают транспорт электронов к митохондриальным цитохромам P450, функционируя по типу системы редокс-партнеров цитохромомов P450, характерной для прокариот. Аденодоксин представляет [2Fe2S] железосерный белок с молекулярной массой 19,4 кДа, который получает электроны от НАДФН через аденодоксин-редуктазу, 53,8 кДа ФАД-содержащий флавопротеин, и передает электроны на терминальный цитохром P450.

Потенциальными редокс-партнерами микобактериальных цитохромов P450 являются ферредоксин-подобный домен Etp1^{fd} электрон-транспортного белка Etp1 и ферредоксин-редуктаза Arh1_A18G *S. pombe*. Данная система редокс-партнеров способна поставлять электроны к митохондриальным цитохромам P450 млекопитающих с высокой эффективностью. Домен Etp1^{fd} содержит [2Fe2S] железосерный кластер и имеет молекулярную массу 11,7 кДа. ФАД-зависимая



Электрофореграмма в 12 и 15 % ПААГ в денатурирующих условиях препаратов исследуемых белков, где St. – стандарт молекулярных масс; 1 – CYP124; 2 – FdR; 3 – FprA; 4 – Arh1; 5 – AdR; 6 – CPR; 7 – Adx; 8 – Etp^{fd}; 9 – Fdx

Electrophoregram in 12 and 15 % PAGE in the denaturing conditions of the loads of the studied proteins, where St. is molecular weight standard; 1 – CYP124; 2 – FdR; 3 – FprA; 4 – Arh1; 5 – AdR; 6 – CPR; 7 – Adx; 8 – Etp^{fd}; 9 – Fdx

редуктаза Arh1 – белок с молекулярной массой 52,4 кДа. Данная редуктаза способна принимать электроны как с НАДН, так и с НАДФН [3].

Цитохром P450 редуктаза *Rattus norvegicus* (CPR) – ФАД/ФМН-содержащий флавопротеин молекулярной массой 76,8 кДа. CPR является редокс-партнером микросомальных цитохромов P450 эукариот, осуществляя однокомпонентный транспорт электронов от НАДФН непосредственно к цитохромам P450 [11].

Для определения каталитической активности CYP124 с различными редокс-партнерами осуществлена экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков: CYP124, Arh1_A18G, Etp1^{fd}, CPR, FprA, FdR, Fdx, AdR и Adx. Результаты ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях подтверждают высокую степень чистоты полученных препаратов (электрофореграмма), а результаты масс-спектрометрии подтверждают, что молекулярные массы выделенных белков соответствуют теоретически рассчитанным (табл. 1).

С целью определения оптимальной системы доноров электронов для восстановления CYP124 протестировано 5 систем редокс-партнеров: адренодоксин (Adx) / адренодоксин-редуктаза человека (AdR); ферредоксинподобный домен Etp1^{fd} / ферредоксин-редуктаза *S. pombe*; цитохром P450 редуктаза крысы (CPR); ферредоксин Fdx / ферредоксин-редуктаза FprA *M. tuberculosis*; ферредоксин Fdx / ферредоксин-редуктаза FdR *M. tuberculosis*.

При использовании Adx / AdR и CPR в качестве систем доноров электронов в реакции окисления холест-4-ен-3-она цитохромом CYP124 наблюдалось окисление стероидного субстрата до 26-гидроксипроизводного (26-гидроксихолест-4-ен-3-она). Скорость образования продукта реакции была выше в случае использования CPR крысы в качестве редокс-партнера по сравнению с системой Adx/AdR.

Микобактериальные системы редокс-партнеров Fdx/FprA и Fdx/FdR не показали способность восстанавливать CYP124 в ферментативной реакции окисления холест-4-ен-3-она, что может быть связано с высокой специфичностью микобактериальных редокс-партнеров по отношению к определенным ферментам, участвующим в окислительно-восстановительных реакциях в клетках микобактерий.

В системе с редокс-партнерами Etp1^{fd} / Arh1_A18G *S. pombe* CYP124, помимо более высокой по сравнению с другими системами каталитической активности, продемонстрировал способность окислять холест-4-ен-3-он не только до основного продукта 6-гидроксихолест-4-ен-3-она, но и до холест-4-ен-3-он-26-овой кислоты (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Ферментативная активность в реакции гидроксилирования цитохромом CYP124 холест-4-ен-3-она в реконструированной системе с различными белками-донорами электронов

T a b l e 2. Enzyme activity in the cytochrome CYP124 hydroxylation reaction of cholest-4-en-3-one in the reconstituted system with various electron donor proteins

Система доноров электронов	Каталитическая активность, нмоль _р /(нмоль _с ×мин)
AdX/AdR	0,89±0,09
CPR	1,09±0,13
Etp1/Arh1	2,73±0,12
FdX/FprA	–
FdX/FdR	–

П р и м е ч а н и е. «Прочерк» – активности не наблюдалось.

Выводы. Выявлено, что оптимальными донорами электронов для реакции окисления 4-холестен-3-она цитохромом P450 124 *M. tuberculosis* в реконструированной системе является система митохондриальных электрон-транспортных белков *S. pombe* Etp1^{fd}/Arh1_A18G. Отсутствие каталитической активности CYP124 в системе с микобактериальными редокс-партнерами может быть обусловлено высокой специфичностью ферредоксинов *M. tuberculosis*, в частности Fdx, по отношению к цитохромам P450.

Благодарности. Авторы выражают особую благодарность профессору, доктору химических наук R. Bernhardt (Saarland University, Institute of Biochemistry, Germany) за предоставленные экспрессионные конструкции, содержащие целевые гены Arh1_A18G и Etp1^{fd}.

Acknowledgements. Authors express particular gratitude to Prof. Dr. Rita Bernhardt (Saarland University, Institute of Biochemistry, Germany) for granted expression constructs containing Arh1_A18G and Etp1^{fd} genes.

Список использованных источников

1. Структурный анализ цитохромов P450 микобактерий комплекса *Mycobacterium tuberculosis* / А. В. Василевская [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2010. – Т. 54, № 5. – С. 55–59.
2. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* enzyme involved in vitamin D and 7-dehydrocholesterol metabolism / A. V. Vasilevskaya [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 169. – P. 202–209. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.021
3. The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe* / K. M. Ewen [et al.] // *FEMS Yeast Res.* – 2008. – Vol. 8, № 3. – P. 432–441. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00360.x
4. Structural and thermodynamic characterization of the adrenodoxin-like domain of the electron-transfer protein Etp1 from *Schizosaccharomyces pombe* / J. J. Müller [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2011. – Vol. 105, № 7. – P. 957–965. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.04.001
5. Цитохром P450124 *Mycobacterium tuberculosis*: лиганд-связывающие и каталитические свойства / А. В. Василевская [et al.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2011. – № 3. – С. 107–112.
6. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system / N. Strushkevich [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, № 25. – P. 10139–10143. DOI: 10.1073/pnas.1019441108
7. Engineering of proteolytically stable NADPH-cytochrome P450 reductase / T. A. Bonina [et al.] // *Biochemistry (Moscow)*. – 2005. – Vol. 70, № 3. – P. 357–365. DOI: 10.1007/s10541-005-0122-3
8. pET System Manual / Novagen. – 11th Ed. – Darmstadt: EMD Biosciences, Inc., 2005. – 80 p.
9. Characterization and catalytic properties of the sterol 14 α -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis* / A. Bellamine [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96, № 16. – P. 8937–8942. DOI: 10.1073/pnas.96.16.8937
10. *Mycobacterium tuberculosis* FprA, a novel bacterial NADPH-ferredoxin reductase / F. Fischer [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269, № 12. – P. 3005–3013. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02989.x
11. Murataliev, M. B. Electron transfer by diflavin reductases / M. B. Murataliev, R. Feyereisen, F. A. Walker // *Biochim. Biophys. Acta* – 2004. – Vol. 1698, № 1. – P. 1–26. DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.10.003

References

1. Vasilevskaya A. V., Sergeev G. V., Gilep A. A., Usanov S. A. Structure analysis of cytochromes P450 of *Mycobacterium tuberculosis* complex mycobacteria. *Doklady Natsionalnoi Akademii Nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2010, vol. 54, no. 5, pp. 55–59 (in Russian).
2. Vasilevskaya A. V., Yantsevich A. V., Sergeev G. V., Lemish A. P., Usanov S. A., Gilep A. A. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* enzyme involved in vitamin D and 7-dehydrocholesterol metabolism. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, vol. 169, pp. 202–209. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.021
3. Ewen K. M., Schiffler B., Uhlmann-Schiffler H., Bernhardt R., Hannemann F. The endogenous adrenodoxin reductase-like flavoprotein arh1 supports heterologous cytochrome P450-dependent substrate conversions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res.*, 2008, vol. 8, no. 3. – P. 432–441. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2008.00360.x
4. Müller J. J., Hannemann F., Schiffler B., Ewen K. M., Kappl R., Heinemann U., Bernhardt R. Structural and thermodynamic characterization of the adrenodoxin-like domain of the electron-transfer protein Etp1 from *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, vol. 105, no. 7, pp. 957–965. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2011.04.001
5. Vasilevskaya A. V., Rusak A. A., Sergeev G.V., Gilep A. A., Usanov S. A. *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome P450124: ligand-binding and catalytic properties. *Vestsi Nacyyanal'noj akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2011, no. 3, pp. 107–112 (in Russian).
6. Strushkevich N., MacKenzie F., Cherkesova T., Grabovec I., Usanov S., Park H. W. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, vol. 108, no. 25, pp. 10139–10143. DOI: 10.1073/pnas.1019441108
7. Bonina T. A., Gilep A. A., Estabrook R. W., Usanov S. A. Engineering of proteolytically stable NADPH-cytochrome P450 reductase. *Biochemistry (Moscow)*, 2005, vol. 70, no. 3, pp. 357–365. DOI: 10.1007/s10541-005-0122-3
8. Novagen. *pET System Manual*. 11th Ed. Darmstadt, EMD Biosciences, Inc., 2005. 80 p.
9. Bellamine A., Mangla A. T., Nes W. D., Waterman M. R. Characterization and catalytic properties of the sterol 14 α -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, vol. 96, no. 16, pp. 8937–8942. DOI: 10.1073/pnas.96.16.8937
10. Fischer F., Raimondi D., Aliverti A., Zanetti G. *Mycobacterium tuberculosis* FprA, a novel bacterial NADPH-ferredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry*, 2002, vol. 269, no. 12, pp. 3005–3013. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02989.x
11. Murataliev M. B., Feyereisen R., Walker F. A. Electron transfer by diflavin reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 2004, vol. 1698, no. 1, pp. 1–26. DOI: 10.1016/j.bbapap.2003.10.003

Информация об авторах

Тумилович Анастасия Михайловна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tumilovicham@gmail.com

Ковалевский Антон Александрович – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bio.kovalevs@gmail.com

Варакса Татьяна Сергеевна – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: varaksa.tanya@gmail.com

Василевская Анна Викторовна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vasilevskaya@iboch.bas-net.by

Черкесова Татьяна Семеновна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: cherkes@iboch.bas-net.by

Грабовец Ирина Петровна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grabovec@iboch.bas-net.by

Шкель Татьяна Владимировна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tvshkel@gmail.com

Диченко Ярослав Владимирович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslavd@tut.by

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, зав. лаб., Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by

Information about the authors

Anastasiya M. Tumilovich – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tumilovicham@gmail.com

Anton A. Kavaleuski – Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bio.kovalevs@gmail.com

Tatsiana S. Varaksa – Junior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: varaksa.tanya@gmail.com

Anna V. Vasilevskaya – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vasilevskaya@iboch.bas-net.by

Tatsiana S. Cherkesova – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: cherkes@iboch.bas-net.by

Irina P. Grabovets – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grabovec@iboch.bas-net.by

Tatsiana V. Shkel – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tvshkel@gmail.com

Yaroslav V. Dichenko – Senior researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslavd@tut.by

Andrei A. Gilep – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Acad. V. F. Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@iboch.bas-net.by