

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Ефимовой Веры Сергеевны
на тему: «Реконструкция энзиматической
холестерингидроксилазной/лиазной системы быка
в гетерологичных клетках»
по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа Ефимовой Веры Сергеевны посвящена реконструкции и изучению функционирования холестерингидроксилазной/лиазной системы (ХГЛ-системы) быка в гетерологичных клетках бактерий, дрожжей и человека. ХГЛ-система представляет собой трехкомпонентную монооксигеназную систему цитохрома P450_{scs}, катализирующую первую стадию стероидогенеза млекопитающих – превращение холестерина в прегненолон. Несмотря на наличие опубликованных данных о составе и функционировании ХГЛ-системы млекопитающих, в литературе имеется небольшое количество работ, описывающих функционирование системы *in vivo* в живых клетках. Проведенное исследование, несомненно, является актуальным ввиду изучения функционирования ХГЛ-системы *in vivo* в клетках бактерий в отсутствие других цитохромов P450, накладывающих отпечаток на спектр получаемых продуктов реакции и активность системы. Кроме этого, в работе разработана методика совместной экспрессии генов с использованием небольших последовательностей, кодирующих саморасщепляющийся пептид 2А вируса ящура. Наконец, работа имеет практическую ценность, поскольку создание трансгенных микроорганизмов, способных осуществлять продукцию прегненолона, может значительно облегчить и удешевить процесс получения лекарственных препаратов стероидной природы.

Структура диссертационной работы соответствует общепринятым стандартам: работа включает введение, обзор литературы, описание

использованных материалов и методов, результаты, их обсуждение, выводы и список литературы, насчитывающий 220 источников.

В исчерпывающем обзоре литературы соискатель подробно излагает современные представления о структуре и функциях компонентов ХГЛ-системы и цитохромов P450 в целом, о подходах, используемых для создания трансгенных микроорганизмов, приводит примеры применения трансгенных организмов, несущих гены цитохромов P450 млекопитающих, в медицине и биотехнологии, а также подробно разбирает особенности методического подхода с использованием пептида 2А вируса ящура, который применяется в диссертационном исследовании для реконструкции ХГЛ системы.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны все методы, использованные в работе. При необходимости все методики можно воспроизвести.

Все полученные в работе результаты подробно описаны и наглядно проиллюстрированы наличием большого числа рисунков и таблиц. Все эксперименты в работе были выполнены многократно. Возможность альтернативных интерпретаций исключается постановкой необходимых контрольных экспериментов. Таким образом, все полученные результаты являются достоверными.

Полученные результаты и сделанные выводы также обладают высокой степенью научной новизны. В частности, впервые энзиматическая система цитохрома P450_{scs}, состоящая из трех белков, была реконструирована в клетках в форме саморасщепляющегося полипротеина, включающего пептиды 2А. В результате работы были получены штаммы бактерии *E. coli*, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Yarrowia lipolytica* и клетки линии НЕК293Т с реконструированной ХГЛ-системой, способные превращать холестерин в прегненолон. При этом полученный штамм *Y. lipolytica* демонстрирует высокоэффективную продукцию прегненолона *in vivo*. В экспериментах с использованием трансформированных бактериальных клеток было продемонстрировано, что в значительной степени их активность

ограничивается неэффективным поступлением холестерина через клеточную стенку. В клеточной линии НЕК293Т было наглядно продемонстрировано отсутствие эндогенных стероидогенных белков цитохрома P450_{ssc} и 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы при наличии в митохондриях белков-переносчиков электронов, которые способны к образованию активной системы с P450_{ssc} быка.

Все полученные в работе результаты обсуждаются в контексте опубликованных данных литературы. Сформулированные выводы научно обоснованы и логично вытекают из представленных экспериментов.

По материалам диссертации было опубликовано четыре статьи в рецензируемых зарубежных научных изданиях, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. В трех опубликованных статьях фамилия соискателя стоит на первом месте в списке авторов, что говорит о значительном личном вкладе автора в выполненную работу.

Тем не менее, по прочтении работы считаю целесообразным высказать следующие замечания и вопросы:

1. Активность ХГЛ-системы в клетках НЕК293Т нормировали на одну трансфицированную клетку, однако в работе автор не сообщает о том, как оценивался уровень трансфекции – посредством визуальной оценки количества флуоресцирующих клеток или методом проточной цитометрии?
2. При описании получения и анализа гаплоидных трансформантов дрожжей *Y. lipolytica* автор утверждает, что с использованием зонда для Саузерн-блоттинга «было определено примерное количество интегрированных в геном копий гетерологичной кДНК и выбраны трансформанты, в геном которых встроилось максимальное количество копий». Однако, какие-либо подробные данные о количестве копий интегрированной ДНК отсутствуют.

Высказанные замечания не снижают высокой ценности и значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ефимова Вера Сергеевна несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук

Гаврилов Алексей Александрович



20.05.19

Контактные данные:

тел.: 7(977)802-03-60, e-mail: aleksey.gavrilov@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.03 – «молекулярная биология»

Адрес места работы:

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
биологии гена Российской академии наук, Группа пространственной
организации генома

Тел.: 7(499)135-97-87; e-mail: info@genebiology.ru

Подпись Гаврилова А.А. удостове

Ученый секретарь ИБГ РАН, д.б.н.



Набирочкина Е.Н.

20.05.19