

Е. Ю. Карпуть¹, И. И. Капустина², К. М. Табакмахер², Т. Н. Макарьева², А. А. Кича²,
Н. В. Иванчина², П. С. Дмитренко², Л. А. Калужский³, А. А. Гилеп¹

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

²Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения
Российской академии наук, Владивосток, Россия

³Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ CYP51 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS В ОТНОШЕНИИ СТЕРОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ

Аннотация. Стероид-14 α -деметилазы CYP51 – представители крупного суперсемейства ферментов цитохромов P450, обнаруженные во всех царствах живых организмов и катализирующие реакцию 14 α -деметилирования ряда природных стероидов, включая ланостерин, обтузифолиол и 24,25-дигидроланостерин. CYP51 являются важными компонентами цепи биосинтеза стероидов у эукариот и по этой причине представляют одну из основных мишеней противогрибковой терапии. Ген, гомологичный стероид-14 α -деметилазе CYP51, также обнаружен в геноме *Mycobacterium tuberculosis*. При этом у *M. tuberculosis* отсутствует путь *de novo* биосинтеза стероидов. Консервативность CYP51 среди представителей рода *Mycobacterium* и колокализация в геноме с 3Fe-4S ферредоксином Rv0763c, который поддерживает его каталитическую активность *in vitro*, могут косвенно указывать на участие CYP51 в важном для микобактерий биохимическом процессе. С целью установления специфичности активного центра MTCYP51 в отношении различных соединений изопреноидной природы нами получен высокоочищенный белковый препарат MTCYP51 и с помощью методов спектрофотометрического титрования и поверхностного плазмонного резонанса проведены исследования взаимодействия MTCYP51 со стероидами из морских организмов, полученными в Тихоокеанском институте биоорганической химии Дальневосточного отделения Российской академии наук. Исследованные соединения представляют собой широкий набор эволюционно древних изопреноидов. Результаты показали, что MTCYP51 способен связывать в активном центре разнообразные по структуре производные стероидов. Проведенные исследования позволяют предположить биологическую роль MTCYP51 для патогенных микобактерий, заключающуюся в связывании и возможном метаболизме экзогенных биорегуляторных изопреноидов в условиях *in vivo*.

Ключевые слова: стероид-14 α -деметилаза, изопреноиды, цитохром P450, микобактерии, туберкулез, гетерологическая экспрессия, высокоэффективная жидкостная хроматография, SPR-анализ, спектрофотометрическое титрование

Для цитирования. Лиганд-связывающие характеристики CYP51 *Mycobacterium tuberculosis* в отношении стероидных соединений из морских организмов / Е. Ю. Карпуть [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2024. – Т. 60, № 3. – С. 235–245. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-3-235-245>

А. I. Karput's¹, I. I. Kapustina², K. M. Tabakmakher², T. N. Makarieva², A. A. Kicha², N. V. Ivanchina²,
P. S. Dmitrenok², L. A. Kaluzhskiy³, A. A. Gilep^{1,3}

¹Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian
Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

³Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

LIGAND-BINDING CHARACTERISTICS OF CYP51 MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS IN RELATION TO MARINE STEROID COMPOUNDS

Abstract. CYP51 steroid-14 α -demethylases are members of a large superfamily of cytochrome P450 enzymes found in all kingdoms of living organisms, and catalyze the 14 α -demethylation reaction of a number of natural steroids, including lanosterol, obtusifoliol, and 24,25-dihydrolanosterol. CYP51 are important components of the eukaryotic steroid biosynthetic chain, and thus represent one of the main targets for antifungal therapy. A 14 α -demethylase CYP51 homologous gene has also been found in the genome of *Mycobacterium tuberculosis*. At the same time, *M. tuberculosis* lacks the *de novo* pathway for steroid biosynthesis. Conservation of CYP51 among the *Mycobacterium* genus and colocalization in the genome with 3Fe-4S ferredoxin Rv0763c, which maintains its catalytic activity *in vitro*, may indirectly indicate the involvement of MTCYP51 in a biochemical process important for mycobacteria. In order to characterize the specificity of the MTCYP51 active site to various compounds of isoprenoid nature, we obtained a highly purified MTCYP51 and, using spectrophotometric titration and surface plasmon resonance methods, studied the interaction of MTCYP51 with steroids from marine organisms obtained in

the Pacific Institute of Bioorganic Chemistry of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences. The investigated compounds represent a wide range of evolutionarily ancient isoprenoids. The results showed that MTCYP51 is able to bind structurally diverse steroid derivatives in the active site. The conducted studies suggest the biological role of MTCYP51 for pathogenic mycobacteria, which consists in the binding and possible metabolism of exogenous bioregulatory isoprenoids *in vivo*.

Keywords: steroid-14 α -demethylase, isoprenoids, cytochrome P450, mycobacteria, tuberculosis, heterological expression, high-performance liquid chromatography, SPR-analysis, spectrophotometric titration

For citation. Karputs A. I., Kapustina I. I., Tabakmakher K. M., Makarieva T. N., Kicha A. A., Ivanchina N. V., Dmitrenok P. S., Kaluzhskiy L. A., Gilep A. A. Ligand-binding characteristics of CYP51 *Mycobacterium tuberculosis* in relation to marine steroid compounds. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryyya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. Chemical series*, 2024, vol. 60, no. 3, pp. 235–245 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-3-235-245>

Введение. Согласно отчету ВОЗ в 2021 г. 10,6 млн человек по всему миру заболели туберкулезом, количество умерших составило 1,6 млн человек. Было выявлено 450 тыс. новых случаев рифампицин-резистентного туберкулеза [1]. Туберкулез человека вызывается бактериями *Mycobacterium tuberculosis* (MT), чьей особенностью является уникальная структура клеточной стенки, которая обеспечивает исключительно прочный непроницаемый барьер для лекарств и играет фундаментальную роль в вирулентности.

Секвенирование генома MT позволило обнаружить наличие белка, гомологичного эукариотическим стероид-14 α -деметилазам [2, 3], что впоследствии было подтверждено экспериментально [4]. CYP51 – крупное высококонсервативное подсемейство ферментов цитохромов P450, которое представлено во всех царствах живых организмов [5] и обнаруживается в вирусных геномах [6]. Данные ферменты являются важными компонентами цепи биосинтеза стероидов у эукариот и катализируют отщепление 14 α -метильных групп ланостерина и 24-метил-24,25-дигидроланостерина у грибов и дрожжей, обтузифолиола у растений и 24,25-дигидроланостерина у млекопитающих и по этой причине являются основными лекарственными мишенями для противогрибковой терапии. При этом в микобактериях отсутствуют пути биосинтеза стероидов, что может указывать на возможное участие MTCYP51 в метаболизме экзогенных молекул изопреноидной природы. Нокаут-эксперименты с использованием транспозонного мутагенеза показали, что MTCYP51 не является необходимым для роста микобактерий в условиях *in vitro* [7], при этом исследования *in vivo* и *ex vivo* на моделях (макрофаги, зараженные MT) не проводились. Следует учитывать, что, по-видимому, MTCYP51 не экспрессируется или экспрессируется на незначительном уровне в условиях *in vitro* [8].

Характерной особенностью паразитических облигатных организмов, подобных MT, является редуцирование генома, поэтому консервативность MTCYP51, а также его расположение в геноме у многих видов микобактерий рядом с геном 3Fe-4S ферредоксина Rv0763c [9], который поддерживает реакции с участием MTCYP51 в *in vitro* реконструированной системе и показывает сходный профиль экспрессии [8], может косвенно указывать на необходимость данного фермента для какого-либо важного физиологического процесса. Исследование лиганд-связывающих свойств MTCYP51 показало его способность связываться со многими видами стероидов [4, 10], в том числе с эстриолом [11]. Для понимания биологической роли MTCYP51 целесообразно расширить спектр потенциальных лигандов активного центра. В данной работе в качестве потенциальных лигандов MTCYP51 рассматриваются производные стероидов и стероидные гликозиды из морских организмов, так как они представляют собой широкий набор эволюционно древних изопреноидов, которые могут дать представление о природном субстрате MTCYP51. В качестве методов исследования взаимодействия MTCYP51 со стероидными молекулами были использованы методы спектрофотометрического титрования и поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Спектрофотометрическое титрование дает информацию о связывании лиганда с активным центром фермента, а метод SPR – о связывании лиганда с любой поверхностью молекулы белка. Последнее может быть использовано для поиска молекул, которые связываются в области взаимодействия цитохромов P450 с их редокс-партнерами. Данный тип соединений является перспективным для поиска ингибиторов P450, основанных на нарушении белок-белковых взаимодействий с редокс-партнерами. С использованием данного подхода (комбинация спектрофотомет-

рического титрования и SPR-анализа) нами ранее был идентифицирован потенциальный ингибитор белок-белкового взаимодействия цитохрома P450 CYP51A1 с его редокс-партнером – лютеолин 7,3'-дисульфатом [12]. Исходя из анализа полученной информации предложена гипотеза о том, что микобактериальные CYP51 участвуют в метаболизме экзогенных соединений изопреноидной природы в условиях *in vivo*, которые образуются в клетках организма человека и/или в микроорганизмах микробиоты.

Материалы и методы. *Гетерологическая экспрессия и очистка белка.* Экспрессионную плазмиду pTc99a со вставкой MTCYP51 (дикий тип) трансформировали в DH5a *E. coli*, единичные колонии инокулировали в 5 мл среды Lysogeny broth (LB) и растили в течение ночи. Далее клеточную культуру добавляли в 1 л Terrific Broth (TB) с добавлением пептона (4 г на 1 л TB), содержащую 100 мкг/мл ампициллина. Нарращивание клеточной культуры осуществляли в колбах Эрленмейера при 37 °С при интенсивной аэрации (180 об/мин, амплитуда вращения 25 мм) до OD₆₀₀ 0,8–1,0. Затем температуру уменьшали до 26 °С и индуцировали экспрессию добавлением 0,6 мМ ИПТГ, скорость перемешивания уменьшали до 120 об/мин и инкубировали клеточную культуру еще в течение 48 ч. В экспрессионную среду также добавляли 1,0 мМ δ-АЛК в качестве предшественника биосинтеза гема. Затем клетки осаждали центрифугированием (2 700 g, 20 мин, 4 °С), ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4) с добавлением 300 мМ NaCl и 0,5 мМ ФМСФ (4 объема буфера на 1 объем клеток) и замораживали при –80 °С.

После размораживания к клеточной суспензии добавляли бензоназу (1 296 Ед на 100 мл клеточной суспензии). Клетки разрушались в гомогенизаторе высокого давления Emulsiflex C3 (Avestin, Канада), клеточные мембраны осаждали центрифугированием (95 000 g, 1 ч, 4 °С). Клеточный супернатант использовали для нанесения на колонку для металл-хелатной аффинной хроматографии HisTrap HP (Cytiva, США) объемом 5 мл, уравновешенную буфером А (50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 300 мМ NaCl). После промывки тем же буфером белок элюировали в градиентном режиме буфером Б (50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 300 мМ NaCl, 500 мМ имидазола). В полученные белковые фракции добавляли 2 мМ трис-(2-карбоксиэтил)-фосфина. Для ионообменной хроматографии фракции со значениями спектрофотометрического индекса чистоты $i_{425/280} > 1,1$ добавляли буфером 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) до концентрации NaCl ~ 10 мМ и наносили на колонку HiTrap Q HP (Cytiva, США) объемом 5 мл для анионообменной хроматографии. После промывки буфером 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) белок элюировали в градиентном режиме буфером состава 50 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1 М NaCl. В полученные фракции с наиболее высоким спектрофотометрическим коэффициентом чистоты ($i_{417/280} > 1,5$) добавляли 2 мМ трис-(2-карбоксиэтил)-фосфина и 15 % глицерина. Белковые фракции хранили при –80 °С до использования.

Определение чистоты и концентрации белка. Чистоту рекомбинантного MTCYP51 оценивали спектрофотометрически по отношению P450-специфического поглощения на длине волны 417 нм к поглощению общего белка на длине волны 280 нм и по результатам электрофоретического разделения в 12,5%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В последнем случае степень чистоты рассчитывали денситометрически с помощью программного обеспечения (ПО) ImageJ 1.54f, полученное значение составило не менее 89 %. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению в максимуме полосы Core на 417 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{417} = 117 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для гемопротейна в низкоспиновом состоянии [13].

Масс-спектрометрия. Масс-спектрометрический анализ белка проводили с помощью метода МАЛДИ с детекцией по времени пролета на приборе Microflex LRF (Bruker Corporation, Германия). Пробоподготовка включала осаждение и промывку белка 100%-м ацетоном с последующим растворением твердого остатка в 70%-й муравьиной кислоте. В качестве матрицы использовали насыщенный раствор синапиновой кислоты, содержащий 0,1 % муравьиной кислоты. Белок и матрицу смешивали в соотношении 1 : 1 на лунке полированной стальной мишени MSP Polished Target Steel, 96 (Bruker Corporation, США) и оставляли высыхать на воздухе до образования равномерного слоя кристаллов. В качестве стандарта молекулярной массы использовали Protein Calibration Standard II (Bruker Corporation, США). После получения кристаллов записывали спектр в линейном режиме работы детектора.

Спектроскопическая характеристика белка. Абсолютный спектр поглощения МТСУР51 в УФ-видимой области записывали с помощью спектрофотометра малых объемов Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, США). Спектр восстановленного белка записывали после добавления небольшого количества дитионита натрия. Спектр поглощения СО-комплекса получали пропусканием монооксида углерода через раствор восстановленного белка в течение 1 мин. Спектрофотометрическое титрование проводили по стандартному протоколу [14] на двухлучевом спектрофотометре Cary 5000 UV–Vis NIR (Agilent Technologies, США) при 20 °С путем добавления к раствору очищенного МТСУР51 увеличивающейся концентрации лиганда с последующей записью спектра. Стоковые растворы соединений готовились в концентрации 10 мМ в ДМСО. Разностные спектры использовались для расчета разницы поглощения при каждой концентрации лиганда. График зависимости полученных значений изменения поглощения от концентрации лиганда применяли для определения равновесных констант диссоциации комплекса фермент-лиганд с помощью ПО Origin 2018 (OriginLab Corporation, США) по следующему уравнению:

$$A_{abs} = (A_{max} / 2E_t) \times (S + E_t + K_d) - \left(\left((S + E_t + K_d)^2 - (4 \times S \times E_t) \right)^{0.5} \right),$$

где A_{abs} – изменение поглощения при каждой концентрации лиганда, A_{max} – разница поглощения при насыщении лигандом, E_t – концентрация белка, S – концентрации лиганда, K_d – константа диссоциации комплекса фермент-лиганд [15].

Получение стероидов. Стероидные соединения **1–14** были выделены в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г. Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук согласно протоколам, аналогичным опубликованным ранее [16–22], из голотурии *Eupentacta fraudatrix*, морских звезд *Echinaster luzonicus*, *Anthenea sibogae*, *Anthenoides laevigatus*, *Choriaster granulatus* и *Archaster typicus*, а также морской губки *Halichondria vansoesti*. Чистота выделенных соединений была подтверждена методами ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопии (^1H и ^{13}C ЯМР) и масс-спектрометрии и соответствовала показателям чистоты образцов, описанным в цитируемых работах [16–22].

Биосенсорный SPR-анализ. SPR-анализ был выполнен при 25 °С с использованием оптического биосенсора Viacore 8K (GE Healthcare, США). В качестве рабочего буфера использовали HBS-N (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7,4) (Cytiva, США). МТСУР51 был иммобилизован на поверхности стандартного оптического чипа CM5 серии S (Cytiva, США). Карбоксильные группы декстрана поверхности оптического чипа активировали с помощью инъекции смеси 0,2 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорида и 0,05 М N-гидроксисукцинимиды в отношении 1 : 1 в течение 30 с со скоростью потока 15 мкл/мин. Далее 20 мкг/мл раствор МТСУР51 в 10 мМ ацетате натрия (pH 5,0) инжестировали в рабочий канал биосенсора с той же скоростью потока в течение 3 мин, после чего система промывалась рабочим буфером в течение 1 ч. Контрольный канал, в котором не производилась иммобилизация белка, использовался для коррекции эффектов неспецифического связывания аналитов с поверхностью чипа биосенсора.

Низкомолекулярные соединения растворялись в ДМСО для создания стоковой концентрации 10 мМ. Экспериментальные образцы соединений готовились в HBS-N буфере в концентрационном диапазоне 10–100 мкМ, финальная концентрация ДМСО составила 1 %. То же количество ДМСО добавлялось в рабочий буфер для снижения вклада объемных эффектов, вызванных разностью коэффициентов преломления рабочего буфера и экспериментального образца. Коэффициенты преломления рабочего буфера и экспериментальных проб выравнивались с помощью рефрактометра RX-5000 (Atago, Япония). При необходимости содержание растворителя в рабочем буфере корректировалось по формуле:

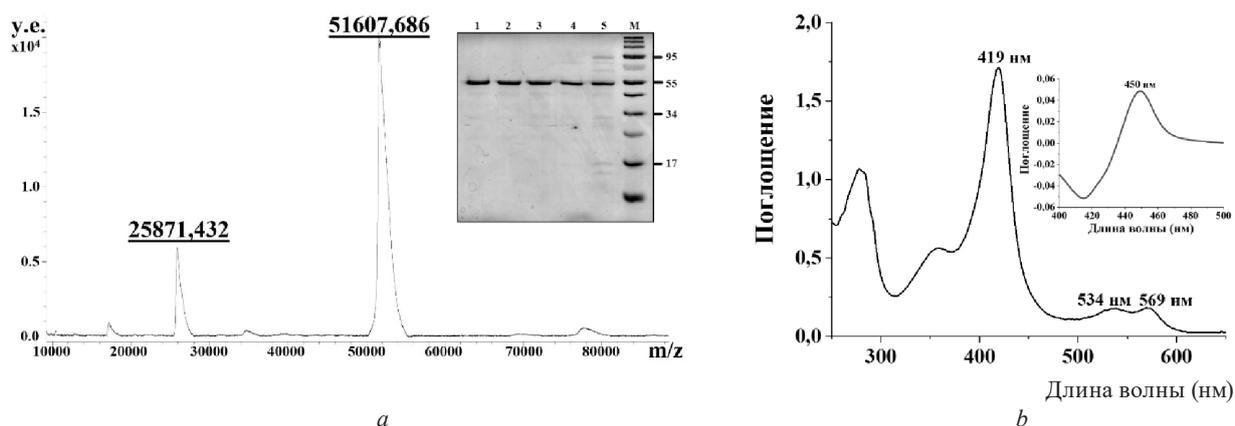
$$C(\text{ДМСО})_{\text{р.б.}} = C(\text{ДМСО})_{\text{образца}} \left(\frac{\eta_1 - \eta_2}{\eta_3 - \eta_2} \right),$$

где $C(\text{ДМСО})_{\text{р.б.}}$ – финальная концентрация ДМСО в рабочем буфере, $C(\text{ДМСО})_{\text{образца}}$ – концентрация ДМСО в экспериментальном образце, η_1 – коэффициент преломления экспериментального образца, η_2 – коэффициент преломления HBS-N буфера, η_3 – коэффициент преломления HBS-N буфера, содержащего ДМСО в концентрации, равной экспериментальному образцу.

Для оценки равновесной константы диссоциации K_d МТСУР51 с низкомолекулярными соединениями раствора соединений в концентрационном диапазоне 10–100 мкМ последовательно инжестировались в систему биосенсора в течение 5 мин, регистрацию распада образовавшегося комплекса проводили в течение 10 мин, скорость потока составляла 30 мкл/мин. Между инъекциями образцов соединений поверхность чипа регенерировали двукратной инъекцией регенерирующего раствора состава 2 М NaCl, 1 % CHAPS в течение 20 с при скорости потока 35 мкл/мин.

Полученные данные были обработаны в программе BIAevaluation Software v 4.1.1 (GE Healthcare, США) с использованием модели расчета Steady state [23] и Two-state (conformational change) binding [24]. Итоговое значение K_d получали из расчетной математической функции, характеризующейся минимальным параметром χ^2 .

Результаты и их обсуждение. Гетерологическая экспрессия и очистка белка. После двух последовательных очисток методами металл-хелатной аффинной на Ni^{2+} -NTA сорбенте и анионообменной хроматографии был получен МТСУР51 в количестве 31,5 мг с 1 л культуральной среды. Продуцируемый *E. coli* МТСУР51 имеет типичный CO-P450 спектр поглощения (вставка на рисунке, *b*). Электрофоретический анализ показал наличие полосы с молекулярной массой около 50 кДа (вставка на рисунке, *a*), МАЛДИ-ТОФ анализ фракций очищенного СУР51 показал наличие основного пика с массой 51,6 кДа (рисунок, *a*), что соответствует расчетной теоретической массе апофермента 51,6 кДа. Абсолютный спектр поглощения окисленного МТСУР51 в отсутствие субстрата показал наличие пика Соре на 419 нм и α - и β -полос на 569 и 535 нм, что характерно для спектра поглощения низкоспиновой формы Р450 (рисунок, *b*).



Результаты физико-химической характеристики полученного препарата рекомбинантного МТСУР51: *a* – МАЛДИ-ТОФ анализ фракции МТСУР51 после очистки, во вставке показана электрофореграмма фракций МТСУР51 после разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях; 1–5 — фракции белка, полученные после анионообменной хроматографии, М – маркер молекулярного веса; *b* – абсолютный спектр поглощения фракции МТСУР51 после очистки; во вставке показан абсолютный спектр поглощения карбонильного комплекса МТСУР51

Purification and characterization of MTCYP51: *a* – MALDI-TOF analysis of the MTCYP51 fraction after purification; the inset shows the electropherogram of MTCYP51 fractions after purification in polyacrylamide gel under denaturing conditions; 1–5 – protein fractions obtained after anion exchange chromatography, M – molecular weight standard; *b* – Absolute absorption spectrum of the MTCYP51 fraction after purification; the inset shows the absolute absorption spectrum of the MTCYP51 carbonyl complex

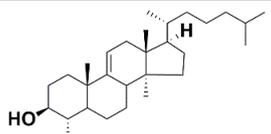
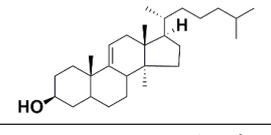
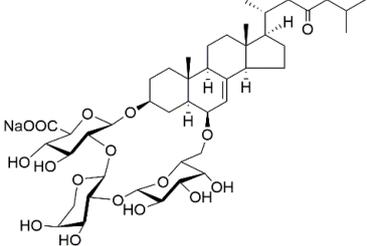
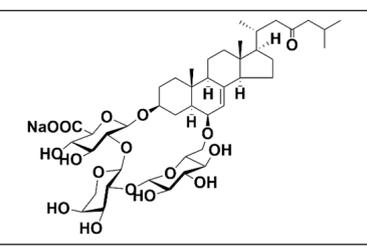
Получение стероидов. В ходе данной работы были получены 14 соединений стероидной природы из голотурии *Eupentacta fraudatrix*, морских звезд *Echinaster luzonicus*, *Anthenea sibogae*, *Anthenoides laevigatus*, *Choriaster granulatus* и *Archaster typicus*, а также морской губки *Halichondria vansoesti*, принадлежащие к разным структурным классам [16–22]. Так, были изучены два метилстерина, пять полигидроксилированных стероидов, один трисульфатированный галогенированный стероид, два полигидроксистероидных монозида, один полигидроксистероидный биозид, два циклических гликозида и один стероидный биозид редкой структурной группы.

Биосенсорный SPR-анализ. МТСУР51 был иммобилизован на поверхность оптического чипа. Уровень иммобилизации составил 1 413 RU. С помощью SPR-анализа было показано взаимодействие МТСУР51 с соединениями **2**, **4**, **8–14**. Равновесные константы диссоциации комплексов представлены в таблице.

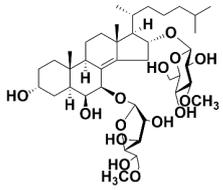
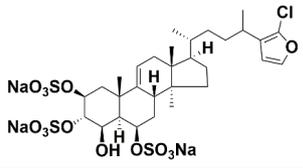
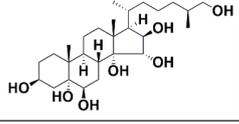
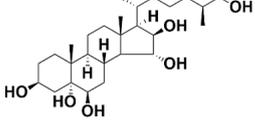
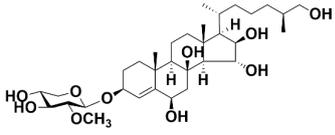
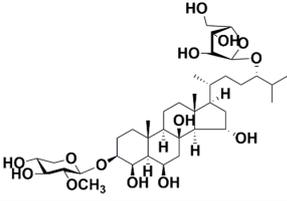
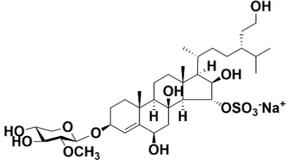
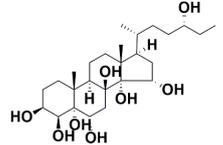
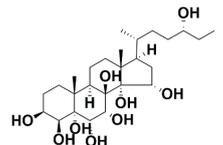
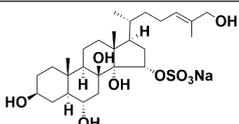
Анализ связывания лигандов с МТСУР51. Связывание лиганда с активным центром цитохрома P450 сопровождается переходом белка из низкоспиновой в высокоспиновую форму, что отражается в наличии специфических максимумов и минимумов в разностных спектрах поглощения [25]. Амплитуда разницы поглощений на данных длинах волн пропорциональна содержанию комплекса P450-лиганд и позволяет рассчитать константу диссоциации K_d комплекса фермент-лиганд (см. табл.). Титрование осуществляли до насыщающей концентрации лиганда, что сопровождается прекращением увеличения ΔA_{\max} , или (для соединений **4**, **8** и **9**) до такой концентрации лиганда, при которой наблюдалось помутнение раствора, что, вероятно, было вызвано достижением предела растворимости данных соединений в используемом буферном растворе. Соединения **2–5**, **7–9**, **11**, **14** проявляли субстратоподобный тип связывания с МТСУР51 с характерными максимумом и минимумом поглощения на ~ 380 и ~ 420 нм соответственно. Для соединения **6** наблюдали нетипичную картину связывания: первоначально положения максимума и минимума поглощения соответствовали ответу типа I, однако при дальнейшем увеличении концентрации лиганда максимум сместился на ~ 440 нм, а минимум – на ~ 417 нм. Общий вид итогового спектра напоминает ответ типа II, характерный для ингибиторов, однако экстремумы сильно смещены в сторону больших длин волн. При этом по результатам SPR-анализа

Результаты спектрофотометрического титрования и SPR-анализа по оценке связывания производных стероидов из морских организмов с активным центром МТСУР51

The results of spectrophotometric titration and SPR-analysis of the binding of steroid derivatives from marine organisms to the active site of МТСУР51

Название (источник)	Структурная формула	Тип спектрального ответа ΔA_{\max} , K_d , мкМ	Модель расчета (SPR) K_d , мкМ
4,14- Δ^9 -Диметилстерин (<i>Eupentacta fraudatrix</i>)		н. с. и.* н. о.**	н. о.
14- Δ^9 -Метилстерин (<i>Eupentacta fraudatrix</i>)		Тип I 0,0214 1,56 \pm 0,7	two-state 98,7 \pm 10,1
Лузоникиозид А (<i>Echinaster luzonicus</i>)		Тип I 0,0457 6,4 \pm 1,0	н. о.
Лузоникиозид D (<i>Echinaster luzonicus</i>)		Тип I 0,0333 4,1 \pm 0,8	steady-state 111,0 \pm 13,3

Окончание таблицы

Название (источник)	Структурная формула	Тип спектрального ответа $\Delta A_{\max} K_D$, мкМ	Модель расчета (SPR) K_D , мкМ
Антенозид Q (<i>Anthenea sibogae</i>)		Тип I 0,0238 3,6 ± 0,5	н. о.
Хлоротопсентиастерин сульфат D (<i>Halichondria vansoesti</i>)		Атипичный спектр н. о.	н. о.
(25S)-5α-холестан-3β,5,6β,14,15α,16β,26-гептаол (<i>Anthenoides laevigatus</i>)		Тип I 0,0099 н. о.	н. о.
(25S)-5α-холестан-3β,5,6β,15α,16β,26-гексаол (<i>Anthenoides laevigatus</i>)		Тип I 0,0321 5,9 ± 0,8	steady-state 77,0 ± 10,0
Эхинастерозид C (<i>Choriaster granulatus</i>)		Тип I 0,0304 38,1 ± 5,3	two-state 106,0 ± 11,7
Гранулатозид A (<i>Choriaster granulatus</i>)		н. с. и. н. о.	steady-state 179,0 ± 23,3
Эхинастерозид B (<i>Choriaster granulatus</i>)		Тип I 0,0296 5,6 ± 0,4	two-state 5,3 ± 0,6
(24R)-27-нор-5α-холестан-3β,4β,5,6α,8,14,15α,24-октаол (<i>Archaster typicus</i>)		н. с. и. н. о.	two-state 0,7 ± 0,1
(24R)-27-нор-5α-холестан-3β,4β,5,6α,7α,8,14,15α,24-нонаол (<i>Archaster typicus</i>)		н. с. и. н. о.	two-state 1,4 ± 0,2
5α-холест-24-ен-3β,6α,8,14,15α,26-гексаол 15-O-сульфат (<i>Archaster typicus</i>)		Тип I 0,0294 15,6 ± 3,2	two-state 3,9 ± 0,5

*н. с. и. – нет спектральных изменений

**н. о. – не определено

связывания для данной молекулы не наблюдается, что может свидетельствовать о взаимодействии с активным центром при сохранении исходного объема молекулы белка. Соединения **10**, **12** и **13**, по-видимому, не связываются с активным центром белка, так как отсутствует спектральный ответ, однако для соединений **12** и **13** по данным SPR наблюдается связывание с высокой аффинностью, что может свидетельствовать о взаимодействии молекулы с поверхностью белка. Соединение **1** обладает структурным сходством с ланостеролом, который демонстрирует субстратоподобный тип спектрального ответа с МТСУР51 и является природным субстратом СУР51 грибов, но данные спектрофотометрического титрования показали отсутствие взаимодействия. Данный факт может объясняться отсутствием одной метильной группы у С4-атома, при этом для соединения **2**, у которого метильные группы в этом положении отсутствуют, связывание наблюдается. Для соединений **3** и **5** при наличии спектрального ответа наблюдается отсутствие детектируемого взаимодействия по данным SPR-анализа, что также может свидетельствовать о связывании с активным центром при сохранении исходного объема молекулы белка. Для соединений **4**, **8**, **9**, по-видимому, разница в значениях констант, полученных двумя методами, может быть обусловлена взаимодействием молекул с поверхностью белка за счет гидрофильных областей молекулы, которые имеются у соединений **4** и **8**. Для соединения **7** не было зафиксировано значимых спектральных изменений при титровании и не было обнаружено взаимодействия при SPR, что, вероятно, обусловлено большим количеством гидроксильных групп в структуре. В случае соединений **11** и **14** с высокой долей вероятности можно утверждать, что происходит связывание молекул в активном центре, что обусловлено низкими значениями K_d , полученных обоими методами анализа. Примечательно, что общей особенностью для данных молекул является наличие сульфогруппы в С15-положении стероидного кольца. Можно предположить, что сульфогруппа участвует в ионном взаимодействии с остатком Н259 активного центра МТСУР51, для которого ранее было показано участие во взаимодействии с азолсодержащим лигандом МТСУР51 4-фенилимидазолом [26]. Важно отметить, что без получения кристаллической структуры нельзя предположить ориентацию молекул в активном центре. Кроме того, только часть исследуемой молекулы может быть связана активным центром, другая часть может быть расположена в канале доступа субстрата или даже на поверхности фермента, что может, в частности, являться одним из объяснений различия показанных K_d для спектрального титрования и биосенсорного SPR-анализа. Для более глубокого понимания особенностей строения активного центра МТСУР51 и его связывания с лигандами необходимо получение трехмерных структур.

Спектр изопреноидных соединений, присутствующих в организме человека, огромен, при этом структуры большинства из них неизвестны. Наличие большого количества молекул различных изопреноидов в организме человека обусловлено многообразием эндогенных биосинтетических путей метаболизма изопреноидов в организме человека, вторичным метаболизмом эндогенных стероидов микробиотой, а также метаболизмом микробиотой и организмом человека изопреноидов, содержащихся в продуктах питания. В последнее время показана важная роль оксистероидов в регуляции иммунной системы. Следует отметить, что в значительной степени изучена лишь роль эндогенных стероидов человека в данных процессах. При этом до конца неизвестна значимость действия продуктов метаболизма изопреноидов ферментами микробиоты на иммунную систему человека, а также роль многообразных экзогенных изопреноидов. По этой причине в рамках работы было важно оценить спектр потенциальных природных лигандов данного орфанного фермента микобактерий. В связи с этим можно предположить, что одной из возможных биологических функций МТСУР51 является метаболизм различных по структуре производных стероидов. Наиболее вероятно, что данный метаболизм направлен на инактивацию иммуноактивных изопреноидов и цитотоксичных для микобактерий соединений.

Заключение. Результаты исследований показали, что МТСУР51 способен связывать в активном центре фермента разнообразные по структуре производные стероидов. Ранее было показано, что микобактериальные цитохромы Р450 участвуют в метаболизме ряда иммуноактивных стероидов человека, включая оксистероиды и производные витамина D [27, 28]. Предполагается, что такая активность цитохромов Р450 является одной из форм обеспечения защиты микобактерий от действия компонентов иммунной системы. Транслируя данную информацию на МТСУР51, мы предполагаем, что данный фермент участвует в метаболизме соединений, которые структур-

но близки к биосинтетическим предшественникам С27-стероидов, относящихся к группе иммуноактивных изопреноидов или обладающих цитотоксическими свойствами в отношении микобактерий.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта БРФФИ № X23РНФ-090 и гранта РНФ № 23-44-10009, <https://rscf.ru/project/23-44-10009>

Acknowledgements. The study was financially supported by the BRFFR grant no. X23RNF-090 and the Russian Science Foundation grant no. 23-44-10009, <https://rscf.ru/project/23-44-10009>

Список использованных источников

1. Global Tuberculosis Report, 2022 / World Health Organization. – Geneva: World Health organization, 2022. – 68 p.
2. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence / S. T. Cole [et al.] // Nature. – 1998. – Vol. 393, № 6685. – P. 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
3. CYP51-like gene of *Mycobacterium tuberculosis* actually encodes a P450 similar to eukaryotic CYP51 / Y. Aoyama [et al.] // J. Biochem. – 1998. – Vol. 124, № 4. – P. 694–696. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022167>
4. Characterization and catalytic properties of the sterol 14 α -demethylase from *Mycobacterium tuberculosis* / A. Belamine [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96, № 16. – P. 8937–8942. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8937>
5. Strushkevich, N. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles / N. Strushkevich, S. A. Usanov, H.-W. Park // J. Mol. Biol. – 2010. – Vol. 397, № 4. – P. 1067–1078. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.075>
6. Lamb, D. C. The first virally encoded cytochrome p450 / D. C. Lamb [et al.] // J. Virol. – 2009. – Vol. 83, № 16. – P. 8266–8269. <https://doi.org/10.1128/JVI.00289-09>
7. Comprehensive essentiality analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* genome via saturating transposon mutagenesis / M. A. DeJesus [et al.] // mBio. – 2017. – Vol. 8, № 1. – P. 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02133-16>
8. Transcriptional adaptation of drug-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* in mice [Electronic Resource] / E. A. Wynn [et al.] // bioRxiv [Preprint]. – 2023, March 08. – Mode of access: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.06.531356v2>. <https://doi.org/10.1101/2023.03.06.531356>
9. Structural insights into 3Fe–4S ferredoxins diversity in *M. tuberculosis* highlighted by a first redox complex with P450 / A. Gilep [et al.] // Front. Mol. Biosci. – 2023. – Vol. 9. – P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1100032>
10. X-ray structure of 4, 4'-dihydroxybenzophenone mimicking sterol substrate in the active site of sterol 14 α -demethylase (CYP51) / A. N. Eddine [et al.] // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, № 22. – P. 15152–15159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801145200>
11. Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14 α -demethylase / L. M. Podust [et al.] // Structure. – 2004. – Vol. 12, № 11. – P. 1937–1945. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.08.009>
12. Human lanosterol 14- α demethylase (CYP51A1) Is a putative target for natural flavonoid luteolin 7, 3'-disulfate / L. Kaluzhskiy [et al.] // Molecules. – 2021. – Vol. 26, № 8. – P. 2237. <https://doi.org/10.3390/molecules26082237>
13. CYP51 from *Trypanosoma brucei* is obtusifoliol-specific / G. I. Lepesheva [et al.] // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43, № 33. – P. 10789–10799. <https://doi.org/10.1021/bi048967t>
14. Schenkman, J. B. Spectral analyses of cytochromes P450 / J. B. Schenkman, I. Jansson // Methods Mol. Biol. – 2006. – Vol. 320. – P. 11–18. <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:11>
15. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection / K. J. McLean [et al.] // J. Biol. Chem. – 2009. – Vol. 284, № 51. – P. 35524–35533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032706>
16. Biosynthetic studies of marine lipids. 42. Biosynthesis of steroid and triterpenoid metabolites in the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix* / T. N. Makarieva [et al.] // Steroids. – 1993. – Vol. 58, № 11. – P. 508–517. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(93\)90026-j](https://doi.org/10.1016/0039-128x(93)90026-j)
17. Cyclic steroid glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: Structures and immunomodulatory activities / A. A. Kicha [et al.] // J. Nat. Prod. – 2015. – Vol. 78, № 6. – P. 1397–1405. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00332>
18. Six new polyhydroxysteroidal glycosides, anthenosides S1–S6, from the starfish *Anthenea sibogae* / A. A. Kicha [et al.] // Chem. Biodiver. – 2018. – Vol. 15, № 3. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700553>
19. Unusual polyhydroxylated steroids from the starfish *Anthenoides laevigatus*, collected of the coastal waters of Vietnam / A. A. Kicha [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25, № 6. – P. 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules25061440>
20. Granulosides D, E and other polar steroid compounds from the starfish *Choriaster granulatus*. Their immunomodulatory activity and cytotoxicity / N. V. Ivanchina [et al.] // Nat. Prod. Res. – 2019. – Vol. 33, № 18. – P. 2623–2630. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1463223>
21. Highly hydroxylated steroids of the starfish *Archaster typicus* from the Vietnamese waters / N. V. Ivanchina [et al.] // Steroids. – 2010. – Vol. 75, № 12. – P. 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.05.012>
22. Tabakmakher, K. M. New trisulfated steroids from the Vietnamese marine sponge *Halichondria vansoesti* and their PSA expression and glucose uptake inhibitory activities / K. M. Tabakmakher [et al.] // Mar. Drugs. – 2019. – Vol. 17, № 8. – P. 445. <https://doi.org/10.3390/md17080445>
23. Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions / F. A. Tanius [et al.] // Methods Cell Biol. – 2008. – Vol. 84. – P. 53–77. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84003-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84003-9)
24. Lipschultz, C. A. Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance / C. A. Lipschultz, Y. Li, S. Smith-Gill // Methods. – 2000. – Vol. 20, № 3. – P. 310–318. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0924>
25. Schenkman, J. B. Substrate interaction with cytochrome P-450 / J. B. Schenkman, S. G. Sligar, D. L. Cinti // Pharmacol. Ther. – 1981. – Vol. 12, № 1. – P. 43–71. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(81\)90075-9](https://doi.org/10.1016/0163-7258(81)90075-9)

26. Podust, L. M. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors / L. M. Podust, T. L. Poulos, M. R. Waterman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, № 6. – P. 3068–3073. <https://doi.org/10.1073/pnas.061562898>

27. Metabolic fate of human immunoactive sterols in *Mycobacterium tuberculosis* / T. Varaksa [et al.] // J. Mol. Biol. – 2021. – Vol. 433, № 4. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.166763>

28. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jsmb.2016.05.021>

References

1. World Health organization. *Global tuberculosis report 2022*. Geneva, 2022.
2. Cole, S. T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D. E., Gordon S. V. [et al.]. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998, vol. 393, no. 6685, pp. 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
3. Aoyama Y., Horiuchi T., Gotoh O., Noshiro M., Yoshida Y. CYP51-like gene of *Mycobacterium tuberculosis* actually encodes a P450 similar to eukaryotic CYP51. *Journal of Biochemistry*, 1998, vol. 124, no. 4, pp. 694–696. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022167>
4. 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 USA*, 1999, vol. 96, no. 16, pp. 8937–8942. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8937>
5. Strushkevich, N., Usanov S. A., Park H.-W. Structural basis of human CYP51 inhibition by antifungal azoles. *Journal of Molecular Biology*, 2010, vol. 397, no. 4, pp. 1067–1078. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.075>
6. Lamb D. C., Lei L., Warrilow A. G. S., Lepesheva G. I., Mullins J. G. L., Waterman M. R., Kelly S. L. The first virally encoded cytochrome p450. *Journal of Virology*, 2009, vol. 83, no. 16, pp. 8266–8269. <https://doi.org/10.1128/jvi.00289-09>
7. DeJesus M. A., Gerrick E. R., Xu W., Park S. W., Long J. E., Boutte C. C., Rubin E. J. [et al.]. Comprehensive essentiality analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* genome via saturating transposon mutagenesis. *mBio*, 2017, vol. 8, no. 1, pp. 1–17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02133-16>
8. Wynn E. A., Dide-Agossou C., Reichlen M., Rossmassler K., Mubarak R. A., Reid J. J., Tabor S. T. [et al.]. Transcriptional adaptation of drug-tolerant *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *bioRxiv* [Preprint], 2023, March 08. Available at: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.03.06.531356v2>. <https://doi.org/10.1101/2023.03.06.531356>
9. Gilep A., Varaksa T., Bukhdruker S., Kavaleuski A., Ryzhykau Y., Smolskaya S., Sushko T. Structural insights into 3Fe–4S ferredoxins diversity in *M. tuberculosis* highlighted by a first redox complex with P450. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2023, vol. 9, pp. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1100032>
10. Eddine A. N., Kries J. P., Podust M. V., Warriar T., Kaufmann S. H. E., Podust L. M. X-ray structure of 4, 4'-dihydroxybenzophenone mimicking sterol substrate in the active site of sterol 14 α -demethylase (CYP51). *Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 22, pp. 15152–15159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801145200>
11. Podust L. M., Yermalitskaya L. V., Lepesheva G. I., Podust V. N., Dalmasso E. A., Waterman M. R. Estriol bound and ligand-free structures of sterol 14 α -demethylase. *Structure*, 2004, vol. 12, no. 11, pp. 1937–1945. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.08.009>
12. Kaluzhskiy L., Ershov P., Yablokov E., Shkel T., Grabovec I., Mezentsev Y., Gnedenko O. [et al.]. Human lanosterol 14-alpha demethylase (CYP51A1) Is a putative target for natural flavonoid luteolin 7, 3'-disulfate. *Molecules*, 2021, vol. 26, no. 8, pp. 2237. <https://doi.org/10.3390/molecules26082237>
13. Lepesheva G. I., Nes W. D., Zhou W., Hill G. C., Waterman M. R. CYP51 from *Trypanosoma brucei* is obtusifoliol-specific. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, no. 33, pp. 10789–10799. <https://doi.org/10.1021/bi048967t>
14. Schenkman J. B., Jansson I. Spectral analyses of cytochromes P450. *Methods in molecular biology*, 2006, vol. 320, pp. 11–18. <https://doi.org/10.1385/1-59259-998-2:11>
15. McLean K. J., Lafite P., Levy C., Cheesman M. R., Mast N., Pikuleva I. A., Leys D., Munro A. W. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* CYP125: molecular basis for cholesterol binding in a P450 needed for host infection. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, vol. 284, no. 51, pp. 35524–35533. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.032706>
16. Makarieva T. N., Stonik V. A., Kapustina I. I., Boguslavsky V. M., Dmitrenko A. S., Kalinin V. I., Cordeiro M. L., Djerassi C. Biosynthetic studies of marine lipids. 42. Biosynthesis of steroid and triterpenoid metabolites in the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *Steroids*, 1993, vol. 58, no. 11, pp. 508–517. [https://doi.org/10.1016/0039-128x\(93\)90026-j](https://doi.org/10.1016/0039-128x(93)90026-j)
17. Kicha A. A., Kalinovskiy A. I., Malyarenko T. V., Ivanchina N. V., Dmitrenok P. S., Menchinskaya E. S., Yurchenko E. A. [et al.]. Cyclic steroidal glycosides from the starfish *Echinaster luzonicus*: Structures and immunomodulatory activities. *Journal of Natural Products*, 2015, vol. 78, no. 6, pp. 1397–1405. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00332>
18. Kicha A. A., Ha D. T., Ivanchina N. V., Malyarenko T. V., Kalinovskiy A. I., Dmitrenok P. S., Ermakova S. P. Six new polyhydroxysteroidal glycosides, anthenosides S1–S6, from the starfish *Anthena sibogae*. *Chemistry & Biodiversity*, 2018, vol. 15, no. 3, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700553>
19. Kicha A. A., Ha D. T., Malyarenko T. V., Kalinovskiy A. I., Popov R. S., Malyarenko O. S., Thuy Tran T. T. Unusual polyhydroxylated steroids from the starfish *Anthenoides laevigatus*, collected of the coastal waters of Vietnam. *Molecules*, 2020, vol. 25, no. 6, pp. 1–12. <https://doi.org/10.3390/molecules25061440>
20. Ivanchina N. V., Kicha A. A., Malyarenko T. V., Ermolaeva S. D., Yurchenko E. A., E. A. Pisyagin, Minh C. V., Dmitrenok P. S. Granulosides D, E and other polar steroid compounds from the starfish *Choriaster granulatus*. Their immunomodulatory activity and cytotoxicity. *Natural Product Research*, 2019, vol. 33, no. 18, pp. 2623–2630. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1463223>

21. Ivanchina N. V., Kicha A. A., Huong T. T. T., Kalinovsky A. I., Dmitrenok P. S., Agafonova I. G., Long P. Q., Stonik V. A. *Steroids*, 2010, vol. 75, no. 12, pp. 897–904. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.05.012>
22. Tabakmakher K. M., Makarieva T. N., Denisenko V. A., Popov R. S., Dmitrenok P. S., Dyshlovoy S. A., Grebnev B. B. New trisulfated steroids from the Vietnamese marine sponge *Halichondria vansomesti* and their PSA expression and glucose uptake inhibitory activities. *Marine Drugs*, 2019, vol. 17, no. 8, pp. 455. <https://doi.org/10.3390/md17080445>
23. Tanious F. A., Nguyen B., Wilson W. D. Biosensor-surface plasmon resonance methods for quantitative analysis of biomolecular interactions. *Methods in Cell Biology*, 2008, vol. 84, pp. 53–77. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84003-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84003-9)
24. Lipschultz C. A., Li Y., Smith-Gill S. Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance. *Methods*, 2000, vol. 20, no. 3, pp. 310–318. <https://doi.org/10.1006/meth.1999.0924>
25. Schenkman J. B., Sligar S. G., Cinti D. L. Substrate interaction with cytochrome P-450. *Pharmacology & Therapeutics*, 1981, vol. 12, no. 1, pp. 43–71. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(81\)90075-9](https://doi.org/10.1016/0163-7258(81)90075-9)
26. Podust L. M., Poulos T. L., Waterman M. R. Crystal structure of cytochrome P450 14 α -sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, vol. 98, no. 6, pp. 3068–3073. <https://doi.org/10.1073/pnas.061562898>
27. Varaksa T., Bukhdruker S., Grabovec I., Marin E., Kavaleuski A., Gusach A., Kovalev K. [et al.]. Metabolic fate of human immunoactive sterols in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Molecular Biology*, 2021, vol. 433, no. 4, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.166763>
28. 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. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, vol. 169, pp. 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.05.021>

Информация об авторах

Карпуть Елена Юрьевна – младший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alena.karputs@gmail.com

Капустина Ирина Ивановна – кандидат химических наук, научный сотрудник. Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН (пр-т 100 лет Владивостоку, 159, 690022, Владивосток, Российская Федерация). E-mail: ikapust@rambler.ru

Табакмахер Ксения Михайловна – кандидат химических наук, научный сотрудник. Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН (пр-т 100 лет Владивостоку, 159, 690022, Владивосток, Российская Федерация). E-mail: tabakmakher_km@piboc.dvo.ru

Макарьева Татьяна Николаевна – доктор химических наук, главный научный сотрудник. Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН (пр-т 100 лет Владивостоку, 159, 690022, Владивосток, Российская Федерация). E-mail: makarieva@piboc.dvo.ru

Кича Алла Анатольевна – доктор химических наук, ведущий научный сотрудник. Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН (пр-т 100 лет Владивостоку, 159, 690022, Владивосток, Российская Федерация). E-mail: kicha@piboc.dvo.ru

Иванчина Наталья Владимировна – кандидат химических наук, заведующий лабораторией. Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН (пр-т 100 лет Владивостоку, 159, 690022, Владивосток, Российская Федерация). E-mail: ivanchina@piboc.dvo.ru

Дмитренко Павел Сергеевич – доктор химических наук, директор. Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г. Б. Елякова ДВО РАН (пр-т 100 лет Владивостоку, 159, 690022, Владивосток, Российская Федерация). E-mail: paveldmt@piboc.dvo.ru

Калужский Леонид Александрович – кандидат биологических наук, научный сотрудник. Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича (ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, 119121, Москва, Российская Федерация). E-mail: leonid.kaluzhskiy@ibmc.msk.ru

Гилеп Андрей Александрович – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@yahoo.com

Information about the authors

Karputs Alena I. – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alena.karputs@gmail.com

Kapustina Irina I. – Ph. D. (Chemistry), Researcher. G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS (159, pr. 100-let Vladivostoku, 690022, Vladivostok, Russian Federation). E-mail: ikapust@rambler.ru

Tabakmakher Ksenia M. – Ph. D. (Chemistry), Researcher. G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS (159, pr. 100-let Vladivostoku, 690022, Vladivostok, Russian Federation). E-mail: tabakmakher_km@piboc.dvo.ru

Makarieva Tatyana N. – Dr. Sc. (Chemistry), Chief Researcher. G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS (159, pr. 100-let Vladivostoku, 690022, Vladivostok, Russian Federation). E-mail: makarieva@piboc.dvo.ru

Kicha Alla A. – Dr. Sc. (Chemistry), Leading Researcher. G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS (159, pr. 100-let Vladivostoku, 690022, Vladivostok, Russian Federation). E-mail: kicha@piboc.dvo.ru

Ivanchina Natalia V. – Ph. D. (Chemistry), Head of the laboratory. G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS (159, pr. 100-let Vladivostoku, 690022, Vladivostok, Russian Federation). E-mail: ivanchina@piboc.dvo.ru

Dmitrenok Pavel S. – Dr. Sc. (Chemistry), Director. G. B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry FEB RAS (159, pr. 100-let Vladivostoku, 690022, Vladivostok, Russian Federation). E-mail: paveldmt@piboc.dvo.ru

Kaluzhskiy Leonid A. – Ph. D. (Biology), Researcher. Institute of Biomedical Chemistry (10, b. 8, Pogodinskaya str., 119121, Moscow, Russian Federation). E-mail: leonid.kaluzhskiy@ibmc.msk.ru

Gilep Andrei A. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@yahoo.com