

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 604+547.963+43.645.2+577.152.231

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-207-216>

Поступила в редакцию 31.01.2024

Received 31.01.2024

Я. В. Фалетров¹, Н. С. Фролова¹, Ш. Мауерсбергер², В. М. Шкуматов¹

¹Научно-исследовательский институт физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Республика Беларусь

²Институт микробиологии Дрезденского технологического университета, Дрезден, Германия

ПОДАВЛЕНИЕ ПОБОЧНЫХ РЕАКЦИЙ АЦЕТИЛИРОВАНИЯ ПРЕГНЕНОЛОНА В ТРАНСГЕННЫХ ДРОЖЖАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНКУРЕНТНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ И ОПТИМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ «ВЕКТОР – ХОЗЯИН»

Аннотация. Известно, что прегненолон и продукты его превращения цитохромом P450 17 α -гидроксилаза/17,20-лиаза (P450c17) – 17-гидроксипрегненолон, дегидроэпиандростерон – подвергаются 3-O-ацетилированию ферментом Atf2p дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Нами установлено, что добавление в среду для культивирования изоамилового или амилового спирта уменьшает образование 3-O-ацетилированных продуктов как неиндуцированными, так и индуцированными клетками трансгенных дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α , экспрессирующими P450c17 под контролем промотора *GAL10*. Более эффективным оказалось использование микроорганизма-хозяина *Yarrowia lipolytica* и промотора экспрессии изоцитратлиаза *ICL1*. Анализ генома дрожжей *Y. lipolytica* с помощью программы BLAST показал отсутствие в них потенциальных аналогов Atf2p, что подтверждено отсутствием продуктов ацетилирования прегненолона. Выбор оптимального организма-хозяина является альтернативой методу получения штамма с удаленными генами.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, Atf2p дрожжей, P450-редуктаза дрожжей, P450c17, изоамиловый спирт, BLAST, рациональная комбинация системы «вектор–хозяин»

Для цитирования: Подавление побочных реакций ацетилирования прегненолона в трансгенных дрожжах с использованием конкурентного ингибирования и оптимальной системы «вектор – хозяин» / Я. В. Фалетров [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2024. – Т. 69, № 3. – С. 207–216. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-207-216>

Yaroslav V. Faletrov¹, Nina S. Frolova¹, Stephan Mauersberger², Vladimir M. Shkumatov¹

¹Research Institute for Physicochemical Problems of Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Microbiology, Dresden University of Technology, Dresden, Germany

SUPPRESSING THE SIDE REACTIONS OF PREGNENOLONE ACETYLATION IN TRANSGENIC YEAST USING COMPETITIVE INHIBITION AND OPTIMAL VECTOR–HOST SYSTEM

Abstract. The rational design of the vector–host system and the conditions for its use is the key to its most effective use as a biocatalyst for obtaining valuable products or for testing potential bioregulators. In this work, we will consider examples of such solutions for some yeasts from the literature over the past 5 years and our experience in optimizing the reactions of 17 α -hydroxylation of pregnanes with recombinant strains of the yeast *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica*. Thus, it was known that pregnenolone and its product pregnenolone and the products of its transformation by cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17) – 17 hydroxypregnenolone, dehydroepiandrosterone – undergo 3-O-acetylation by the Atf2p enzyme of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We have found that adding isoamyl or amyl alcohol to the cultivation medium significantly reduced the formation of 3-O-acetylated products by both uninduced and induced cells of transgenic yeast *S. cerevisiae* GRF18 YEp5117 α expressing P450c17 under the control of the GAL10 promoter. In this case, the Atf2p substrate competition model was applied. A more effective solution was to use a different host microorganism and an expression promoter. The analysis of the genome of the yeast *Y. lipolytica* using the BLAST program showed the absence of potential analogues of Atf2p, which was confirmed by the absence of pregnenolone acetylation products. Selecting the optimal host organism is an alternative to using a strain with a deleted gene.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, yeast Atf2p, Yeast P450 reductase, Mammalian P450c17, isoamyl alcohol, BLAST, rational combination of vector–host system

For citation: Faletrov Y. V., Frolova N. S., Mauersberger S., Shkumatov V. M. Suppressing the side reactions of pregnenolone acetylation in transgenic yeast using competitive inhibition and optimal vector–host system. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 3, pp. 207–216 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-3-207-216>

Введение. Основное место в промышленном получении стероидов занимает химико-ферментативный синтез с использованием природных микроорганизмов, причем осуществление ряда стадий модификации стероидов с использованием биотехнологий (окислительное отщепление боковых цепей природных стероидов, Δ^1 -дегидрирование, 11β -гидроксилирование) принципиально изменило методы получения всего спектра стероидных гормонов [1–4]. Эти уже ставшие традиционными подходы практически реализовали свой потенциал с точки зрения оптимизации промышленного производства таких ценных продуктов. Важной проблемой при использовании природных микроорганизмов как биокатализаторов превращения стероидов является наличие побочных реакций. Как правило, это требует применения модифицированных исходных субстратов (фторпроизводных, $\Delta^{1,3,5}$ ненасыщенных стероидов, 3-оксидов стеранов) и ингибиторов побочных реакций (α, α' -дипиридила, 1,10 фенантролина, 8-гидроксихинолина и др.), что усложняет решение производственных задач [4, 5].

Альтернативным подходом является использование трансгенных микроорганизмов, экспрессирующих только необходимые ферментные системы для селективных модификаций стероидов. Однако реализация этого подхода сопряжена с различными трудностями и помимо «встраивания» генов. Например, для *Saccharomyces cerevisiae*, наиболее изученных с точки зрения генетических манипуляций, установлено, что прегненолон, дегидроэпиандростерон (ДГЕА) и некоторые другие аналогичные Δ^5 -3-гидроксистероиды ацетируются ферментом Atf2p [6]. Образующиеся 3-О-ацетиловые эфиры не являются субстратами ферментов дальнейшего стероидогенеза млекопитающих (P450c17, CYP21, HSD3B1), а следовательно, получение целевых производных практически невозможно. Также в этих дрожжах содержатся функциональные аналоги 17β -гидроксистероиддегидрогеназ, Ayr1p и Fox2p, 20α -гидроксистероиддегидрогеназ, Gcyp1 и YPR1p, которые восстанавливают кетонные группы соответствующих стероидных субстратов, интермедиатов и продуктов [7–9], а значит, заводят процесс биосинтеза конечных стероидных продуктов в тупик. Поэтому в работе Szchebara с соавт. [10] по созданию трансгенного штамма *S. cerevisiae*, продуцирующего гидрокортизон из простых источников углерода, дополнительно были удалены гены, кодирующие упомянутые выше белки дрожжей, что значительно повлияло на жизнеспособность штамма.

Другое ограничение при создании клеточных биокатализаторов превращения стероидов связано с низкой растворимостью этих соединений в водных средах. Для преодоления этого ограничения используют смешивающиеся с водой растворители, двухфазные системы, диспергируют субстраты на мицеллах поверхностно-активных веществ, а также добавляют циклодекстрины для образования комплексов со стероидами [3, 11]. Дополнительное введение химических реагентов в ходе биотехнологического процесса усложняет весь процесс производства, включая его экологичность. Эти ограничения (наличие побочных продуктов и растворимость гидрофобных субстратов) можно преодолеть с помощью оптимальных систем «хозяин–вектор», в которых объединены строгая регио- и стереоспецифичность ферментов стероидогенеза млекопитающих и биотехнологические преимущества клеток микроорганизмов, использующих гидрофобные субстраты и синтезирующих собственные поверхностно-активные вещества [12–19].

Цель работы – установить с использованием приемов рационального дизайна биокатализатора и контроля протекания реакции 3-О-ацетилирования прегненолона с применением алифатических спиртов, а также с помощью компьютерного анализа генома *Y. lipolytica* наличие в трансгенных штаммах дрожжей потенциальных аналогов Atf2p.

Материалы и методы исследования. *Химические реагенты.* В работе использованы стероиды (прогестерон, прегненолон, 17α -гидроксипрегненолон, прегненолон-3-О-ацетат) производства Sigma-Aldrich, а также компоненты питательных сред YPD и YNB производства Difco Laboratories.

Исходные и трансформированные штаммы микроорганизмов. Исходным микроорганизмом служил *S. cerevisiae* GRF18 (Mata his3-11 his 3-15 leu2-3 leu2-112 cir+ canR). В качестве трансформантов использовали *S. cerevisiae* GRF18/YEp51 (трансформант штамма GRF18 с челночной плазмидой YEp51 – негативный контрольный штамм) и *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a, содержащий встроенный ген P450c17 под контролем промотора *GAL10* [8]. Исходный штамм *Y. lipolytica* E129 (MATA leu2-270 ura3-302 lys11-23 xpr2-322) использовали для трансформации с многокопийной интегративной плазмидой p67IC17a [16]. Вектор содержал экспрессионную кассету с кДНК

P450c17 под контролем промотора и терминатора изоцитратлиазы *ICL1* (индукция алканами, жирными кислотами, этанолом; репрессия глюкозой). Рекомбинантные линии гаплоидных и диплоидных штаммов *Y. lipolytica* использовали для биотрансформации стероидов после гетерологической экспрессии P450c17 из коры надпочечников и сверхэкспрессии собственной NADPH-зависимой, FAD/FMN-содержащей P450 редуктазы (CPR) дрожжей. Прототрофные диплоидные линии *Y. lipolytica* (линии E129A15, DE и DC) получены путем скрещивания гаплоидных мультикопийных трансформантов PO1d (MATA leu2-270 xpr2-322) или E129 (MATA leu2-270 lys211-23 xpr2-322) с диким ауксотрофным штаммом A1-5 (MATB met6) [14].

Культивирование трансформантов микроорганизмов и биотрансформация стероидов. Культивирование рекомбинантных дрожжей *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117a, индукцию биосинтеза P450C17 D-галактозой и биотрансформацию прогестерона проводили так же, как в работе [8]. В случае рекомбинантных линий дрожжей *Y. lipolytica* культивирование и индукция чужеродного белка и сверхэкспрессия собственной CPR осуществлялись так, как описано ранее [15, 16], путем добавления в среду индукторов – этанола или *n*-гексадекана до 1 % (v/v). При изучении влияния алифатических спиртов на ацетилирование стероидов в *S. cerevisiae* GRF 18/YEp5117a дополнительно на стадии внесения субстрата в среду добавляли изоамиловый, амиловый, циклогексильный спирты или этанол (контроль) из расчета 0,5 % (v/v). Общая концентрация спиртов составляла 1,0 % (v/v).

Газохроматографический анализ. Анализ проб Δ^5 -стероидов проводился методом высокотемпературной капиллярной газофазной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе GC 17A, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и компьютерной системой контроля и анализа данных CLASS-VP (Shimadzu, Япония). Для анализа стероидов использовали колонку RTX 1 (Restek) с пленкой силиконового масла в качестве неподвижной фазы (длина 30 м, внутренний диаметр 3,2 мкм, толщина фазы 0,5 мкм). Скорость потока газа-носителя (N_2) составляла 1,1 мл/мин, температура инжектора и детектора – 310 °С. Используемая программа температурного градиента колонки: 0–16,7 мин – 200–300 °С (6 °С/мин), 16,7–20,0 мин – 300 °С. Объем вводимой пробы – 1 мкл.

BLAST-анализ геномов на наличие гомологов Atf2p. Виртуальный поиск белков аналогов Atf2p *S. cerevisiae* в *Y. lipolytica* и других типов дрожжей, используемых для экспрессии цитохромов P450 стероидогенеза млекопитающих, осуществляли при помощи программы BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), используя доступные базы данных первичных последовательностей белков и алгоритмы их сравнения [20]. Для моделирования трехмерной структуры Atf2p, которая не имеет высокой степени гомологии с белками с экспериментально определенной трехмерной структурой, использовали интернет-ресурсы на основе технологии искусственного интеллекта AlphaFold2/ColabFold (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). Последовательность этого белка доступна на интернет-ресурсе Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) под кодами N1P2F9 (E1W10524). Трехмерные модели прегненолона и ДГЕА были загружены с ресурса Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>): коды веществ CID8955 и CID5881 соответственно. Для проведения расчетов параметров модельных белок-лигандных комплексов и анализа результатов использовали программу AutodockVina (размер области расчетов $5 \times 5 \times 5$ нм³) и программу-помощник FyTdock, для построения двухмерных графических представлений о рассчитанном положении стероидов – программу BioVia Discovery Studio.

Результаты и их обсуждение. Биотрансформация прегненолона *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a. Известно, что белки Atf2p и Atf1p могут катализировать образование ацетиловых эфиров изоамилового и ряда других алифатических спиртов в *S. cerevisiae* [21, 22]. Это послужило предпосылкой для использования ряда алифатических спиртов в качестве конкурентных субстратов Atf2p с целью уменьшения ацетилирования прегненолона и его производных в дрожжах *S. cerevisiae*. Наличие в дрожжах собственной микросомальной FAD/FMN-содержащей цитохром P450-редуктазы (CPR) [23] способствовало их выбору как микроорганизмов-хозяев для получения 17 α -гидроксильированных стероидов.

Установлено, что при использовании неиндуцированных клеток прегненолон за 4 ч практически полностью превращался в 3-О-ацетат прегненолона, тогда как добавление в среду изоамилового спирта до 0,5 % (v/v) практически полностью подавляло ацетилирование прегненолона (соотношение ацетата и субстрата уменьшалось в 8 раз (0,11 по сравнению 0,87 в контроле) (рис. 1).

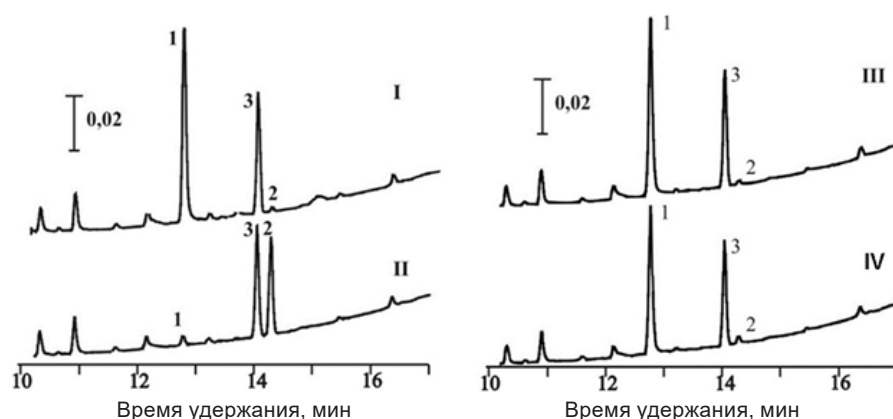


Рис 1. Хроматограммы ГЖХ-анализа биотрансформации прегненолона неиндуцированными клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α (I и II – контроль (0 и 4 ч соответственно); III и IV – с добавлением изоамилового спирта до 0,5 % (v/v) (0 и 4 ч соответственно)). 1 – прегненолон, 2 – прегненолона 3-О-ацетат, 3 – прогестерон (внутренний стандарт)

Fig. 1. Chromatograms of GC analysis of pregnenolone biotransformation by uninduced *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α cells (I and II – control (0 and 4 hours, respectively); III and IV – with the addition of isoamyl alcohol up to 0.5 % (v/v) (0 and 4 hours, respectively)). 1 – pregnenolone, 2 – pregnenolone 3-O-acetate, 3 – progesterone (internal standard)

С целью оценки применимости данного подхода в условиях активности встроенного P450c17 изучено, как добавление изоамилового, амилового и циклогексилового алифатических спиртов влияет на соотношение реакций 17 α -гидроксилирования и 3-О-ацетилирования в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α . За 4 ч биотрансформации при использовании амилового спирта наблюдалось уменьшение содержания неацетилированного 17 α -гидроксипрегненолона (как и при применении изоамилового спирта), тогда как при использовании циклогексанола отмечался менее выраженный эффект (см. таблицу).

Установлено, что в концентрациях до 0,5 % исследованные алифатические спирты не оказывали влияния на рост используемого штамма дрожжей, что позволяет предположить отсутствие общего токсического эффекта. Возможная причина уменьшения степени 3-О-ацетилирования стероидов исследованными алифатическими спиртами заключалась в конкурентном превращении спирта и стероида ферментом Atf2p, что подтверждается каталитическими свойствами Atf2p [21, 22], а также сходством геометрии цикла А прегненолона и исследуемых спиртов (рис. 2).

Содержание прегненолона, 17 α -гидроксипрегненолона и их 3-О-ацетатов (%) при биотрансформации прегненолона индуцированными клетками *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α (Preg, 17-Preg, Pac и 17-Pac-прегненолона, 17 α -гидроксипрегненолона, прегненолона 3-О-ацетата и 17 α -гидроксипрегненолона 3-О-ацетата соответственно), %

Relative content of pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone and their 3-O-acetates (%) during the biotransformation of pregnenolone by induced *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α cells (Preg, 17-Preg, Pac и 17-Pac-pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone, pregnenolone 3-O-acetate и 17 α -hydroxypregnenolone 3-O-acetate, respectively), %

Время биотрансформации	Спирт	Preg	17-Preg	Pac	17-Pac
2 ч	Изоамиловый	82,7	13,6	2,6	1,1
	Циклогексиловый	85,6	7,5	3,4	3,4
	Амиловый	86,9	9,8	3,3	0,0
	Этиловый (контроль)	77,1	8,2	9,9	4,9
4 ч	Изоамиловый	60,6	14,5	21,2	3,7
	Циклогексиловый	15,4	4,2	66,5	13,8
	Амиловый	60,9	14,4	21,2	3,6
	Этиловый (контроль)	4,3	2,8	74,9	18,1

Примечание. Preg – прегненолон, 17-Preg – 17 α -гидроксипрегненолон, Pac – прегненолон 3-О-ацетат, 17-Pac – 17 α -гидроксипрегненолон 3-О-ацетат.

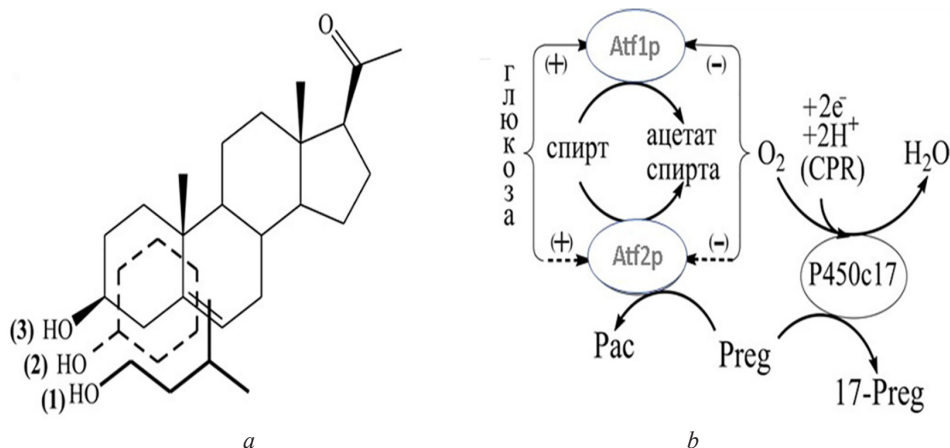


Рис. 2. Структуры субстратов Atf2p и предполагаемый характер их совместного метаболизма с помощью P450c17 и Atf2p в *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a: а – схожие фрагменты структур гипотетического (2) и установленных (1 и 3) субстратов Atf2p (1 – изоамиловый спирт (жирная сплошная), 2 – циклогексанол (жирная пунктирная), 3 – прегненолон (тонкая сплошная)); б – предложенная схема начального этапа совместного метаболизма алифатических спиртов и прегненолона в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a и потенциальное влияние кислорода и глюкозы на данный процесс [6]. Preg, 17-Preg и Pac – прегненолон, 17 α -гидроксипрегненолон и прегненолон 3-О-ацетат соответственно; (+) и (–) – индукция и репрессия биосинтеза ферментов Atf1p и Atf2p

Fig. 2. Structures of Atf2p substrates and the proposed pattern of their co-metabolism by P450c17 and Atf2p in *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a: a – similar fragments of the structures of hypothetical (2) and established (1 and 3) substrates of Atf2p (1 – isoamyl alcohol (fat solid), 2 – cyclohexanol (bold dotted line), 3 – pregnenolone (thin solid)); b – proposed scheme of the initial stage of the joint metabolism of aliphatic alcohols and pregnenolone in induced *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a cells and the potential influence of oxygen and glucose on this process according to [6]. Preg, 17-Preg and Pac – pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone and pregnenolone 3-O-acetate, respectively; (+) and (–) – induction and repression of the biosynthesis of the enzymes Atf1p and Atf2p

Наблюдаемая слабая конкуренция алифатических спиртов с прегненолоном может быть отнесена к быстрому ацетилированию спиртов посредством Atf1p, не способного превращать прегненолон в его ацетилированную форму, что отражено на рис. 2. Подавлению ацетилирования 3 β -гидроксистероидов в индуцированных клетках *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a, экспрессирующих P450c17, также может препятствовать понижение внутриклеточного содержания кислорода (репрессора гена Atf1p), который затрачивается на активность по P450c17-зависимому 17 α -гидроксилированию прегненолона (рис. 2). Изоамиловый спирт и его ацетат являются естественными метаболитами аминокислоты лейцина в дрожжах *S. cerevisiae*, а 2-метилбутиловый – естественным метаболитом изолейцина [24], что создает предпосылки для использования этой аминокислоты как регулятора ацетилирования прегненолона и родственных стероидов *S. cerevisiae*.

BLAST-анализ Y. lipolytica и превращение стероидов трансгенными штаммами, экспрессирующими P450c17. Анализ аминокислотных последовательностей белков протеома *Y. lipolytica* по базе NCBI (алгоритм BLAST) показал явное отсутствие аналогов Atf2p в этих дрожжах. Установлено также отсутствие гомологов (возможных функциональных аналогов Atf2p) и для дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [25] и *Pichia pastoris* [26], для которых показана функциональная активность *in cellulo* встроенных ферментов стероидогенеза млекопитающих, использующих прегненолон как субстрат (P450c17, CYP21, 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа) или как продукт (CYP11A1). Согласно нашим данным, для этих микроорганизмов не сообщалось об ацетилировании прегненолона и ДГЕА, однако у *Pichia fermentans* ITD00165 зарегистрировано образование ацетата изоамилового спирта [27]. Среди дрожжей и грибов белки с хорошей гомологией с Atf2p дрожжей *S. cerevisiae* обнаружены у *Nakaseomyces glabratus*, *Vanderwaltozyma polyspora* DSM 70294, *Tetrapisispora phaffii* CBS 4417 (покрытие последовательности не менее 98 %, E-value от 0.0 до 1e-172). Отрицательный результат поиска гомологов Atf2p получен и у других организмов, для которых описана экспрессия стероидогенных ферментов млекопитающих: у бактерии *E. coli* [28, 29], растений [30] и *Homo sapiens* [31]. Однако следует учитывать и возможность существования функциональных аналогов Atf2p, не характеризующихся высокой сте-

пению гомологии с ферментом-прототипом. Например, показано, что прегненолон в присутствии олеил-КоА человека способен превращаться в прегненолона олеат под действием ацилтрансферазы 1 (ACAT1), не являющейся гомологом Atf2p [32, 33]. При этом не установлено превращение прегненолона в 3-О-ацетат. Также важно отметить, что P450c17-экспрессирующие трансгенные клетки дрожжей, не имеющие Atf2p, как клеточная модель больше подходят для тестирования лекарственных веществ.

Биотрансформация прегненолона *Y. lipolytica* DE5-54.1. При использовании клеток *Y. lipolytica*, экспрессирующих P450c17 под контролем промотора *ICL1*, прегненолон за 6 ч количественно превращается в 17 α -гидроксиpregненолон без каких-либо дополнительных продуктов, включая 3-О-ацетаты (рис. 3).

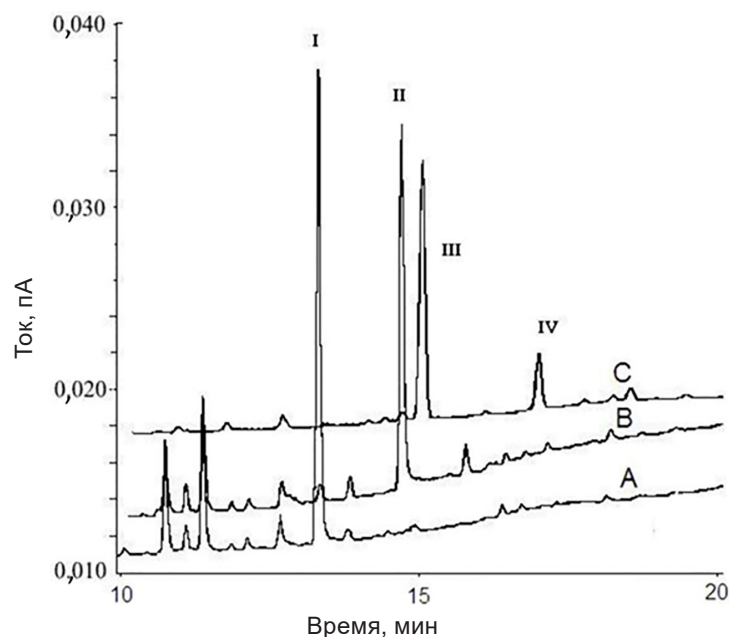


Рис. 3. Газохроматографический анализ проявления прегненолона рекомбинантными дрожжами *Y. lipolytica* и *S. cerevisiae*, экспрессирующими P450c17. I – прегненолон, II – 17 α -гидроксиpregненолон, III и IV – 3-О-ацетаты прегненолона и 17 α -гидроксиpregненолона; A, B – *Y. lipolytica* DE5-54.1 (0 и 6 ч биотрансформации соответственно), C – *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α (4 ч биотрансформации)

Fig. 3. Gas chromatography analysis of the manifestation of pregnenolone by recombinant yeasts *Y. lipolytica* and *S. cerevisiae* expressing P450c17. I – pregnenolone, II – 17 α -hydroxypregnenolone, III and IV – 3-O-acetates of pregnenolone and 17 α -hydroxypregnenolone; A, B – *Y. lipolytica* DE5-54.1 (0 and 6 h of biotransformation, respectively), C – *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117 α

Таким образом, показано отсутствие прегненолон-ацетилазной активности *Y. lipolytica* в условиях эксперимента. Возможно, это является следствием отсутствия соответствующих ферментов (данные BLAST) или незначительного уровня их экспрессии вследствие минимального использования глюкозы – потенциального индуктора Atf2p. Поскольку Atf2p не имеет хороших гомологов среди белков с известной трехмерной структурой из базы данных PDB, ранее было невозможно получить компьютерную модель этого фермента для прогноза связывания и превращения веществ по методологии докинга. Недавно на базе искусственного интеллекта AlphaFold2 были созданы алгоритм и сервис на его основе, где можно смоделировать трехмерную структуру белка по его аминокислотной последовательности (в настоящей работе смоделирована структура белка Atf2p). Далее эту структуру использовали для проведения докинга с прегненолоном и ДГЕА. В результате показана возможность связывания этих стероидов с Atf2p, что предполагает близкую колокализацию гидроксигрупп этих стероидов и имидазольного цикла гистидина 189 (His189) (рис. 4).

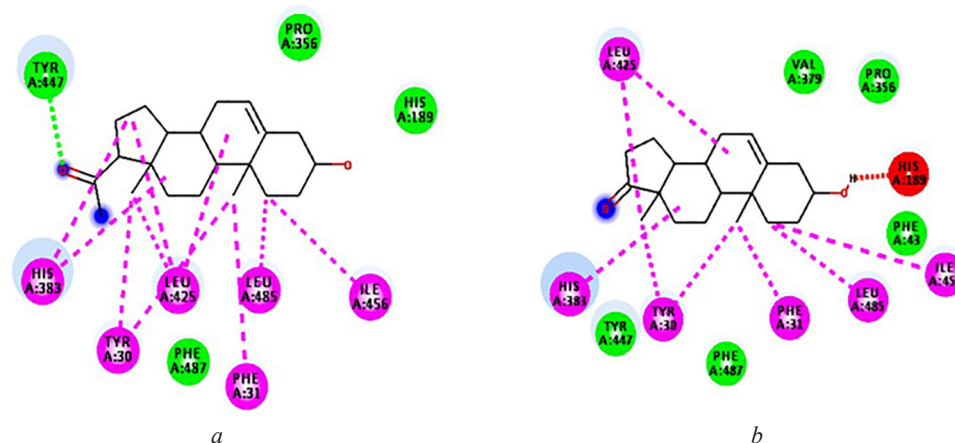


Рис. 4. Рассчитанные положения прегненолона (а) и ДГЕА (b) в полости модельной структуры Atf2p, показывающие возможную роль His189 в катализе переноса ацетильной группы на 3β-гидроксигруппу этих стероидов

Fig. 4. Calculated positions of pregnenolone (a) and DHEA (b) in the cavity of the Atf2p model structure, showing the possible role of His189 in catalyzing the transfer of the acetyl group to the 3β-hydroxy group of these steroids

Полученные результаты показали близкое расположение 3β-гидроксигруппы прегненолона и ДГЕА вблизи His189 этого белка. По данным литературы, остатки гистидина выполняют каталитические функции в различных ацил-КоА ацилтрансферазах [32, 33].

Согласно полученным результатам, в дрожжах *Y. lipolytica* прегненолон и 17α-гидрокси-прегненолон не подвергаются 3-О-ацетилированию вследствие отсутствия (по данным BLAST и данных о геноме этих дрожжей) аналога Atf2p. Данный факт наряду с разработкой этого организма как объекта генно-инженерных манипуляций по «встраиванию» систем экспрессии для ферментных систем стероидогенеза (P450ssc, аденодоксина, аденодоксин-редуктазы, P450c17) под контролем *ICL*-промотора [8, 9, 14–16] способствует созданию эффективных биокатализаторов получения стероидных гормонов. С другой стороны, трансгенные дрожжи *Y. lipolytica*, экспрессирующие P450c17, могут быть использованы как модель стероидогенных клеток млекопитающих для скрининга ингибиторов P450c17 – потенциальных лекарств для терапии рака простаты. Отсутствие 3-О-ацетилирования позволяет с помощью таких дрожжей тестировать ряд ингибиторов на основе производных 3β-гидрокси-Δ⁵-стероидов, в частности аналогов абиратерона – соединения-лидера при лечении рака предстательной железы [34], которые характеризуются большим сродством взаимодействия с P450c17 по сравнению с их аналогами 3-кето-Δ⁴-гидроксистероидов [31, 35, 36].

Заключение. Показано, что добавление алифатических спиртов – изоамилового и амилового – уменьшает степень ацетилирования прегненолона и 17α-гидрокси-прегненолона на среде YPD клетками дрожжей *S. cerevisiae* GRF18/YEp5117a, не содержащими и содержащими предварительно индуцированный D-галактозой P450c17. Этот эффект является следствием конкурентного метаболизма стероидных и нестероидных спиртов фермента Atf2p. Таким образом, реализован подход, позволяющий уменьшить нежелательные свойства генно-инженерного биокатализатора путем специальных добавок в среду для культивирования. Однако этот подход не обеспечил полного устранения побочной реакции вследствие токсичности спиртов при концентрациях более 1 % и их метаболизма ферментом Atf1p. В связи с этим была исследована другая комбинация «микроорганизм-хозяин и система экспрессии». Показано отсутствие прегненолон-ацетилазной активности у *Y. lipolytica* в условиях экспрессии встроенного P450c17 под контролем промотора *ICL1* из-за отсутствия, по данным гомологии, аналогов фермента Atf2p. Таким образом, нами продемонстрировано, как анализ генома микроорганизма-хозяина способствует прогнозу нежелательных свойств нового биокатализатора и минимизации числа необходимых генно-инженерных операций для его создания.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований (номера госрегистрации 20065241, 20103068 и 20210560).

Acknowledgements. The work was financially supported by the Government program for scientific research (numbers of state registration 20065241, 20103068 and 20210560).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Charney, W. Microbial transformation of steroids / W. Charney, H. L. Herzog. – New York: Academic Press, 1967. – 728 p.
2. Ахрем, А. А. Стероиды и микроорганизмы / А. А. Ахрем, Ю. А. Титов. – М.: Наука, 1970. – 525 с.
3. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments / P. Fernandes [et al.] // *Enzyme Microb. Technol.* – 2003. – Vol. 32, N 6. – P. 688–705. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
4. Новые подходы к синтезу стероидов / В. М. Шкуматов [и др.] // Выбранные научные работы Белорусского государственного университета: у 7 т. / В. В. Свирыдаў (адк. рэд.) [і інш.]. – Т. 5: Хімія. – Мінск, 2001. – С. 447–460.
5. Marshech, W. J. Microbial degradation of sterols / W. J. Marshech, S. Kraychy, R. D. Muir // *Appl. Microbiol.* – 1972. – Vol. 23, N 1. – P. 72–77. <https://doi.org/10.1128/am.23.1.72-77.1972>
6. Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism / G. Cauet [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 261, N 1. – P. 317–324. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00282.x>
7. Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian steroid hydroxylase CYP7B: Ayr1p and Fox2p display 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity / P. Vico [et al.] // *Yeast.* – 2002. – Vol. 19, N 10. – P. 873–886. <https://doi.org/10.1002/yea.882>
8. Биотрансформация стероидов рекомбинантным штаммом дрожжей, экспрессирующим бычий цитохром P-45017 α / В. М. Шкуматов [и др.] // *Биохимия.* – 2002. – Т. 67, № 4. – С. 547–560.
9. Окисление 17 α ,20 β - и 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-онов, побочных продуктов биотрансформации прогестерона, рекомбинантными микроорганизмами, экспрессирующими цитохром P-45017 α / В. М. Шкуматов [и др.] // *Биоорган. химия.* – 2003. – Т. 29, № 6. – С. 640–647.
10. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast / F. M. Szczebara [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21, N 2. – P. 143–148. <https://doi.org/10.1038/nbt775>
11. Manosroi, J. Enhancement of 17 α -hydroxyprogesterone production from progesterone by biotransformation using hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation technique / J. Manosroi, S. Saowakhon, A. Manosroi // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2008. – Vol. 112, N 4–5. – P. 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.10.003>
12. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications / P. Fickers [et al.] // *FEMS Yeast Res.* – 2005. – Vol. 5, N 6–7. – P. 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
13. Zinjarde, S. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 / S. Zinjarde, A. Pant // *J. Basic. Microbiol.* – 2002. – Vol. 42, N 1. – P. 67–73. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M)
14. Mauersberger, S. Cytochrome P450 expression in *Yarrowia lipolytica* and its use in steroid biotransformation / S. Mauersberger, L. A. Novikova, V. M. Shkumatov // *Yarrowia lipolytica* / ed. G. Barth. – New York, 2013. – P. 171–226. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38583-4_7
15. Влияние модификаторов биосинтеза стероидов на биотрансформацию прогестерона рекомбинантными микроорганизмами экспрессирующими цитохром P450c17 / В. М. Шкуматов [и др.] // *Биомед. химия.* – 2006. – Т. 52, № 3. – С. 298–308.
16. Субстратная специфичность и реакции биотрансформации стероидов, осуществляемые рекомбинантными микроорганизмами *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующими цитохром P450c17 / В. М. Шкуматов [и др.] // *Прикл. биохим. микробиол.* – 2006. – Т. 42, № 5. – С. 539–546.
17. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains / Yu. Zhang [et al.] // *Biotechnol. Lett.* – 2017. – Vol. 39, N 7. – P. 1033–1039. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2331-4>
18. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system / R. Zhang [et al.] // *ACS Synth. Biol.* – 2019. – Vol. 8, N 12. – P. 2666–2678. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00018>
19. Xu, S. Optimization of campesterol-producing yeast strains as a feasible platform for the functional reconstitution of plant membrane-bound enzymes / S. Xu, X. Teng, Y. Li // *ACS Synth. Biol.* – 2023. – Vol. 12, N 4. – P. 1109–1118. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00599>
20. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices / S. F. Altschul [et al.] // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272, N 20. – P. 5101–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>
21. Production of isoamyl acetate in acka-pta and/or ldh mutants of *Escherichia coli* with overexpression of yeast ATF2 / R. V. Vadali [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 63, N 6. – P. 698–704. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1452-y>
22. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene / T. Fujii [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1997. – Vol. 63, N 3. – P. 910–915. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.910-915.1997>
23. Expression of human liver cytochrome P450 IIIA4 in yeast. A functional model for the hepatic enzyme / J. Renaud [et al.] // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – Vol. 194, N 3. – P. 889–896. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19483.x>
24. Yuan, J. Engineering the leucine biosynthetic pathway for isoamyl alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae* / J. Yuan, P. Mishra, C. B. Ching // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 44, N 1. – P. 107–117. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1855-2>
25. Corticosteroid biosynthesis revisited: no direct hydroxylation of pregnenolone by steroid 21-hydroxylase / S. Loke [et al.] // *Front. Endocrinol. (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – Art. 633785. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.633785>
26. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase α 3 β 1 isoform / M. Hirz [et al.] // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97, N 21. – P. 9465–9478. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5156-7>
27. Screening of native yeast from *Agave duranguensis* fermentation for isoamyl acetate production / G. Hernández-Carbajal [et al.] // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2013. – Vol. 56, N 3. – P. 357–363. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300002>
28. Ehmer, P. B. Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli* / P. B. Ehmer, J. Jose, R. W. Hartmann // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 75, N 1. – P. 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00137-0)
29. Barnes, H. J. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli* / H. J. Barnes, M. P. Arlotto, M. R. Waterman // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, N 13. – P. 5597–5601. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5597>

30. *De novo* progesterone synthesis in plants [Electronic resource] / R. Li [et al.] // bioRxiv. – 2023. – Mode of access: <https://doi.org/10.1101/2023.07.19.549634>. – Date of access: 31.05.2024.
31. Prostate cancer androgen biosynthesis relies solely on CYP17A1 downstream metabolites / G. Snarterse [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2024. – Vol. 236. – Art. 106446. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106446>
32. Cellular pregnenolone esterification by acyl-CoA:cholesterol acyltransferase / M. A. Rogers [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, N 21. – P. 17483–17492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331306>
33. A critical role for the histidine residues in the catalytic function of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase catalysis: evidence for catalytic difference between ACAT1 and ACAT2 / S. An [et al.] // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580, N 11. – P. 2741–2749. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.035>
35. Inhibitors of enzymes of androgen biosynthesis: cytochrome P45017 α and 5 α -steroid reductase / M. Jarman [et al.] // *Nat. Prod. Reports.* – 1998. – Vol. 15, N 5. – P. 495–512. <https://doi.org/10.1039/A815495Y>
36. Differential induction of C6 glioma apoptosis and autophagy by 3 β -hydroxysteroid-indolamine conjugates / J. Panada [et al.] // *Steroids.* – 2023. – Vol. 200. – Art. 109326. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109326>

References

- Charney W., Herzog H. L. *Microbial transformation of steroids*. New York, Academic Press Publ., 1967. 728 p.
- Akhrem A. A., Titov Yu. A. *Steroids and microorganisms*. Moscow, Nauka Publ., 1970. 525 p. (in Russian).
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B., Pinheiro H. M., Cabral J. M. S. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, vol. 32, no. 6, pp. 688–705. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00029-2)
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Radyuk V. G., Frolova N. S., Raikov A. V., Novikova L. A., Nazarov P. A., Druitsa V. L., Luzikov V. N. New approaches to the synthesis of steroids. *Selected scientific practices of the Belarusian State University. Vol. 5. Chemistry*. Minsk, 2001, pp. 447–460 (in Russian).
- Marsheck W. J., Kraychy S., Muir R. D. Microbial degradation of sterols. *Applied Microbiology*, 1972, vol. 23, no. 1, pp. 72–77. <https://doi.org/10.1128/am.23.1.72-77.1972>
- Cauet G., Degryse E., Ledoux C., Spagnoli R., Achstetter T. Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. *European Journal of Biochemistry*, 1999, vol. 261, no. 1, pp. 317–324. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00282.x>
- Vico P., Cauet G., Rose K., Lathe R., Degryse E. Dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* expressing mammalian steroid hydroxylase CYP7B: Ayr1p and Fox2p display 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Yeast*, 2002, vol. 19, no. 10, pp. 873–886. <https://doi.org/10.1002/yea.882>
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Poljakov Y. S., Frolova N. S., Radyuk V. G., Mauersberger S., Chernogolov A. A., Honeck H., Schunck W.-H. Biotransformation of steroids by a recombinant yeast strain expressing bovine cytochrome P-45017 α . *Biochemistry (Moscow)*, 2002, vol. 67, no. 4, pp. 456–467 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/A:1015290108071>
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Radyuk V. G., Kashkan Zh. N., Kovganko N. V., Juretzek T., Mauersberger S. Oxidation of 17 α ,20 β - and 17 α ,20 α -dihydroxypregn-4-en-3-ones, side products of progesterone biotransformation with recombinant microorganisms expressing cytochrome P-45017 α . *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2023, vol. 29, pp. 581–587 (in Russian). <https://doi.org/10.1023/B:RUBI.0000008900.54667.d9>
- Szchebara F. M., Chandelier C., Villeret C., Masurel A., Bourot S., Duport C. [et al.]. Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature Biotechnology*, 2003, vol. 21, no. 2, pp. 143–148. <https://doi.org/10.1038/nbt775>
- Manosroi J., Saowakhon S., Manosroi A. Enhancement of 17 α -hydroxyprogesterone production from progesterone by biotransformation using hydroxypropyl- β -cyclodextrin complexation technique. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, vol. 112, no. 4–5, pp. 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.10.003>
- Fickers P., Benetti P.-H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M. S., Nicaud J.-M. Hydrophobic substrate utilization by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Research*, 2005, vol. 5, no. 6–7, pp. 527–543. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.09.004>
- Zinjarde S., Pant A. Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*, 2002, vol. 42, no. 1, pp. 67–73. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200203\)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200203)42:1<67::AID-JOBM67>3.0.CO;2-M)
- Mauersberger S., Novikova L. A., Shkumatov V. M. Cytochrome P450 expression in *Yarrowia lipolytica* and its use in steroid biotransformation *Yarrowia lipolytica*. New York, 2013, pp. 171–226. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38583-4_7
- Shkumatov V. M., Usova E. V., Frolova N. S., Barth G., Mauersberger S. Effect of steroid biosynthesis modifiers on progesterone biotransformation by recombinant yeasts expressing cytochrome P450c17. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, Suppl. Ser. B, vol. 1, pp. 87–94 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S1990750807010131>
- Shkumatov V. M., Frolova N. S., Rudaya E. V., Faletrov Ya. V., Mauersberger S., Barth G. Range of substrates and steroid bioconversion reactions performed by recombinant microorganisms *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* expressing cytochrome P450c17. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2006, vol. 42, pp. 472–478 (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S000368380605005x>
- Zhang Yu., Wang Y., Yao M., Liu H., Zhou X., Xiao W., Yuan Y. Improved campesterol production in engineered *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnology Letters*, 2017, vol. 39, no. 7, pp. 1033–1039. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2331-4>
- Zhang R., Zhang Y., Wang Y., Yao M., Zhang J., Liu H., Zhou X., Xiao W., Yuan Y. Pregnenolone overproduction in *Yarrowia lipolytica* by integrative components pairing of the cytochrome P450scc system. *ACS Synthetic Biology*, 2019, vol. 8, no. 12, pp. 2666–2678. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00018>
- Xu S., Teng X., Li Y. Optimization of campesterol-producing yeast strains as a feasible platform for the functional reconstitution of plant membrane-bound enzymes. *ACS Synthetic Biology*, 2023, vol. 12, no. 4, pp. 1109–1118. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.2c00599>
- Altschul S. F., Wootton J. C., Gertz E. M., Agarwala R., Morgulis A., Schäffer A. A., Yu Y.-K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal*, 2005, vol. 272, no. 20, pp. 5101–5109. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x>

21. Vadali R. V., Horton C. E., Rudolph F. B., Bennett G. N., San K.-Y. Production of isoamyl acetate in acka-pta and/or ldh mutants of *Escherichia coli* with overexpression of yeast ATF2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, vol. 63, no. 6, pp. 698–704. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1452-y>
22. Fujii T., Kobayashi O., Yoshimoto H., Furukawa S., Tamai Y. Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, vol. 63, no. 3, pp. 910–915. <https://doi.org/10.1128/aem.63.3.910-915.1997>
23. Renaud J., Cullin Ch., Pompon D., Beaune Ph., Mansuy D. Expression of human liver cytochrome P450 IIIA4 in yeast. A functional model for the hepatic enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 1990, vol. 194, no. 3, pp. 889–896. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19483.x>
24. Yuan J., Mishra P., Ching C. B. Engineering the leucine biosynthetic pathway for isoamyl alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2017, vol. 44, no. 1, pp. 107–117. <https://doi.org/10.1007/s10295-016-1855-2>
25. Loke S., Stoll A., Machalz D., Botrè F., Wolber G., Bureik M., Parr M. K. Corticosteroid biosynthesis revisited: no direct hydroxylation of pregnenolone by steroid 21-hydroxylase. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 2021, vol. 12, art. 633785. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.633785>
26. Hirz M., Richter G., Leitner E., Wriessnegger T., Pichler H. A novel cholesterol-producing *Pichia pastoris* strain is an ideal host for functional expression of human Na,K-ATPase $\alpha 3\beta 1$ isoform. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, vol. 97, no. 21, pp. 9465–9478. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5156-7>
27. Hernández-Carbajal G., Rutiaga-Quiñones O. M., Pérez-Silva A., Saucedo-Castañeda G., Medeiros A., Soccol C. R., Soto-Cruz N. Ó. Screening of native yeast from Agave duranguensis fermentation for isoamyl acetate production. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2013, vol. 56, no. 3, pp. 357–363. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000300002>
28. Ehmer P. B., Jose J., Hartmann R. W. Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17 α -hydroxylase-C17,20-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, vol. 75, no. 1, pp. 57–63. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(00\)00137-0](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00137-0)
29. Barnes H. J., Arlotto M. P., Waterman M. R. Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1991, vol. 88, no. 13, pp. 5597–5601. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.13.5597>
30. Li R., Guo S., Wang D., Yang T., Zhang X., Dai Z. *De novo* progesterone synthesis in plants. *BioRxiv*, 2023. Available at: <https://doi.org/10.1101/2023.07.19.549634> (accessed 31.05.2024).
31. Snaterse G., Taylor A. E., Moll J. M., O’Neil D. M., Teubel W. J., van Weerden W. M., Arlt W., Hofland J. Prostate cancer androgen biosynthesis relies solely on CYP17A1 downstream metabolites. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2024, vol. 236, art. 106446. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2023.106446>
32. Rogers M. A., Liu J., Kushnir M. M., Bryleva E., Rockwood A. L., Meikle A. W., Shapiro D., Vaisman B. L., Remaley A. T., Chang C. C. Y., Chang T. Y. Cellular pregnenolone esterification by acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 21, pp. 17483–17492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.331306>
33. An S., Cho K.-H., Lee W. S., Lee J.-O., Paik Y.-K., Jeong A. T.-S. A critical role for the histidine residues in the catalytic function of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase catalysis: evidence for catalytic difference between ACAT1 and ACAT2. *FEBS Letters*, 2006, vol. 580, no. 11, pp. 2741–2749. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.035>
35. Jarman M., Smith H. J., Nicholls P. J., Simons C. Inhibitors of enzymes of androgen biosynthesis: cytochrome P45017 α and 5 α -steroid reductase. *Natural Product Reports*, 1998, vol. 15, no. 5, pp. 495–512. <https://doi.org/10.1039/A815495y>
36. Panada J., Klopava V., Kulahava T., Koran S., Faletrov Y., Frolova N., Fomina E., Shkumatov V. Differential induction of C6 glioma apoptosis and autophagy by 3 β -hydroxysteroid-indolamine conjugates. *Steroids*, 2023, vol. 200, art. 109326. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109326>

Информация об авторах

Фалетров Ярослав Вячеславович – канд. хим. наук, доцент, вед. науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета (ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslav82@tut.by

Фролова Нина Степановна – науч. сотрудник. Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета (ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: frolova_n_2006@bk.ru

Штефан Мауерсбергер – д-р наук, ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии Дрезденского технологического университета (Хедда Фогель, 01062, г. Дрезден, Германия).

Шкуматов Владимир Макарович – член-корреспондент, д-р биол. наук.

Information about the authors

Yaroslav V. Faletrov – Ph. D. (Chem.), Associate Professor, Leading Researcher. Research Institute for Physicochemical Problems of Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslav82@tut.by

Nina S. Frolova – Researcher. Research Institute for Physicochemical Problems of Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: frolova_n_2006@bk.ru

Stephan Mauersberger – D. Sc., Senior Researcher. Institute of Microbiology, Dresden University of Technology (Hedda Vogel, 01062, Dresden, Germany). E-mail: Stephan.Mauersberger@tu-dresden

Vladimir M. Shkumatov – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.).