

УДК 579.255+579.258: 579.222.4

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА P450-МОНООКСИГЕНАЗЫ ГРИБА *CURVULARIA* SP. В БАКТЕРИЯХ *ESCHERICHIA COLI* И ПОДТВЕРЖДЕНИЕ ФУНКЦИИ 7-ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ

© 2024 г. В. В. Коллеров^а, *, С. В. Тарлачков^а, А. А. Шутов^а, М. В. Донова^а

^аИнститут биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ “Пушкинский научный центр биологических исследований РАН”, Пушкино, 142290, Московская обл., Россия

*e-mail: svkollerov@rambler.ru

Поступила в редакцию 13.10.2023 г.

После исправления 28.10.2023 г.

Принята к опубликованию 01.11.2023 г.

Разнообразие и уникальность грибных цитохромов P450 (CYP), способных катализировать регио- и стереоспецифическое гидрокселирование стероидов, делает их важным объектом в области микробиологического синтеза ценных гидроксистероидов. В ходе настоящей работы изучена функция рекомбинантной грибной P450 монооксигеназы (CYP1) штамма *Curvularia* sp. ВКМ F-3040 — перспективного биокатализатора реакции 7-гидрокселирования стероидов андростанового ряда. Осуществлена ОТ-ПЦР амплификация кДНК последовательностей кандидатного гена CYP1 и гена его природного редокс партнера (POR), их клонирование и гетерологическая экспрессия в клетках *Escherichia coli* BL 21 DE(3). В экспериментах *in vitro* показана способность полученной рекомбинантной монооксигеназы катализировать гидрокселирование дегидроэпиандростерона в положениях 7 α и 7 β . Полученные результаты расширяют знания о грибных стероидных гидроксилазах и открывают перспективы синтеза ценных 7-гидроксистероидов с использованием рекомбинантных продуцентов.

Ключевые слова: *Curvularia* sp., гидрокселирование, ДГЭА, цитохром P450, гетерологическая экспрессия, *E. coli* BL 21 DE(3)

DOI: 10.31857/S0026365624020168

Известно, что представители низших эукариот, мицелиальные грибы, могут являться источником специфических P450 монооксигеназ (CYP), способных катализировать введение гидроксильных групп по различным положениям стероидных субстратов, что делает их важным объектом в области микробиологического синтеза ценных гидроксистероидов (Nassiri-Koopaei, Faramarzi, 2015; Kristan, Rižner 2012; Durairaj et al., 2016; Girvan, Munro 2016).

Ранее нами был выявлен перспективный грибной штамм *Curvularia* sp. ВКМ F-3040, обладающий крайне редкой для микромицетов способностью катализировать реакцию 7 β -гидрокселирования, сопряженную с введением гидроксильной группы в положение СН-7 α и возможностью синтеза ценных 7-гидроксипроизводных (Коллеров и соавт., 2020). Изучение ферментативной гидроксилазной активности данного штамма и последующий транскриптомный анализ позволили выявить кандидатный ген P450 (CYP1), экспрессия которого значительно увеличивалась в ответ на индукцию клеток мицелия стероидным субстратом (Коллеров и соавт., 2022; Kollerov et al., 2023).

Целью настоящей работы являлось клонирование и гетерологическая экспрессия кандидатного гена CYP1 штамма *Curvularia* sp. в клетках *E. coli* BL 21 DE(3) с подтверждением функциональной активности рекомбинантного фермента.

Штамм мицелиального гриба *Curvularia* sp. ВКМ F-3040 был получен из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН). Грибную культуру поддерживали на сусло-агаре. Для получения мицелия первой и второй генерации использовали условия, описанные ранее (Kollerov et al., 2022).

Штаммы *E. coli* DH5 α и *E. coli* BL 21 DE(3) выращивали при 37°C в среде LB (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 10; агар – 15; pH 7.0

Суммарную РНК выделяли из индуцированного ДГЭА мицелия *Curvularia* sp. с использованием набора RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США) в соответствии с инструкциями производителя. Обратную транскрипцию и синтез кДНК проводили на основе тотальной РНК с использованием M-MLV обратной транскриптазы (набор для синтеза кДНК MINT, “Evrogen”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Гомогенаты разрушенных

клеток, несущих рекомбинантные плазмиды со вставками целевых генов *CYP1* и *POR* смешивали в равных пропорциях и центрифугировали при 20000 об./мин в течение 30 мин. Полученный осадок ($R_{20\,000}$) и супернатант ($S_{20\,000}$) использовали для трансформации стероидного субстрата ДГЭА *in vitro*. Для проведения трансформации к 3 мл фракции $R_{20\,000}$ или $S_{20\,000}$ добавляли $MgCl_2$ — 10 мМ, НАДФН — 1 мМ, ФАД — 10 мкМ, ФМН — 10 мкМ, стероид ДГЭА — 0.35 мМ и продолжали инкубирование при 220 об./мин и 28°C в течение 72 ч.

ТСХ и ВЭЖХ анализ стероидных метаболитов осуществляли в условиях, описанных ранее (Kollerov et al., 2022). Времена удерживания (R_t): ДГЭА, 8.46 мин; 7 α -ОН-ДГЭА, 3.53 мин; 7 β -ОН-ДГЭА, 3.38 мин.

Известно, что грибные гидроксилазы, участвующие в реакциях гидроксилирования стероидных субстратов, требуют присутствия НАДФН-цитохром P450-редуктазы (*POR*) для переноса электронов (Šrešnar, Petrič, 2011). Среди транскриптов грибной культуры *Curvularia* sp., помимо обнаруженного кандидатного гена *cyp1* (1551 п.о.), был также выявлен ген *por* (2091 п.о.), кодирующий синтез редокс-партнера для цитохрома P450.

Выделение РНК является важным шагом для проведения последующей обратной транскрипции, синтеза кДНК и ОТ-ПЦР амплификации целевых генов (Sánchez-Rodríguez et al., 2008).

На основе суммарной РНК, выделенной из клеток индуцированного ДГЭА мицелия, был осуществлен синтез первой цепи кДНК. С использованием сконструированных ген-специфических праймеров FPCYP1 и RPCYP1, а также синтезированной первой цепи кДНК и Q5 ДНК-полимеразы была проведена ОТ-ПЦР амплификация кандидатных генов *CYP1* и *POR*. На рис. 1а, 1б представлены результаты амплификации кДНК последовательностей генов *CYP1* и *POR*, свидетельствующие о чистоте полученных

ПЦР-продуктов и соответствии их исходным размерам (~1.6 и 2.1 т.п.о., соответственно).

ПЦР-продукты генов *CYP1* и *POR* были по отдельности клонированы в плазмидный экспрессионный вектор pET-22b(+) под контроль T7 промотора. Полученные лигазные смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 α с последующим отбором положительных трансформантов на агаризованной среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Наличие вставок целевых генов в рекомбинантных плаزمидах выделенных из выборочных положительных трансформантов подтверждали экспресс-ПЦР-реакцией с использованием ген-специфических праймеров, а также рестрикционным анализом (рис. 1в, 1г).

Полученными рекомбинантными плазмидами pET-22b(+)-*CYP1* и pET-22b(+)-*POR* была осуществлена трансформация компетентных клеток *E. coli* BL 21 DE(3). Биоконверсию ДГЭА проводили *in vitro* с применением клеточных фракций полученного рекомбинантного штамма бактерий. При трансформации ДГЭА клеточными фракциями контрольного штамма *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+), несущего пустой вектор, образование гидроксилированных стероидов не выявлено (рис. 2а, варианты 1, 2).

В то же время при использовании супернатанта $S_{20\,000}$ разрушенных клеток рекомбинантных штаммов *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+)-*CYP1* и *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+)-*POR* после 72 ч инкубации в среде конверсии отмечалось образование двух продуктов трансформации (соединения I и II) (рис. 2а, вариант 4).

Соединения I и II были выделены и на основании сопоставления с аутентичными гидрокси-стероидами были идентифицированы как 7 β -ОН-ДГЭА и 7 α -ОН-ДГЭА, соответственно (рис. 2б, 2в).

Следует отметить, что в литературе сведения о грибных монооксигеназах, осуществляющих 7 β -гидроксилирование стероидов, ограничены одной

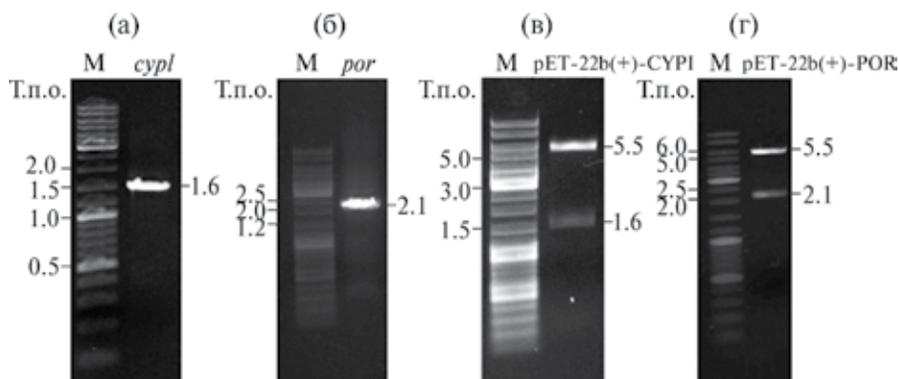


Рис. 1. Визуализация ПЦР-продуктов генов *CYP1* (а) и *POR* (б), амплифицированных с использованием в качестве матрицы первой цепи кДНК и рекомбинантной плазмиды pET-22b(+)-*CYP1* (в) и pET-22b(+)-*POR* (г) после обработки эндонуклеазами рестрикции *NdeI/NotI* и *EcoRI/NotI*, соответственно; гель-электрофорез на 0.8% агарозе (120 В; 40 мин) с окрашиванием этидиум бромидом; М — ДНК маркер (~0.5 мкг).

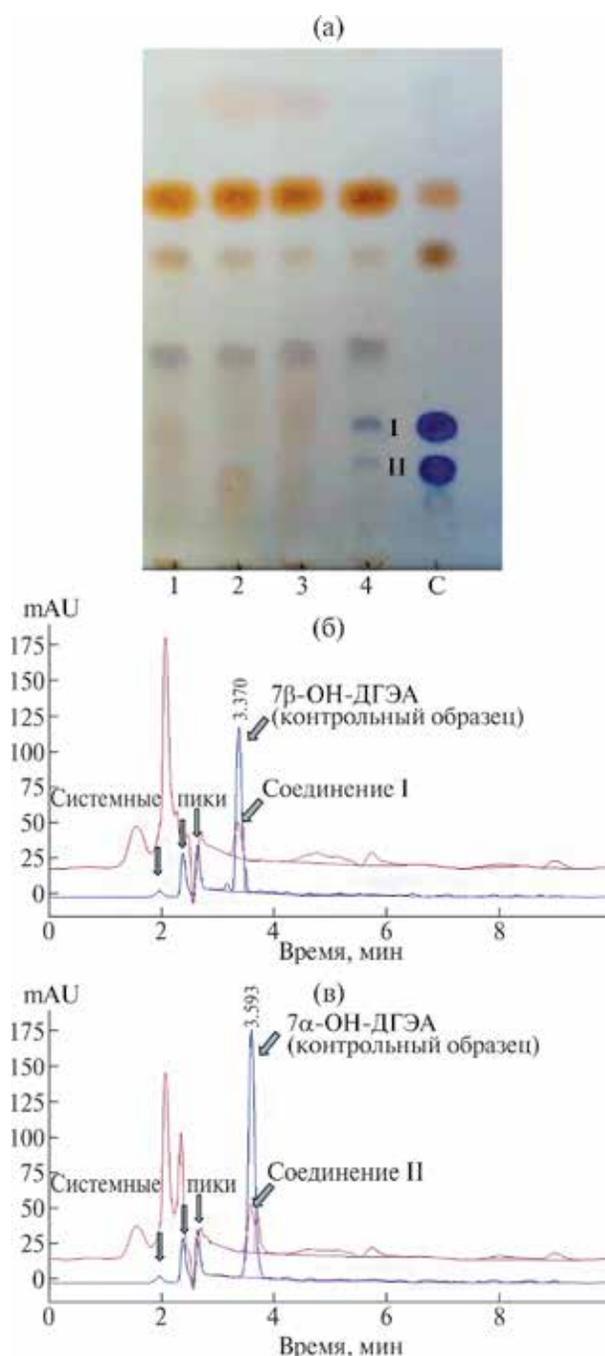


Рис. 2. ТСХ профиль образцов трансформационной жидкости биоконверсии ДГЭА (0.1 г/л) осадком $R_{20\,000}$ (варианты 1, 3) и супернатантом $S_{20\,000}$ (варианты 2, 4), полученными из гомогената разрушенных рекомбинантных клеток *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+), несущих пустой вектор (варианты 1, 2) и гомогената разрушенных рекомбинантных клеток *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+)-CYP1 и *E. coli* BL 21 DE(3)-pET-22b(+)-POR, несущих целевые гены CYP1 и POR, соответственно (варианты 3, 4) (72 ч трансформации); С – смесь стандартных стероидов в точке (сверху вниз): ДГЭА (2 мкг), андростендиол (3 мкг), 7β-ОН-ДГЭА (2 мкг), 7α-ОН-ДГЭА (2 мкг) (а); Сравнительный ВЭЖХ анализ соединений I и II с контрольными образцами 7β-ОН-ДГЭА (б) и 7α-ОН-ДГЭА (в).

публикацией, в которой упоминается способность гидроксилазы CYP5150AP3, выявленной в клетках мицелия *Thanatephorus cucumeris*, катализировать 7β- и 6β-гидроксилирование, однако данная активность проявлялась лишь в отношении кортексолона и тестостерона (Lu et al., 2019). В данной работе впервые идентифицирована грибная гидроксилаза, катализирующая 7β-гидроксилирование ДГЭА.

Таким образом, изучение функциональной активности рекомбинантных ферментов CYP1 и POR *in vitro* в отношении стероидного субстрата ДГЭА позволило сделать вывод в пользу того, что ген *cyp1* в клетках грибной культуры *Curvularia* sp. кодирует синтез 7-гидроксилазы. Результаты расширяют представления о разнообразии стероидных гидроксилаз микромицетов и важны для биоинженерии микробных продуцентов ценных гидроксистероидов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-64-00024.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались животные или люди.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kristan K., Rižner T.L. Steroid-transforming enzymes in fungi // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2012. V. 129. P. 79–91.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.012>
- Nassiri-Koopaie N., Faramarzi M.A. Recent developments in the fungal transformation of steroids // *Biocatal. Bio-transform.* 2015. V. 33. P. 1–28.
<https://doi.org/10.3109/10242422.2015.1022533>
- Kollerov V., Shutov A., Kazantsev A., Donova M. Bio-transformation of androstenedione and androstadienedione by selected *Ascomycota* and *Zygomycota* fungal strains // *Phytochem.* 2020. V. 169. Art. 112160.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112160>
- Kollerov V., Shutov A., Kazantsev A., Donova M. Steroid modification by filamentous fungus *Drechslera* sp.: Focus on 7-hydroxylase and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activities // *Fungal Biol.* 2022. V. 126. P. 91–100.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2021.11.002>
- Kollerov V.V., Tarlachkov S.V., Donova M.V. De novo transcriptome assembly of *Curvularia* sp. VKM F-3040, a

- promising steroid-modifying ascomycete // *Microbiol. Resour. Announc.* 2023.
<https://doi.org/10.1128/MRA.00663-23>
- Črešnar B., Petrič Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1814. P. 29–35.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.06.020>
- Sánchez-Rodríguez A., Portal O., Rojas L.E., Ocaña B., Mendoza M., Acosta M., Jiménez E., Höfte M. An efficient method for the extraction of high-quality fungal total RNA to study the *Mycosphaerella fijiensis*-*Musa* spp. interaction // *Mol. Biotechnol.* 2008. V. 40. P. 299–305.
<https://doi.org/10.1007/s12033-008-9092-1>
- Lu W., Feng J., Chen X., Bao Y.J., Wang Y., Wu Q., Ma Y., Zhu D. Distinct regioselectivity of fungal P450 enzymes for steroidal hydroxylation // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. V. 85. Art. e01182–19.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01182-19>

SHORT COMMUNICATIONS

Expression of the *Curvularia* sp. P450 Monooxygenase Gene in *Escherichia coli* and Confirmation of Its 7-Hydroxylation Function

V. V. Kollerov^{1, *}, S. V. Tarlachkov¹, A. A. Shutov¹, and M. V. Donova¹

¹*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences," Pushchino, 142290 Russia*

**e-mail: svkollerov@rambler.ru*

Received October 13, 2023; revised October 28, 2023; accepted November 1, 2023

Abstract—The diversity and uniqueness of fungal cytochromes P450 (CYP), capable of catalyzing the regio- and stereospecific hydroxylation of steroids, makes them important for microbiological synthesis of valuable hydroxysteroids. In the present work, the function of recombinant fungal P450 monooxygenase (CYPI) of *Curvularia* sp. strain VKM F-3040, a promising biocatalyst of 7-hydroxylation of androstane steroids, was studied. RT-PCR amplification of cDNA of the candidate CYPI gene and of the gene of its natural redox partner (POR), their cloning and heterologous expression in the cells of *E. coli* BL 21 DE(3) was carried out. In vitro experiments showed the ability of the obtained recombinant monooxygenase to catalyze hydroxylation of dehydroepiandrosterone at positions 7 α and 7 β . Our results expand the knowledge about fungal steroid hydroxylases and open up the prospects for the synthesis of valuable 7-hydroxysteroids by using recombinant producers.

Keywords: *Curvularia* sp., hydroxylation, DHEA, cytochrome P450, heterologous expression, *E. coli* BL 21 DE(3)