

ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА *CYP102A1-LG23* И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОХРОМА P450 BM3-LG23 В АКТИНОБАКТЕРИЯХ *Mycolicibacterium smegmatis*

© 2023 В.Ю. Пошихонцева^{1*}, Н.И. Стрижов¹, М.В. Карпов¹, В.М. Николаева¹,
А.В. Казанцев², О.И. Сазонова¹, А.А. Шутов¹, М.В. Донова¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: rikahameleon@mail.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.05.2023

После доработки 15.06.2023

Принята к публикации 16.06.2023

Цитохром CYP102A1 (P450 BM3) из *Priestia megaterium* (bas. *Bacillus megaterium*) имеет ряд уникальных функциональных особенностей, которые делают его идеальным объектом для направленной эволюции и других синтетических приложений. Ранее был получен мутант CYP102A1-LG23 с 14 мутациями в гем-связывающей части белка, осуществляющий 7β-гидроксилирование стероидных субстратов ряда андростанов с образованием продуктов, обладающих противовоспалительной и нейротекторной активностью. В настоящем исследовании синтетический ген *cyp102A1-LG23*, кодирующий мутантный вариант P450 BM3, экспрессирован в клетках *Mycolicibacterium smegmatis* в составе моно- и бицистронных оперонов совместно с синтетическими генами *gdh* или *zwf2*, кодирующими глюкозодегидрогеназу (ГДГ) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД) соответственно. Показана функциональная активность рекомбинантных ферментов *in vivo* на примере гидроксилирования андрост-4-ен-3,17-диона (АД) до 7β-гидрокси-АД (7β-ОН-АД) в растущих культурах миколицибактерий. Биокаталитическая активность увеличена вдвое за счет повышения растворимости белка CYP102A1-LG23 в клетке и организации дополнительной системы регенерации кофакторов путем введения ГДГ и Г6ФД. Максимальный выход 7β-ОН-АД, составляющий 37,68% мольн., был достигнут коэкспрессией в *M. smegmatis* генов *cyp102A1-LG23* и *gdh*. Результаты свидетельствуют о перспективности использования синтетических генов для получения рекомбинантных ферментов, расширяют представления о гидроксилировании стероидных соединений бактериальными цитохромами и могут быть востребованы для разработки методов микробиологического получения 7β-гидроксистероидов с помощью генетически модифицированных миколицибактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром CYP102A1 (P450 BM3), гетерологическая экспрессия, гидроксилирование, 7β-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион, *Mycolicibacterium smegmatis*, биоконверсия, стероиды.

DOI: 10.31857/S0320972523090142, EDN: WUZTVO

ВВЕДЕНИЕ

Обширный спектр биологической активности стероидных соединений обеспечивает их широкое применение в клинической практике. Стероиды активно используются в терапии воспалительных процессов, эндокринологических и нейродегенеративных нарушений,

ряда онкологических заболеваний и других областях медицины [1].

Биологическая активность стероидных соединений зависит от степени окисления циклоалканового ядра и присутствия в молекулах стероидов функциональных кислородсодержащих групп. Широко известно, что гидроксилированные стероиды проявляют более высокую

Принятые сокращения: АД — андрост-4-ен-3,17-дион; 7β-ОН-АД — 7β-гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион; ГДГ — глюкозодегидрогеназа; Г6ФД — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

* Адресат для корреспонденции.

активность в сравнении с их негидроксилированными аналогами. Наличие гидроксильных групп в циклоалкановом ядре стероидов обеспечивает повышение полярности молекул, их растворимости, влияет на их токсичность и сорбционные свойства. Регио- и стереоположение гидроксильных групп важно для связывания с соответствующими клеточными рецепторами, запускающими каскады метаболических реакций в организме [2–5].

Химический синтез специфических гидроксистероидов зачастую многостадийен и сложен (если вообще возможен), и решением проблемы является гидроксилирование неактивных С–Н-связей с применением микроорганизмов или ферментов [1, 6]. Перспективным подходом является создание и применение рекомбинантных ферментов, обладающих регио- и стереоспецифической активностью в отношении стероидных соединений [7, 8].

Исключительно важная роль в реакции оксифункционализации неактивных углеродных атомов принадлежит цитохром-Р450-монооксигеназам (P450/CYP), что определяет глубокий интерес к ним для генной и белковой инженерии. Цитохром P450 BM3 (CYP102A1) из *Priestia megaterium* (bas. *Bacillus megaterium*) имеет ряд уникальных функциональных особенностей, которые делают его идеальным объектом для направленной эволюции и других синтетических приложений. В отличие от большинства цитохромов P450, BM3 является водорастворимым белком. Другой его важной отличительной особенностью является бифункциональность, которой соответствует двухкомпонентная структура белка, где монооксигеназный домен P450 природно слит с его редуктазным доменом в одной белковой молекуле. В настоящее время P450 BM3 является самым быстрым катализатором из известных P450 с числом оборотов до 17 000 в минуту (при использовании в качестве субстрата арахидоновой кислоты) [9], что на порядки выше, чем у большинства P450 млекопитающих [10]. Основной причиной такой чрезвычайно высокой каталитической скорости, предположи-

тельно, является слияние окислительно-восстановительных партнеров в одной белковой молекуле, обеспечивающее быстрый перенос электронов от флавина к гему [11].

Природный P450 BM3 не участвует в метаболизме стероидов [12]. Методом направленной эволюции получены мутантные варианты белка, в том числе мутант P450 BM3-LG23 с 14 мутациями в гем-связывающей части белка, осуществляющий гидроксилирование стероидных субстратов ряда андростанов [13].

Актинобактерии рода *Mycolicibacterium* способны к утилизации стероидов (холестерина, фитостерина), что обуславливает их широкое применение для получения терапевтических стероидов и их предшественников [14, 15]. Непатогенный быстрорастущий штамм *Mycolicibacterium smegmatis* mc² 155 (syn. *Mycobacterium smegmatis*) является удобным хозяйским организмом для гетерологической экспрессии генов стероидогенеза, поскольку обладает эффективной системой транспорта экзогенных стероидных соединений и отличается высокой частотой трансформации [16]. С целью предотвращения полной деструкции циклоалканового ядра стероидов ранее нами были введены делеции в гены *kshB* (кодирует 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназу) и *kstD* (кодирует редуктазную субъединицу 3-кетостероид-9 α -гидроксилазы), и получен мутантный штамм *M. smegmatis* BD, осуществляющий окисление фитостерина и холестерина до андрост-4-ен-3,17-диона (АД) [15].

В настоящем исследовании на основе *M. smegmatis* BD были созданы рекомбинантные штаммы, гетерологически экспрессирующие P450 BM3-LG23 и осуществляющие гидроксилирование АД в положении C7 β – одну из наиболее трудноосуществимых и востребованных реакций оксифункционализации стероидов (рис. 1).

Наряду с 7 β -гидроксилированием полученные штаммы осуществляли введение гидроксильных групп в положение C1 β . Образование 1 β -гидрокси- и 1 β ,7 β -дигидроксистероидов с помощью мутантных вариантов P450 BM3 ранее не описывалось.

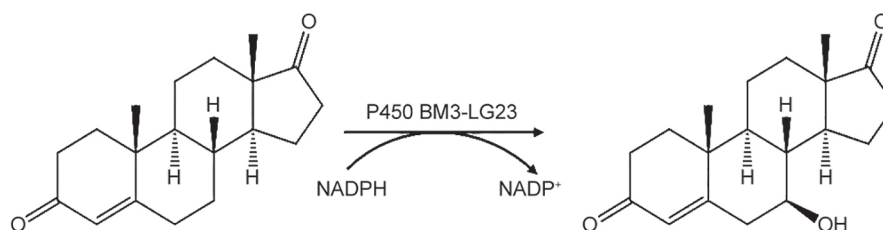


Рис. 1. C7 β -гидроксилирование АД мутантным P450 BM3-LG23

Разработанная методология может быть использована также при создании других микробных катализаторов на основе *CYP102A1-LG23*, а также открывает перспективы одностадийного получения гидроксилированных андростанов из фитостерина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: андрост-4-ен-3,17-дион («Steraloids», США); ацетамид («Sigma-Aldrich», США); агароза («Invitrogen», Великобритания); метил- β -циклодекстрин (МЦД; «Wacker Chemie», Германия); бромистый этидий («Serva», Германия); канамицин («БиоХим», Россия); гиромидин, ампициллин, глицерин, дрожжевой экстракт, пептон, агар-агар («Panreac», Испания); триптон («Диа-М», Россия); Tween-80 («Serva», Германия); ДНК-модифицирующие ферменты и наборы для экстракции ДНК («Thermo Fisher», США); силикагель («Fluka», США). Остальные реактивы были отечественного производства (Россия) квалификации х. ч. или ч. д. а.

Бактериальные штаммы, плазмиды и условия выращивания. Праймеры, бактериальные штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Штамм *Escherichia coli* DH5 α использовали для клонирования плазмидных конструкций. Бактерии культивировали при 37 °С и 200 об./мин в среде LB [19]. Для селекции плазмид вносили канамицин (50 мкг/мл), гиромидин (50 мкг/мл) или ампициллин (100 мкг/мл). Для приготовления плотных сред добавляли агар до 20 г/литр.

Культуру *M. smegmatis* BD выращивали при 37 °С и 200 об./мин в среде M3 [15]. Для создания селективных условий в среду добавляли гиромидин (50–75 мкг/мл). Плотные среды получали добавлением 20 г/литр агара.

Синтетические последовательности и сайт-направленный мутагенез. Нуклеотидная последовательность гена *cyp102A1* дикого типа была взята из баз данных KEGG (BG04_163; *Bacillus megaterium* NBRC 15308) и GenBank (ACCESSION J04832, VERSION J04832.1), белковая последовательность фрагмента гема *CYP102A1-LG23* — из базы данных RCSB PDB (PDB code 6LY4). Исходная нуклеотидная последовательность гена *gdh* взята из базы данных GenBank (ACCESSION AY930464, VERSION AY930464.1; *Bacillus megaterium* AS1.223).

Синтетические последовательности мутантного гена *cyp102A1-LG23* [13] и *gdh* были оп-

тимизированы для эффективной экспрессии в клетках гетерологического хозяина *M. smegmatis*, согласно алгоритму OptimumGene™. Оптимизированные последовательности указанных генов были синтезированы «GenScript» (США) и клонированы в векторе pBluescript II SK(+) с получением плазмид pSKLG23 и pSKGDH соответственно (табл. 1). Источником оптимизированной синтетической последовательности гена *zwf2*, кодирующего глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФД) 2-го типа из *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, служила плазида pNS25 [18].

Вектор pMyNTA был сконструирован на основе челночного экспрессионного вектора pMyNT [17] путем введения сайта NdeI в расположении стартового кодона ATG с помощью сайт-направленного мутагенеза в соответствии с протоколом QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis System (QCM) («Stratagene», США). Плазмиду pMyNT амплифицировали с использованием олигонуклеотидных праймеров NdeIF и NdeIR (табл. 1). Полученную смесь обрабатывали рестриктазой DpnI и клонировали в клетках *E. coli* DH5 α .

Моноцистронные плазмидные конструкции для экспрессии гена *cyp102A1-LG23* в микобактериях. Клонирование ДНК проводили согласно стандартному протоколу [20]. В качестве основы был выбран экспрессионный челночный вектор pMyNT (рис. 2, а), а также производный от него вектор pMyNTA (рис. 2, б).

Плазмиду pSKLG23 гидролизировали с помощью эндонуклеаз рестрикции NcoI и BamHI. ДНК-фрагмент гена *cyp102A1-LG23* лигировали с линеаризованным по тем же сайтам рестрикции вектором pMyNT с образованием рекомбинантной плазмиды pNS38 (табл. 1, рис. 2, в), где целевой ген был слит с N-концевой нуклеотидной последовательностью, кодирующей 6-гистидиновую метку (6 $\times$ His-tag).

Плазмиду pNS38 последовательно расщепляли рестриктазой NcoI, обрабатывали фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и гидролизировали рестриктазой BamHI. Вектор pMyNTA последовательно обрабатывали рестриктазой NdeI, фрагментом Кленова и рестриктазой BamHI. ДНК-фрагмент гена *cyp102A1-LG23* клонировали в линеаризованном векторе pMyNTA с образованием рекомбинантной плазмиды pVP1 (табл. 1, рис. 2, г).

Бицистронные плазмидные конструкции для коэкспрессии генов *cyp102A1-LG23/gdh* и *cyp102A1-LG23/zwf2* в микобактериях. Плазмиду pSKGDH расщепляли эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII, ДНК-фрагмент гена *gdh* лигировали с линеаризо-

Таблица 1. Праймеры, штаммы и плазмиды, использованные в работе

Название	Описание	Источник
Штаммы		
<i>Escherichia coli</i> DH 5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>deoR</i> , <i>nupG</i> , <i>purB20</i> , <i>φ80dlacZΔM15</i> , <i>Δ(lacZYA-argF)U169</i> , <i>hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i> , λ ⁻	Invitrogen
<i>Mycobacterium smegmatis</i> BD	mc ² 155 <i>Δ(kshB, kstD)</i> , продуцирующий АД-мутант	[15]
Плазмиды		
pMyNT	реплицирующийся в <i>E. coli</i> и микобактериях экспрессионный челночный вектор, содержит Ami-промотор, N-концевой 6×His-tag, сайт расщепления TEV, Hyg ^R	[17]
pMyNTA	дериват вектора pMyNT, содержащий сайт рестрикции NdeI	данная работа
pNS25	плаزمид, содержащая синтетические оптимизированные гены глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы 2-го типа из <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv (<i>zwf2</i>) и 17β-гидроксистероиддегидрогеназы из <i>Cohliobolus lunatus</i>	[18]
pSKLG23	вектор pBluescript II SK(+), содержащий синтетический оптимизированный мутантный вариант (LG23) гена <i>cyp102A1</i> из <i>Bacillus megaterium</i> NBRC 15308 (<i>cyp102A1-LG23</i>)	GenScript/ данная работа
pSKGDH	вектор pBluescript II SK(+), содержащий синтетический оптимизированный ген глюкодегидрогеназы из <i>B. megaterium</i> AS1.223 (<i>gdh</i>)	GenScript/ данная работа
pNS38	вектор pMyNT, содержащий ген <i>cyp102A1-LG23</i>	данная работа
pVP1	вектор pMyNTA, содержащий ген <i>cyp102A1-LG23</i>	данная работа
pVP2	вектор pMyNTA, содержащий бицистронный оперон генов <i>cyp102A1-LG23</i> и <i>gdh</i>	данная работа
pVP3	вектор pMyNTA, содержащий бицистронный оперон генов <i>cyp102A1-LG23</i> и <i>zwf2</i>	данная работа
Праймеры (5'→3')		
NdeIIF	cgataagagaaaggagtgccaCATATGaagcaccaccaccaccacc	данная работа
NdeIIR	gggtggtggtggtggtgcttCATATGtggtgactcccttctctatcg	данная работа
ClaIzwf2F	tagacATCGATaggaggtaaaggcgatgaaccggcccgccgcgcgc	данная работа
ClaIzwf2R	gccatATCGATtcattggccgcccattcccgccg	данная работа

Примечание. Прописными буквами в последовательностях праймеров выделены сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции (NdeI – CATATG, ClaI – ATCGAT). Полу жирным шрифтом выделена последовательность RBS (**aggagg** – сайт связывания рибосомы).

ванной по тем же сайтам рестрикции плазмидой pVP1 с образованием плазмиды pVP2 (табл. 1, рис. 2, д).

ДНК-фрагмент, кодирующий ген *zwf2*, был ПЦР-амплифицирован с использованием праймеров ClaIzwf2F и ClaIzwf2R (табл. 1) на матрице плазмиды pNS25 [18]. Амплифицированный ДНК-фрагмент гена *zwf2* обра-

батывали рестриктазой ClaI, инкубировали с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Плазмиду pVP1 последовательно обрабатывали рестриктазой BamHI и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Последовательность гена *zwf2* лигировали с линейаризованной pVP1 с получением плазмиды pVP3 (табл. 1, рис 2, е).

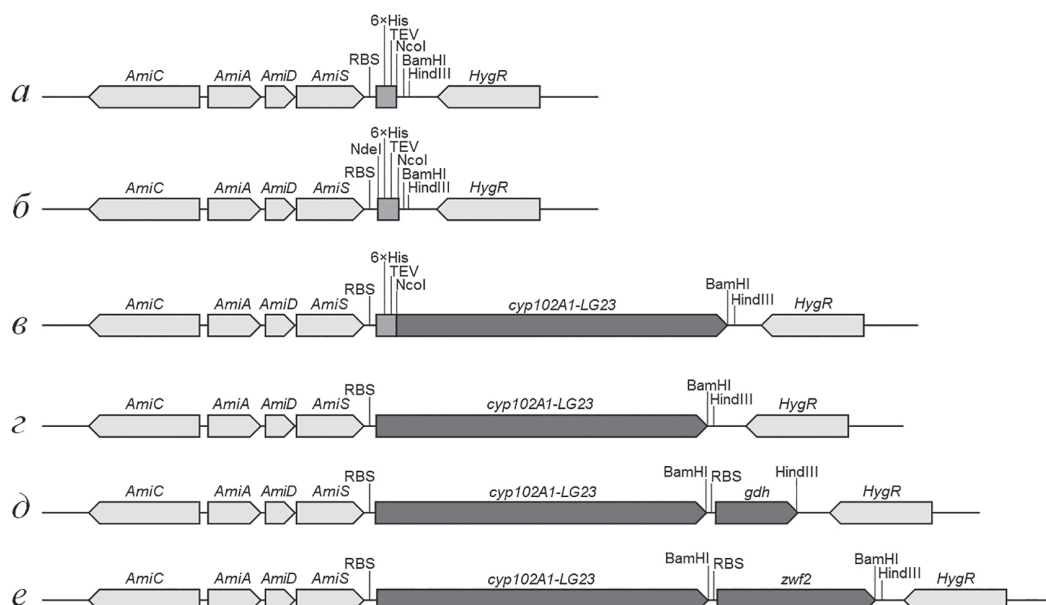


Рис. 2. Генетические элементы для моно- и бицистронных конструкций. *а* – Карта плазмидного экспрессионного вектора rMyNT. *б* – Карта плазмидного экспрессионного вектора rMyNTA. *в* – Плазмида pNS38, содержащая одиночный ген *cyp102A1-LG23*. *г* – Плазмида pVP1, содержащая одиночный ген *cyp102A1-LG23*. *д* – Плазмида pVP2, несущая бицистронную экспрессионную кассету генов *cyp102A1-LG23* и *gdh*. *е* – Плазмида pVP3, несущая бицистронную экспрессионную кассету генов *cyp102A1-LG23* и *zwf2*. *AmiC*, *AmiA*, *AmiD*, *AmiS* – компоненты ацетидазного промотора; 6×His – 6-гистициновая метка; *HygR* – маркер устойчивости к гиромидину; RBS – сайт связывания рибосомы

Экспрессия генов в рекомбинантных штаммах микобактерий. Электрокомпетентные клетки мутантного штамма *M. smegmatis* BD трансформировали методом электропорации [21] плазмидной ДНК вектора rMyNT, генетическими конструкциями pNS38 и pVP1–pVP3 и высевали на плотную питательную среду М3 с гиромидином (75 мкг/мл). Посевные культуры *M. smegmatis* BD, трансформированные сконструированными плазмидами, получали в 5 мл жидкой среды М3 в присутствии гиромидина (50 мкг/мл) при 37 °C и 200 об./мин в течение 12–15 ч. Инокулянты переносили в колбы объемом 750 мл, содержащие по 50 мл вышеуказанной среды, и выращивали до поглощения ОП₆₀₀ 0,8–1,0 на шейкере-инкубаторе при 37 °C и 200 об./мин. Экспрессию гетерологичных генов инициировали добавлением в среду раствора ацетамида (АсА) до конечной концентрации 2 г/литр. Культивирование индуцированных культур продолжали при 25 °C и 200 об./мин в течение 48 ч, центрифугировали при 5020 g и 4 °C в течение 15 мин и ресуспендировали в 20 мл буфера (50 mM K₂HPO₄, 50 mM NaCl, pH 7,4). Клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Q500 («Qsonica», США), согласно протоколу производителя. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 27 300 g и 4 °C в течение 2,5 ч. Белки анализировали методом электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле (SDS-ПААГ) [22].

Биоконверсия АД рекомбинантными микобактериями. Получение посевных культур и индукцию осуществляли, как описано выше. Одновременно с ацетамидом вносили субстрат АД в виде водной суспензии с МЦД (1/1,5 моль/моль) до конечной концентрации 200 мг/литр. Культивировали при 25 °C и 200 об./мин в течение 4 суток. В момент внесения индуктора и ежедневно в ферментационную среду добавляли раствор глюкозы (до 10 г/литр). Пробы культуральной жидкости (0,5 мл) отбирали каждые 24 ч. Анализ стероидов осуществляли методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Определение биомассы. Рост культур оценивали по увеличению ОП₆₀₀ на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer Basic («Eppendorf», Германия). Штаммы культивировали в жидкой питательной среде М3 (среда для трансформантов дополнительно содержала 50 мкг/мл гиромидина) при 37 °C и 200 об./мин в течение 48 ч.

Тонкослойная хроматография (ТСХ). Стероиды экстрагировали двукратным объемом этилацетата, экстракты наносили на хроматографические пластинки ALUGRAM SIL G/UV254 («Macherey-Nagel», Германия) и разделяли в системе бензол/ацетон = 2/1 (v/v). Стероиды детектировали в УФ-свете при 254 нм на хемископе CN-15.LC UV Darkroom («Vilber Lourmat», Франция).

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Аликвоты культуральной жидкости разводили равным объемом ацетонитрила, выдерживали в течение 12 ч и центрифугировали 8 мин при 12 100 g. Надосадочную жидкость использовали для анализа на хроматографе Agilent Infinity 1260 («Agilent Technologies», США) с колонкой Symmetry RP-18 (5 мкм, 4,6 × 250 мм) и с предколонкой Symmetry RP-18 (5 мкм, 3,9 × 20 мм; «Waters», США). Состав мобильных фаз: А — ацетонитрил/ТГФ (тетрагидрофуран)/вода = 10/10/80 (v/v); Б — ацетонитрил 100%; скорость потока — 1 мл/мин; градиентное элюирование (1 ступень: элюент А 100%; 2 ступень: элюент А (40%)/элюент Б (60%); температура термостатирования колонки — 50 °С. Стероиды детектировали при 254 нм.

Выделение гидроксилированных производных АД и определение структуры гидроксипроизводных андростендиона. Культуральную жидкость после 48 ч инкубирования (~ 200 мл) центрифугировали при 4 °С и 27 300 g в течение 1 ч. Полученный супернатант трижды экстрагировали этилацетатом (по 70 мл). Объединенный этилацетатный экстракт упаривали при пониженном давлении. Стероиды разделяли колоночной хроматографией на силикагеле (Silica gel 90, 0,2–0,5 мм), продукты гидроксилирования АД выделяли ступенчатой элюцией с использованием смеси растворителей гексан/этилацетат/этанол:

- 1 ступень: гексан 70% + этилацетат 30%;
- 2 ступень: гексан 50% + этилацетат 50%;
- 3 ступень: гексан 30% + этилацетат 70%;
- 4 ступень: этилацетат 100%;
- 5 ступень: этилацетат 70% + этанол 30%;
- 6 ступень: этилацетат 50% + этанол 50%;
- 7 ступень: этилацетат 30% + этанол 70%;
- 8 ступень: этанол 100%.

Полученные фракции упаривали досуха, растворяли в 500 мкл этилацетата и проводили дополнительную очистку с помощью ТСХ на пластинках ALUGRAM SIL G/UV254. Хроматографию проводили в системе бензол/ацетон = 3/1 (v/v). Стероидные соединения детектировали в УФ-свете на хемископе CN-15.LC UV Darkroom при 254 нм.

Структуру стероидов подтверждали ¹H-ЯМР-спектроскопией. Спектры регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 («Bruker», Германия) при частотах 400 и 100,6 МГц соответственно. Химические сдвиги измеряли относительно тетраметилсилана (¹H-ЯМР).

Статистическая обработка данных. Экспериментальные данные получены в трех неза-

висимых биологических повторах. Результаты представлены в виде среднего значения, погрешности — в виде стандартного отклонения по выборке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве платформы для создания рекомбинантных продуцентов был использован мутантный штамм *M. smegmatis* BD (табл. 1) [15]. Сконструирован набор плазмид, позволяющий осуществлять экспрессию синтетического гена *sup102A1-LG23* как одиночно, так и в составе бицистронных оперонов совместно с генами *gdh* или *zwf2* (табл. 1). Искусственные опероны в вышеуказанных плаزمиде находились под контролем индуцибельного ацетамидного (Ami) промотора.

Созданные рекомбинантные штаммы не различались по культурально-морфологическим свойствам при росте на плотной среде М3. В жидкой среде скорость роста трансформантов по сравнению с родительским штаммом *M. smegmatis* BD была несколько ниже (рис. 3).

Экспрессия CYP102A1-LG23 в клетках микобактерий, несущих плазмиду pNS38, отличалась наиболее высоким уровнем (рис. 4, а; дорожка 2). Фракционирование клеточного гомогената показало, что почти весь белок локализован в «тельцах включения» (рис. 4, б; дорожка 2д). Удаление полигистидиновой метки с N-конца мутантного цитохрома позволило перевести до 40–50% белка в растворимую форму (рис. 4, б; дорожки 3д и 3с).

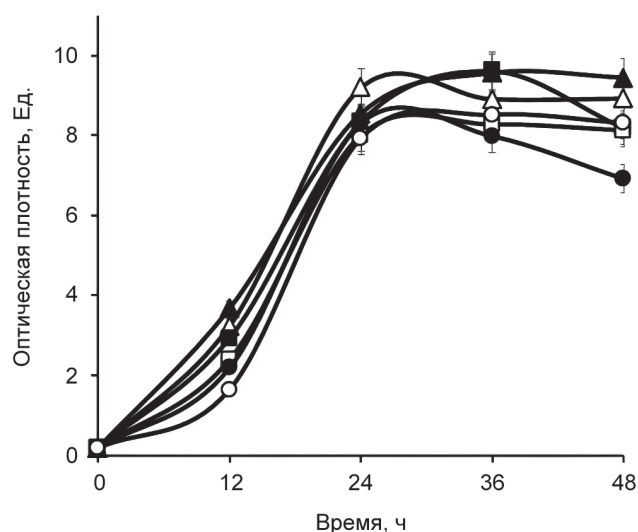


Рис. 3. Динамика роста штамма *M. smegmatis* BD и рекомбинантов на его основе: (—Δ—) — родительский штамм, (—▲—) — pMyNT, (—■—) — pNS38, (—□—) — pVP1, (—●—) — pVP2, (—○—) — pVP3

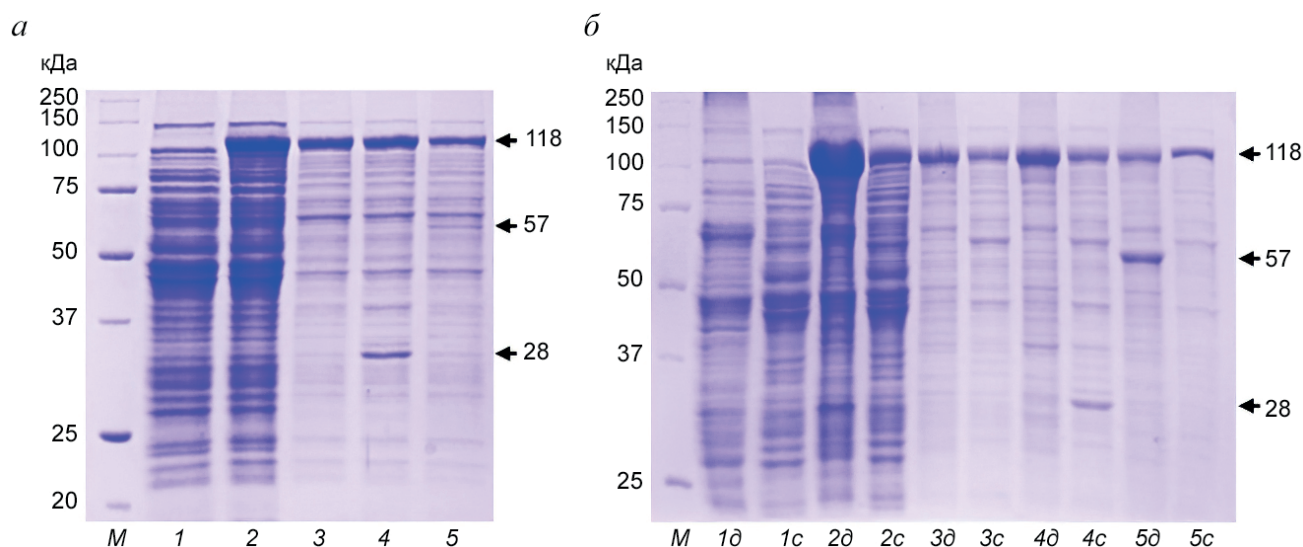


Рис. 4. Анализ экспрессии гетерологичных генов (а) и растворимости целевых белков (б) в АсА-индуцированных культурах рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* BD методом электрофореза в SDS-ПААГ. М – Маркер молекулярных масс («Bio-Rad», США), с – супернатант, д – клеточный дебрис. Плазмиды: 1 – рMyNT (контроль), 2 – рNS38, 3 – рVP1, 4 – рVP2, 5 – рVP3. Стрелками указаны белки: CYP102A1-LG23 (118 кДа), ГДГ (28 кДа), Г6ФД (57 кДа)

Показано наличие глюкодегидрогеназы (ГДГ) в растворимой фракции бактериальной клетки (рис. 4, б; дорожка 4с), тогда как глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа была представлена в мембранной фракции (рис. 4, б; дорожка 5д). В условиях индукции ацетамидом синтезирующиеся целевые белки соответствовали ожидаемым значениям молекулярной массы: CYP102A1-LG23 – 118 кДа; Г6ФД – 57 кДа; ГДГ – 28 кДа. Во всех рекомбинантных штаммах, несущих бицистронные конструкции, продукция второго белка (ГДГ или Г6ФД) была значительно ниже, чем первого (рис. 4, а; дорожки 4 и 5).

В реакции *in vivo* для штамма с плазмидой рNS38 наблюдали низкий уровень образования 7β-ОН-АД, составивший 15,56% мольн. (рис. 5), свидетельствующий о том, что нерастворимая форма белка является малоактивной. Подавление экспрессии гена *cyp102A1-LG23* за счет снижения количества индуктора не привело к значимому положительному результату (данные не приведены). Повышение растворимости Р450 BM3-LG23 за счет удаления гистициновой метки (плазмида рVP1) ожидаемо увеличило эффективность биоконверсии вдвое, составив 32,75% мольн. (рис. 5).

Однако и в этом случае полной биоконверсии АД в 7β-ОН-АД не наблюдалось. С целью дальнейшего повышения эффективности биоконверсии оценивали возможность увеличения активности CYP102A1-LG23 за счет обеспечения необходимого уровня восстановленных кофакторов путем коэкспрессии генов *gdh* (плазмида рVP2) или *zwf2* (плазмида рVP3).

Во всех случаях 7β-ОН-АД накапливался в качестве основного метаболита, содержание 7α-ОН-АД не превышало 1,5% мольн. 7β-Гидроксилирование АД рекомбинантными штаммами с бицистронными конструкциями рVP2 и рVP3 происходило на 9–15% эффективнее (37,68 и 35,63% мольн. соответственно), чем вариантом с моноцистронной конструкцией рVP1 (рис. 5). Максимальный выход 7β-ОН-АД достигался за 48 ч, далее отмечали снижение концентрации целевого продукта (рис. 5) на фоне продолжающейся убыли АД.

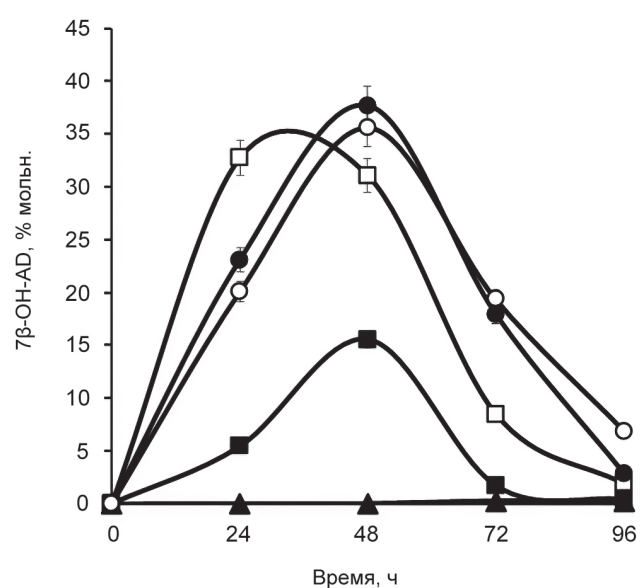


Рис. 5. Накопление 7β-ОН-АД в культурах рекомбинантных штаммов *M. smegmatis* BD: (—▲—) – рMyNT, (—■—) – рNS38, (—□—) – рVP1, (—●—) – рVP2, (—○—) – рVP3

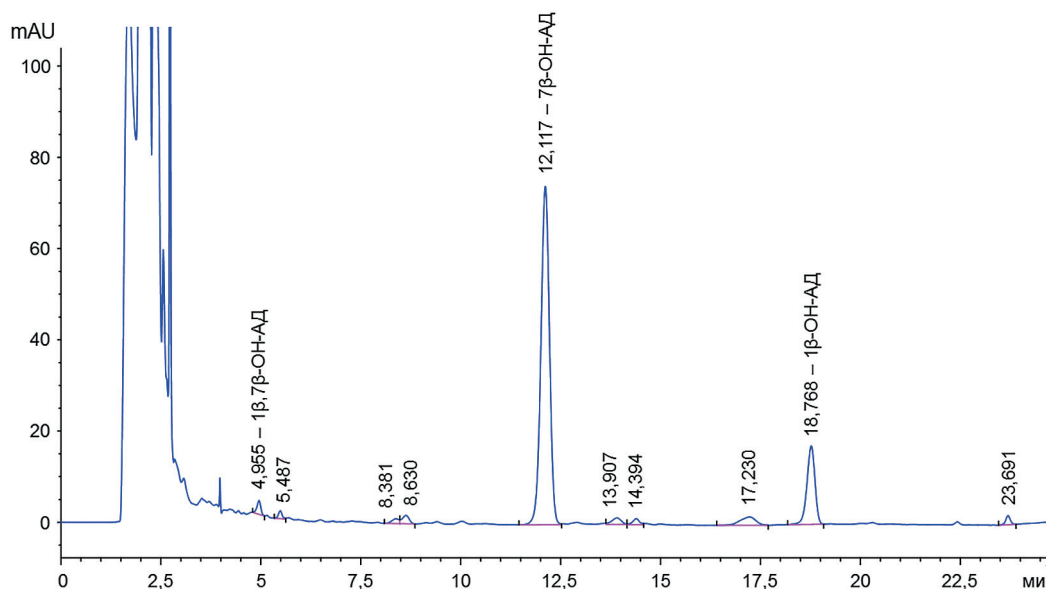


Рис. 6. ВЭЖХ-профиль разделения продуктов гидроксилирования АД рекомбинантными штаммами *M. smegmatis* BD

Таблица 2. Характеристика продуктов биоконверсии АД рекомбинантными штаммами *M. smegmatis* BD

Продукт	Химическая формула	RT, мин (ВЭЖХ)	¹ H-ЯМР (CDCl ₃ , δ, м.д.)
7β-Гидрокси-андрост-4-ен-3,17-дион (7β-ОН-АД)		12,19 ± 0,13	5,78 (s, 1H, H-4) 3,60 (dt, <i>J</i> = 10,3, 5,2 Hz, 1H, H-7α) 1,24 (s, 3H, H-19) 0,95 (s, 3H, H-18)
1β-Гидрокси-андрост-4-ен-3,17-дион (1β-ОН-АД)		18,15 ± 0,88	5,82 (d, <i>J</i> = 1,1 Hz, 1H, H-4) 4,06 (dd, <i>J</i> = 8,2, 7,6 Hz, 1H, H-1α) 1,27 (s, 3H, H-19) 0,93 (s, 3H, H-18)
1β,7β-Дигидрокси-андрост-4-ен-3,17-дион (1β,7β-диОН-АД)		4,97 ± 0,02	5,83 (br. s, 1H, H-4) 4,03 (dd, <i>J</i> = 9,2, 6,2 Hz, 1H, H-1α) 3,63–3,55 (m, 1H, H-7α) 1,30 (s, 3H, H-19) 0,95 (s, 3H, H-18)

Следует отметить, что совместно с С7β-гидроксилированием (рис. 1) рекомбинантные штаммы осуществляли введение ОН-группы в положение С1β (рис. 6; табл. 2). Образование 1β-ОН- и 1β,7β-диОН-стероидов с участием мутантных вариантов Р450 ВМ3 ранее не было описано.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Введение кислородсодержащих функциональных групп в циклоалкановое ядро остается одной из наиболее важных и сложных задач в синтезе терапевтических стероидов. Новые возможности в этой области связаны с созда-

нием и применением рекомбинантных бактериальных цитохромов P450, отличающихся от большинства эукариотических цитохромов растворимостью и высокой активностью [5]. Наиболее перспективным направлением представляется применение бациллярного цитохрома P450 BM3 с уникальными биокаталитическими возможностями [9, 11]. Выдающимся достижением является создание его мутантного варианта — CYP102A1 BM3-LG23, отличающегося способностью к гидроксированию стероидов при C7 β [13]. В данной работе нуклеотидная последовательность гена, кодирующего этот мутант, была оптимизирована для экспрессии в миколицибактериях. На основе полученного синтетического гена были созданы плазмидные конструкции, позволяющие гетерологически экспрессировать *sup102A1-LG23* в составе моно- и бицистронных оперонов совместно с генами *gdh* или *zwf2*, кодирующими глюкозодегидрогеназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу соответственно в клетках *M. smegmatis* BD.

Выбор в качестве хозяйского организма штамма *M. smegmatis* BD обусловлен, с одной стороны, наличием у миколицибактерий систем эффективного транспорта стероидов [15], с другой стороны, открывающимися в перспективе возможностями одностадийного получения 7 β -гидроксиандростанов из фитостеринов [23]. Ранее этот штамм был успешно апробирован для экспрессии генов бациллярных цитохромов CYP106A1 и CYP106A2. Рекомбинантный штамм, экспрессирующий ген *sup106A2*, селективно гидроксировал АД при C15 β [15].

В реакции *in vivo* наблюдали суперэкспрессию *sup102A1-LG23*, приводившую к образованию белка в преимущественно нерастворимой форме и, как следствие, низкой эффективности C7 β -гидроксирования. Предположительно, причиной этого является присутствие полигистидиновой метки на N-конце полипептидной последовательности, оказывающее негативное влияние на растворимость, структуру и/или сворачивание P450 BM-LG23. Известно, что His-метка способна влиять на функционирование и стабильность белков. В последнее время увеличивается число сообщений, свидетельствующих об отрицательном влиянии His-метки на структуру, олигомерное состояние, кинетические свойства или каталитическую активность белков [24]. Удаление гистидиновой метки на N-конце белковой последовательности CYP102A1-LG23 позволило перевести до 50% фермента в функциональную растворимую форму при этом без значитель-

ных потерь в его количестве, что, в свою очередь, приводило к двукратному увеличению выхода 7 β -ОН-АД.

Эффективным подходом к повышению производительности процессов получения ценных метаболитов является кофакторная инженерия. Так, за счет сверхэкспрессии NADPH-регенерирующей глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы удалось увеличить производство ϵ -капролактона в *E. coli* [25], также баланс между NADP⁺ и NADPH был ключевым фактором в регуляции процесса превращения фитостерина в 7 β -гидроксиандрост-4-ен-3,17-дион (7 β -ОН-АД) в *Mycobacterium neoaurum* [23]. Для поддержания пула восстановленного NADPH в *M. smegmatis* BD совместно с CYP102A1-LG23 были экспрессированы ГДГ или Г6ФД. В качестве косубстрата для регенерации NADPH в ферментационную среду добавляли глюкозу [23, 26]. Введение дополнительных ферментов рециркуляции кофакторов позволило увеличить активность рекомбинантной системы на 15%. Во всех случаях 7 β -ОН-АД накапливался в качестве основного метаболита, 7 α -ОН-АД обнаруживался в следовых количествах, что согласуется с известными литературными данными [13, 23]. Интересным фактом является обнаружение среди метаболитов 1 β -ОН-АД и 1 β ,7 β -диОН-АД, ранее не детектируемых в качестве возможных продуктов реакции гидроксирования АД мутантными вариантами P450 BM3. Микробиологическое 1 β -гидроксирование является крайне редкой реакцией [27], которая, несомненно, представляет особый интерес для дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые реализована гетерологическая экспрессия гена уникального мутантного цитохрома CYP102A1-LG23 в клетках *M. smegmatis* BD для осуществления синтеза 7 β -ОН-АД из АД. Ферментативная активность рекомбинантных миколицибактерий была увеличена за счет повышения количества активной формы фермента и конструирования системы регенерации кофакторов, ставших ключевыми факторами, ограничивающими превращение АД в 7 β -ОН-АД в *M. smegmatis*. Максимальный выход целевого продукта достигнут в культуре клеток *M. smegmatis* BD (pVP2), коэкспрессирующих гены *sup102A1-LG23* и *gdh*. Полученные результаты вносят вклад в понимание каталитических особенностей рекомбинантных цитохромов P450

и могут служить отправной точкой для разработки биотехнологий производства ценных С7 β -гидроксистероидов из фитостеринов.

Вклад авторов. В.Ю. Пошехонцева — планирование и проведение экспериментов, обсуждение результатов исследования и написание текста; Н.И. Стрижов — концепция работы и дизайн генетических конструкций; М.В. Карпов — планирование экспериментов, обсуждение результатов исследования и написание текста; В.М. Николаева — выделение и очистка стероидов; А.В. Казанцев — ЯМР-анализ;

О.И. Сазонова — проведение экспериментов; А.А. Шутов — ВЭЖХ-анализ; М.В. Донова — руководство работой и редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-64-00024).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Donova, M. V. (2017) Steroid Bioconversions, *Methods Mol. Biol.*, **1645**, 1-13, doi: 10.1007/978-1-4939-7183-1_1.
- Wojtal, K., Trojnar, M. K., and Czuczwar, S. J. (2006) Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids, *Pharmacol. Rep.*, **58**, 335-340.
- Fegan, K. S., Rae, M. T., Critchley, H. O. D., and Hillier, S. G. (2008) Anti-inflammatory steroid signalling in the human peritoneum, *J. Endocrinol.*, **196**, 369-376, doi: 10.1677/joe-07-0419.
- Ali Shah, S. A., Sultan, S., and Adnan, H. S. (2013) A whole-cell biocatalysis application of steroidal drugs, *Orient. J. Chem.*, **29**, 389-403, doi: 10.13005/ojc/290201.
- Szaleniec, M., Wojtkiewicz, A. M., Borowski, T., Bernhardt, R., and Donova, M. (2018) Bacterial steroid hydroxylases: enzyme classes, their functions and comparison of their catalytic mechanisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 8153-8171, doi: 10.1007/s00253-018-9239-3.
- Julsing, M. K., Cornelissen, S., Bühler, B., and Schmid, A. (2008) Heme-iron oxygenases: powerful industrial biocatalysts? *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 177-186, doi: 10.1016/j.cbpa.2008.01.029.
- Bureik, M., and Bernhardt, R. (2007) in *Modern Biooxidation. Enzymes, Reactions and Applications* (Schmid, R. D., and Urlacher, V. B., eds) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 155-176.
- Fernández-Cabezón, L., Galán, B., and García, J. L. (2018) New insights on steroid biotechnology, *Front. Microbiol.*, **9**, 958, doi: 10.3389/fmicb.2018.00958.
- Munro, A. W., Leys, D. G., McLean, K. J., Marshall, K. R., Ost, T. W. B., Daff, S., Miles, C. S., Chapman, S. K., Lysek, D. A., Moser, C. C., Page, C. C., and Dutton, P. L. (2002) P450 BM3: the very model of a modern flavocytochrome, *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 250-257, doi: 10.1016/s0968-0004(02)02086-8.
- Guengerich, F. P. (1991) Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes, *J. Biol. Chem.*, **266**, 10019-10022, doi: 10.1016/S0021-9258(18)99177-5.
- Munro, A. W., Daff, S., Coggins, J. R., Lindsay, J. G., and Chapman, S. K. (1996) Probing electron transfer in flavocytochrome P-450 BM3 and its component domains, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 403-409, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0403u.x.
- Finnigan, J. D., Young, C., Cook, D. J., Charnock, S. J., and Black, G. W. (2020) Cytochromes P450 (P450s): A review of the class system with a focus on prokaryotic P450s, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, **122**, 289-320, doi: 10.1016/bs.apcsb.2020.06.005.
- Li, A., Acevedo-Rocha, C. G., D'Amore, L., Chen, J., Peng, Y., Garcia-Borràs, M., Gao, C., Zhu, J., Rickerby, H., Osuna, S., Zhou, J., and Reetz, M. T. (2020) Regio- and stereoselective steroid hydroxylation at C7 by cytochrome P450 monooxygenase mutants, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 12499-12505, doi: 10.1002/ange.202003139.
- Tang, R., Ren, X., Xia, M., Shen, Y., Tu, L., Luo, J., Zhang, Q., Wang, Y., Ji, P., and Wang, M. (2021) Efficient one-step biocatalytic multienzyme cascade strategy for direct conversion of phytosterol to C-17-hydroxylated steroids, *Appl. Environ. Microbiol.*, **87**, e0032121, doi: 10.1128/AEM.00321-21.
- Karpov, M. V., Nikolaeva, V. M., Fokina, V. V., Shutov, A. A., Kazantsev, A. V., Strizhov, N. I., and Donova, M. V. (2022) Creation and functional analysis of *Mycobacterium smegmatis* recombinant strains carrying the bacillary cytochromes CYP106A1 and CYP106A2 genes, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **58**, 947-957, doi: 10.1134/S0003683822090058.
- Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, W. R. Jr. (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*, *Mol. Microbiol.*, **4**, 1911-1919, doi: 10.1111/j.1365-2958.1990.tb02040.x.

17. Poulsen, C., Holton, S., Geerlof, A., Wilmanns, M., and Song, Y.-H. (2010) Stoichiometric protein complex formation and over expression using the prokaryotic native operon structure, *FEBS Lett.*, **584**, 669-674, doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.057.
18. Strizhov, N., Karpov, M., Sukhodolskaya, G., Nikolaeva, V., Fokina, V., Shutov, A. A., and Donova, M. V. (2016) Development of mycobacterial strains producing testosterone, *Proc. Nat. Acad. Sci. Belarus, Chem. Series*, **3**, 57-58.
19. Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **62**, 293-300, doi: 10.1128/jb.62.3.293-300.1951.
20. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
21. Daugelat, S., Kowall, J., Mattow, J., Bumann, D., Winter, R., Hurwitz, R., and Kaufmann, S. H. E. (2003) The RD1 proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: expression in *Mycobacterium smegmatis* and biochemical characterization, *Microbes Infect.*, **5**, 1082-1095, doi: 10.1016/s1286-4579(03)00205-3.
22. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
23. Zhao, Y.-Q., Liu, Y.-J., Ji, W.-T., Liu, K., Gao, B., Tao, X.-Y., Zhao, M., Wang, F.-Q., and Wei, D.-Z. (2022) One-pot biosynthesis of 7 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from phytosterols by cofactor regeneration system in engineered *Mycobacterium neoaurum*, *Microb. Cell Fact.*, **21**, 59, doi: 10.1186/s12934-022-01786-5.
24. Booth, W. T., Schlachter, C. R., Pote, S., Ussin, N., Mank, N. J., Klapper, V., Offermann, L. R., Tang, C., Hurlburt, B. K., and Chruszcz, M. (2018) Impact of an N-terminal polyhistidine tag on protein thermal stability, *ACS Omega*, **3**, 760-768, doi: 10.1021/acsomega.7b01598.
25. Lee, W.-H., Park, J.-B., Park, K., Kim, M.-D., and Seo, J.-H. (2007) Enhanced production of ϵ -caprolactone by overexpression of NADPH-regenerating glucose 6-phosphate dehydrogenase in recombinant *Escherichia coli* harboring cyclohexanone monooxygenase gene, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **76**, 329-338, doi: 10.1007/s00253-007-1016-7.
26. Wu, Y., Li, H., Zhang, X. M., Gong, J. S., Li, H., Rao, Z. M., Shi, J. S., and Xu, Z. H. (2015) Improvement of NADPH-dependent P450-mediated biotransformation of 7 α , 15 α -diOH-DHEA from DHEA by a dual cosubstrate-coupled system, *Steroids*, **101**, 15-20, doi: 10.1016/j.steroids.2015.05.005.
27. Dodson, R. M., Kraychy, S., Nicholson, R. T., and Mizuba, S. (1962) Microbiological transformations. IX. The 1 β -hydroxylation of androstenedione, *J. Org. Chem.*, **27**, 3159-3164, doi: 10.1021/jo01056a043.

EXPRESSION OF THE SYNTHETIC CYP102A1-LG23 GENE AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF RECOMBINANT P450 BM3-LG23 CYTOCHROME IN ACTINOBACTERIA *Mycobacterium smegmatis*

V. Y. Poshekhontseva^{1*}, N. I. Strizhov¹, M. V. Karpov¹, V. M. Nikolaeva¹, A. V. Kazantsev², O. I. Sazonova¹, A. A. Shutov¹, and M. V. Donova¹

¹ G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences; Federal Research Center "Pushchino Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: rikahameleon@mail.ru

² Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Cytochrome CYP102A1 (P450 BM3) from *Priestia megaterium* (bas. *Bacillus megaterium*) has a number of specific features making it an ideal target for directed evolution and other synthetic applications. Previously, the CYP102A1-LG23 mutant with 14 mutations in the heme was obtained providing 7 β -hydroxylation of steroid substrates of the androstane series with the formation of products possessing anti-inflammatory and neuroprotective activity. In this study, the synthetic *cyp102A1-LG23* gene encoding the P450 BM3 mutant variant was expressed in *Mycobacterium smegmatis* cells as part of mono- and bicistronic operons together with the synthetic *gdh* or *zwf2* genes encoding glucose dehydrogenase (GDH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), respectively. The functional activity of the recombinant enzymes was shown *in vivo* by the example of hydroxylation of androst-4-ene-3,17-dione (AD) to 7 β -OH-AD in growing cultures of mycobacteria. Biocatalytic activity was doubled by increasing the CYP102A1-LG23 protein solubility in the cell and organizing the cofactor regeneration additional system by introducing GDH and G6PD. The maximum level of 7 β -OH-AD amounting 37,68 mol % was achieved by co-expression the *cyp102A1-LG23* and *gdh* genes in *M. smegmatis*. The results evidence to the perspective of using synthetic genes to obtain recombinant enzymes, expand the understanding of the hydroxylation of steroid compounds by bacterial cytochromes and can be demand for the methods of microbiological production of 7 β -hydroxylated steroids by genetically modified mycobacteria.

Keywords: cytochrome CYP102A1 (P450 BM3), heterologous expression, hydroxylation, 7 β -hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione, *Mycobacterium smegmatis*, bioconversion, steroids