

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора Калининой Натальи Олеговны, на диссертационную работу **Ефимовой Веры Сергеевны** «Реконструкция энзиматической холестерингидроксилазной/лиазной системы быка в гетерологичных клетках», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология».

Холестерингидроксилазная/лиазная (ХГЛ) система представляет собой сложно организованную энзиматическую P450-систему I класса, в состав которой входят цитохром P450<sub>ssc</sub> и два белка-переносчика электронов: ферредоксин - адренодоксин (Adx), и NADPH-зависимая флавиновая редуктаза – адренодоксинредуктаза (AdR). ХГЛ система локализуется в митохондриях клеток стероидогенных тканей млекопитающих и выполняет первую стадию стероидогенеза - превращение холестерина в прегненолон, который является предшественником всех стероидных гормонов в организме млекопитающих. Изучение белков стероидогенных P450-систем, в том числе и ХГЛ системы, которая лимитирует скорость всего процесса стероидогенеза, в клетках стероидогенных органов затруднено в силу ряда причин, вследствие чего для изучения особенностей формирования и функционирования таких систем используют модели их реконструкции на основе гетерологичных клеток. С начала 90-х годов прошлого века предпринимались попытки реконструкции ХГЛ системы в клетках бактерий, дрожжей и нестероидогенных клетках млекопитающих. Хотя принципиальная возможность такого подхода была продемонстрирована, получение реконструированной высокоэффективной ХГЛ системы и данные о ее функционировании ограничиваются несколькими примерами и являются актуальной задачей. Целью диссертационной работы Веры Сергеевны Ефимовой была реконструкция и оптимизация функционирования ХГЛ системы быка в клетках прокариотических и эукариотических организмов для дальнейшего использования системы в фундаментальных исследованиях и для реализации прикладных задач. Следует отметить, что Вере Сергеевне удалось успешно выполнить поставленные задачи: функционально активная ХГЛ система быка реконструирована в различных типах клеток, что позволило получить разнообразные характеристики и изучить особенности функционирования системы. Впервые функционально активная ХГЛ система быка реконструирована в дрожжах *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica* и клетках человека (линии НЕК293Т) в форме саморасщепляющегося полипротеина, включающего белки ХГЛ системы, разделенные пептидами 2А вируса ящура. Полученные в диссертационной работе модельные системы могут быть использованы как для фундаментальных исследований, направленных на выяснение деталей процесса стероидогенеза, так и для решения прикладных задач, в частности, для создания биотехнологических систем, обеспечивающих синтез физиологически активных стероидных соединений.



Диссертация написана по классической схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, разделов «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение результатов», Выводов и Списка литературы. Диссертационная работа изложена на 163-х страницах машинописного текста, содержит 50 рисунков и 7 таблиц. Список использованной литературы включает 220 источников.

Во Введении описаны актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, проблемы, на решение которых направлена работа, и сформулированы основные цели, задачи исследования и положения, выносимые на защиту. В «Обзоре литературы» детально описаны и проанализированы литературные данные по теме диссертации. Обзор состоит из семи разделов. В первом разделе дано краткое описание организации монооксигеназных систем цитохромов P450 десяти существующих классов и приведена схема каталитической реакции. Второй раздел содержит основные сведения о стероидогенезе в организме млекопитающих. Третий раздел посвящён детальному анализу данных о ХГЛ системе коры надпочечников млекопитающих: в нем приведена характеристика и структурная организация всех компонентов системы. В четвертом разделе описаны модельные системы для реконструкции систем цитохромов P450 в гетерологичных клетках, обсуждены проблемы, с которыми приходится сталкиваться исследователям, и подходы, используемые для их решения. В частности, подробно описаны методы совместной экспрессии генов, в том числе в составе одной экспрессионной кассеты. Два следующих раздела подробно останавливаются на методе совместной экспрессии генов, основанном на применении нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид 2A вируса ящура и 2A-подобные пептиды (механизм процессинга полипротеина, кодируемого геномом вируса ящура путем «саморасщепления» пептида 2A). Особое внимание в разделе уделено применению подобного подхода для продукции белков для целей биотехнологии и медицины. Проблемы экспрессии генов белков ХЛГ системы в гетерологичных клетках описаны в шестом разделе, проведен анализ подходов, позволяющих оптимизировать модельные системы. В этом разделе приведены результаты, ранее полученные в лаборатории. Последний раздел посвящён практическому применению в биотехнологии и фармакологии трансгенных микроорганизмов с реконструированными системами млекопитающих, гидроксиллирующих стероиды. Обзор написан хорошим литературным языком, иллюстрирован 14 рисунками и дает полное представление о современном состоянии проблемы. Обзор может быть рекомендован к отдельной публикации.



Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием самых современных подходов. В разделе «Материалы и методы» автор достаточно полно описывает все использованные в ходе выполнения работы экспериментальные процедуры. Описание использованных методов позволяет их воспроизведение. Основные методы данной работы - это генно-инженерные методы, которыми профессионально владеет соискатель. В работе также использован широкий спектр современных молекулярно-биологических, биохимических и микробиологических методов. Для реконструкции ХГЛ системы млекопитающих в гетерологичных клетках впервые использован подход, основанный на применении полицистронных плазмидных конструкций, включающих гены целевых белков и линкерные последовательности, кодирующие 2А-пептид вируса ящура, обеспечивающий образование индивидуальных белков в процессе трансляции. При конструировании рекомбинантных штаммов дрожжей использовалось сочетание генно-инженерных и микробиологических подходов: создание кДНК с использованием 2А-линкеров, мультикопийная интеграция кДНК в повторяющиеся элементы генома дрожжей, а также скрещивание гаплоидных трансформантов. Следует также отметить методы, использованные для изучения характеристик реконструированной системы: метод ИФА, метод иммуно-блоттинга, метод ВЭЖХ для оценки активности ХГЛ системы в биотрансформации холистерина в прегненолон и методы клеточной биологии для оценки внутриклеточной локализации белков.

Раздел «Результаты» содержит описание поставленных автором экспериментов и полученных результатов. Этот раздел обширен: 42 страницы, 36 рисунков, 7 таблиц. Соискателем проведена впечатляющая по объему работа: ХГЛ система быка была реконструирована, а характеристики ее исследованы в четырех модельных системах в клетках *E. coli*, в клетках двух видов дрожжей и клетках эмбриональных почек человека линии НЕК293Т. На первом этапе исследования проведена реконструкция ХГЛ системы в клетках *E. coli* с использованием полицистронной кассеты экспрессии, включающей гены белков ХГЛ системы и расположенные перед ними последовательности, кодирующие участки посадки рибосом. На этой модели исследованы некоторые особенности функционирования данной системы в живых бактериях. В частности, показано, что изменение порядка генов в кассете экспрессии рекомбинантной плазмиды приводит к изменению стехиометрического соотношения синтезируемых гетерологичных белков и, как следствие, к некоторому изменению активности реконструированной ХГЛ системы. Показано, что аминокислотные остатки Иле351, Иле461 и Лей355 в последовательности цитохрома P450scs и Сер112 в последовательности Adx являются важными для их функционирования, а фактором, лимитирующим ХГЛ активность клеток



*E. coli in vivo*, является низкая эффективность поступления стероидного субстрата в клетку. Эта система, хотя и не обеспечивает высокой степени трансформации холестерина в прегненолон, может успешно использоваться в дальнейшем для фундаментальных исследований.

Следующий этап работы был направлен на реконструкцию ХГЛ системы в клетках дрожжей *S. cerevisiae*. Для осуществления совместной продукции трех белков ХГЛ системы быка в клетках дрожжей впервые был использован подход, основанный на применении полицистронных плазмид, включающих гены целевых белков и линкерные последовательности, кодирующие «саморасщепляющийся» пептид 2А вируса ящура, обеспечивающий образование индивидуальных белков в процессе трансляции. Сконструированный в процессе работы вектор pYeDP/pCoxIV-CHL-2A эффективно направлял в клетках *S. cerevisiae* синтез полипротеина pCoxIV-P450scc-2A-Adx-2A-AdR (pCoxIV-CHL-2A), во время трансляции которого происходило образование функционально активных индивидуальных белков P450scc-2A, Adx-2A и AdR, хотя и наблюдалось значительное количество слитого белка Adx-2A-AdR. Показано, что эффективность расщепления 2А-содержащего полипротеина зависит от его аминокислотной последовательности и типа используемых пептидов 2А и не зависит от типа эукариотической клетки. Образующиеся в клетках *S. cerevisiae* белок-предшественник pCoxIV-P450scc-2A и зрелые белки Adx-2A, AdR и Adx-2A-AdR в основном локализуются правильно соответственно в митохондриях и цитозоле.

На следующем этапе работы в клетках линии HEK293T успешно ко-экспрессированы гены цитохрома P450scc, Adx и AdR, находящиеся в составе полицистронной плазмиды и разделенные последовательностями, кодирующими пептид 2А вируса ящура. Распределение продуктов «расщепления» полипротеина pCoxIV-CHL-GFP в клетках HEK293T также аналогично распределению образующихся белков-компонентов pCoxIV-CHL-2A в клетках *S. cerevisiae*. Клетки HEK293T, трансфицированные вектором pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, согласно результатам ВЭЖХ, эффективно метаболизировали 22-гидроксихолестерин, а также холестерин, 20 $\alpha$ -гидроксихолестерин и 22-NBD-холестерин в прегненолон. Существенно, что ХГЛ активность клеток HEK293T, трансфицированных векторами pcDNA 3.1/pCoxIV-CHL-GFP и pcDNA 3.1/pCoxIV-P450-2A-GFP, сравнима с активностью природных стероидогенных клеток млекопитающих. Получены данные, указывающие на то, что клетки HEK293T могут рассматриваться как нестероидогенные и пригодные для экспрессии и изучения характеристик стероидогенных белков, поскольку в данных



клетках отсутствуют цитохром P450<sub>scs</sub> и 3β-гидроксистероиддегидрогеназа и в то же время в клетках НЕК293Т имеются редокс-партнеры, способные функционировать в сопряжении со стероидогенными цитохромами P450.

В заключительной части работы соискатель постарался использовать все апробированные на предыдущих этапах методические подходы, чтобы достичь максимально высокого уровня экспрессии гетерологичных генов в клетках дрожжей *Y. lipolytica*. Во-первых, была сконструирована кДНК, включающая гены всех трех белков ХГЛ системы P450<sub>scs</sub>, Adx и AdR, разделенные последовательностями, кодирующими пептиды F2A вируса ящура и T2A вируса *Thosea asigna*, которые позволяют наиболее эффективное из всех исследованных 2A-полипротеинов образование индивидуальных белков. Во-вторых, был применен метод мультикопийной интеграции гетерологичной кДНК в повторяющиеся элементы генома (в среднем осуществляется интеграция 10-15 копий кДНК). В-третьих, для увеличения количества копий кДНК на клетку дрожжей было использовано скрещивание гаплоидных трансформантов разного полового типа. В результате в рекомбинантных клетках *Y. lipolytica* диплоидного штамма DE131 были идентифицированы синтезирующиеся индивидуальные белки ХГЛ системы. Кроме того, в отличие от рекомбинантных клеток *S. cerevisiae*, полученный трансгенный штамм *Y. lipolytica* проявлял ХГЛ активность *in vivo*. Несмотря на то, что ХГЛ активность полученного штамма *Y. lipolytica* недостаточно высокая, его способность к биотрансформации холестерина в прегненолон *in vivo* указывает на возможность проведения оптимизации условий культивирования штамма для увеличения его активности, что делает его перспективным для применения в биотехнологических целях.

Наконец, следует особо отметить отличное написание раздела «Обсуждение результатов». Соискатель подробно с многочисленными ссылками на литературные источники анализирует полученные данные. Тщательно проанализированы и обсуждены все этапы исследования и подходы для создания оптимальной генетической конструкции для максимально высокого уровня экспрессии гетерологичных генов.

В заключении хочется отметить, что научные положения и выводы, сформулированные соискателем, обоснованы, аргументированы, не вызывают сомнений и полностью соответствуют поставленным в диссертационной работе задачам. Представленная работа, несомненно, обладает научной новизной и практической значимостью. Полученные данные расширяют представление об особенностях функционирования ХГЛ системы млекопитающих в гетерологичных клетках. Полученные модельные системы на основе трансфицированных клеток и трансгенных клеток дрожжей



перспективны для использования в фундаментальных исследованиях и для прикладных разработок.

Текст автореферата полно отражает содержание диссертации, включает поставленные задачи, положения, выносимые на защиту, основные результаты, заключение и выводы. Основные результаты работы отражены в 4 публикациях, все в международных журналах, и доложены на 5 международных конференциях.

Несмотря на значительный объем работы замечания, касающиеся оформления практически отсутствуют. Диссертация и автореферат написаны хорошим литературным языком и практически не содержат опечаток и стилистических неточностей. К числу немногочисленных замечаний относятся следующие: определение «слитой» белок или «слитой» полипротеин – правильное - слитый и полипротеин. Содержание белков (цитохрома P450<sub>scs</sub>, Adx и AdR) в гомогенатах рекомбинантных клеток приводится в нмоль/мг белка гомогената на основании данных метода Вестерн-блоттинга и хемилюминесцентной детекции и дано с указанием тысячных долей (!). Наконец, раздел «Выводы». Большой объем работы оправдывает значительное число выводов. Однако, на мой взгляд, вывод 4 можно было бы убрать. Вывод 5 объединить с выводом 7, причем в выводе 5 описать конкретные результаты – «увеличивает появление индивидуальных белков». Вывод 6 логически должен быть последним и, наверное, следовало бы указать, что получен трансгенный мультিকопийный штамм. Вопрос, возникающий к постановке одного из экспериментов: почему, если мутация в гене Adx снижала активность системы, были поставлены эксперименты по увеличению количества копий мутантного гена Adx\* в составе использованной рекомбинантной плазмиды? Указанные недостатки не являются существенными и не снижают научной значимости работы.

Диссертационная работа Ефимовой Веры Сергеевны «Реконструкция энзиматической холестерингидроксилазной/лиазной системы быка в гетерологичных клетках» является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком теоретическом и экспериментальном уровне, которая имеет фундаментальное значение и перспективы практического применения. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. 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, а также оформлена, согласно

приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета 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, профессор,  
ведущий научный сотрудник  
лаборатории генной инженерии вирусов  
отдела биохимии вирусов растений  
Научно-исследовательского института  
физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского  
МГУ имени М.В.Ломоносова  
Калинина Наталья Олеговна

23.05.2019

Контактные данные:

тел.: 7(495)9395366, e-mail: kalinina@genebee.msu.ru  
Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:  
03.01.03 – «молекулярная биология».

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40,  
Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,  
НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского  
Тел.: 8(494)939-53-59; e-mail: fxb@genebee.msu.ru



Подпись сотрудника Калининой Н.О.

удостоверяю:

Зав. канцелярией НИИ ФХБ имени А.Н.Бело:  
МГУ имени М.В.Ломоносова