



УДК 547.92 + 547.963

ОКИСЛЕНИЕ 17 α ,20 β - И 17 α ,20 α -ДИГИДРОКСИПРЕГН-4-ЕН-3-ОНОВ – ПОБОЧНЫХ ПРОДУКТОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ПРОГЕСТЕРОНА РЕКОМБИНАНТНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ ЦИТОХРОМ P45017 α

© 2003 г. В. М. Шкуматов*#, Е. В. Усова*, В. Г. Радюк*, Ж. Н. Кашкан**, Н. В. Ковганко**, Т. Юречек***, Ш. Мауерсбергер***

*Институт физико-химических проблем Белгосуниверситета,
Беларусь, 220050, Минск, ул. Ленинградская, 14;

**Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь;

***Институт микробиологии Технического университета Дрездена, Дрезден, Германия

Поступила в редакцию 15.07.2002 г. Принята к печати 07.12.2002 г.

Биотрансформация прогестерона рекомбинантными дрожжами *Yarrowia lipolytica* E129A15 и *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YEр5117 α , экспрессирующими цитохром P45017 α коры надпочечников быка, дает 17 α -гидроксипрогестерон и два диола – 17 α ,20 β - и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-он. Окисление смесей этих трех стероидов хромовой кислотой приводило к расщеплению 17–20-связи в диолах и к образованию андрост-4-ен-3,17-диона. Биотрансформация прегн-4-ен-20 β -ол-3-она или прегн-4-ен-20 α -ол-3-она с помощью *Y. lipolytica* E129A15 сопровождалась протеканием следующих реакций: первоначальным окислением этих соединений до прогестерона и последующими последовательными реакциями 17 α -гидроксилирования, 20 α - и 20 β -восстановления. Полученные результаты расширяют возможности ферментативной и химической модификации стероидов.

Ключевые слова: рекомбинантные микроорганизмы; стероиды, биотрансформация, C20-восстановление–окисление, расщепление связи 17–20; цитохром P45017 α .

ВВЕДЕНИЕ

Многофункциональный фермент 17 α -гидроксилаза-17,20-лиаза (цитохром P45017 α , далее P45017 α) обеспечивает в клетках стероидогенных тканей млекопитающих биосинтез 17-дезоксидов (минералокортикоидов) и 17 α -гидроксикортикостероидов (глюкокортикоидов), а также катализирует расщепление связи 17–20 – реакцию, ведущую к образованию половых гормонов [1–4]. Катализ нескольких типов реакций одной протомерной формой белка характерен также и для других цитохромов P450, участвующих в биосинтезе стероидов; в частности, такой феномен хорошо доказан при структурно-функциональном изучении цитохрома P450_{ssc}, отщепляющего боковую цепь холестерина [5]. В ряде работ по гетерологической экспрессии P45017 α установлено изменение соотношения продуктов гидроксилазной и лиазной реакций. Цубер и др. [6] сообщили, что P45017 α быка, продуцируемый клетками COS-1, проявлял по отношению к прегненолону обе активности, а Сакаки и др. [7] установили, что эта же форма P45017 α , полученная в клетках *Saccharomyces cerevisiae* AN22 под контролем промото-

ра и терминатора алкогольдегидрогеназы, проявляла только 17 α -гидроксилазную активность, а лиазная активность отсутствовала. Соотношение этих активностей P45017 α зависит от субстрата (прегненолон или прогестерон) и может регулироваться наличием цитохрома *b*₅, взаимодействием гемопротейда со своим редокс-партнером – NADPH-оксидоредуктазой и фосфорилированием P45017 α [8–12]. Изменение субстратной специфичности и направленности реакций при гетерологической экспрессии ферментов в некоторых случаях имеет полезный характер с точки зрения новых возможностей химико-ферментативной модификации стероидов. Как показано ранее [13, 14], при биотрансформации прогестерона (I) рекомбинантным штаммом *S. cerevisiae* GRF18/YEр5117 α возможно образование, помимо целевого 17 α -гидроксипрогестерона (II), также и продукта его дальнейшего восстановления, имеющего строение 17 α ,20-дигидроксипрегн-4-ен-3-она. При этом хиральность центра C20 в последнем соединении не была установлена.

В настоящей работе мы использовали препараты цитохрома P45017 α коры надпочечников быка, продуцируемые двумя рекомбинантными микроорганизмами – *S. cerevisiae* GRF18/YEр5117 α [14] и *Yarrowia lipolytica* E129A15 (см. “Эксперимент.

Автор для переписки (тел./факс: (+375-17) 209-54-61; эл. почта: biopharm@bsu.by).

часть”). Биотрансформация ими прогестерона позволила установить особенности 17 α -гидроксилирования и 20-восстановления стероида и строго доказать структуры побочных продуктов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальных этапах биотрансформации прогестерона (пик I) рекомбинантным штаммом *Y. lipolytica* E129A15 наблюдалось образование целевого продукта – 17 α -гидроксипрогестерона (пик II), а затем обнаруживалось накопление побочных стероидных продуктов (пики III и IV), которое зависело от времени биотрансформации (рис. 1). Образование дополнительного стероидного продукта – 17 α ,20-дигидроксипрегн-4-ен-3-она, имеющего при данных условиях ВЭЖХ (см. подпись к рис. 1) такое же время удерживания (12.0 мин), как и для стероида, элюируемого в виде пика IV, было также установлено с использованием трансформантов *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α [14]. Спектры поглощения, зарегистрированные в максимумах пиков для нескольких минорных соединений с временами удерживания менее 11 мин (рис. 1), свидетельствовали о нестероидной природе этих метаболитов, экстрагированных из культуральной среды, и в дальнейшем эти соединения не анализировались. В принципе, исходный прогестерон под действием гетерологично экспрессированного цитохрома P45017 α , кроме 17 α -гидроксилирования, может подвергаться 16 α -гидроксилированию и расщеплению связи 17–20. Не исключены также потенциально возможные модификации прогестерона или 17 α -гидроксипрогестерона собственными ферментными системами дрожжей. Поэтому соединения, соответствующие пикам III и IV (рис. 1), были проработаны при укрупненной биотрансформации прогестерона с *Y. lipolytica* E129A15, очищены сочетанием ТСХ и ВЭЖХ и их структура доказана анализом спектров ¹H-ЯМР (табл. 1).

В спектре соединения (III) присутствовал сигнал метинового протона (H20), геминального к гидроксигруппе. Наличие 20-гидроксигруппы в молекуле данного вещества подтверждалось также тем, что сигнал протонов 21-метильной группы в спектре имел вид дублета с КССВ 7 Гц, обусловленной вицинальным взаимодействием с H20. О присутствии 17 α -гидроксигруппы в молекуле соединения (III) можно было судить по величине химического сдвига H20 (δ 4.04 м. д.), так как известно [15], что в соответствующих 20-гидроксистероидах ряда прегнана, не имеющих 17 α -гидроксигруппы, этот сигнал наблюдается при δ 3.72–3.73 м.д. Поскольку вид и положение сигнала винильного протона H4 в спектрах стероидов (II) и (III) полностью совпадали, следовало сделать вывод о сохранении в молекуле (III) $\Delta^4,3$ -кетогруппировки. Окончательно 20R-конфигурация образо-

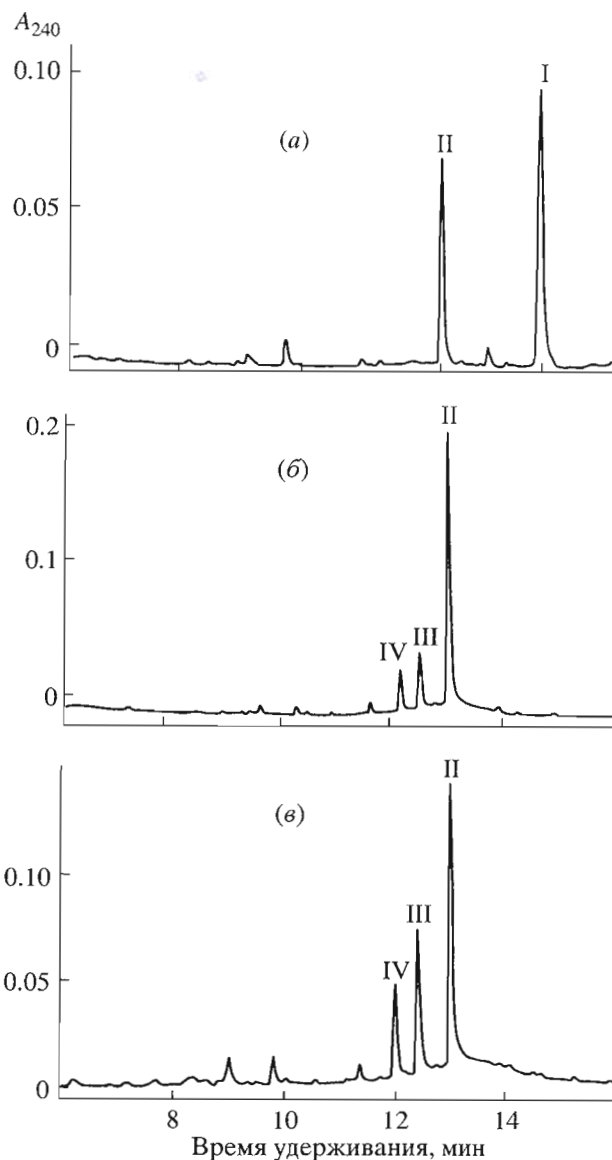


Рис. 1. ВЭЖХ стероидных продуктов, образующихся при биотрансформации прогестерона этанолиндукцированными клетками рекомбинантного штамма *Y. lipolytica* E129A15 через 3 (а), 18 (б) и 24 ч (в) инкубации. Пик I – исходный субстрат [прогестерон (I)], пик II – 17 α -гидроксипрогестерон (II) (основной продукт), пики III и IV – побочные стероидные продукты. Условия культивирования, индукции P45017 α этанолом и биотрансформации прогестерона см. в “Эксперимент. части”. Колонка Kromasil 100-C18, 5 мкм, 125 \times 4 мм; элюция в градиенте раствора Б (ацетонитрил) в растворе А (H₂O): 5 мин – 20% Б, 5–10 мин – 20 \rightarrow 80% Б, 10–17 мин – 80% Б, 17–20 мин – 80 \rightarrow 20% Б. Скорость элюирования 1 мл/мин, спектрофотометрическая регистрация в диапазоне 220–340 нм, по оси ординат показано поглощение при 240 нм.

вавшегося хирального центра в молекуле полученного нами стероида (III) подтверждалась полным совпадением параметров его спектра ¹H-ЯМР с параметрами, описанными для этого вещества в

Таблица 1. Данные спектров ^1H -ЯМР (δ , м. д.) стероидов (II)–(IV)

Протоны	17 α -Гидроксипрогестерон (II)	17 α ,20 β -Дигидроксипрегн-4-ен-3-он (III)	17 α ,20 α -Дигидроксипрегн-4-ен-3-он (IV)
18-Ме	0.77 с	0.85 с	0.78 с
19-Ме	1.20 с	1.20 с	1.19 с
21-Ме	2.28 с	1.18 д (J 6 Гц)	1.20 д (J 5 Гц)
H20	–	4.04 кв (J 6 Гц)	3.88 кв (J 6 Гц)
H4	5.72 уш. с	5.74 уш. с	5.75 уш. с

литературе [16] и измеренными нами для специально синтезированного вещества [17].

Строение соединения (IV) было также доказано анализом его спектра ^1H -ЯМР (табл. 1). Наличие в молекуле стероида (IV) $\Delta^4,3$ -кетогруппировки подтверждалось характерным сигналом винильного протона (H4) и совпадением в спектрах стероидов (II)–(IV) химических сдвигов протонов 19-метильных групп. В спектре соединения (IV) метиновый протон (H20), геминальный к гидроксигруппе, резонировал при δ 3.88 м.д. Наличие 20-гидроксигруппы в молекуле данного вещества подтверждалось также тем, что сигнал протонов 21-метильной группы в спектре имел вид дублета с КССВ J 5 Гц, обусловленной вицинальным взаимодействием с H20. Кроме того, в спектре наблюдалось характерное смещение сигнала 21-метильной группы в сильное поле (до δ 1.20 м.д.) по сравнению с его положением в спектре 17 α -гидроксипрогестерона (II) (δ 2.28 м.д.). Окончательно 20S-конфигурация в молекуле стероида (IV) доказана сравнением его спектра со спектром 20 β -изомера (III). Из данных табл. 1 видно, что сигналы протонов 18-метильной группы и H20 в спектрах соединений (III) и (IV) имели различные химические сдвиги. В свою очередь о присутствии 17 α -гидроксигруппы в молекуле соединения (IV) можно было судить, как и в случае его изомера (III), по величине химического сдвига H20 (δ 3.88 м. д.).

Таким образом, данные ^1H -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и ВЭЖХ и их сопоставление с соответствующими данными для синтезированного нами ранее 17 α ,20 β -дигидроксипрегн-4-ен-3-она, а также для выделенного побочного метаболита *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α [14, 17] позволили установить структуру стероидов (III) и (IV) как 17 α ,20 β -дигидроксипрегн-4-ен-3-она и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она соответственно.

Восстановление 17 α -гидроксипрогестерона (II) до соединений (III) и (IV) обусловлено функционированием соответствующих дрожжевых 20-стероидредуктаз. Необходимо отметить некоторые отличительные и общие особенности метаболизма прогестерона рекомбинантными дрожжами, продуцирующими цитохром P45017 α быка. Если в слу-

чае трансформантов *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α основной побочный продукт – это диол (IV) (соотношение соединений (III) и (IV) составляет примерно 1 : 50), то в случае *Y. lipolytica* E129A15 соотношение стереоизомеров соизмеримо и наблюдается даже некоторое превалирование диола (III) (рис. 1в). Кроме того, эти побочные соединения в случае последнего штамма не становились основными продуктами даже после 48-часовой биотрансформации на среде YP–этанол (данные не приведены), в то время как в случае *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α после 24-часовой биотрансформации на неселективной среде YP–галактоза выход стероида (IV) составлял более 80% от исходного прогестерона [14]. Несмотря на различные уровни экспрессии цитохрома P45017 α , общими были значения числа оборотов *in vivo* для обоих трансформантов дрожжей, составляющие 7–10 моль 17 α -гидроксипрогестерона (II) на моль продуцированного цитохрома P45017 α в минуту, что свидетельствует о примерно одинаковой доступности прогестерона для активных центров экспрессируемого гемопротейда и о близких механизмах взаимодействия P45017 α (комплексобразование, электронный транспорт) с собственными NADPH-зависимыми цитохром P450-оксидоредуктазами дрожжей. В то же время вопросы транспорта стероидных субстратов, их превращения и выведения продуктов клетками рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica*, дикие штаммы которых способны эффективно метаболизировать различные гидрофобные соединения (*n*-алканы, жирные кислоты), требуют дальнейшего изучения.

Тот факт, что при биотрансформации прогестерона (I) рекомбинантными штаммами, наряду с 17 α -гидроксипрогестероном (II), образуются также его восстановленные производные (III) и (IV), естественно снижает выход целевого вещества и затрудняет его выделение из смеси [14]. Мы предположили, что селективное химическое окисление 20-гидроксигрупп в соединениях (III) и (IV) с образованием 20-кетона (II) может увеличить его выход и одновременно упростить схему выделения. С этой целью мы вначале изучили окисление хромовой кислотой в ацетоне по Джонсу модельной смеси 17 α -гидроксипрогестерона (II) и дигидроксипроизводного (III) (табл. 2, образец 1).

Таблица 2. Окисление стероидов (II)–(IV)* хромовой кислотой (данные ВЭЖХ)**

Образец	Метод окисления	Состав исходных стероидов в смеси, %			Состав продуктов окисления, %			
		(II)	(III)	(IV)	(II)	(III)	(IV)	(V)
1	A	55.3	44.7	–	55.1	13.8	–	31.1
2	B	100	–	–	97.8	–	–	–
3	B	–	100	–	1.2	71.2	–	25.6
4	B	67.9	1.9	16.6	68.3	1.0	8.3	9.0
5	B	12.3	1.7	85.9	15.6	1.0	14.9	68.5
6	B	57.1	22.7	20.2	57.7	0.5	0.5	41.2

* Образцы: 1–3 – смесь стероидов (II) + (III) или отдельно взятые для окисления стероиды (II) и (III); 4 – смесь стероидов после биотрансформации прогестерона с *S. cerevisiae* GRF18/УЕр5117 α на среде УР–галактоза в течение 6 ч (осталось 13.6% исходного прогестерона); 5 – смесь стероидов после биотрансформации прогестерона с *S. cerevisiae* GRF18/УЕр5117 α на среде УР–галактоза в течение 24 ч; 6 – смесь стероидов после биотрансформации прогестерона с *Y. lipolytica* E129A15 на среде УР–этанол в течение 28 ч.

** Колонка Kromasil 100-C18, 5 мкм, 250 \times 4 мм. Элюция градиентом раствора Б (ацетонитрил) в растворе А (H₂O): 5 мин – 25% Б, 5–40 мин 25 \rightarrow –50% Б, 40–45 мин – 50 \rightarrow 100% Б, 45–55 мин – 100% Б, 55–60 мин 100 \rightarrow –25% Б.

Известно, что в данных условиях изолированные 20-гидроксигруппы в стероидах ряда прегнана легко окисляются с образованием соответствующих 20-кетонных (см., например, [18]). Однако оказалось, что в смеси продуктов окисления, наряду с исходными соединениями (II) и (III), содержалось также значительное количество андрост-4-ен-3,17-диона (V). Из данных табл. 2 следует, что содержание 17 α -гидроксипрогестерона (II) в смеси продуктов реакции окисления осталось практически таким же, как и в исходной смеси. Это заставило нас предположить, что образование андростендиона (V) происходило в результате расщепления 17(20)-связи в молекуле стероида (III) под действием хромовой кислоты.

Для подтверждения этого мы провели окисление по Джонсу индивидуальных стероидов (II) и (III) хромовой кислотой в аналогичных условиях (табл. 2, образцы 2 и 3) и установили, что 17 α -гидроксипрогестерон (II) практически не подвергался окислению, а 17 α ,20 β -диол (III) окислялся главным образом до андростендиона (V). В то же время образование 17 α -гидроксипрогестерона (II) из соединения (III) все же происходило, но являлось минорным процессом.

Далее мы изучили окисление хромовой кислотой по Джонсу реальных смесей стероидов (II)–(IV), образующихся при биотрансформации прогестерона (I) под действием *S. cerevisiae* GRF18/УЕр5117 α или *Y. lipolytica* E129A15, культивируемых на неселективных средах с добавлением соответствующих индукторов (табл. 2, образцы 4–6). Во всех этих случаях 17 α -гидроксипрогестерон (II) не подвергался окислению. В то же время 17 α ,20 β -диол (III) и 17 α ,20 α -диол (IV) превращались в андростендион (V). При этом обращает на себя внимание тот факт, что стероид (IV) окислялся в андростановое производное (V) быстрее, чем его изомер (III). Результаты химико-ферментатив-

ной трансформации прогестерона представлены на схеме 1.

Представленные здесь результаты окисления 17,20-дигидроксипрегнанов (III) и (IV) хромовой кислотой, в принципе, аналогичны ранее полученным результатам окисления тетраацетатом свинца изомерных по С20 прегн-4-ен-3 β ,17 α ,20-триолов до 3 β -гидроксиандрост-4-ен-17-она [19]. Следует отметить, что в наших экспериментах условия окисления подбирались таким образом, чтобы оставалась некоторая часть непрореагировавших стероидов (III) или (IV). Однако не существует принципиальных препятствий для проведения реакций исчерпывающего окисления указанных веществ с образованием только 17 α -гидроксипрогестерона (II) и андрост-4-ен-3,17-диона (V).

Химический механизм 17,20-лиазной реакции, катализируемой Р45017 α , до сих пор окончательно не установлен. Хотя диолы (III) и (IV) и не рассматриваются в настоящее время как интермедиаты этой реакции, их химическое окисление легко приводит к одному из продуктов ферментативных реакций – андростендиону (V).

Образование побочных диолов (III) и (IV), в принципе, возможно путем независимых реакций 17 α -гидроксилирования гетерологично продуцируемым цитохромом Р45017 α и 20-восстановления молекулы прогестерона собственными 20-стероидоредуктазами дрожжей. При биотрансформации 20 β - (VI) или 20 α -дигидропрогестерона (VII) с помощью *Y. lipolytica* E129A15 была обнаружена необычная последовательность реакций (схема 2): первоначально каждый из стереоизомеров окислялся до прогестерона, а затем происходило последовательное 17 α -гидроксилирование и 20 α - и 20 β -восстановление.

Кинетика этих процессов (рис. 2) свидетельствует о том, что прогестерон (I) в этих случаях – промежуточное соединение и его содержание не

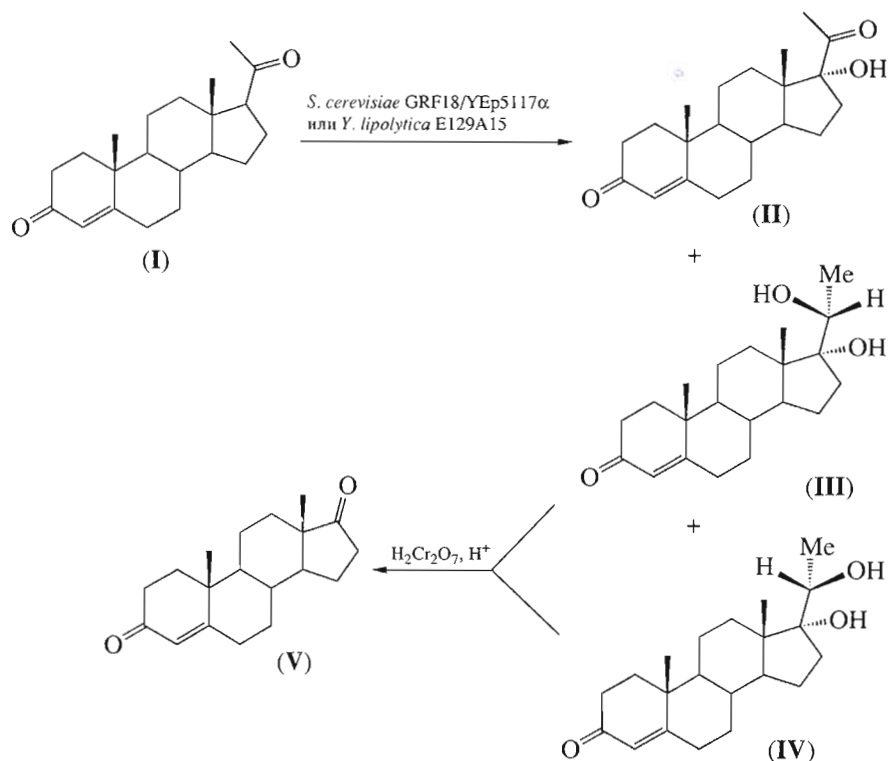


Схема 1. Ферментативные превращения прогестерона (I) рекомбинантными штаммами дрожжей, экспрессирующими P45017α, с образованием целевого продукта – 17α-гидроксипрогестерона (II) и побочных продуктов – 17α,20β-дигидроксипрегн-4-ен-3-она (III) и 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-она (IV) с химическим окислением стереоизомеров (III) и (IV) до андрост-4-ен-3,17-диона (V).

превышает 6%. “Прямого” 17α-гидроксилирования дигидропроизводных (VI) и (VII) с образованием диолов (III) и (IV) не обнаружено. Образование стероидов (III) и (IV) имеет выраженную лаг-фазу (до 24 ч), что указывает на возможность индукции синтеза соответствующих 20-стероид-редуктаз образующимся 17α-гидроксипрогестероном (II). Контрольные штаммы дрожжей, не продуцирующие цитохром P45017α, способности к окислению стероидов (VI) и (VII) в положение 20 не проявляли. Таким образом, полученный гемопротеид может выполнять функцию оксидазы, по крайней мере, по отношению к 20-дигидропроизводным прогестерона. Подобная функция была описана для 21-стероидгидроксилирующей системы из коры надпочечников, реконструированной из очищенных компонентов (NADPH, цитохром P450-оксидоредуктаза, цитохром P450c21), по отношению к 20β-дигидропрогестерону или 17α,20β-дигидроксипрегн-4-ен-3-ону [20, 21]. В отличие от этих работ мы обнаружили окисление обоих стереоизомеров (VI) и (VII) (рис. 2).

Результаты, полученные в настоящей работе, расширяют возможности химико-ферментативного синтеза стероидов. Сочетание биотехнологических методов с использованием различных рекомбинантных микроорганизмов, продуцирую-

щих цитохром P45017α млекопитающих, и химических методов окисления позволяет получать из одного исходного прогестерона (I) желаемый набор из стероидов (II)–(V). Соединения (II) и (V) относятся к важным веществам для промышленного производства широкого спектра стероидных лекарственных препаратов [22]. Стероиды (III) и (IV) представляют, на наш взгляд, интерес как исходные соединения для синтеза потенциальных ингибиторов P45017α, фермента, который играет значительную роль в развитии доброкачественных и злокачественных опухолей предстательной железы [23], а также в связи с функцией соединения (III) как полового феромона для некоторых видов рыб [24].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы: прогестерон (I), 17α-гидроксипрогестерон (II), андрост-4-ен-3,17-дион (V), прегн-4-ен-20β-ол-3-он (VI) и прегн-4-ен-20α-ол-3-он (VII) (Sigma, США). 17α,20β-Дигидроксипрегн-4-ен-3-он (III) получали восстановлением стероида (II) боргидридом натрия [17].

Исходные и трансформированные штаммы микроорганизмов. Исходным микроорганизмом служил *S. cerevisiae* GRF18 (*Matα his3-11 his3-15*

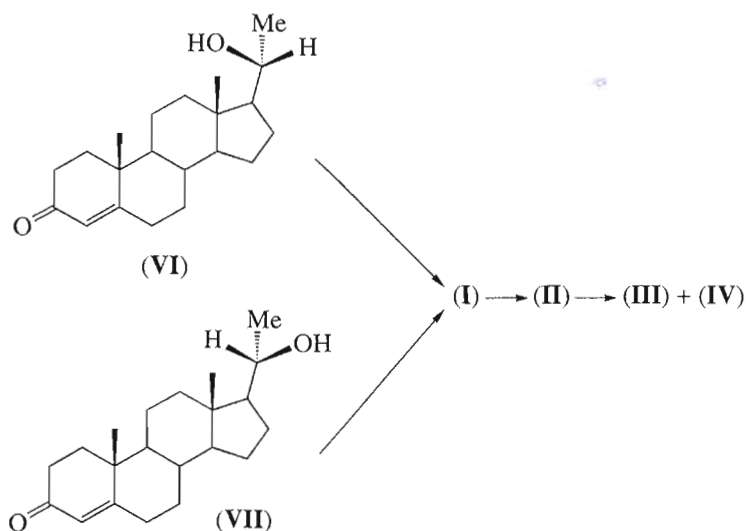


Схема 2. Ферментативные превращения субстратов – прегн-4-ен-20 β -ол-3-она (VI) и прегн-4-ен-20 α -ол-3-она (VII) в прогестерон (I) с последующим образованием 17 α -гидроксипрогестерона (II), а также 17 α ,20 β -дигидроксипрегн-4-ен-3-она (III) и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она (IV). Биотрансформации стероидов проводили с помощью рекомбинантного диплоидного штамма *Y. lipolytica* E129A15, экспрессирующего P45017 α под контролем промотора изоцитратлиазы.

leu2-3 leu2-112 cir⁺ can^R). В качестве трансформантов использовали *S. cerevisiae* GRF18/YEp51 (трансформант штамма GRF18 с плазмидой YEp51 – негативный контрольный штамм) и *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α , содержащий встроенный ген цитохрома P45017 α под контролем промотора *GAL10* [14]. Исходный штамм *Y. lipolytica* E129 (*MATA leu2-270 ura3-302 lys11-23 xpr2-322*) использовали для трансформации с многокопийной интегративной плазмидой p67IC17 α [25, 26]. Вектор содержал экспрессионную кассету с кДНК *CYP17* под контролем промотора и терминатора изоцитратлиазы *ICL1* (индукция алканами, жирными кислотами, этанолом; репрессия глюкозой) [27]. Результирующий диплоидный прототрофный штамм *Y. lipolytica* E129A15 получали путем скрещивания многокопийного трансформанта E129 (p67IC17 α) со штаммом A1-5 (*MATB met Alk⁺*), обладающим схожим с диким типом хорошим ростом на алканах, как это показано ранее для других диплоидных рекомбинантных штаммов *Y. lipolytica* [25, 26].

Культивирование трансформантов микроорганизмов и биотрансформация стероидов. Культивирование рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α , индукцию биосинтеза цитохрома P45017 α *D*-галактозой и биотрансформацию прогестерона на среде YP–галактоза проводили как в работе [14]. В случае *Y. lipolytica* E129A15 дрожжи культивировали на среде YPD (Difco), содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% пептона и 2% глюкозы. Через 24 ч после полного потребления культурой *D*-глюкозы в колбы прибавляли индуктор (этиловый спирт до конечной

концентрации 1%). Через 6 ч повторно добавляли этиловый спирт в той же концентрации, а после 18 ч культивирования клетки отделяли центрифугированием и переносили на новую среду, содержащую 1% этанола (среда YP–этанол) и соответствующие стероиды в концентрации 100 мкМ (среда для биотрансформации). Культивирование и биотрансформацию стероидов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем культуры 50 мл) при 28–29 $^{\circ}$ C, pH 5–6, в условиях аэрации (200 об/мин). Из реакционной среды через определенные промежутки времени после прибавления стероидных субстратов отбирали 1 мл инкубационной среды, клетки отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость экстрагировали этилацетатом (2 \times 2 мл) и объединенную органическую фазу упаривали на роторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 500 мкл метанола и анализировали ВЭЖХ.

Микробиологический синтез 17 α ,20 β - (III) и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она (IV) из прогестерона (I). К индуцированной этанолом культуре дрожжей *Y. lipolytica* E129A15 (общий объем 200 мл) прибавляли прогестерон (20 мкмоль) и проводили биотрансформацию в течение 30 ч. Клетки отделяли центрифугированием, а супернатант экстрагировали этилацетатом (3 \times 200 мл), органические экстракты упаривали в вакууме. Состав стероидов по данным ВЭЖХ: 17 α -гидроксипрогестерон (II) (56%), стероиды (III) (25%) и (IV) (16%). Препаративную ТСХ суммарного экстракта проводили на пластинках (10 \times 5 см) с закрепленным слоем силикагеля (Merck UV-254, Германия) в хроматографической системе бен-

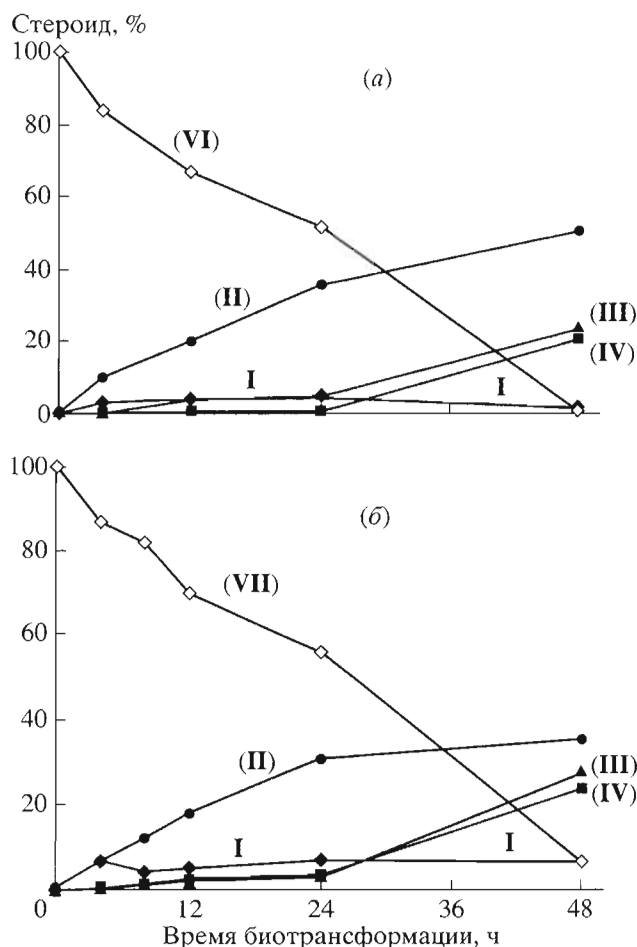


Рис. 2. Изменение содержания стероидов при биотрансформации прегн-4-ен-20β-ол-3-она (VI) (а) и прегн-4-ен-20α-ол-3-она (VII) (б) рекомбинантными дрожжами *Y. lipolytica* E129A15. Обозначение стероидов как на схемах 1, 2. Условия ВЭЖХ аналогичны приведенным в пояснениях к табл. 2.

зол-ацетон (4 : 1). Полученные после разделения зоны стероидов, соответствующие по ВЭЖХ продуктам (III) и (IV), вырезали, измельчали и экстрагировали метанолом (2 × 4 мл), экстракты упаривали досуха, а сухие остатки растворяли в 100 мкл метанола и дополнительно очищали методом ВЭЖХ. Получали 1.33 мг (4 мкмоль) соединения (III) и 0.8 мг (2.4 мкмоль) соединения (IV).

Окисление стероидов (II)–(IV) хромовой кислотой. А. К раствору 0.9 мг 17α-гидроксипрогестерона (II) и 1.1 мг 17α,20β-дигидроксипрегн-4-ен-3-она (III) в 4.5 мл ацетона прибавляли 0.5 мл 0.08 н. хромовой кислоты. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, затем прибавляли 2 капли изопропанола, и перемешивание продолжали в течение 20 мин. После этого смесь фильтровали через слой силикагеля, и растворитель удаляли в вакууме.

Б. К раствору 0.27 мг 17α-гидроксипрогестерона (II) или 17α,20β-дигидроксипрегн-4-ен-3-она (III) в 1 мл ацетона прибавляли 0.11 мл 0.08 н. хромовой кислоты. Реакционную смесь выдерживали в течение 5 мин при комнатной температуре при периодическом встряхивании и затем обрабатывали 2 каплями этанола. Через 20 мин смесь фильтровали через слой силикагеля, и растворитель удаляли в вакууме.

В. Смесь стероидов (II)–(IV), полученных в результате биотрансформации прогестерона с рекомбинантными микроорганизмами, растворяли в 1 мл ацетона. Затем к раствору прибавляли 0.1 мл 0.08 н. хромовой кислоты, реакционную смесь выдерживали в течение 5 мин при комнатной температуре при периодическом встряхивании и затем обрабатывали 2 каплями этанола. Через 20 мин смесь фильтровали через слой силикагеля, и растворитель удаляли в вакууме.

ВЭЖХ проводили на хроматографической системе LC-10AT (Shimadzu, Япония). Для регистрации использовали УФ-детектор с диодной матрицей SPD-M10A. Процесс хроматографии и его обработку осуществляли с помощью программного обеспечения CLASS-VP (Shimadzu).

¹H-ЯМР-спектры (растворы в CDCl₃) получали на ЯМР-спектрометре Bruker AC-200 с рабочей частотой 200 МГц. Химические сдвиги приведены в шкале δ относительно Me₄Si, использованного в качестве внутреннего стандарта.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б02Р-106).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shkumatov V.M., Usanov S.A., Chashchin V.L., Akhrem A.A. // *Pharmazie*. 1985. V. 40. P. 757–766.
2. Miller W.L. // *Endocr. Rev.* 1988. V. 9. P. 295–318.
3. Nakajin S., Hall P.F. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 6134–6139.
4. Nakajin S., Shinoda M., Haniu M., Shively J.E., Hall P.F. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. P. 3971–3976.
5. Chashchin V.L., Usanov S.A., Lapko V.N., Adamovich T.B., Shkumatov V.M., Akhrem A.A. // *Chemistry of Peptides and Proteins* / Eds W. Voelter, E. Bayer, Yu. Ovchinnikov, V. Ivanov. Berlin-N.Y.: Walter de Gruyter and Co., 1986. P. 177–189.
6. Zuber M.X., Simpson E.R., Waterman M.R. // *Science*. 1986. V. 234. P. 1258–1261.
7. Sakaki T., Shibata M., Yabusaki Y., Murakami H., Ohkawa H. // *DNA*. 1989. V. 8. P. 409–418.
8. Katagiri M., Kagawa N., Waterman M.R. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 317. P. 343–347.
9. Zhang L., Rodriguez H., Ohno S., Miller W.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 10619–10623.
10. Lee-Robichaud P., Akhtar M.E., Akhtar M. // *Biochem. J.* 1998. V. 332. P. 293–296.

11. Auchus R.J., Lee T.C., Miller W.L. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 3158–3165.
12. Geller D.H., Auchus R.J., Miller W.L. // Mol. Endocrinol. 1999. V. 13. P. 167–175.
13. Шкуматов В.М., Радюк В.Г., Усова Е.В., Шунк В.-Х., Мауерсбергер Ш. // Химические проблемы создания новых материалов и технологий / Ред. В.В. Свиридов. Минск: Белгосуниверситет, 1998. С. 559–566.
14. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Поляков Ю.С., Фролова Н.С., Радюк В.Г., Мауерсбергер Ш., Черноглов А.А., Хонек Х., Шунк В.-Х. // Биохимия. 2002. Т. 67. С. 547–560.
15. Kirk D.N., Toms H.C., Douglas C., White K.A., Smith K.E., Latif S., Hubbard R.W.P. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1990. P. 1567–1594.
16. Nakajin S., Ohno S., Takahashi M., Nishimura K., Shinoda M. // Chem. Pharm. Bull. 1987. V. 35. P. 2490–2494.
17. Ковганко Н.В., Каишкан Ж.Н., Шкуматов В.М. // Химия природн. соед. 2001. № 1. С. 55–56.
18. Gondos G., Orr J.C. // Liebigs Ann. Chem. 1990. № 9. P. 213–215.
19. Ward M.G., Orr J.C., Engel L.L. // J. Org. Chem. 1965. V. 30. P. 1421–1423.
20. Tsubaki M., Morimoto K., Tomita S., Miura S., Ichikawa Y., Miyatake A., Masuya F., Hori H. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1259. P. 89–98.
21. Tsubaki M., Matsumoto N., Tomita S., Ichikawa Y., Hori H. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1390. P. 197–206.
22. Zeelen F.J. Medicinal Chemistry of Steroids. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 1990. 357 p.
23. Grigoryev D.N., Long B.J., Nnane I.P., Njar V.C., Liu Y., Brodie A.M. // Br. J. Cancer. 1999. V. 81. P. 622–630.
24. Nagahama Y., Hirose K., Young G., Adachi S., Suzuki K., Tamaoki B. // Gen. Comp. Endocrinol. 1983. V. 51. P. 15–23.
25. Barth G., Juretzek T., Mauersberger S. Rekombinante haploide oder diploide *Yarrowia lipolytica* Zellen zur funktionellen heterologen Expression von Cytochrom P450 Systemen: Patent DE19932811; Recombinant Haploid or Diploid *Yarrowia lipolytica* Cells for the Functional Heterologous Expression of Cytochrome P450 Systems: Patent WO0003008. 1998.
26. Juretzek T. Entwicklung von Wirts-Vector-Systemen zur heterologen Expression von Proteinen in der nichtkonventionellen Hefe *Yarrowia lipolytica* und ihre Anwendung für die Cytochrom P450-katalysierte Stoffumwandlung. PhD thesis, Technische Universität Dresden, 1999. S. 132.
27. Juretzek T., Prinz A., Schunck W.-H., Barth G., Mauersberger S. Verfahren zur heterologen Expression von Proteinen in der Hefe *Yarrowia lipolytica* unter Kontrolle des regulierbaren Promotors der Isocitratlyase (*Yarrowia lipolytica* expression cassettes containing the *ICLI* promoter and terminator). Patent DE19525282. 1995.

Oxidation of 17 α ,20 β - and 17 α ,20 α -Dihydroxypregn-4-en-3-ones, By-Products of Progesterone Biotransformation with Recombinant Microorganisms Expressing Cytochrome P45017 α

V. M. Shkumatov^{**}, E. V. Usova^{*}, V. G. Radyuk^{*}, Zh. N. Kashkan^{**},
N. V. Kovgancko^{**}, T. Juretzek^{***}, and S. Mauersberger^{*****}

[#]Phonelfax: (375-17) 209-5461; e-mail: biopharm@bsu.by

^{##}Phonelfax: (49-351) 463-7715; e-mail: smau@rcs.urz.tu-dresden.de

^{*}Research Institute for Physicochemical Problems, Belarussian State University, ul. Leningradskaya 14, Minsk, 220050 Belarus

^{**}Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

^{***}Institute of Microbiology, Dresden University of Technology, Mommsenstr. 13, Dresden, 01062 Germany

Progesterone biotransformation with recombinant yeast *Yarrowia lipolytica* E129A15 and *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/YEp5117 α expressing bovine adrenocortical cytochrome P45017 α yielded 17 α -hydroxypregesterone and two diols, 17 α ,20 β - and 17 α ,20 α -dihydroxypregn-4-en-3-one. The oxidation of mixtures of the three steroids with chromic acid resulted in the cleavage of 17–20 bonds in the diols with the formation of androst-4-ene-3,17-dione. The biotransformation of pregn-4-ene-20 β -ol-3-one by means of *Y. lipolytica* E129A15 was accompanied by the following reactions: the primary oxidation of these compounds to progesterone and the subsequent successive reactions of 17 α -hydroxylation and 20 α - and 20 β -reduction. The results widen the possibilities for enzymatic and chemical modifications of steroids. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: biotransformation, cleavage of the 17–20 bond, cytochrome P45017 α , recombinant microorganisms, C20 reduction–oxidation, steroids