

В.М. Шкуматов, В.Г. Радюк, Е.В. Усова,
НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета (Минск, Беларусь),
В.-Х. Шунк, Ш. Мауерсбергер,
Макс Дельбрюк Центр по молекулярной медицине (Берлин-Бух, Германия)

ТРАНСГЕННЫЕ ШТАММЫ МИКРООРГАНИЗМОВ В БИОСИНТЕЗЕ СТЕРОИДОВ

ВВЕДЕНИЕ

В медицине широкое применение находят соединения стероидной природы, к которым относятся стероидные гормоны, гликоалкалоиды, сердечные гликозиды, желчные кислоты, витамины группы D и др. Часть из них в промышленном масштабе получают из дефицитного и дорогостоящего сырья растительного и животного происхождения [1, 2]. Биосинтез стероидных гормонов из холестерина в коре надпочечников млекопитающих включает окислительное расщепление боковой цепи стерина с последующим регио- и стереоселективным гидроксированием при C17, C21 и C11 с участием 4 форм цитохрома P-450. Четко выражен принцип компартментализации при биосинтезе стероидов: цитохромы P-450_{sc} и P-45011 β катализируют соответственно реакции отщепления боковой цепи холестерина и 11 β -гидроксирование стероидов андростенового и прегненового рядов в митохондриях в сочетании с FAD-содержащим флавопротеидом (адренородоксин-редуктазой) и 2Fe-2S-ферредоксином (адренородоксином); цитохромы P-45021 и P-45017 α осуществляют реакции гидроксирования стероидов в эндоплазматическом ретикулеуме совместно с FAD/FMN-редуктазой [3].

Сведения о структурно-функциональных основах функционирования монооксигеназных систем позволяют в настоящее время сформулировать проблему биотехнологического синтеза стероидных гормонов из доступных предшественников с использованием гетерологической экспрессии цитохромов P-450 млекопитающих в соответствующих микроорганизмах [3–5]. Природные микроорганизмы имеют в плане проведения трансформаций стероидов ряд недостатков: наличие побочных реакций, относительно низкую функциональную активность, необходимость использования селективных ингибиторов реакций.

Технология промышленного получения стероидных гормонов и лекарственных средств на их основе в фирмах развитых стран включает в ка-

честве начальной стадии микробиологическую трансформацию одного из природных стерина (холестерина, эргостерина, β -ситостерина) с полной деградацией боковой цепи с получением С-19-стероидов: андростендиона и андростендиендиона, которые с помощью дополнительных химико-ферментативных стадий превращают в исходные соединения для всего спектра стероидных гормонов: минералкортикоидов, глюкокортикоидов и эстрогенов.

Предлагаемая к разработке технология позволит получить путем прямой трансформации трансгенными микроорганизмами С-21-стероиды типа прегненолона или прогестерона, причем в некоторых случаях возможно одностадийное проведение нескольких реакций (например, одновременное отщепление боковой цепи стерина и введение гидроксильных групп), что принципиально изменяет технологию получения конечных стероидных препаратов.

Дрожжи, использующие нормальные алканы, такие, как *Candida maltosa*, *Candida tropicalis* и *Yarrowia lipolytica*, характеризуются очень высокой активностью собственных монооксигеназных систем, гидроксилирующих n-алканы и жирные кислоты, в которых цитохром Р-450 выступает в качестве терминальной оксидазы. (В бывшем СССР на основе утилизации дрожжами парафинов нефти были созданы крупнейшие в мире производства по получению кормового белка на основе дрожжей *C.maltosa*; в качестве примеров можно привести производства белка одноклеточных: Мозырский завод кормовых дрожжей и Новополоцкий завод белково-витаминных концентратов.) Существенными факторами при этом являются субклеточная организация транспорта субстратов и продуктов для гидрофобных соединений и высокое содержание электротранспортных белковых компонентов, таких, как NADPH-Р-450 редуктаза и цитохром b_5 [6]. По сравнению с *S.cerevisiae* (классический объект для генноинженерных манипуляций), алкан-утилизирующие дрожжи могли бы служить хорошим реципиентом для функциональной экспрессии гетерологичных генов Р-450 и создания эффективной биотрансформирующей системы для гидрофобных субстратов. Важным условием при этом является установление уровня базовой активности этих микроорганизмов в отношении стероидов, что необходимо для оценки эффективности гетерологической экспрессии, особенно при низких уровнях синтеза и активности чужеродных белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Трансформация стероидов микросомальными фракциями микроорганизмов

К 1 мл 0,05 М калий-фосфатного буфера (рН 7,0), содержащего 0,03% твина 20, добавляли микросомальную фракцию (содержание цитохрома Р-450 — 0,6–1,0 нмоль) и соответствующий стероидный субстрат до концентрации 100 мкМ. После 5 минут прединкубации реакцию начинали добавле-

нием NADPH (1 мМ) и проводили в течение 30 минут при 25°C на ротационном встряхивателе. После остановки реакции к инкубационной среде добавляли 4 мл этилового эфира уксусной кислоты, встряхивали в течение 30 секунд. После этого раствор центрифугировали 5 минут при 3000 об/мин. Экстракцию проводили дважды. Объединенные этилацетатные фракции упаривали досуха на роторном испарителе, сухой остаток растворяли в 500 мкл этанола. Пробы анализировали на жидкостном хроматографе "Shimadzu" (Япония) на колонке Nucleosil 100, 5 микрон, C₁₈, 125 x 4 мм ("Macherey-Nagel", Германия) в системе ацетонитрил : H₂O / 4 : 6 при длине волны 254 нм и скорости потока элюэнта 1 мл/мин.

Трансформация стероидов при росте культур *Yarrowia lipolytica* B213 и *Saccharomyces cerevisiae* GRF18

Культуры *Y.lipolytica* и *S.cerevisiae* выращивали на среде YNB + 2% глюкоза. В случае *S.cerevisiae* в среду для роста добавляли leu и his, в случае *Y.lipolytica* — leu и ura. Рост культур осуществляли в течение 24 часов на ротационном встряхивателе при 30°C, 240 об/ мин. Затем в инкубационную среду добавляли *n*-алканы C₁₄ (1%), через сутки инкубации в тех же условиях клетки осаждали и переносили в свежую среду, содержащую *n*-алканы C₁₄. На этой стадии в культуры *Y.lipolytica* и *S.cerevisiae* добавляли соответствующие стероиды в концентрации 100 мкМ. Реакции вели далее на термостатируемом встряхивателе при 30°C, 200 об/мин.

Подготовка проб к анализу и анализ описаны выше.

Описание штаммов

Исходный штамм: *Saccharomyces cerevisiae* GRF 18 (α , his 3-11, his 3-15, leu 2-3, leu 2-112, can^R).

Трансформированные штаммы: GRF 18/Yep51 (контрольный штамм); GRF 18/Yep51 17 α (встроенный P-450c17 α под контролем GAL10 промотора).

Культивирование штамма GRF 18/Yep51 17 α

Предкультура. Для 10 мл автоклавированной минимальной среды, содержащей 1,34% YNB, 2% глюкозы, 100 мкг/мл L-гистидина, переносили одну колонию из агарового планшета, инкубировали 15 часов при 30°C на качалке с водяным термостатированием при 200 об/мин. Возможно также выращивание предкультуры в 2,5 мл среды в пробирках на 15 мл. Конечная плотность клеток должна быть в пределах 1–3 x 10⁸ клеток/мл культуры.

Основная культура. В 50 мл автоклавированной минимальной среды, содержащей 1,34% YNB, 2% раффинозы, 200 мкг/мл L-гистидина и 0,001% FeCl₃,

вносили 2 мл предкультуры (до плотности около $5-7 \times 10^6$ клеток/мл культуры) и инкубировали 20 часов при 30°C на качалке с водяным термостатированием при 200 об/мин. Через 8 часов после начала инкубации и по ее окончании добавляли по 100 мкл 5 М NaOH для поддержания pH среды 5,5–6,0.

Индукция и экспрессия цитохрома P-45017 α в основной культуре. В оптимизированных условиях к основной культуре при плотности $3-5 \times 10^7$ клеток/мл добавляли 2,5 мл 40% D-галактозы и дополнительно L-гистидин из расчета 200 мкг/мл, после чего инкубировали 22 часа при 30°C на качалке с водяным термостатированием при 200 об/мин. В процессе культивирования после 8 и 20 часов добавляли по 100 мкл 5 М NaOH для поддержания pH среды 5,5–6,0. Появление пика на 450 нм в карбонильном комплексе восстановленной культуры, разведенной в 10 раз 20 mM К-фосфатным буфером, pH 7,4, фиксируется через 12–15 часов. После окончания инкубации с D-галактозой клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием при 600g в течение 10 минут, ресуспендировали в 20 mM К-фосфатном буфере, содержащем 20% глицерин, 1 mM дитиотреит и 5 mM ЭДТА и хранили при -20°C .

Трансформация прогестерона в процессе индукции и экспрессии P-450c17 α

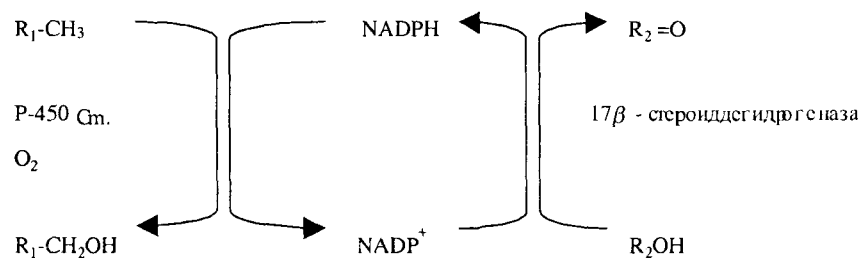
Стероид добавляли к культуре клеток на стадии индукции цитохрома P-450c17 и через 4 часа после индукции до концентрации 100 мкМ. Трансформацию осуществляли в колбах емкостью 50 мл. Прогестерон вносили в виде этанольного раствора. Трансформацию проводили при 28°C на качалке с частотой вращения 200 мин⁻¹. Из реакционной среды через определенные промежутки времени отбирали аликвоты водной фазы, из которых стероиды дважды экстрагировали двойным объемом этилацетата. После удаления этилацетата сухой остаток стероидов растворяли в метаноле. Разделение стероидов проводили методом ВЭЖХ (хроматографы “Миличром 4”, “Waters”) на колонках “Seraon C18” в системе ацетонитрил — вода, 45–55%.

Результаты и обсуждение

Проверка активности в процессе роста микроорганизмов. Ни в одном из экспериментов по соокислению стероидов (прогестерон, дезоксикортикостерон, дезоксикортизол) не было обнаружено реакций гидроксилирования при C21-, C17-, C11- или других атомах углерода молекул стероидов. Незначительное количество продуктов (в сумме меньше 1%) можно отнести к неферментативному превращению субстратов, возможно, в результате окисления по радикальному типу.

При соокислении C21-стероида (прогестерон) или C19-стероида (тестостерон) обнаружено превращение только тестостерона в андростендион,

подчиняющееся кинетической зависимости. Продукт был идентифицирован на основании идентичности времени удержания при добавлении в пробу внутреннего стандарта андростендиона, идентичности при двумерной тонкослойной хроматографии и на идентификации методом хромато-масс-спектрометрии. Установлено, что сумма тестостерона и андростендиона на каждом интервале времени практически равна взятому в опыт тестостерону, что свидетельствует об отсутствии других, не детектируемых ВЭЖХ продуктов. Накопление андростендиона выходит на уровень ~50% через 24–48 часов роста культуры. Это превращение можно связать с функционированием 17β -гидроксистероиддегидрогеназы, зависимой от NADP(NAD), и оно связано с функционированием собственных алкан-утилизирующих монооксигеназных систем *S.maltosa* через соотношение NADPH/NADP⁺ (схема):



где: R₁ — *n*-алкан; R₂OH — тестостерон.

Окисление *n*-алканов цитохромом P-450_{Gm.} сопровождается образованием окисленного NADP⁺, который участвует в окислении тестостерона с помощью 17β -стероиддегидрогеназы. Эксперименты с микросомальной фракцией показывают, что этот фермент является конститутивным.

Аналогичный результат был получен при окислении тестостерона при росте дрожжей *Y.lipolytica*: NADP⁺/NAD⁺-зависимое превращение тестостерона в андростендион устанавливалось на уровне ~40% через 24–48 часов культивирования.

NADPH-зависимая трансформация стероидов микросомами дрожжей. Для проверки наличия потенциальных монооксигеназных активностей микросом дрожжей в отношении C19 и C21-стероидов проведены NADPH-зависимые трансформации (табл. 1).

В случае микросом *S.maltosa* и *Y.lipolytica* и субстратов прогестерона и тестостерона установлено образование тестостерона и андростендиона, а также андростендиона соответственно (табл.1). В этой таблице приведены активности по образующимся продуктам в зависимости от источника микросом. Во всех случаях за 30 минут инкубации образование продуктов достигало не более 1%. Ни в одном из случаев не было обнаружено стероидов, свидетельствующих об образовании гидроксилированных производных, связанных с активностью C21-, C17-, C11- или других монооксигеназ.

Таблица 1

NADPH-зависимые трансформации стероидов микросомами дрожжей

Источник микросом	Субстрат	Продукт	нмоль/мин
C.maltosa VSB из C10 клеток	Прогестерон	Тестостерон+ Андростендион	0,076 + 0,0025
	Тестостерон	Андростендион	0,066
Y.lipolytica H222 из Парекс-клеток	Прогестерон	Тестостерон+ Андростендион	0,34 + 0, 01
	Тестостерон	Андростендион	0,1
S.cerevisiae GRF18	Прогестерон	Не обнаружено	
	Тестостерон	Не обнаружено	

В отличие от соокисления растущими культурами, на микросомальном уровне обнаружена трансформация прогестерона в тестостерон и андростендион. Первый процесс — образования тестостерона — может быть обусловлен расщеплением связи C20–C17 с участием интермедиата типа FeIII–ООН или гидроксигированием при C21- и C17- с образованием короткоживущего интермедиата типа диола стероида с последующим отщеплением боковой цепи, как это описано для P-45017 α из млекопитающих. Второй процесс — образование андростендиона — обусловлен функционированием NADP/NAD-17 β -гидроксистероиддегидрогеназы. Если предположить, что первый процесс связан с монооксигеназной активностью, то расчет показывает, что активность находится в диапазоне 0,01–0,3 нмоль продукта на 1 нмоль суммарного цитохрома P-450 (включая концентрацию алкан-утилизирующий цитохрома P-450) в минуту. Эти значения примерно на 2 порядка уступают аналогичным параметрам, полученным для нативного P-45017 α млекопитающих [7, 8].

Необходимо также отметить, что при использовании других стероидных субстратов (дезоксикортикостерон, дезоксикортизол) для потенциального гидроксигирования в C17- или C21-положения не было обнаружено ни в одном из случаев соответствующих продуктов.

Таким образом, как эксперименты с растущими культурами, так и эксперименты с микросомальными фракциями показали отсутствие существенного уровня собственных монооксигеназных активностей тестируемых микроорганизмов, связанных с C21-, C17- или C11-гидроксигированиями. Эти эксперименты создают хорошую предпосылку для переноса генов стероидогенных цитохромов P-450 млекопитающих в используемые микроорганизмы.

Трансформация стероидов рекомбинантными цитохромами P-45017 α в *S.cerevisiae* и *Y.lipolytica*. кДНК для цитохрома P-45017 α заимствована из плазмиды pCMV17 α , любезно предоставленной профессором M. Waterman (Уни-

верситет Вандербиля, Нэшвилл, США). Применены векторы для гетерологичной экспрессии цитохрома P-45017 α (CYP17) из микросом коры надпочечников быка в дрожжах *Yarrowia lipolytica* под контролем ICL1-промотора (1) и в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* под контролем GAL10-промотора (2):

- (1) Автономно реплицирующийся низкокопийный вектор для *Yarrowia lipolytica*: плазмида pIC17 α базируется на автономно реплицирующемся низкокопийном векторе pINA273 (ARS18/CEN, LEU2) и содержит экспрессионный набор для кДНК цитохрома P-450 под контролем ICL1-промотора и ICL1-терминатора: (ICLp/ICLi/CYP17/ICLt).
- (2) Автономно реплицирующийся высококопийный вектор (50-100) для *Saccharomyces cerevisiae*: кДНК для P-45017 α (плазмида pCMV17 α) была клонирована в челночный вектор *E.coli* — дрожжи (Yер51, LEU2, 2 μ ARS). Созданный высококопийный вектор Yер5117 α позволяет экспрессию P-45017 α под контролем GAL10-промотора в дрожжах *S.cerevisiae*.

Обозначения: ARS — последовательность, обеспечивающая автономную репликацию в дрожжах; ICL — изоцитратлиаза; Yер51 — “челночный” вектор дрожжи — *E.coli*; GAL10p — промотор UDP-глюкозо-4-эпимеразы.

Ген изоцитратлиазы I регулируется в зависимости от источников углерода: индукция этанолом, ацетатом, жирными кислотами или n-алканами, репрессия — через глюкозу.

Описанные выше исследования по потенциальным побочным реакциям организмов-реципиентов *Y.lipolytica* и *S.cerevisiae* в отношении выбранных стероидов (прогестерон, дезоксикортикостерон, дезоксикортизол, тестостерон) показали отсутствие монооксигеназных активностей. В процессе соокисления отмечена необычная реакция 17 β -дегидрирования, не связанная с системами цитохрома P-450.

Векторы pIC17 α и Yер5117 α вели к функциональной экспрессии кДНК P-45017 α , что подтверждается специфической активностью P-45017 α : трансформация прогестерона главным образом в 17 α -прогестерон с числом оборотов 19–124 мин⁻¹ для интактных клеток и 7–9 мин⁻¹ для мембран эндоплазматического ретикула (данные ВЭЖХ и ТСХ-радиохроматографии).

Уровень экспрессии P-45017 α с низкокопийным вектором pIC17 α в *Y.lipolytica* был ниже, чем для высококопийного вектора Yер5117 α в *S.cerevisiae*, где содержание P-45017 α в 60 пикомоль/10⁸ клеток фиксировалось уже из разностных карбоновых спектров. Для *Y.lipolytica*, культивируемой на этаноле, с помощью Вестерн-блоттинга фиксируется около 3–6 пикомоль/10⁸ клеток. Удельная активность сопоставима на уровне экспрессируемых ферментов (микросомальные фракции) и существенно выше (в 5–6 раз) на уровне интактных клеток для экспрессии цитохрома P-45017 α в *Y.lipolytica*.

Таким образом, представлены доказательства функциональной экспрессии цитохрома P-45017 α млекопитающих в дрожжах.

Таблица 2

Сравнение систем “реципиент-вектор” для функциональной экспрессии цитохрома Р-45017α в дрожжах Yarrowia lipolytica и Saccharomyces cerevisiae

Реципиент/вектор (число копий)	Источник углерода	Содержание в микросомах пикомоль/мг белка	Активность интактных клеток ²⁾ пмоль/мин	Активность микросом ²⁾ пмоль/мин
Y.lipolytica/ pIC17α (1–3)	Этанол	14 (COD) 10–20 (WB)	74	8,1
	Гексадекан	(50) ¹⁾ (COD) 10–20 (WB)	124	9,8
S. cerevisiae/ Ycp5117α (50–100)	Галактоза	370–400	19	7,1

Реципиентные штаммы: Yarrowia lipolytica B204-12A-213 (leu2 ura3), Saccharomyces cerevisiae GRF18 (leu2 his3).

Плазмиды: pIC17α (низкокопийная, ICL1 промотор), Ycp5117 α (высококопийная, GAL10 промотор)

¹⁾ COD-определение по разностным СО-спектрам; WB — Вестерн-блоттинг.

²⁾ Определение активности по ТСХ-радиоавтографии с ³Н-меченым прогестероном

В качестве критериев были привлечены:

- 1) данные разностных карбонильных спектров для контроля (GRF18/Ycp51) и опыта (GRF 18/Ycp51 17α) — содержание Р-45017α составляет 370–400 пикомоль/мг белка микросом;
- 2) данные разностных прогестерон-индуцированных спектров на интактных трансформированных клетках — время поступления субстрата в клетку составляет менее 3 минут;
- 3) данные анализа продуктов реакции ³Н-меченого прогестерона методом тонкослойной хроматографии;
- 4) данные ВЭЖХ анализа продуктов реакции в кинетике экспрессии цитохрома Р-45017α в отличие от контрольных штаммов;
- 5) хромато-масс-спектрометрическое доказательство аутентичности основного продукта реакции 17α-прогестерону.

Литература

1. Физер Л., Физер М. Стероиды. М., 1964. 962 с.
2. Ахрем А.А., Титов Ю.А. Стероиды и микроорганизмы. М., 1970. 526 с.
3. Shkumatov V.M., Usanov S.A., Chashchin V.L., Akhrem A.A. //Pharmazie. 1985. Vol. 10. P. 757.
4. Shkumatov V.M. //2nd International Symposium on Cytochrome P-450 of Microorganisms and Plants. Tokyo, 1993. L-28. P. 28.
5. Usanov S.A., Chashchin V.L., Akhrem A.A. Frontiers in Biotransformation. London, 1990. Vol. 3. P. 1.
6. Müller H.-G., Schunck W.-H., Riege P., Honeck H. in: Cytochrome p-450 (Ed. K. Ruckpaul and H. Rein) 1984. Berlin, 1984. S. 337.
7. Ruckpaul K., Rein H. Frontiers in Biotransformation. London, 1990. Vol. 3. P. 523.
8. Zuber M.X., John M.E., Okamura T., Simpson E.R., Waterman M.R.// J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. P. 2475.