

Биоконверсия холестерина в прогестерон рекомбинантными штаммами *Mycobacterium smegmatis* mc²155 с делециями в генах окисления стероидного ядра

Карпов М.В., Стрижов Н.И., Шутов А.А., Донова М.В.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН;
г. Пушкино; mikemikekarp@mail.ru

Прогестерон – эндогенный стероидный гормон млекопитающих, способствующий возникновению и протеканию беременности. Он является ключевым предшественником стероидных гормонов (прогестагенов, минерало- и глюкокортикоидов, андрогенов и эстрогенов), а также выполняет роль нейростероида. У позвоночных животных прогестерон синтезируется из прегненолона в результате реакции, катализируемой 3 β -гидроксистероиддегидрогеназой. В свою очередь, процесс биосинтеза прегненолона из холестерина происходит под действием трёхкомпонентной холестерингидроксилазной/C20-C22-лиазной ферментной системы (ХГС) с цитохромом P450_{ssc} в качестве терминальной оксидазы. Принципиально новые решения в области стероидной биотехнологии основаны на создании генно-инженерных микроорганизмов для получения фармацевтически важных стероидных субстанций. Ранее была показана возможность гетерологической экспрессии генов компонентов ХГС быка в клетках непатогенного быстрорастущего штамма *Mycobacterium smegmatis* mc²155, который имеет собственную систему превращения стероидов и обладает промышленным потенциалом в качестве продуцента стероидных соединений. Полученный рекомбинантный микобактериальный штамм осуществлял направленную трансформацию холестерина в прогестерон [1]. При этом в процессе роста наблюдалась деструкция как субстрата биоконверсии, так и накопленного продукта, что связано с активностью собственных ферментов стероидного катаболизма хозяйского штамма.

Целью работы явилось создание рекомбинантных штаммов *Mycobacterium smegmatis* mc²155, несущих делеционные мутации в генах ферментов окисления стероидного ядра и гетерологически ко-экспрессирующих гены компонентов холестерингидроксилазной/C20-C22-лиазной ферментной системы бычьей коры надпочечников.

Проблема, связанная с сохранением 3 β -гидрокси-5-ен структуры холестерина, была частично решена с использованием мутантного штамма *M. smegmatis* mc²155 Δ hsdD, несущего делецию в гене MSMEG_5228, кодирующего 3 β -гидроксистероиддегидрогеназу. Известно, что данный фермент имеет преимущественную роль в окислении холестерина до холестенона, который не является субстратом для бычьего цитохрома P450_{ssc}. Используя гомологическую рекомбинацию как метод для получения безмаркерных мутантов, были введены делеции в гены *M. smegmatis* Δ hsdD, кодирующие ключевые ферменты катаболизма стероидов: 3-кетостероид-9 α -гидроксилазы, KshAB (ген MSMEG_6039_kshB) и 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназы, KstD (ген MSMEG_5941_kstD). Результаты мутагенеза подтверждены ПЦР скринингом. Полученные мутанты ожидаемо накапливали соответствующие стероидные продукты из стероидов (Δ hsdD Δ kshB – андростадиендион, Δ hsdD Δ kstD – 9 α -ОН-андростендион, Δ hsdD Δ kshB Δ kstD – андростендион), а внесённые делеции не оказывали достоверного влияния на их ростовые характеристики.

В компетентные клетки *M. smegmatis* Δ hsdD Δ kshB, *M. smegmatis* Δ hsdD Δ kstD и *M. smegmatis* Δ hsdD Δ kshB Δ kstD были перенесены плазмидные генетические конструкции pNS11, позволяющие ко-экспрессировать гены компонентов ХГС: цитохрома P450_{ssc}, аденодоксина (Adx) и аденодоксинредуктазы (AdR).

В качестве субстрата биоконверсии использовали холестерин с нагрузкой 3 г/л, который вносили в виде растворимого комплекса с солюбилизатором метил- β -

циклодекстрином через 36 часов индукции синтеза гетерологичных белков. Процесс получения прогестерона с использованием полученных штаммов включал два последовательных этапа. На первом этапе рекомбинантная ХГС катализировала отщепление боковой цепи холестерина с образованием ключевого интермедиата – прегненолона. На втором этапе происходило его окисление до прогестерона под действием собственных микобактериальных ферментов. Установлено, что в процессе биоконверсии холестерина штаммом *M. smegmatis* Δ hsdD Δ kshB (pNS11) наблюдается окисление накопленного прогестерона с образованием его 1(2)-дегидрированного аналога, что связано с активностью микобактериальной 3-кетостероид-1(2)-дегидрогеназы KstD. Напротив, с использованием *M. smegmatis* Δ hsdD Δ kstD (pNS11) и *M. smegmatis* Δ hsdD Δ kshB Δ kstD (pNS11), несущих делецию данного гена, достоверной деструкции продукта обнаружено не было. Максимальный выход прогестерона 281 мг/л при биоконверсии 3 г/л холестерина (11,5% моль/моль) был достигнут при использовании культуры рекомбинантного штамма *M. smegmatis* Δ hsdD Δ kshB Δ kstD (pNS11).

Результаты исследований могут быть использованы при создании одностадийного микробиологического способа получения терапевтических C21-стероидов из холестерина.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (проект РНФ 18-14-00361).

Литература

1. Strizhov N., Fokina V., Sukhodolskaya G., Dovbnya D., Karpov M., Shutov A., Novikova L., Donova M.. Progesterone biosynthesis by combined action of adrenal steroidogenic and mycobacterial enzymes in fast growing mycobacteria // *New Biotechnology*. 2014. V. 31. P. 67.