

**В. В. Бритиков<sup>1</sup>, Е. В. Бритикова<sup>1</sup>, Э. В. Бочаров<sup>2</sup>, Я. В. Бершадский<sup>2</sup>,  
Н. В. Кузьмина<sup>3</sup>, К. М. Бойко<sup>4</sup>, член-корреспондент С. А. Усанов<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

<sup>2</sup>*Институт биоорганической химии имени академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова  
Российской академии наук, Москва, Российская Федерация*

<sup>3</sup>*Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук, Москва, Российская Федерация*

<sup>4</sup>*Институт физической химии и электрохимии имени А. Н. Фрумкина Российской академии наук,  
Москва, Российская Федерация*

### **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА Δ3–12 ЦИСТЕИН-ОБЕДНЕННОГО ЦИТОХРОМА P450 3A4 С АМИНОКИСЛОТНОЙ ЗАМЕНОЙ S291C**

**Аннотация.** Цитохром P450 3A4 (3A4) экспрессируется в клетках печени человека и играет ключевую роль в метаболизме ксенобиотиков, в том числе и более 50 % лекарственных препаратов. Регуляция активности данного фермента может происходить на уровне экспрессии генов, а также на уровне конформационного состояния структуры самого белка, за счет изменения молекулярного окружения, в том числе за счет взаимодействия с высокомолекулярными эффекторами. Понимание изменения структуры и динамики 3A4 в ответ на изменение условий среды необходимо для предсказания изменения уровня его активности, который в значительной степени обуславливает гомеостаз организма. Для проведения *in vitro* экспериментов по исследованию структуры, динамики и белок-лигандных/белковых взаимодействий ферментов современными спектральными методами используется подход, в котором в целевой белок селективно вводятся методами белковой инженерии цистеиновые остатки в заданные локусы полипептидной цепи для последующего мечения специализированными молекулярными метками. Для этих целей в данной работе была получена мутантная форма мембрансвязанного (полноразмерного) рекомбинантного цитохрома P450 3A4 человека C58A/C64M/C98A/C239T/C377A/C468S/S291C. По данным спектроскопии кругового дихроизма нами было установлено, что введенные мутации не вызывают значимых изменений во вторичной структуре полученной формы 3A4, что свидетельствует о сохранении свернутости полипептидной цепи. Проведены спектрофотометрические измерения для сравнительного анализа изменения сродства к лигандам активного центра. Более того, нами было показано, что тестостерон гидроксилирующая активность в *in vitro* реконструированной системе для данной мутантной формы 3A4 многократно увеличивается относительно дикой формы фермента.

**Ключевые слова:** цитохром P450 3A4 человека, микросомальный цитохром *b*<sub>5</sub> человека, белковая инженерия, сайт-направленный мутагенез, гидроксиллазная активность, спектроскопия кругового дихроизма

**Для цитирования.** Физико-химические свойства Δ3–12 цистеин-обедненного цитохрома P450 3A4 с аминокислотной заменой S291C / В. В. Бритиков [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2022. – Т. 66, № 2. – С. 176–186. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-2-176-186>

**Vladimir V. Britikov<sup>1</sup>, Elena V. Britikova<sup>1</sup>, Eduard V. Bocharov<sup>2</sup>, Yaroslav V. Bershatsky<sup>2</sup>, Natalya V. Kuzmina<sup>3</sup>,  
Konstantin M. Boyko<sup>4</sup>, Corresponding Member Sergey A. Usanov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

<sup>2</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation*

<sup>3</sup>*Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation*

<sup>4</sup>*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences,  
Moscow, Russian Federation*

### **PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF Δ3–12 CYSTEINE-DEPLETED CYTOCHROME P450 3A4 WITH AMINO ACID SUBSTITUTION OF S291C**

**Abstract.** Cytochrome P450 3A4 (3A4) is highly expressed in the human liver cells and plays a decisive role in the metabolism of xenobiotics, including more than 50 % of medical products. The activity of this enzyme can be regulated at the expression level of genes, as well as at the conformation level of the structure of the protein itself, due to changes in the molecular environment, including due to the interaction with high-molecular effectors. The understanding of the structure changes

and the 3A4 dynamics in response to the environmental changes is necessary to predict the changes in the level of its activity that to a considerable extent regulates the body's homeostasis. To perform *in vitro* experiments on the structure, dynamics, and protein-ligand/protein interactions of the enzymes by the modern spectral methods, the approach is used, in which the target protein is selectively added with cysteine residues in the given polypeptide chain loci by the protein engineering methods for subsequent labeling with specialized molecular labels. To do this, the human mutant form of membrane-bound (full length) recombinant cytochrome P450 3A4 C58A/C64M/C98A/C239T/C377A/C468S/S291C was obtained. According to the circular dichroism spectroscopy data we established that the introduced mutations do not cause significant changes in the secondary structure of the obtained form 3A4, which shows the preservation of the folding of the peptide chain. The spectral photometric measurements were made to comparatively analyze the changes in the affinity to the ligands of the active center. Moreover, we showed that the testosterone hydroxylase activity in the *in vitro* reconstructed system for a given mutation form of 3A4 increases many times with respect to the wild form of the enzyme.

**Keywords:** human cytochrome P450 3A4, human microsomal cytochrome  $b_5$ , protein engineering, site-directed mutagenesis, hydroxylase activity, circular dichroism spectroscopy

**For citation.** Britikov V. V., Britikova E. V., Bocharov E. V., Bershatsky Ya. V., Kuzmina N. V., Boyko K. M., Usanov S. A. Physical and chemical properties of  $\Delta 3-12$  cysteine-depleted cytochrome P450 3A4 with amino acid substitution of S291C. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2022, vol. 66, no. 2, pp. 176–186 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2022-66-2-176-186>

**Введение.** Изучение цитохрома P450 3A4 человека (3A4) представляет значительный интерес из-за его ключевой роли в метаболизме более 50 % лекарственных средств, доступных на фармацевтическом рынке. 3A4 является мембран-связанным белком и локализован в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) клеток со стороны, обращенной в цитозоль. 3A4 наиболее распространенный из цитохромов P450, представленных в печени человека и в тонком кишечнике. На долю 3A4 из общего количества P450 в печени в среднем приходится 25–30 % [1]. В настоящий момент накоплено большое количество данных относительно кристаллической структуры 3A4 в несвязанной с мембраной форме для его транскрибированного по N-концу варианта с различными лигандами активного центра [2–6]. Полученные данные не могут объяснить процессов, происходящих в условиях *in vivo* для 3A4, ввиду ограниченности применения и интерпретации данных кристаллографического метода (рентгеноструктурного анализа). Альтернативой в исследовании является применение методов молекулярного моделирования, а в частности метода молекулярной динамики (МД) [7]. Так МД была успешно использована в процессе исследования взаимодействия 3A4 с тестостероном в мембранном окружении [8]. В результате моделирования ускоренной МД на траектории более чем 25 мкс было установлено, что связывание с субстратом может происходить напрямую с его мембран-солюбилизированной формой [8]. Но подтверждение результатов молекулярного моделирования требует экспериментальных проверок и уточнений. Для этих целей необходимо использовать макромолекулярные биофизические методы, способные предоставить информацию о структуре и динамике белковой глобулы в водном (нативном) окружении. К таким методам можно отнести флуоресцентную и ЯМР спектроскопию. Часто для применения этих методов прибегают к получению форм белков, меченых специализированными молекулярными метками (зондами), чувствительными к изменению структуры и динамики при изменении условий среды или при взаимодействии с белками партнерами. Для введения таких меток используется подход белковой инженерии по селективному внедрению в полипептидную цепь одиночных цистеиновых остатков, к боковой группе которых присоединяется необходимая молекулярная метка [9; 10]. Целью данной работы является получение мембран-связанной цистеин-обедненной рекомбинантной формы 3A4 с селективно внедренным цистеиновым остатком и физико-химическая характеристика для подтверждения сохранения нативности структуры. Введение нового цистеина осуществляется рациональным способом с целью дальнейшего использования в исследованиях определения взаимодействия 3A4 с белками партнерами на структурном уровне. Ранее уже были получены различные цистеин-обедненные формы 3A4 как для растворимой ( $\Delta 3-22$ ) [11–13], так и мембран-связанной формы ( $\Delta 3-12$ ) [14–19]. В качестве основы для селективного внедрения цистеинового остатка в  $\Delta 3-12$  S18F форму 3A4 нами был выбран цистеин-обедненный вариант C58A/C64M/C98A/C239T/C377A/C468S из [13], который охарактеризован как каталитически активный и высокоэкспрессируемый. Участок цепи для внедрения нового цистеина был выбран нами исходя из следующих критериев: он должен быть расположен на

поверхности белковой глобулы, но в участке, не связанном с липидным окружением, не должен перекрываться с сайтом связывания для доноров электрона (НАДФН-зависимая цитохром P450 редуктаза (ЦПР)), должен находиться в участке с пониженной динамикой цепи (т. е. избегаются подвижные петли), мутируемый остаток должен быть максимально похож по структуре цистеину (например, серин), чтобы предотвратить потенциальную пертурбацию структуры и влияние на взаимодействие с белками партнерами. Таким критериям, с нашей точки зрения, исходя из анализа имеющихся структурных данных, соответствует сериновый остаток в положении 291 и поэтому он был выбран для замещения на цистеин. Мутантная форма S281C 3A4 ранее описана не была. Полученная в данной работе форма 3A4 послужит в дальнейшем базисом для проведения биофизических экспериментов по определению влияния изменения конформационной динамики белка на его результирующую каталитическую активность.

**Материалы и методы исследования.** Клонирование, гетерологическая экспрессия и очистка рекомбинантных белков. Кодон-оптимизированный ген 3A4 с делецией участка, кодирующего 10 аминокислотных остатков в области предполагаемой трансмембранной спирали на N-конце полипептидной цепи ( $\Delta 3-12$ ), и введением аминокислотных замен S18F/C58A/C64M/C98A/C239T/C377A/C468S/S291C, а также с добавлением гексогистидиновой последовательности на C-конец был синтезирован (Synbio Technologies, США) и клонирован в экспрессионный вектор pCW-LIC по сайтам рестрикции NdeI и HindIII. Рекомбинантный P450 3A4 дикого типа был также получен в виде  $\Delta 3-12$  S18F формы (NF14) с использованием pCW-LIC вектора. Полноразмерный микросомальный цитохром  $b_5$  человека ( $b_5$ ) был клонирован нами ранее в pT7 плазмидный вектор с T7 промотором экспрессии по сайтам рестрикции NdeI и SalI.

Для гетерологической экспрессии колонию свежетрансформированных клеток *E. coli* штамма DH5 $\alpha$  для цитохрома 3A4 и BL21(DE3) для  $b_5$  засевали в LB среду, содержащую 100 мг/мл ампициллина, и растили 16 ч при 37 °C и 180 об/мин. Итоговую ночную культуру переносили в 500 мл ТВ-среды, содержащую 100 мг/мл ампициллина и микроэлементы, и инкубировали до оптической плотности OD<sub>600</sub> ~ 0,8 при 37 °C и 180 об/мин. Экспрессию индуцировали добавлением в среду изопропил- $\beta$ -D-1-тиогактопиранозид до концентрации 170 мг/л. Для увеличения синтеза гема В клетками в среду добавляли аминоклевулиновую кислоту до концентрации 110 мг/л. Экспрессия осуществлялась в течение 48 ч при 28 °C и 200 об/мин для P450 3A4 и при 22 °C и 130 об/мин для цитохрома  $b_5$ . По окончании экспрессии клетки осаждали с использованием центрифуги ScanSpeed (LaboGene, Дания) при 2700g в течение 20 мин. Клетки ресуспендировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере (КФБ) (pH 7,4), содержащем 20 % глицерина, 0,4 мМ фенилметилсульфонил фторида (ФМСФ) и 0,3 М NaCl.

Очистку целевых белков осуществляли с использованием метода металл-аффинной хроматографии. В качестве аффинного сорбента был использован синтезированный нами Ni-IDA-Сефакрил S-200 по методике, описанной в [20], с использованием в качестве матрицы (носителя IDA-групп) Сефакрила S-200 HR. Использование такого сорбента позволяет получить рекомбинантные белки с гексагистидиновыми тагами в высокоочищенном состоянии за один акт хроматографии. В начале к размороженным клеткам добавляли ингибитор протеаз ФМСФ до концентрации 1 мМ и разрушали с использованием гомогенизатора высокого давления Emulsiflex-C5 (Avestin, Канада). Далее полученную суспензию осаждали с использованием центрифуги Avanti JXN-30 (BeckmanCoulter, США) при 58000g в течение 40 мин. Полученный осадок, содержащий мембрансвязанную форму целевых белков, отделяли от супернатанта и гомогенизировали в буфере, содержащем 0,1 М КФБ (pH 7,4), 20 % глицерина 0,3 М NaCl. К полученному раствору добавляли детергент CHAPS до концентрации 1,2 % и инкубировали при постоянном перемешивании при температуре 4 °C в течение 75 мин для солиubilизации белков из мембран. Затем солиubilизированный белок отделяли от липидных компонент при помощи центрифугирования в течение 1 ч при 58000g. Итоговый супернатант пропускали через ДЭАЭ-целлюлозу и наносили на Ni-IDA-Сефакрил S-200, предварительно уравновешенный буфером, содержащим 0,1 М КФБ (pH 7,4), 20 % глицерина, 0,2 % CHAPS и 0,3 М NaCl (буфер А). На этом этапе, до пропускания через ДЭАЭ-целлюлозу, для цитохрома  $b_5$  добавлялась стадия инкубирования супернатанта с гемин хлоридом (50 мкМ) для образования холо-формы  $b_5$ . После аффинной иммобилизации белка колонку промывали двадцатью объемами буфера А с 50 мМ имидазола. Для иллюции

белков использовали линейный градиент имидазола от 50 до 500 мМ в буфере А. Фракцию очищенного белка избавляли от имидазола при помощи гель-фильтрации с использованием Сефадекса G-15, предварительно уравновешенного буфером А. Степень чистоты белков была определена с использованием электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Точные молекулярные массы белков определены с использованием МАЛДИ масс-спектрометра Microflex (Bruker Daltonik Ink., США). Финальные препараты целевых белков хранили при температуре  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

*In vitro* реконструкция гидроксиллазной активности и ее измерение. Для измерения гидроксиллазной активности рекомбинантных 3A4 использовали *in vitro* реконструированную P450 систему гидроксирования. В качестве донора электронов для 3A4 применяли рекомбинантную ЦПР и систему регенерации НАДФН на основе НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (ИД) и изоцитрата натрия. Реакцию проводили в 50 мМ КФБ (pH 7,4), который содержал 10 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 100 мкМ тестостерона, 8 мМ изоцитрат натрия, 0,1 ЕМ/мл ИД. В такой раствор добавляли предварительно смешанные P450 3A4 и ЦПР до концентрации 1 и 2 мкМ соответственно. При определении влияния  $b_5$  на гидроксиллазную активность его добавляли до концентрации от 0,5 до 4 мкМ. Реакцию инициировали добавлением НАДФН до концентрации 1 мМ и инкубировали при температуре  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 2 ч, а останавливали добавлением дихлорметана. Экстракт в дихлорметане выпаривали с использованием центрифужного вакуумного концентратора ScanVac (LaboGene, Дания). Полученный осадок растворяли в метаноле до концентрации 200 мкМ и анализировали при помощи ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, США). ВЭЖХ для разделения тестостерона и его гидроксированной формы проводили с использованием C18 колонки при температуре  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  с градиентом метанола в воде (от 40 до 95 % метанола в смеси). Детекция веществ осуществлялась по поглощению на длине волны 254 нм.

*Измерение спектров кругового дихроизма (КД).* Спектры КД для 3A4 и его мутантной формы были измерены с использованием КД спектрометра J-1700 (JASCO, Япония). Измерения проводили при комнатной температуре ( $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в 10 мМ КФБ (pH 7,4) и оптическом пути 1 мм, при диапазоне длин волн 180–260 нм и продувке измерительного отсека азотом. Белок добавлялся в буферный раствор для измерений при 150-кратном разбавлении для значительного снижения концентрации компонентов криоконсервирующего буфера. Спектр базовой линии записывали по буферному раствору. Концентрация белка при измерении составляла 1 мкМ. Итоговые спектры были получены в результате усреднения 10 сканирований. Скорость сканирования диапазона длин волн составила 50 нм/мин при сканировании точек с разрешением 0,5 нм.

*Разностное спектрофотометрическое титрование.* Данные измерения проводили с использованием двулучевого спектрофотометра Cary 5000 (Agilent Technologies, США), оснащенного термостатируемой измерительной ячейкой. Измерение производили в 50 мМ КФБ (pH 7,4) при температуре  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  в диапазоне длин волн 350–700 нм. Концентрация белка составляла 1 мкМ. Добавляемые лиганды были растворены в этаноле. В кювету сравнения при каждом шаге титрования добавляли соответствующий объем этанола. Для определения кажущейся равновесной константы диссоциации ( $K_{d(\text{каж})}$ ) использовали зависимость разности поглощения от концентрации лиганда с учетом выражения, которое является производным от уравнения Моррисона [21]:

$$\Delta A_{\text{полг}} = \Delta A_{\text{макс}} \left\{ (n[P]_{\text{общ}} + [L]_{\text{общ}} + K_{d(\text{каж})}) - [n[P]_{\text{общ}} + [L]_{\text{общ}} + K_{d(\text{каж})}]^2 - 4n[P]_{\text{общ}}[L]_{\text{общ}} \right\}^{1/2} / 2n[P]_{\text{общ}},$$

где  $\Delta A_{\text{полг}}$  – модуль разницы поглощения между максимумами для высоко- и низкоспиновой составляющей;  $\Delta A_{\text{макс}}$  – разница поглощения при максимальном насыщении сайтов связывания;  $[P]_{\text{общ}}$  и  $[L]_{\text{общ}}$  – итоговая концентрация фермента и лиганда соответственно;  $n$  – количество сайтов связывания в ферменте.

**Результаты и их обсуждение.** *Получение цистеин-обедненной мутантной формы 3A4.* Нами была получена в высокоочищенном состоянии рекомбинантная мембран-связанная цистеин-обедненная форма 3A4 с селективно введенным цистеиновым остатком в положение 291 полипеп-



тидной цепи (далее 3A4monoC-S291C) (рис. 1, *a*). За основу взята модифицированная аминокислотная последовательность 3A4 NF14 (3A4-NF14) из [22], которая обеспечивает высокий уровень экспрессии мембран-связанной рекомбинантной формы 3A4 с минимальными изменениями последовательности и сохранением активности на уровне дикого типа фермента. В такой последовательности усечена на 10 аминокислотных остатков N-концевая трансмембранная альфа-спираль ( $\Delta 3-12$ ) (рис. 1, *a*) и введена мутация S18F, кардинально увеличивающая уровень экспрессии в клетках *E. coli* [22]. Для применения металл-аффинной хроматографии, с целью получения высокоочищенной формы 3A4, на C-конец были добавлены шесть гистидиновых остатков. В данную последовательность введена мутация S291C и мутации для цистеинового обеднения последовательности C58A/C64M/C98A/C239T/C377A/C468S, которые, как было продемонстрировано ранее, позволяют получить цистеин-обедненную немембран-связанную ( $\Delta 3-22$ ) форму 3A4 в активном состоянии с высоким выходом экспрессии и сохранением нативности структуры [13]. Полученная последовательность была кодон-оптимизирована для экспрессии в *E. coli*, синтезирована и клонирована в экспрессионный вектор pCW-LIC по сайтам рестрикции NdeI и HindIII. Уровень экспрессии определен по итоговому количеству очищенного белка (в предположении, что потери при очистке незначительны) и составил 94 нмоль/л (0,32 мг/г клеток). Молекулярная масса очищенного 3A4monoC-S291C соответствует теоретически ожидаемой, что было подтверждено по МАЛДИ масс-спектру (рис. 1, *b*). Высокая степень чистоты финального препарата определена электрофоретическим и спектрофотометрическим методами (рис. 1, *b*). Так соотношение поглощения на длинах волн 424/280 для имидазол-связанной формы составило  $>1,2$  (рис. 1, *c*). В свободном от лигандов состоянии спектр поглощения характеризуется наличием двух максимумов поглощения в области полосы Core (393 и 410 нм), что указывает на взаимодействие с молекулами CHAPS детергента, которые вероятно связываются с областью активного сайта

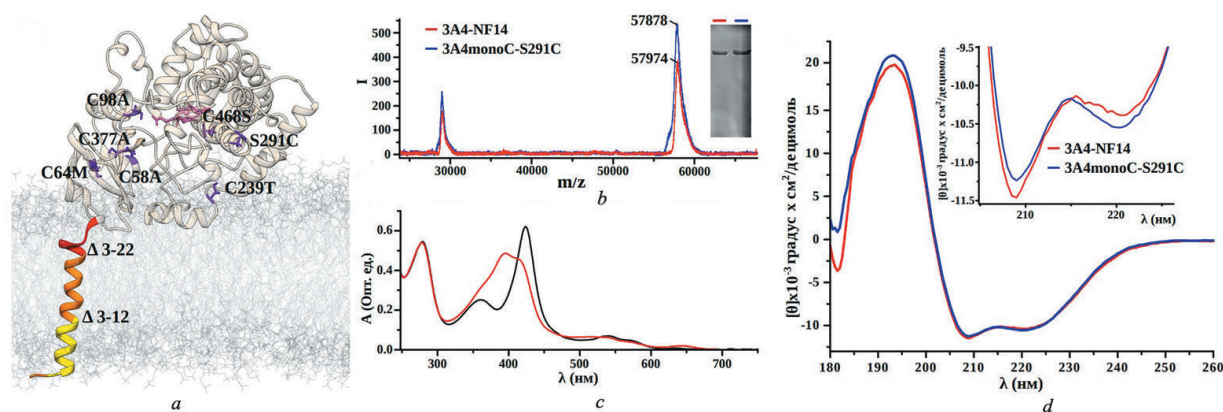


Рис. 1. Анализ состояния полученного 3A4monoC-S291C: *a* – изображение локализации введенных мутаций на структурной модели 3A4 в мембранном окружении. Модель структуры получена нами на основании моделирования молекулярной динамики 3A4 дикого типа при помощи Amber16 [23] в POPC липидном бислое. Стартовая модель построена с использованием веб-приложения CHARMM-GUI [24] и координат кристаллической структуры 3A4 (pdb-код: 1TQN) [2]; *b* – МАЛДИ масс-спектр для очищенных 3A4 (3A4-NF14 – красный, 3A4monoC-S291C – синий). На вставке изображена электрофореграмма разделения очищенных фракций в полиакриламидном геле при денатурирующих условиях; *c* – спектр поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра для 3A4monoC-S291C в свободном (красный) и связанном (черный) с имидазолом состоянии; *d* – спектр КД для 3A4-NF14 (красный) и 3A4monoC-S291C (синий)

Fig. 1. Analysis of the state of obtained 3A4monoC-S291C: *a* – image of the localization of the introduced mutations on the structure model of 3A4 in the membrane environment. We obtained the structure model by simulating molecular dynamics of the wild form of 3A4 using Amber16 [23] in the POPC lipid bilayer. The starting model was built with the aid of the web-application CHARMM-GUI [24] and the coordinates of the crystalline structure of 3A4 (pdb-code: 1TQN) [2]; *b* – MALDI mass-spectrometer for purified 3A4 (3A4-NF14 – red, 3A4monoC-S291C – blue). The insert show the electrophoreogram of purified fraction separation in polyacrylamide gel at denaturing conditions; *c* – absorption spectrum in the ultraviolet and visible spectrum areas of 3A4monoC-S291C in the free (red) and bound (black) imidazol state; *d* – CD spectrum for 3A4-NF14 (red) and 3A4monoC-S291C (blue)

3A4monoC-S291C и смещают равновесие спинового состояния атома железа гемовой группы в сторону уменьшения низко-спиновой составляющей.

Нативность конформации 3A4monoC-S291C была проанализирована при помощи спектроскопии КД (рис. 1, *d*). В результате сравнения КД спектров 3A4monoC-S291C с 3A4-NF14 установлено, что введение выбранных мутаций не приводит к каким-либо значимым изменениям в составе вторичной структуры. Поэтому мы можем утверждать, что общий фолд белковой глобулы для 3A4monoC-S291C не нарушается. Небольшая разница в интенсивности вращения плоскости поляризации для двух форм 3A4 в диапазоне длин волн 180–195 нм может быть связана с неточностью измерений из-за избыточного поглощения раствора препарата. В области 208 нм для 3A4monoC-S291C происходит уменьшение вращения на 2 % по сравнению с 3A4-NF14, а в области 220 нм вращение плоскости увеличивается (рис. 1, *d*). Такое спектральное поведение указывает на возможное небольшое увеличение спиральности для 3A4monoC-S291C.

*Измерение равновесной константы диссоциации.* Потенциальные изменения во взаимодействии с лигандами активного центра для 3A4monoC-S291C вследствие введенных мутаций исследовали при помощи разностного спектрофотометрического титрования (рис. 2). В качестве лигандов были выбраны ингибитор гидроксилазной активности кетоконазол, а в качестве субстрата – тестостерон. В процессе титрования кетоконазолом в обоих случаях спектральные изменения соответствуют увеличению доли низкоспиновой формы, что согласуется с координированием атома азота азольной группы по атому железа гема в нативном состоянии (рис. 2, *a, b*). В результате измерений было установлено, что для 3A4monoC-S291C сродство к кетоконазолу увеличилось в 2,57 раз. Кроме того, величина  $\Delta A$  увеличивается в 1,225 раза, что может указывать на такое же увеличение доли конформаций 3A4monoC-S291C, способных связывать кетоконазол, если предположить, что в растворе 3A4 находится в динамическом равновесии между «открытой» и «закрытой» конформацией. Тогда для 3A4monoC-S291C доля «открытой» конформации увеличивается в 1,225 по сравнению с 3A4-NF14.

Для случая титрования тестостероном для обеих форм 3A4 обнаруживается отклонение от стандартного спектрального ответа при связывании P450 с субстратом (рис. 2, *b, d*). При добавлении тестостерона уменьшается поглощение в области, связанной с высокоспиновым пятикоординационным состоянием, и не происходит значительных изменений в области для низкоспинового состояния. Такое поведение объясняется вытеснением тестостероном CHAPS детергента из активного сайта, который остается связанным после растворения стокового раствора белка в буфере для измерений. Поэтому наблюдаемые изменения в разностном спектре характеризуют замещение одного субстрата другим субстратом. Уменьшение высокоспиновой составляющей при добавлении тестостерона можно объяснить разным химическим равновесием между низко- и высокоспиновым состоянием для CHAPS и тестостерона. Стоит отметить, что при увеличении концентрации тестостерона больше 4 мкМ происходит скачкообразное изменение типа спектрального ответа со сдвигом в длинноволновую область спектра (рис. 2, *c, d*). Такое поведение можно связать с моментом полного вытеснения CHAPS из активного сайта или началом одновременного связывания нескольких молекул тестостерона. Известно, что 3A4 может одновременно связывать несколько молекул субстрата [25]. Но несмотря на это представляется возможность оценить изменение сродства тестостерона для 3A4monoC-S291C относительно дикого варианта 3A4 по концентрационной зависимости связывания в диапазоне до начала скачкообразного перехода. Так, для 3A4monoC-S291C  $K_{d(каж)}$  взаимодействия с тестостероном составляет 196 нМ, что в 1,18 раз меньше, чем для дикого типа 3A4. Суммируя результаты спектрофотометрического титрования, можно сделать вывод, что 3A4monoC-S291C связывает лиганды активного центра с большим сродством. Исходя из этого можно предположить влияние введенных мутаций на локальную структуру активного сайта или канала доступа субстрата, не приводящего к их глобальным структурным перестроениям.

*In vitro реконструкция гидроксилазной активности.* Нами были проведены сравнительные измерения гидроксирования тестостерона в *in vitro* реконструированной системе для 3A4-NF14 и 3A4monoC-S291C (рис. 3). Активность проанализирована по количеству образовавшегося 6 $\beta$ -гидрокситестостерона (6 $\beta$ -ОН) после 2 ч ферментации при условиях, описанных выше.

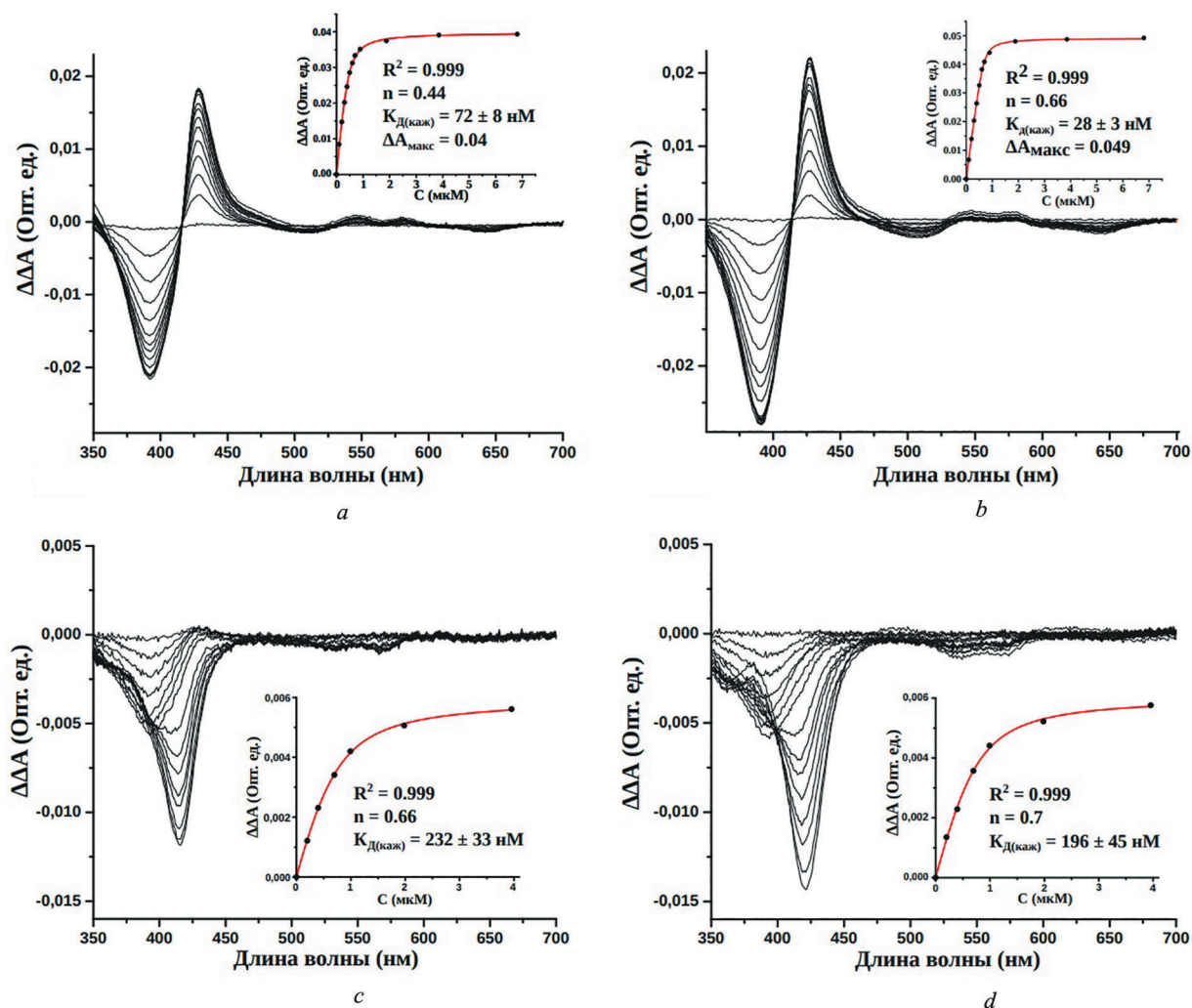


Рис. 2. Разностное спектрофотометрическое титрование 3A4-NF14 (a, c) и 3A4monoC-S291C (b, d) кетоконазолом и тестостероном. Измерения выполнены при температуре 25 °С и концентрации 3A4 1 мкМ в 50 мМ КФБ буфере (рН 7,4). Вставки в спектрах отображают зависимость  $\Delta A_{\text{полд}}$  от концентрации лиганда с соответствующей аппроксимирующей кривой и ее параметрами

Fig. 2. Difference spectrophotometric titration of 3A4-NF14 (a, c) and 3A4monoC-S291C (b, d) with ketoconazole and testosterone. Measurements are made at a temperature of 25 °C and a concentration of 3A4 1  $\mu\text{M}$  in 50 mM KPB (pH 7.4). The inserts in the spectra show the dependence of  $\Delta A_{\text{absorb}}$  on the ligand concentration using the approximate approximation curve and its parameters

В результате установлено, что для 3A4monoC-S291C данная активность увеличивается в 4 раза по сравнению с 3A4-NF14 (рис. 3, b, c). Кроме активности форм 3A4 также исследовалось влияние добавления  $b_5$  в реконструированную систему. Установлено, что добавление  $b_5$  в систему приводит к увеличению активности для обеих форм белков. Оптимальное соотношение между 3A4 и  $b_5$  составляет 1 : 1, при дальнейшем увеличении концентрации  $b_5$  активность существенно не изменяется (рис. 3, c). Это означает то, что 3A4 с  $b_5$  образуют специфический комплекс с одним сайтом связывания и при достижении равного стехиометрического соотношения концентраций двух белков рост эффекта прекращается. Прирост в активности для 3A4monoC-S291C и дикого типа в присутствии  $b_5$  составляет 1,57 и 1,64 раз соответственно. Такая небольшая разница между двумя формами 3A4 находится в пределах экспериментальной погрешности. Поэтому мы можем утверждать, что введение выбранных мутаций 3A4 не влияет на взаимодействие с цитохромом  $b_5$ . Это дает возможность в будущем осуществить детальные биофизические исследования по взаимодействию меченного 3A4monoC-S291C с  $b_5$ .



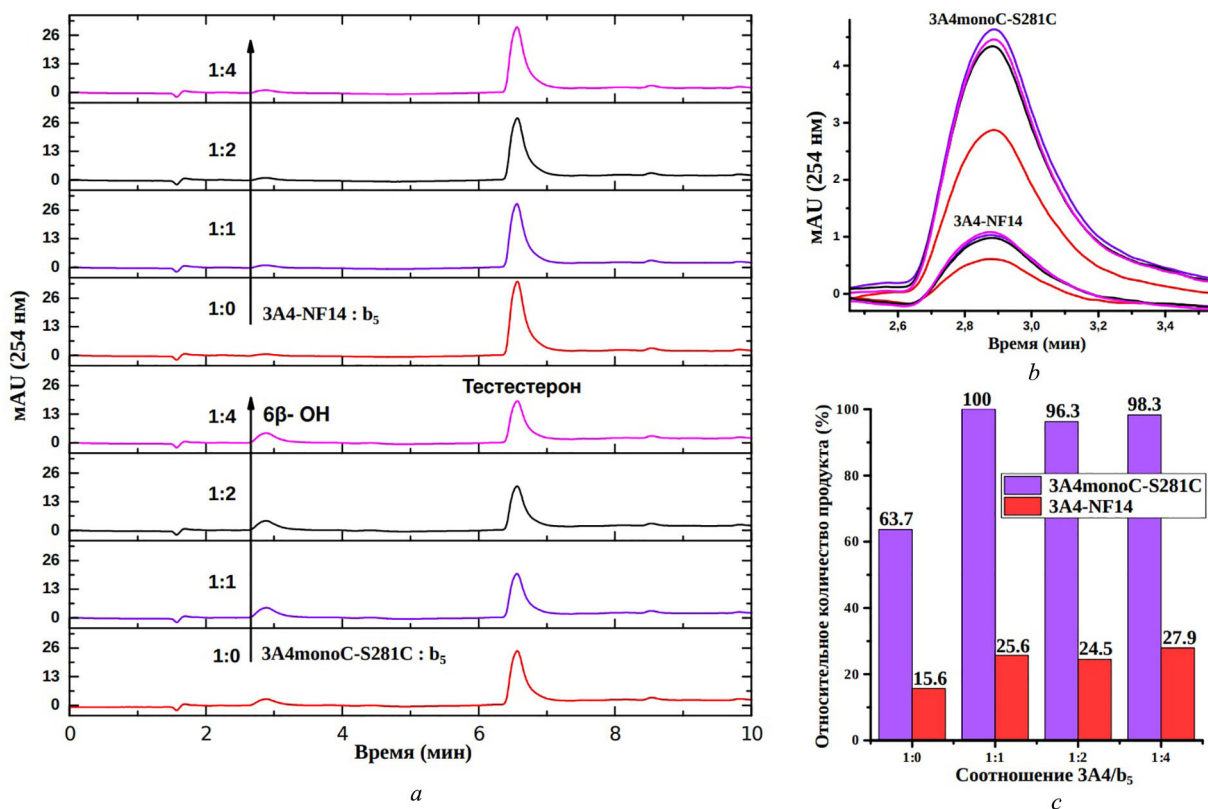


Рис. 3. Сравнительный анализ гидроксилазной активности в *in vitro* реконструированной системе P450 для 3A4-NF14 и 3A4monoC-S291C в зависимости от концентрации  $b_5$ : *a* – ВЭЖХ хроматограммы для реакции с 3A4 (4 верхних) и 3A4monoC-S291C (4 нижних). Увеличение концентрации  $b_5$  в реакции указано стрелкой с соответствующими соотношениями. Время выхода для тестостерона 2,9 и 6,6 мин для  $6\beta$ -ОН; *b* – наложение хроматограмм в области для  $6\beta$ -ОН. Цвета кривых соответствуют обозначениям на полных хроматограммах; *c* – гистограмма зависимости относительного количества образованного  $6\beta$ -ОН от формы 3A4 и количества  $b_5$  в реакции

Fig. 3. Comparative analysis of the hydroxylase activity in the *in vitro* reconstructed system of P450 for 3A4-NF14 and 3A4monoC-S291C depending on the concentration of  $b_5$ : *a* – HPLC of the chromatogram for the reaction with 3A4 (4 upper) and 3A4monoC-S291C (4 lower). The increase in the concentration of  $b_5$  in the reaction is shown by the arrow with the appropriate relations. The testosterone time is 2.9 and 6.6 min for  $6\beta$ -OH; *b* – superposition of chromatograms in the  $6\beta$ -OH region. The colors of the curves correspond to the designations on the complete chromatograms; *c* – histogram of the dependence of a relative amount of formed  $6\beta$ -OH on the 3A4 form and the number of  $b_5$  in the reaction

**Закключение.** В результате с использованием методов белковой инженерии была получена новая рекомбинантная мутантная форма цитохрома P450 3A4 в активном состоянии. Сравнение данной формы с диким типом фермента установлено как увеличение в степени сродства к лигандам активного центра, так и в увеличении степени гидроксилазной активности. Введенные мутации не влияют на взаимодействие 3A4 с цитохромом  $b_5$ , что установлено по результатам измерения тестостерон-гидроксилирующей активности. Анализ спектров КД позволяет утверждать о сохранении основного состава вторичной структуры и общего фолда (свернутости) мутантной формы 3A4. Полученная мутантная форма может быть с уверенностью использована для дальнейших исследований по определению взаимодействия 3A4 с белками партнерами.

**Благодарности.** Работа была выполнена при финансовой поддержке БРФФИ и РФФИ (проекты № X20P-159 и № 20-54-00041Бел\_а).

**Acknowledgments.** The research is financially sponsored by the Belarusian Republican Foundation of Fundamental Research and the Russian Foundation of Basic Research (Projects No. X20P-159 and No. 20-54-00041Бел\_а).

#### Список использованных источников

1. Guengerich, F. P. Human cytochrome P450 enzymes / F. P. Guengerich // Cytochrome P450. – Springer, Cham, 2015. – P. 597–607.
2. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution / J. K. Yano [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, N 37. – P. 38091–38094. <https://doi.org/10.1074/jbc.c400293200>



3. Ekroos, M. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4 / M. Ekroos, T. Sjögren // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – Vol. 103, N 37. – P. 13682–13687. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603236103>
4. Sevrioukova, I. F. Dissecting cytochrome P450 3A4–ligand interactions using ritonavir analogues / I. F. Sevrioukova, T. L. Poulos // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52, N 26. – P. 4474–4481. <https://doi.org/10.1021/bi4005396>
5. Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects / G. Brändén [et al.] // *Drug Discovery Today*. – 2014. – Vol. 19, N 7. – P. 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.012>
6. Sevrioukova, I. F. Anion-dependent stimulation of CYP3A4 monooxygenase / I. F. Sevrioukova, T. L. Poulos // *Biochemistry*. – 2015. – Vol. 54, N 26. – P. 4083–4096. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00510>
7. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners / M. Šrejber [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* – 2018. – Vol. 183. – P. 117–136. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.002>
8. Hackett, J. C. Membrane-embedded substrate recognition by cytochrome P450 3A4 / J. C. Hackett // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293, N 11. – P. 4037–4046. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra117.000961>
9. Site-specific labelling of proteins with a rigid lanthanide-binding tag / X. C. Su [et al.] // *ChemBioChem*. – 2006. – Vol. 7, N 10. – P. 1599–1604. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600142>
10. A Chiral Lanthanide Tag for Stable and Rigid Attachment to Single Cysteine Residues in Proteins for NMR, EPR and Time-Resolved Luminescence Studies / I. D. Herath [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2021. – Vol. 27, N 51. – P. 13009–13023. <https://doi.org/10.1002/chem.202101143>
11. Site-specific fluorescent labeling and oriented immobilization of a triple mutant of CYP3A4 via C64 / A. Ménard [et al.] // *Bioconjugate Chemistry*. – 2012. – Vol. 23, N 4. – P. 826–836. <https://doi.org/10.1021/bc200672s>
12. Polic, V. Allosteric activation of cytochrome P450 3A4 via progesterone bioconjugation / V. Polic, K. Auclair // *Bioconjugate Chemistry*. – 2017. – Vol. 28, N 4. – P. 885–889. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00604>
13. Sevrioukova, I. F. High-level production and properties of the cysteine-depleted cytochrome P450 3A4 / I. F. Sevrioukova // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 56, N 24. – P. 3058–3067. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00334>
14. Mechanism of interactions of  $\alpha$ -naphthoflavone with cytochrome P450 3A4 explored with an engineered enzyme bearing a fluorescent probe / T. N. Tsalkova [et al.] // *Biochemistry*. – 2007. – Vol. 46, N 1. – P. 106–119. <https://doi.org/10.1021/bi061944p>
15. Effect of glutathione on homo- and heterotropic cooperativity in cytochrome P450 3A4 / D. R. Davydov [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2008. – Vol. 471, N 2. – P. 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.001>
16. Peripheral ligand-binding site in cytochrome P450 3A4 located with fluorescence resonance energy transfer (FRET) / D. R. Davydov [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, N 9. – P. 6797–6809. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.325654>
17. A large-scale allosteric transition in cytochrome P450 3A4 revealed by luminescence resonance energy transfer (LRET) / E. V. Sineva [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 12. – Art. e83898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083898>
18. Interactions among cytochromes P450 in microsomal membranes: oligomerization of cytochromes P450 3A4, 3A5, and 2E1 and its functional consequences / D. R. Davydov [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, N 6. – P. 3850–3864. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.615443>
19. Conformational mobility in cytochrome P450 3A4 explored by pressure-perturbation EPR spectroscopy / D. R. Davydov [et al.] // *Biophys. J.* – 2016. – Vol. 110, N 7. – P. 1485–1498. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.02.026>
20. Porath, J. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions / J. Porath, B. Olin // *Biochemistry*. – 1983. – Vol. 22, N 7. – P. 1621–1630. <https://doi.org/10.1021/bi00276a015>
21. Morrison, J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors / J. F. Morrison // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*. – 1969. – Vol. 185, N 2. – P. 269–286. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90420-3](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90420-3)
22. Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme / E. M. J. Gillam [et al.] // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1993. – Vol. 305, N 1. – P. 123–131. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1401>
23. AMBER16 package / D. A. Case [et al.]. – San Francisco, 2016.
24. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM / S. Jo [et al.] // *J. Comp. Chem.* – 2008. – Vol. 29, N 11. – P. 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
25. Frank, D. J. Analysis of heterotropic cooperativity in cytochrome P450 3A4 using  $\alpha$ -naphthoflavone and testosterone / D. J. Frank, I. G. Denisov, S. G. Sligar // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 7. – P. 5540–5545. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.182055>

## References

1. Guengerich F. P. Human cytochrome P450 enzymes. *Cytochrome P450*. Springer, 2015, pp. 597–607.
2. Yano J. K., Wester M. R., Schoch G. A., Griffin K. J., Stout C. D., Johnson E. F. The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, vol. 279, no. 37, pp. 38091–38094. <https://doi.org/10.1074/jbc.c400293200>
3. Ekroos M., Sjögren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, vol. 103, no. 37, pp. 13682–13687. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603236103>

4. Sevrioukova I. F., Poulos T. L. Dissecting cytochrome P450 3A4–ligand interactions using ritonavir analogues. *Biochemistry*, 2013, vol. 52, no. 26, pp. 4474–4481. <https://doi.org/10.1021/bi4005396>
5. Brändén G., Sjögren T., Schnecke V., Xue Y. Structure-based ligand design to overcome CYP inhibition in drug discovery projects. *Drug Discovery Today*, 2014, vol. 19, no. 7, pp. 905–911. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.012>
6. Sevrioukova I. F., Poulos T. L. Anion-dependent stimulation of CYP3A4 monooxygenase. *Biochemistry*, 2015, vol. 54, no. 26, pp. 4083–4096. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00510>
7. Šrejber M., Navrátilová V., Paloncýová M., Bazgier V., Berka K., Anzenbacher P., Otyepka M. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, vol. 183, pp. 117–136. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.03.002>
8. Hackett J. C. Membrane-embedded substrate recognition by cytochrome P450 3A4. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, vol. 293, no. 11, pp. 4037–4046. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra117.000961>
9. Su X. C., Huber T., Dixon N. E., Otting G. Site-specific labelling of proteins with a rigid lanthanide-binding tag. *ChemBioChem*, 2006, vol. 7, no. 10, pp. 1599–1604. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600142>
10. Herath I. D., Breen C., Hewitt S. H., Berki T. R., Kassir A. F., Dodson C., Judd M., Jabar S., Cox N., Otting G., Butler S. J. A Chiral Lanthanide Tag for Stable and Rigid Attachment to Single Cysteine Residues in Proteins for NMR, EPR and Time-Resolved Luminescence Studies. *Chemistry – A European Journal*, 2021, vol. 27, no. 51, pp. 13009–13023. <https://doi.org/10.1002/chem.202101143>
11. Ménard A., Huang Y., Karam P., Cosa G., Auclair K. Site-specific fluorescent labeling and oriented immobilization of a triple mutant of CYP3A4 via C64. *Bioconjugate Chemistry*, 2012, vol. 23, no. 4, pp. 826–836. <https://doi.org/10.1021/bc200672s>
12. Polic V., Auclair K. Allosteric activation of cytochrome P450 3A4 via progesterone bioconjugation. *Bioconjugate Chemistry*, 2017, vol. 28, no. 4, pp. 885–889. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00604>
13. Sevrioukova I. F. High-level production and properties of the cysteine-depleted cytochrome P450 3A4. *Biochemistry*, 2017, vol. 56, no. 24, pp. 3058–3067. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00334>
14. Tsalkova T. N., Davydova N. Y., Halpert J. R., Davydov D. R. Mechanism of interactions of  $\alpha$ -naphthoflavone with cytochrome P450 3A4 explored with an engineered enzyme bearing a fluorescent probe. *Biochemistry*, 2007, vol. 46, no. 1, pp. 106–119. <https://doi.org/10.1021/bi061944p>
15. Davydov D. R., Davydova N. Y., Tsalkova T. N., Halpert J. R. Effect of glutathione on homo- and heterotropic cooperativity in cytochrome P450 3A4. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, vol. 471, no. 2, pp. 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.001>
16. Davydov D. R., Rumfeldt J. A., Sineva E. V., Fernando H., Davydova N. Y., Halpert J. R. Peripheral ligand-binding site in cytochrome P450 3A4 located with fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 9, pp. 6797–6809. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.325654>
17. Sineva E. V., Rumfeldt J. A., Halpert J. R., Davydov D. R. A large-scale allosteric transition in cytochrome P450 3A4 revealed by luminescence resonance energy transfer (LRET). *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 12, art. e83898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083898>
18. Davydov D. R., Davydova N. Y., Sineva E. V., Halpert J. R. Interactions among cytochromes P450 in microsomal membranes: oligomerization of cytochromes P450 3A4, 3A5, and 2E1 and its functional consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, vol. 290, no. 6, pp. 3850–3864. <https://doi.org/10.1074/jbc.m114.615443>
19. Davydov D. R., Yang Z., Davydova N., Halpert J. R., Hubbell W. L. Conformational mobility in cytochrome P450 3A4 explored by pressure-perturbation EPR spectroscopy. *Biophysical Journal*, 2016, vol. 110, no. 7, pp. 1485–1498. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.02.026>
20. Porath J., Olin B. Immobilized metal affinity adsorption and immobilized metal affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, 1983, vol. 22, no. 7, pp. 1621–1630. <https://doi.org/10.1021/bi00276a015>
21. Morrison J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Enzymology*, 1969, vol. 185, no. 2, pp. 269–286. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(69\)90420-3](https://doi.org/10.1016/0005-2744(69)90420-3)
22. Gillam E. M., Baba T., Kim B. R., Ohmori S., Guengerich F. P. Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993, vol. 305, no. 1, pp. 123–131. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1401>
23. Case D. A., Cerutti D., Cheatham T., Darden T., Duke R., Homeyer N. *AMBER16 package*. San Francisco, 2016.
24. Jo S., Kim T., Iyer V. G., Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 2008, vol. 29, no. 11, pp. 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
25. Frank D. J., Denisov I. G., Sligar S. G. Analysis of heterotropic cooperativity in cytochrome P450 3A4 using  $\alpha$ -naphthoflavone and testosterone. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, vol. 286, no. 7, pp. 5540–5545. <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.182055>

**Информация об авторах**

*Бритиков Владимир Владимирович* – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: britikov@iboch.by.

*Бритикова Елена Вячеславовна* – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: britikova@iboch.by.

*Бочаров Эдуард Валерьевич* – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997, Москва, Российская Федерация). E-mail: edvbbon@mail.ru.

*Бершацкий Ярослав Витальевич* – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, 117997, Москва, Российская Федерация). E-mail: bershackujaroslav@gmail.com.

*Кузьмина Наталья Викторовна* – канд. физ.-мат. наук, науч. сотрудник. Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Ленинский пр., 33/2, 119071, Москва, Российская Федерация). E-mail: kuzmina-natsha@inbox.ru.

*Бойко Константин Михайлович* – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина РАН (Ленинский пр., 31/4, 119071, Москва, Российская Федерация). E-mail: boiko\_konstantin@inbi.ras.ru.

*Усанов Сергей Александрович* – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.by.

**Information about the authors**

*Britikov Vladimir V.* – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: britikov@iboch.by.

*Britikova Elena V.* – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: britikova@iboch.by.

*Bocharov Eduard V.* – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS (16/10, Miklukho-Maklai Str., 117997, Moscow, Russian Federation). E-mail: edvbbon@mail.ru.

*Bershatsky Yaroslav V.* – Junior Researcher. Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS (16/10, Miklukho-Maklai Str., 117997, Moscow, Russian Federation). E-mail: edvbbon@mail.ru.

*Kuzmina Natalya V.* – Ph. D. (Physics and Mathematics), Researcher. Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” RAS (33/2, Leninsky Ave., 119071, Moscow, Russian Federation). E-mail: kuzmina-natsha@inbox.ru.

*Boiko Konstantin M.* – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry RAS (31/4, Leninsky Ave., 119071, Moscow, Russian Federation). E-mail: boiko\_konstantin@inbi.ras.ru.

*Usanov Sergey A.* – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by.