

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ефимова Вера Сергеевна

**Реконструкция энзиматической
холестерингидроксилазной/лиазной
системы быка в гетерологичных клетках**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре молекулярной биологии Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в отделе молекулярных основ онтогенеза Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научные руководители

Рубцов Михаил Александрович, кандидат биологических наук

Новикова Людмила Александровна, доктор биологических наук

Официальные оппоненты

Вейко Владимир Петрович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»

Калинина Наталья Олеговна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник отдела биохимии вирусов растений Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ имени М.В.Ломоносова

Гаврилов Алексей Александрович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель Группы пространственной организации генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена» РАН

Защита диссертации состоится «06» июня 2019 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.01 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/>.

Автореферат разослан _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т. В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В организме млекопитающих стероидные гормоны регулируют жизненно важные функции (углеводный и водно-солевой обмен, половую дифференциацию, эмбриональное развитие, иммунный ответ и т. д.). Нарушения функционирования цитохромов P450, обеспечивающих синтез стероидных гормонов, приводят к серьезным заболеваниям. Первую ключевую стадию стероидогенеза осуществляет холестерингидроксилазная/лиазная (ХГЛ) система, включающая цитохром P450_{ssc}, катализирующий превращение холестерина в предшественник всех стероидных гормонов прегненолон, и белки-переносчики электронов: [2Fe-2S] ферредоксин - адренодоксин (Adx), и NADPH-зависимую флавиновую редуктазу - адренодоксинредуктазу (AdR).

Поскольку изучение белков стероидогенных P450-систем, в том числе и ХГЛ системы, в клетках стероидогенных органов затруднено (вследствие присутствия в них нескольких изоформ цитохромов P450), актуальной задачей является создание моделей для их изучения на основе гетерологичных клеток. Трансгенные штаммы микроорганизмов и линии клеток с реконструированной ХГЛ системой 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.

Степень разработанности темы. Впервые реконструкция стероидогенной монооксигеназной ХГЛ системы была выполнена путем экспрессии кДНК, кодирующей трехкомпонентный слитой белок P450_{ssc}-AdR-Adx в клетках млекопитающих линии COS-1, где данный белок демонстрировал ХГЛ активность, превышающую активность ХГЛ системы, состоящей из отдельных белков (Harikrishna et al., 1993). Однако, аналогичные слитые полипротеины в клетках бактерий и дрожжей демонстрировали низкую активность и подвергались протеолизу (Nazarov et al., 2003, Savel'ev et al., 1998). Продукция трех индивидуальных белков ХГЛ системы - P450_{ssc}, AdR и Adx – была осуществлена в нашей лаборатории в клетках *E. coli* и дрожжей *Yarrowia lipolytica* (Shashkova et al., 2006, Makeeva et al., 2013, Novikova et al., 2009), однако, активность полученных рекомбинантных штаммов также была низкой. В выдающейся работе Szczebara et al., 2003, создан рекомбинантный штамм *S. cerevisiae*, в котором объединены стероидогенные пути двух организмов: биосинтез эргостерола дрожжей и биосинтез кортизола клеток млекопитающих. Полученные дрожжи синтезировали кортизол, используя этанол в качестве субстрата. Данная работа продемонстрировала принципиальную

возможность реконструкции активных стероидогенных систем в микроорганизмах. Во время выполнения настоящей работы с использованием полицистронного вектора высокоэффективная ХГЛ система была реконструирована в клетках бактерии *Bacillus megaterium* (Gerber et al., 2015). В литературе представлено небольшое количество данных о функционировании ХГЛ системы в живых клетках, поэтому для успешного создания трансгенных организмов с высокоэффективной ХГЛ системой необходимо предварительное изучение свойств белков данной системы в различных организмах-хозяевах, поскольку функционирование гетерологичных белков может зависеть от типа клетки или ткани.

Цель работы: реконструкция и оптимизация функционирования холестерингидроксилазной/лиазной (ХГЛ) системы быка в клетках прокариотических и эукариотических организмов для их дальнейшего использования в фундаментальных исследованиях и, в случае получения системы с высокой активностью, для практических целей.

Задачи работы:

1. Реконструкция ХГЛ системы быка в клетках *E. coli* и оптимизация ее функционирования посредством изменения соотношения гетерологичных белков в клетках, использования их мутантных версий и изменения условий культивирования клеток.
2. Оценка возможности использования подхода, основанного на применении саморасщепляющихся вирусных пептидов 2А, для реконструкции энзиматической ХГЛ системы быка в клетках дрожжей.
3. Сравнительный анализ экспрессии кДНК, кодирующей полипротеин, включающий белки ХГЛ системы и пептиды 2А, в клетках дрожжей и человека.

Научная новизна. С использованием полученного штамма клеток *E. coli* с реконструированной ХГЛ системой быка 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 изменению активности реконструированной ХГЛ системы, а также, что фактором, лимитирующим ХГЛ активность клеток *in vivo*, является эффективность поступления субстрата в клетку. Показано, что аминокислотные остатки Иле351, Иле461 и Лей355 в последовательности цитохрома P450_{ssc} и Сер112 в последовательности Adx являются важными для их функционирования. Впервые продемонстрировано, что метод, основанный на использовании

саморасщепляющегося вирусного пептида 2А, может успешно применяться для реконструкции ХГЛ системы в клетках дрожжей и млекопитающих. Обнаружено, что эффективность расщепления 2А-содержащего полипротеина зависит от его аминокислотной последовательности и типа используемых пептидов 2А и не зависит от типа эукариотической клетки. Получены данные, указывающие на то, что клетки НЕК293Т могут рассматриваться как нестероидогенные и пригодные для экспрессии и изучения характеристик стероидогенных белков, поскольку в данных клетках отсутствуют цитохром P450_{ssc} и 3β-гидроксистероиддегидрогеназа и в то же время в клетках НЕК293Т имеются редокс-партнеры, способные функционировать в сопряжении со стероидогенными цитохромами P450.

Научная и практическая значимость. Полученные данные расширяют представление об особенностях функционирования ХГЛ системы млекопитающих в гетерологичных клетках. Полученные трансгенные клетки могут быть использованы для фундаментальных исследований и прикладных разработок.

Личный вклад автора. Соискатель самостоятельно проводил анализ имеющейся литературы, планировал и проводил эксперименты, обработку и интерпретацию полученных данных, самостоятельно представлял результаты исследований на конференциях и принимал участие в подготовке публикаций результатов.

Методология и методы исследования. В работе использовался 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 саморасщепляющийся 2А-пептид вируса ящура, обеспечивающий образование индивидуальных белков в процессе трансляции. При конструировании рекомбинантных штаммов дрожжей использовалось сочетание генно-инженерных и микробиологических подходов: создание слитой кДНК с использованием 2А-линкеров, мультикопийная интеграция кДНК в повторяющиеся элементы генома дрожжей, а также скрещивание гаплоидных трансформантов.

Положения, выносимые на защиту

1. Клетки *E. coli* с реконструированной холестерингидроксилазной/лиазной (ХГЛ, CHL) системой быка, включающей цитохром P450_{ssc}, аденодоксинредуктазу (AdR) и аденодоксин (Adx), способны осуществлять конверсию холестерина в прегненолон; критическим фактором, лимитирующим ХГЛ-активность полученного штамма, является эффективность поглощения холестерина клетками.

2. Клетки *E. coli* с реконструированной ХГЛ системой могут использоваться в качестве модельной системы для фундаментальных исследований. С их использованием показано, что аминокислотные остатки Иле351, Иле461 и Лей355 в последовательности цитохрома P450_{scs} и Сер112 в последовательности Adx являются важными для их функционирования.

3. Штаммы дрожжей и клетки человека с реконструированной функционально активной ХГЛ системой быка могут быть получены с использованием кДНК, кодирующей саморасщепляющийся полипротеин, включающий белки ХГЛ системы и пептиды 2А вируса ящура

4. Клетки рекомбинантного штамма дрожжей *Y. lipolytica* с реконструированной ХГЛ системой быка способны осуществлять эффективную биотрансформацию холестерина *in vivo*.

5. Присутствие на С-конце цитохрома P450_{scs} дополнительных 18 аминокислот, происходящих из 2А-пептида, не препятствует проявлению его каталитической активности.

6. Эффективность расщепления 2А-содержащего полипротеина CHL-2А и локализация образующихся белков в эукариотических клетках дрожжей *S. cerevisiae* и клетках НЕК293Т не зависят от типа клеток, а определяются аминокислотной последовательностью полипротеина.

7. В митохондриях клеток НЕК293Т отсутствуют цитохром P450_{scs} и 3β-гидроксистероиддегидрогеназа, и присутствуют электрон-транспортные белки, способные обеспечить функционирование стероидогенного цитохрома P450, что позволяет рассматривать клетки НЕК293Т как нестероидогенные и пригодные для экспрессии генов и изучения характеристик стероидогенных белков.

Степень достоверности и апробация результатов. Представленные результаты были получены с использованием современного оборудования. Достоверность данных подтверждена их воспроизводимостью при проведении нескольких независимых экспериментов. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных журналах. Результаты работы представлены на 4 международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 164 печатных страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, включающего 220 наименований. Работа содержит 7 таблиц и 50 рисунков.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Реконструкция ХГЛ системы в клетках *E. coli*

Для реконструкции ХГЛ системы в клетках *E. coli* использованы полицистронные плазмиды, включающие целевые гены с находящимися перед ними участками посадки рибосом (RBS). В работе использованы плазмиды pTrc99A/CHL и pBar_Triple с разным расположением в кассете экспрессии рекомбинантных генов, кодирующих зрелые формы цитохрома P450_{scc}, AdR и Adx1-108 (Adx) быка, а также pTrc99A/CHL(Adx*) и pTrc99A/CHL(2Adx*), содержащие вместо гена Adx1-108 одну или две копии гена Adx с точечной заменой Ser112 на Trp112 (Adx1-S112W, Adx*), которая приводит к значительному увеличению активности ХГЛ системы в экспериментах *in vitro* (Schiffler et al., 2001) (Рис. 1). Полученные рекомбинантные векторы эффективно направляли синтез в клетках цитохрома P450_{scc}, Adx и AdR (Рис. 2).

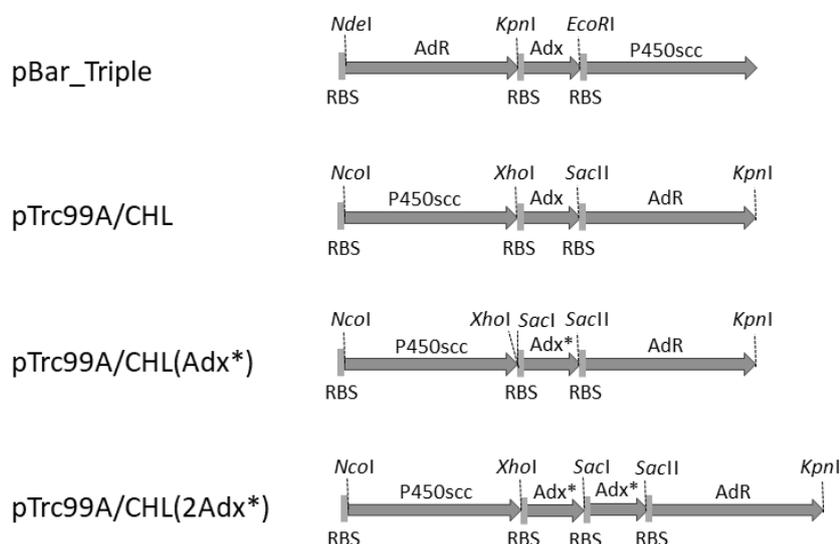


Рис. 1. Схемы расположения кДНК цитохрома P450_{scc}, Adx и AdR в кассетах экспрессии полицистронных плазмид.

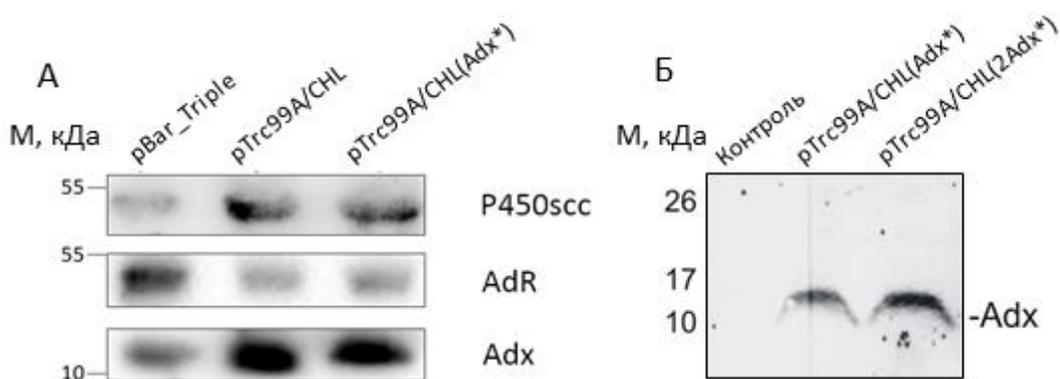


Рис. 2. Идентификация P450_{scc}, AdR и Adx (А) и Adx* (Б) в рекомбинантных клетках *E. coli* с использованием Вестерн-блоттинга.

Анализ соотношения синтезируемых гетерологичных белков (с использованием Вестерн-блоттинга гомогенатов клеток и хемилюминесцентной детекции) в клетках используемых штаммов показал, что изменение порядка гетерологичных кДНК в каскаде экспрессии плазмиды с AdR–Adx–P450scc на P450scc–Adx–AdR приводит к изменению стехиометрического соотношения P450scc:Adx:AdR с 1:1,45:4,2 на 1:1,67:0,98 (Рис. 2А, Таблица 1). Введение в каскад экспрессии второй копии гена Adx* приводит к увеличению содержания Adx* в клетках в 2 раза (Рис. 2Б).

Таблица 1. Содержание цитохрома P450scc, Adx и AdR в рекомбинантных клетках *E. coli* (нмоль/мг белка гомогената)¹

Плазмида	P450scc	Adx	AdR
pBar_Triple	0,145±0,025	0,211±0,062	0,610±0,019
pTrc99A/CHL	0,290±0,040	0,485±0,157	0,283±0,026
pTrc99A/CHL(Adx*)	0,340±0,006	0,361±0,078	0,231±0,037

Активность ХГЛ системы (измерена с использованием ИФА), реконструированной в клетках *E. coli*/pBar_Triple и *E. coli*/pTrc99A/CHL, рассчитанная на мг клеточного гомогената, различается несущественно (120% и 100%, Таблица 2), однако, удельная активность P450scc значительно различается и составляет 33,1±8,96 и 13,8±4,5 нмоль прегненолона/1 нмоль P450scc×ч в гомогенатах клеток *E. coli*/pBar_Triple и *E. coli*/pTrc99A/CHL соответственно. Следовательно, соотношение белков P450scc:Adx:AdR 1:1,45:4,2 является более оптимальным для функционирования ХГЛ системы.

Таблица 2. ХГЛ активность, измеренная в гомогенатах рекомбинантных клеток *E. coli*

Плазмида	Активность (%)
pBar_Triple	120,0
pTrc99A/CHL	100,0
pTrc99A/CHL(Adx*)	12,4
pTrc99A/CHL(2Adx*)	24,7

За 100% принята активность, измеренная в образцах *E. coli*/pTrc99A/CHL (4,0 ± 1,3 нмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч)

Замена Adx на Adx* приводит к значительному снижению активности ХГЛ системы, а введение второй копии гена Adx* в каскад экспрессии приводит к

¹ Здесь и далее, если не указано иное, приведенные данные – средние значения ± стандартное отклонение из не менее, чем трех независимых экспериментов.

увеличению содержания Adx* и ХГЛ активности примерно в 2 раза, по сравнению с системой P450_{scc}/Adx*/AdR (Рис. 2Б, Таблица 2). Вероятно, различие в функционировании Adx* в реконструированной системе *in vitro* и в живых клетках связано с влиянием каких-то внутриклеточных факторов на взаимодействие Adx* с AdR или P450_{scc}, что, в свою очередь, влияет на эффективность переноса электронов и функционирование цитохрома P450_{scc}.

Показано, что клетки *E. coli*/pTrc99A/CHL при инкубации в присутствии холестерина, вносимого в среду культивирования в виде раствора в этаноле, осуществляют его биотрансформацию в прегненолон. Прегненолон идентифицирован в суспензии клеток методом ВЭЖХ и масс спектрометрии (перед проведением анализа органический экстракт суспензии клеток обрабатывали холестеролоксидазой, превращающей прегненолон в прогестерон) (Рис. 4, Рис. 5).

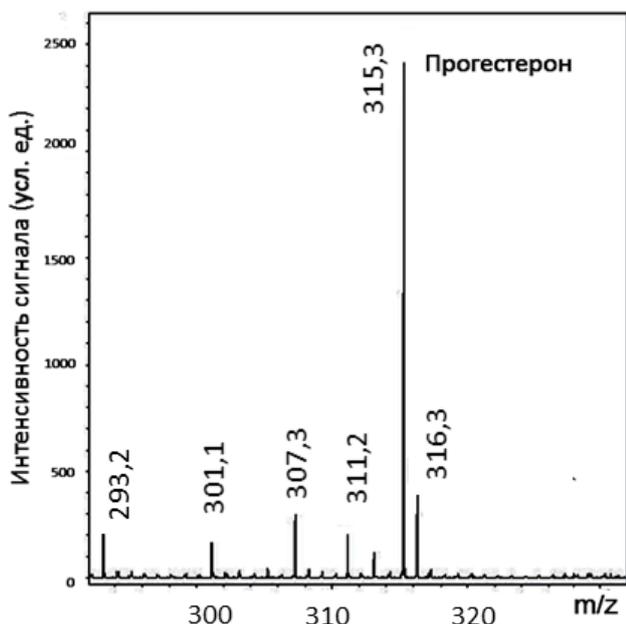
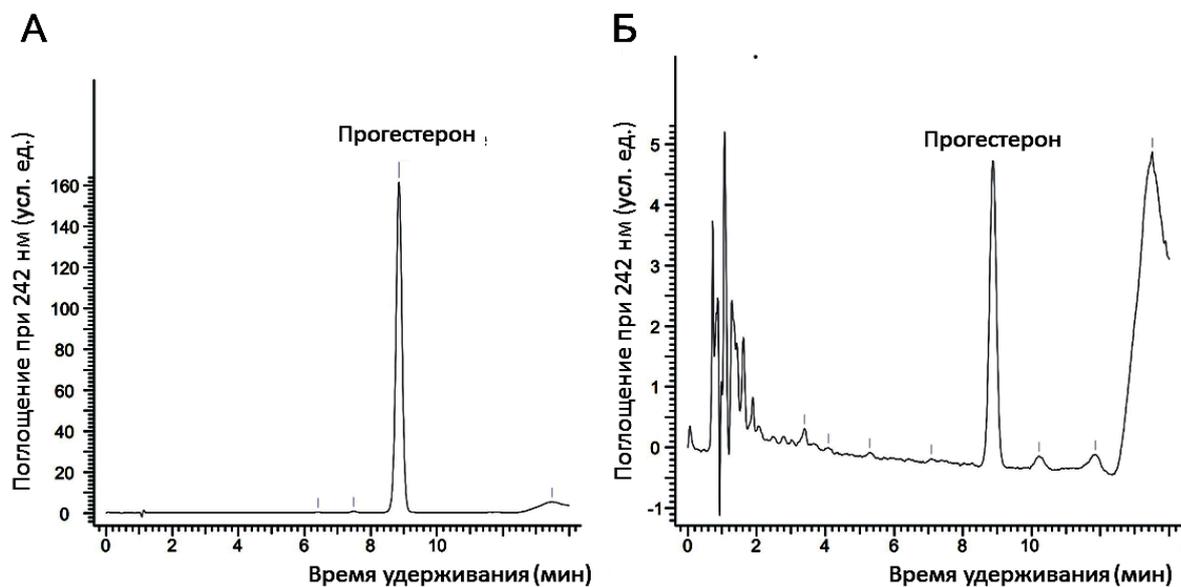


Рис. 4. Идентификация продукта биотрансформации холестерина клетками *E. coli*/pTrc99A/CHL методом ВЭЖХ. А. Внешний стандарт - прогестерон (1 мкл, 1 мг/мл); Б. Хроматограмма испытуемого образца (20 мкл).

Рис. 5. Идентификация продукта биотрансформации холестерина клетками *E. coli*/pTrc99A/CHL методом масс-спектрометрии.

Обнаружено, что ХГЛ активность клеток при использовании разных химических агентов, влияющих на растворимость гидрофобных стероидов в водной среде (ДМСО, β -метилциклодекстрина (МЦД), этанола, сапонины, лизоцима) существенно различается. МЦД является более предпочтительным пермеабилзирующим агентом (например, см. Рис. 6А), максимальная активность наблюдается при использовании 0,2% МЦД (Рис. 6Б). В целом активность ХГЛ системы в клетках *E. coli*/pTrc99A/CHL *in vivo* варьировала в диапазоне 0,05–0,62 мг прегненолона/л сгущенной суспензии клеток×24 ч в зависимости от типа и концентрации в среде пермеабилзирующего агента.

Таким образом, эффективность функционирования ХГЛ системы, реконструированной в клетках *E. coli*, лимитирует плохое проникновение субстрата в клетки, в то время как формирование активных белков протекает без особых осложнений.

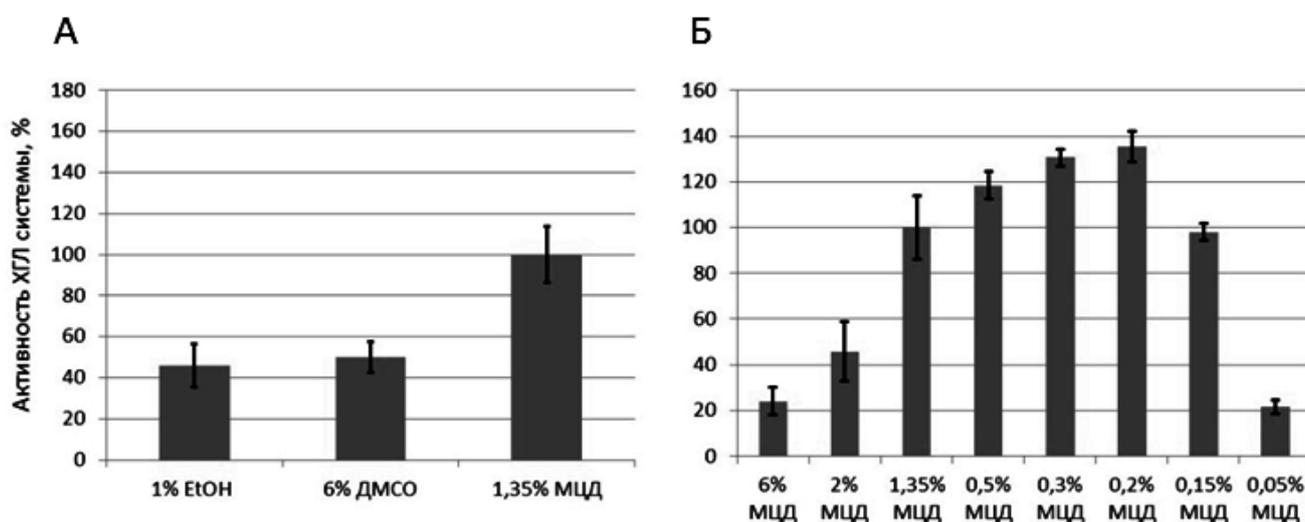


Рисунок 6. Влияние химических агентов на ХГЛ активность клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL. За 100% принята активность, зарегистрированная в присутствии 1,35% МЦД, соответствующая 108 мкг (0,34 мкмоль) прегненолона/л суспензии клеток×24 ч. Указана конечная концентрация пермеабилзирующих агентов в среде.

2. Изучение влияния замены аминокислотных остатков Иле351, Лей355 и Иле461 в молекуле цитохрома P450scs на его функционирование

Клетки *E. coli* с реконструированной ХГЛ системой быка использованы в экспериментах, целью которых являлся анализ влияния определенных аминокислотных остатков, локализованных в активном центре цитохрома P450scs, на эффективность конверсии стероидных субстратов. Работа проведена совместно с сотрудниками лабораторий О. В. Галзитской и М. В. Доновой (Институт белка РАН и Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, г. Пущино). В результате

анализа 3D-структур 27 структурных гомологов цитохрома P450_{scs}, способных взаимодействовать с холестерином и β-ситостерином, в активном центре цитохрома P450_{scs} быка идентифицированы аминокислотные остатки Иле351, Лей355 и Иле461, замена которых на Ала могла бы способствовать расширению субстрат-связывающего кармана и увеличению активности P450_{scs} в отношении β-ситостерина. Нами получены рекомбинантные клетки *E. coli*, осуществляющие синтез AdR, Adx и мутированных вариантов цитохрома P450_{scs} с заменой одной аминокислоты - P450-I351A, P450-L355A и P450-I461A, двух аминокислот P450-I351A/L355A или трех аминокислот - P450-I351A/L355A/I461A. Показано, что все мутантные версии P450_{scs} эффективно синтезируются в клетках *E. coli* - во всех штаммах была визуализирована полоса, соответствующая полноразмерной форме P450_{scs} (53 кДа) (Рис. 7).

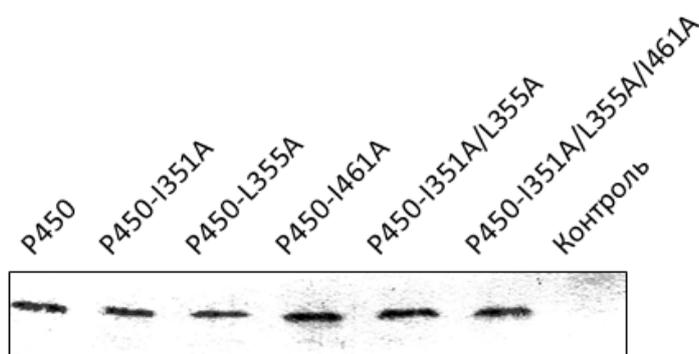


Рисунок 7. Синтез P450_{scs} дикого типа и мутированных форм P450_{scs} в рекомбинантных клетках *E. coli*.

Анализ активности ХГЛ системы *in vitro* в гомогенатах рекомбинантных клеток с использованием метода ИФА показал, что введение каждой из мутаций приводит к резкому снижению каталитической активности цитохрома P450_{scs} как в отношении β-ситостерина, так и в отношении 20α-гидроксихолестерина, а замена двух или трех аминокислот приводит к полной потере каталитической активности. (Таблица 3). Таким образом, аминокислоты активного центра цитохрома P450_{scs} в положениях 351, 355 и 461 критичны для функционирования белка.

Таблица 3. Активность *in vitro* цитохрома P450_{scs} дикого типа и мутированных форм цитохрома P450_{scs} (пмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч)

	20α-гидроксихолестерин	β-ситостерин
P450 _{scs}	540,00±9,40	129,00±29,50
P450 _{scs} (I351A)	11,45±8,03	1,24±0,36
P450 _{scs} (L355A)	383,00±7,92	21,40±7,70
P450 _{scs} (I461A)	12,09±4,50	0
P450-I351A/L355A	0	0
P450-I351A/L355A/I461A	0	0

3. Реконструкция ХГЛ системы в дрожжах *S. cerevisiae*

Изучение функционирования ХГЛ системы, реконструированной в клетках *E. coli*, показало, что низкая эффективность проникновения субстрата в клетку серьезно лимитирует выход реакции конверсии холестерина в прегненолон и использование пермеабилезирующих агентов лишь в некоторой степени решает эту проблему. В отличие от клеток *E. coli* некоторые дрожжи (например, *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica* и *Yarrowia lipolytica*) обладают механизмами импорта гидрофобных субстратов в клетку и выведения продуктов их метаболизма в среду, что делает их весьма привлекательными кандидатами на роль организмов-хозяев для реконструкции ХГЛ системы. Поэтому следующий этап работы был направлен на реконструкцию ХГЛ системы в клетках дрожжей. Для осуществления совместной продукции белков ХГЛ системы быка в клетках дрожжей впервые 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.

Сконструирован вектор pYeDP/pCoxIV-CHL-2A, включающий кДНК, кодирующие зрелые формы AdR и Adx и предшественник P450_{scc} с адресующей митохондриальной препоследовательностью субъединицы IV цитохром с-оксидазы дрожжей (pCoxIV) (Рис. 8). С помощью адресования P450_{scc} в митохондрии предполагалось более точно детектировать расщепление 2А-линкера.



Рис. 8. Схема слитой кДНК, включенной в вектор pYeDP/pCoxIV-CHL-2A, кодирующей саморасщепляющийся полипротеин CHL-2A. Стрелками указаны предполагаемые участки расщепления полипротеина.

Сконструированный вектор обеспечивал в клетках дрожжей синтез полипротеина pCoxIVP450_{scc}-2A-Adx-2A-AdR (CHL-2A), который расщеплялся с образованием индивидуальных белков pCoxIVP450_{scc}-2A (55 кДа), Adx-2A (14 кДа) и AdR (51 кДа) (Рис. 9). Кроме того, значительное количество Adx и AdR присутствовало в клетках в составе слитого белка Adx-2A-AdR (65 кДа). То есть первый линкер 2А демонстрировал эффективное расщепление, а второй - значительно более низкую эффективность.

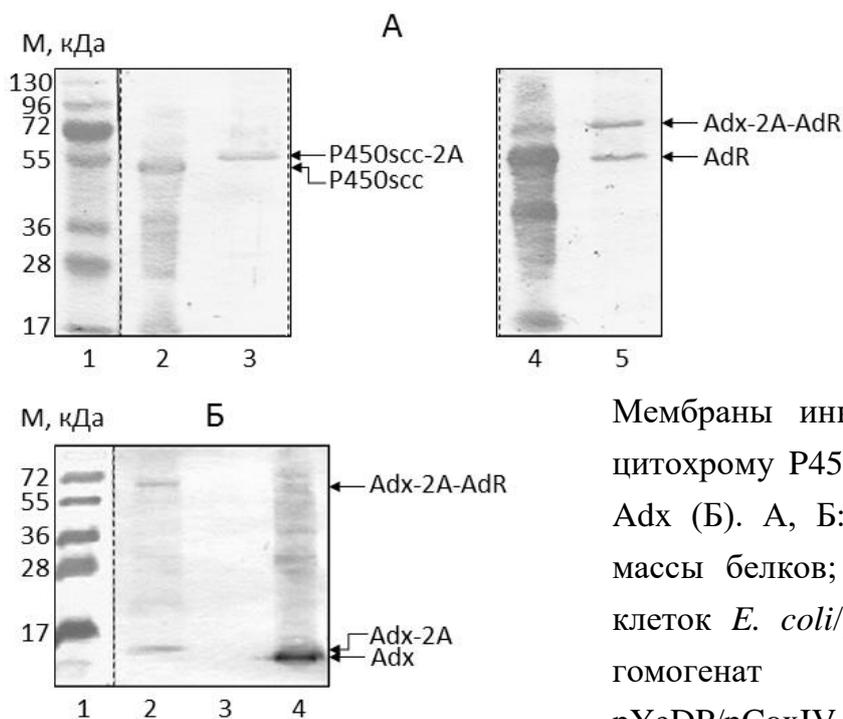


Рис. 9. Идентификация белков ХГЛ системы, синтезируемых в рекомбинантных клетках *S. cerevisiae* методом Вестерн-блоттинга.

Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450scc (А: 2,3), AdR (А: 4,5) и Adx (Б). А, Б: 1 - маркеры молекулярной массы белков; А: 2, 4, Б: 4 – гомогенат клеток *E. coli*/pBar_Triple; А: 3, 5, Б: 2 – гомогенат клеток *S. cerevisiae*/pYeDP/pCoxIV-CHL-2A; Б: 3 - гомогенат нетрансформированных клеток *S. cerevisiae*.

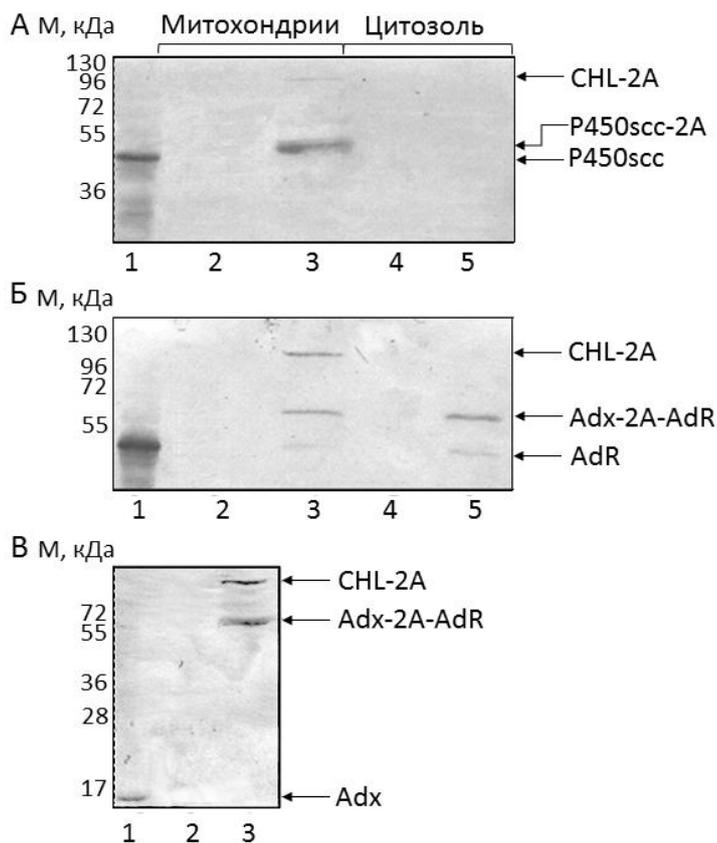


Рис. 10. Локализация рекомбинантных белков в клетках дрожжей. Анализ методом Вестерн-блоттинга. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450scc (А), AdR (Б) и Adx (В). А-В: 1 - гомогенат клеток *E. coli*/pBar_Triple; А-В: 2, 3 митохондрии и А, Б: 4, 5 – фракция постмитохондриального супернатанта нетрансформированных и трансформированных pYeDP/pCoxIV-CHL-2A клеток *S. cerevisiae*, соответственно.

Обнаружено, что P450scc эффективно импортируется в митохондрии (Рис. 10). Большая часть зрелых белков AdR и Adx-2A-AdR остается в цитозоле, однако, некоторая часть белков AdR и Adx-2A-AdR, несмотря на отсутствие адресующей последовательности, проникает в митохондрии, что подтверждено в контрольных

экспериментах, включавших обработку выделенных митохондрий протеиназами (трипсином или протеиназой К). Неправильное адресование части молекул AdR и Adx-2A-AdR, вероятно, связано с их проникновением в транслокон вслед за pCoxIV-P450_{scs}-2A в ходе ко-трансляционного импорта. В гомогенатах клеток зарегистрирована ХГЛ активность ($4,36 \pm 2,21$ пмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч). Следовательно, наличие 18 а.о., происходящих из пептида 2A, на С-конце цитохрома P450_{scs} не препятствует проявлению им каталитической активности и правильному адресованию белка.

Таким образом, мы продемонстрировали, что подход, основанный на использовании саморасщепляющегося вирусного пептида 2A, может успешно применяться для реконструкции функционально активной P450-системы млекопитающих в клетках дрожжей.

4. Реконструкция ХГЛ системы в клетках НЕК293Т

В литературе имеются данные, указывающие на то, что эффективность расщепления линкеров, а также адресование полученных компонентов полипротеина зависит от типа клеток, в которых осуществляется трансляция (Kim et al., 2011). В связи с тем, что при синтезе CHL-2A в дрожжах *S. cerevisiae* мы наблюдали неэффективное расщепление 2A-полипротеина и неправильное адресование части продуктов расщепления, мы провели сравнительный анализ экспрессии кДНК, кодирующей полипротеин CHL-2A, в клетках дрожжей и человека (линии НЕК293Т). В клетках НЕК293Т с использованием метода Вестерн-блоттинга белки P450_{scs}, Adx и AdR не обнаружены. Для реконструкции ХГЛ системы в клетках млекопитающих линии НЕК293Т использован вектор pсDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, включающий кДНК, кодирующие предшественник pCoxIV-P450_{scs} и зрелые белки Adx и AdR-GFP, разделенные линкерами 2A вируса ящура (Рис. 11). Предполагалось, что регистрация сигнала GFP, введенного на С-конец полипротеина, позволит определить локализацию в клетке фрагментов полипротеина, включающих GFP.

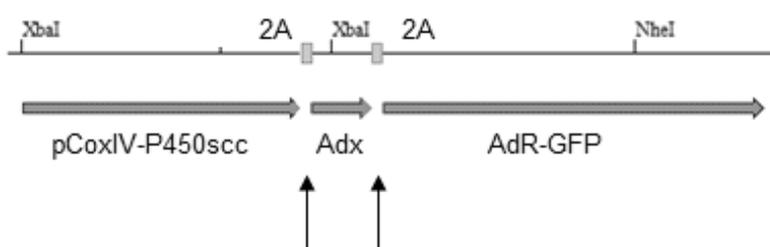


Рис. 11. Схема слитой кДНК, включенной в вектор pсDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, кодирующей полипротеин CHL-GFP. Стрелками указаны предполагаемые участки расщепления.

Клетки линии НЕК293Т, трансфицированные вектором pсDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP или контрольным вектором pсDNA3.1/CT-GFP, анализировали методом флуоресцентной микроскопии (Рис. 12). Сигнал GFP в контрольных клетках

детектирован в ядрах; в клетках, трансфицированных вектором рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP, его локализация изменяется с ядерной на цитозольную. Наличие флуоресценции GFP в клетках, трансфицированных вектором рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP, указывает на присутствие в них полноразмерного полипротеина CHL-GFP.

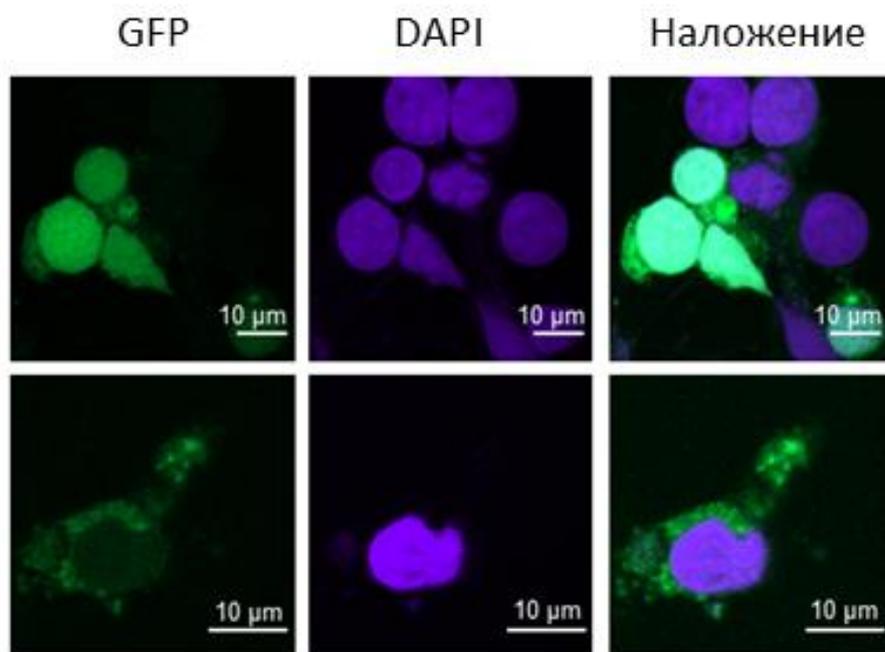


Рис. 12. Микрофотография клеток HEK293T, трансфицированных рсDNA3.1/CT-GFP (верхний ряд) и рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP (нижний ряд). Масштаб 10 мкм.

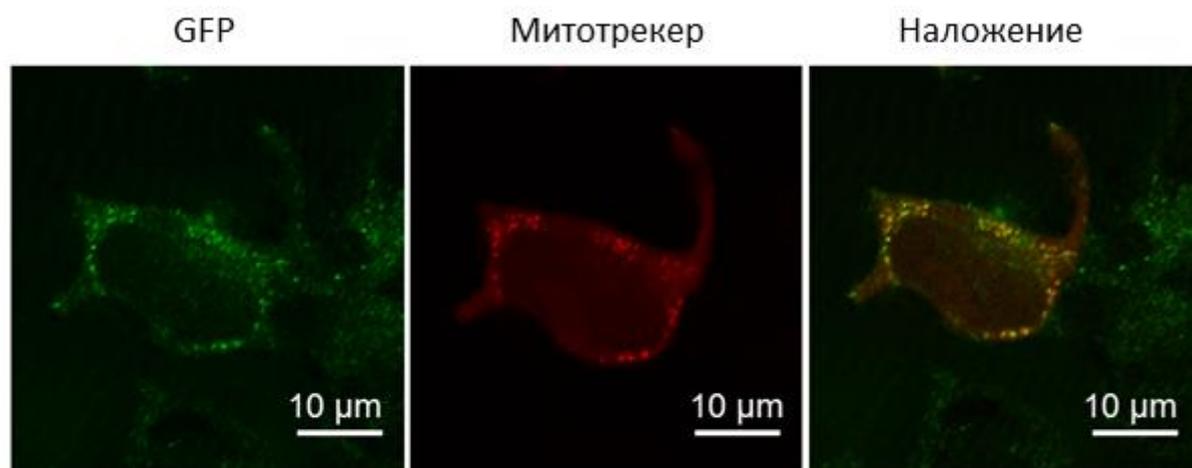


Рис. 13. Ко-локализация сигналов GFP и митотрекера в клетках, трансфицированных вектором рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP. Масштаб 10 мкм.

Для того, чтобы определить, присутствуют ли в митохондриях полипротеин CHL-GFP или продукты его расщепления, содержащие GFP, через 48 часов после трансфекции проведена оценка ко-локализации сигналов GFP и митотрекера с использованием конфокального микроскопа. Перекрывание сигналов красной и

зеленой флуоресценции в некоторых участках клеток (Рис. 13) указывает на наличие в митохондриях GFP-содержащих белков.

Обнаружено, что характер расщепления полипротеина CHL-2A в клетках линии НЕК293Т аналогичен таковому в клетках *S. cerevisiae*: наблюдается высокая эффективность расщепления первого и значительно более низкая эффективность расщепления второго 2А-пептида (Рис. 14): в гомогенатах клеток идентифицированы белки P450-2A, Adx-2A и AdR-GFP (78 кДа), некоторое количество слитого белка P450_{scs}-2A-Adx-2A (69 кДа) и значительное количество слитого белка Adx-2A-AdR-GFP (92 кДа). Кроме того, распределение продуктов расщепления полипротеина рCoxIV-CHL-GFP в клетках НЕК293Т также аналогично распределению белков-компонентов рCoxIV-CHL-2A в клетках *S. cerevisiae*: белки, несущие препоследовательность рCoxIV (P450-2A и слитой белок P450-2A-Adx-2A), а также небольшое количество белков AdR-GFP и Adx-2A-AdR-GFP, не несущих митохондриальной адресующей последовательности, импортируются в митохондрии (Рис 15), что коррелирует с результатами флуоресцентной микроскопии (Рис. 13).

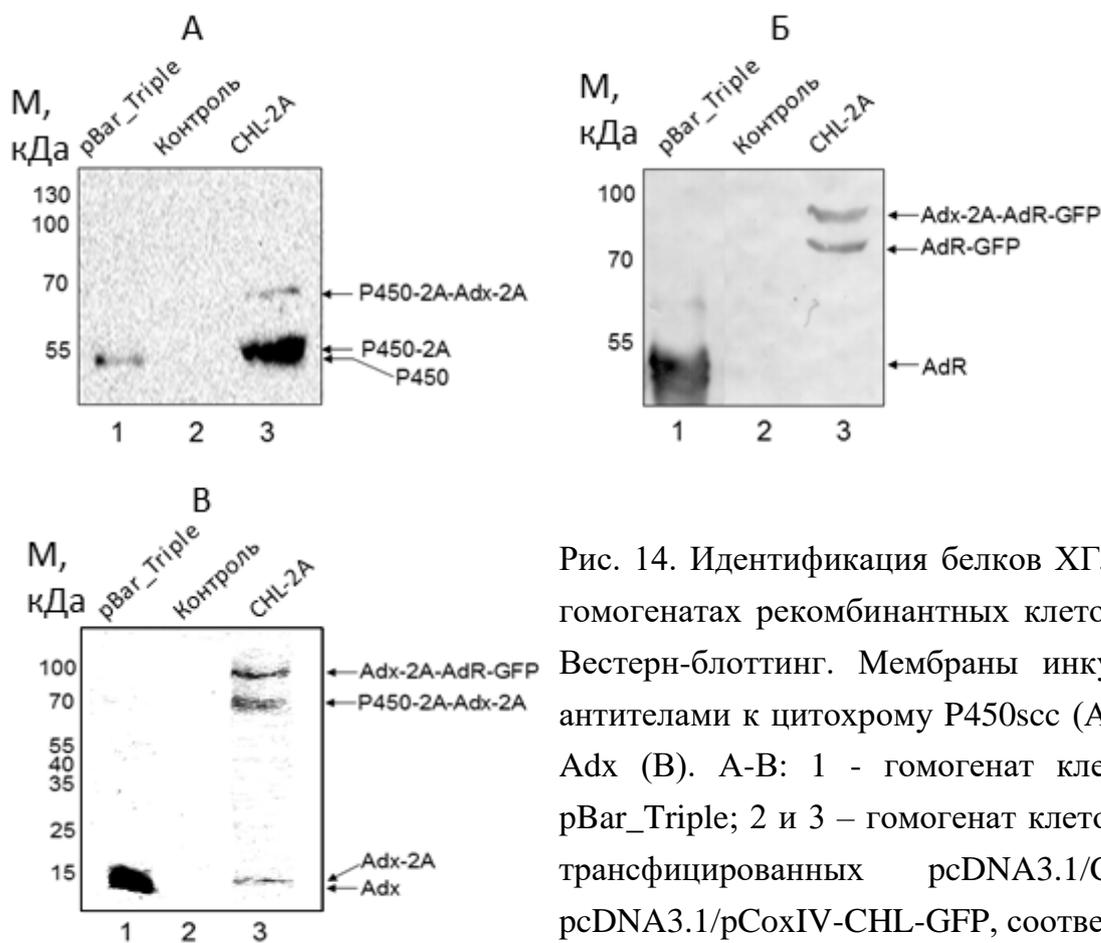


Рис. 14. Идентификация белков ХГЛ системы в гомогенатах рекомбинантных клеток НЕК293Т. Вестерн-блоттинг. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450_{scs} (А), AdR (Б) и Adx (В). А-В: 1 - гомогенат клеток *E. coli*/pBar_Triple; 2 и 3 – гомогенат клеток НЕК293Т, трансфицированных рсDNA3.1/CT-GFP и рсDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, соответственно.

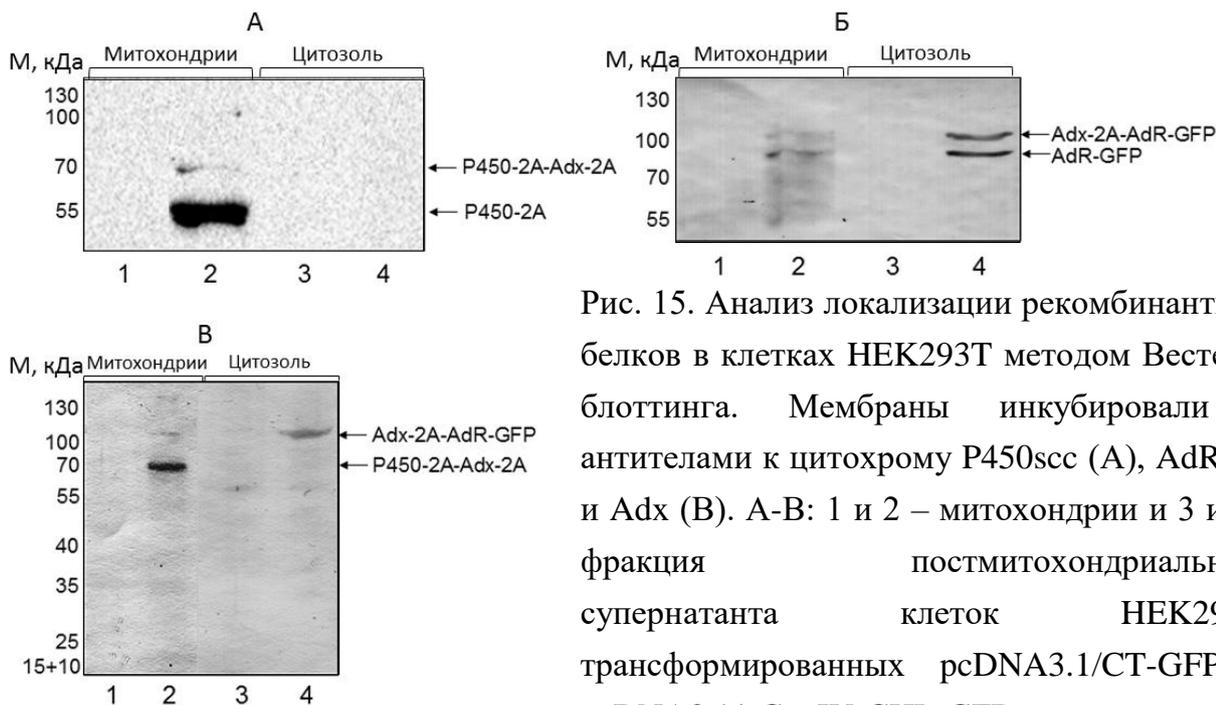


Рис. 15. Анализ локализации рекомбинантных белков в клетках НЕК293Т методом Вестерн-блоттинга. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450_{ssc} (А), AdR (Б) и Adx (В). А-В: 1 и 2 – митохондрии и 3 и 4 – фракция постмитохондриального супернатанта клеток НЕК293Т, трансформированных рсDNA3.1/СТ-GFP и рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP, соответственно.

ВЭЖХ-анализ органического экстракта культуральной среды, собранной после инкубации контрольных клеток и клеток, трансфицированных вектором рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP, с 22R-гидроксихолестерином (22ОН-хол), показал, что прегненолон обнаруживается только в клетках, трансфицированных вектором рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP (Рис. 16). Это указывает на отсутствие функционально активного цитохрома P450_{ssc} в клетках НЕК293Т дикого типа и на способность цитохрома P450_{ssc} быка, синтезируемого в клетках НЕК293Т, превращать *in vivo* 22ОН-хол в прегненолон с эффективностью $360,0 \pm 75,6$ нг прегненолона/мл культуры $\times 24$ ч ($1,2 \pm 0,2$ пг прегненолона/трансфицированная клетка $\times 24$ ч).

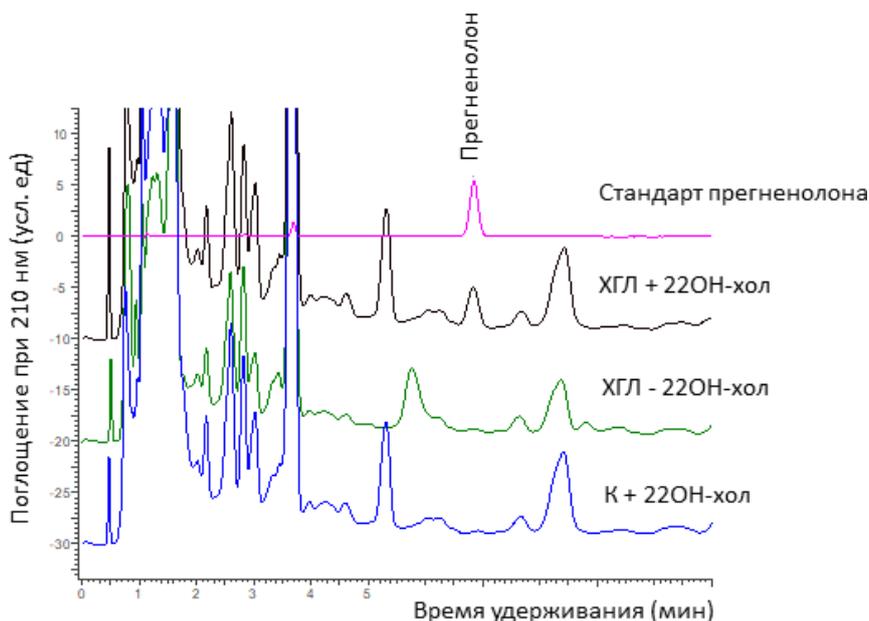


Рис. 16. ВЭЖХ-анализ органических экстрактов культуральной среды, собранной после инкубации контрольных клеток НЕК293Т (К) и клеток НЕК293Т/рсDNA3.1/рCохIV-CHL-GFP (ХГЛ). Верхняя кривая – хроматограмма стандарта прегненолона (1 мг/мл).

Прегненолон не регистрировался при культивировании клеток НЕК293Т/рсDNA3.1/рCoxIV-CHL-GFP без добавления 22ОН-хол (Рис. 16), что указывает на отсутствие в клетках эндогенного пула холестерина или его производных, доступных для цитохрома P450_{ssc}. Показано, что цитохром P450_{ssc} быка, присутствующий в клетках НЕК293Т, способен осуществлять биотрансформацию *in vivo* не только 22ОН-хол, но и 20 α -гидроксихолестерина, холестерина и объемных молекул флуоресцентно-меченного 22-NBD-холестерина.

В данной работе обнаружено также, что прегненолон, образующийся в клетках НЕК293Т/рсDNA3.1/рCoxIV-CHL-GFP, не подвергается дальнейшей трансформации в прогестерон, как это происходит в стероидогенных клетках. Этот факт указывает на отсутствие в клетках 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (3 β -ГСД), которая катализирует эту реакцию каскада стероидогенеза (Рис. 17).

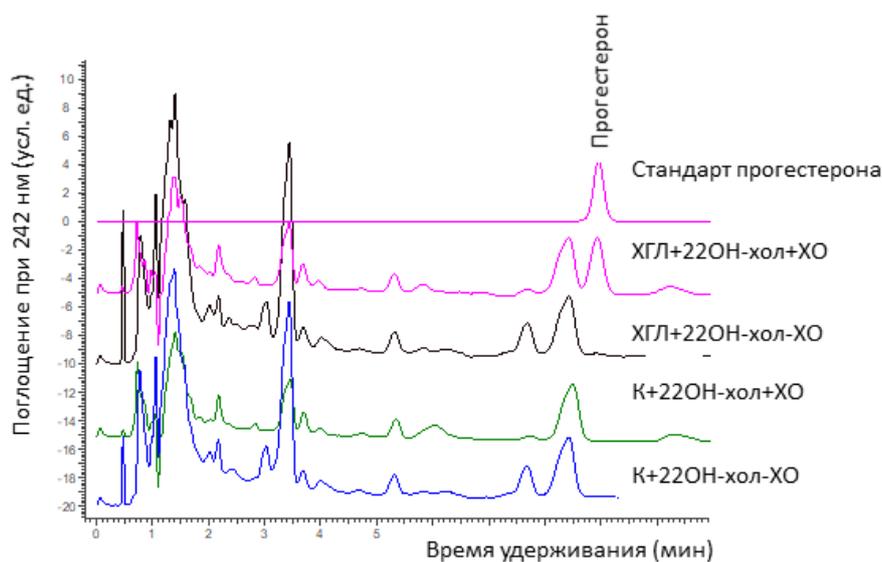


Рис. 17. ВЭЖХ-анализ органических экстрактов культуральной среды, собранной после инкубации контрольных клеток НЕК293Т (К) и клеток НЕК293Т/рсDNA3.1/рCoxIV-CHL-GFP

(ХГЛ) в присутствии 22R-гидроксихолестерина без обработки (-ХО) и после обработки холестеролоксидазой (+ХО). Верхняя кривая – хроматограмма стандарта прогестерона (1 мг/мл).

Несмотря на пространственное разобщение гетерологичного P450_{ssc} и значительной части гетерологичных переносчиков электронов Adx и AdR (Рис. 15), клетки НЕК293Т, синтезирующие белки ХГЛ системы, демонстрируют стеролгидроксилазную активность (Рис. 16). Для того, чтобы проверить, есть ли в клетках НЕК293Т белки-переносчики электронов, способные обеспечить функционирование рекомбинантного цитохрома P450_{ssc}, мы осуществили синтез в данных клетках P450_{ssc} в отсутствие Adx и AdR с использованием плазмиды рсDNA3.1/рCoxIV-P450_{ssc}-2A-GFP (схема слитой кДНК представлена на Рис 18). Согласно результатам Вестерн-блоттинга, в трансфицированных клетках

синтезируется белок pCoxIV-P450_{scc}-2A, эффективно импортирующийся в митохондрии и процессирующийся с образованием зрелой формы белка (Рис. 18).

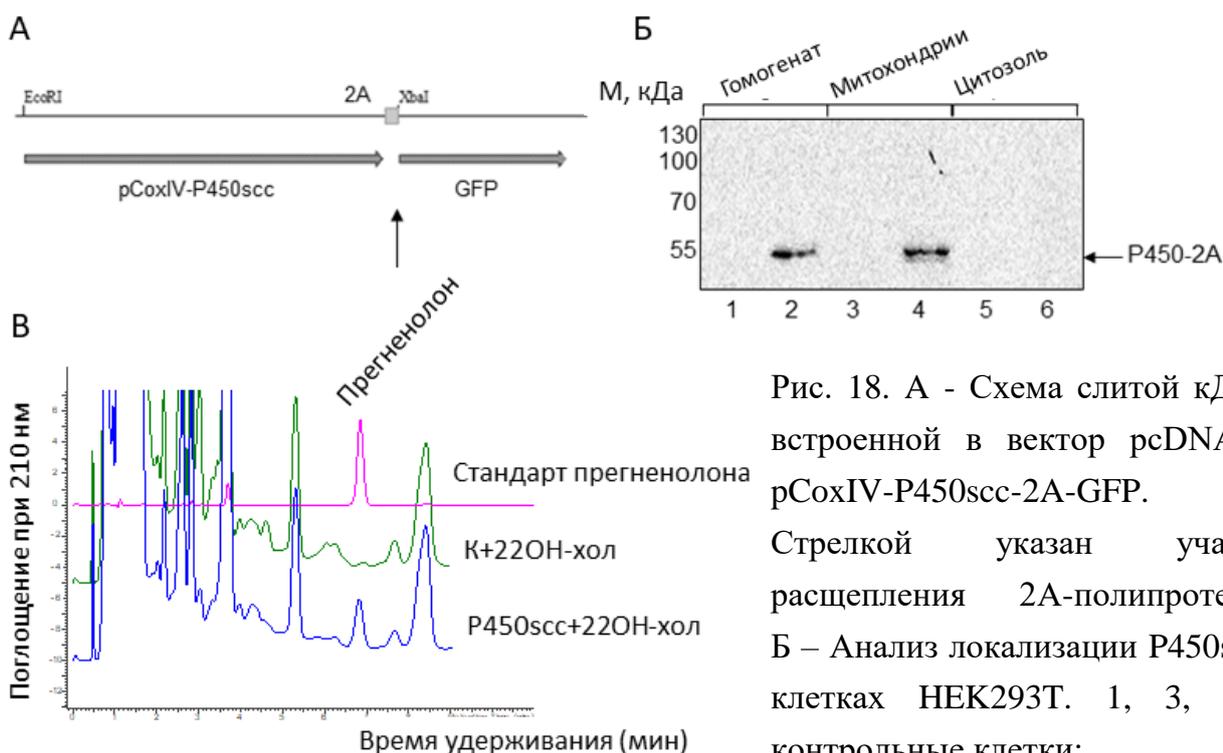


Рис. 18. А - Схема слитой кДНК, встроенной в вектор pcDNA3.1/pCoxIV-P450_{scc}-2A-GFP. Стрелкой указан участок расщепления 2A-полипротеина.

Б - Анализ локализации P450_{scc} в клетках HEK293T. 1, 3, 5 - контрольные клетки;

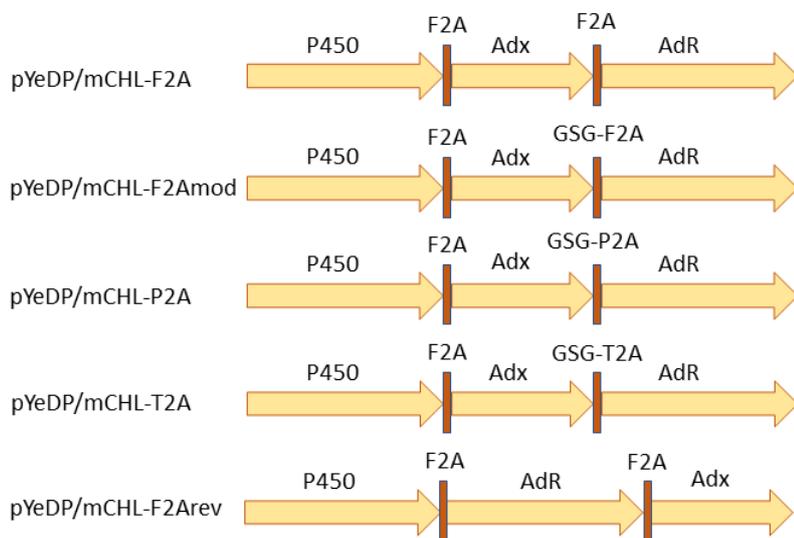
2, 4, 6 - клетки HEK293T/pcDNA3.1/pCoxIV-P450_{scc}-2A-GFP. В - ВЭЖХ-анализ органических экстрактов культуральной среды, собранной после инкубации клеток HEK293T/pcDNA3.1/CT-GFP (К) и HEK293T/pcDNA3.1/pCoxIV-P450_{scc}-2A-GFP (P450_{scc}) в присутствии 22ОН-хол. Верхняя кривая - хроматограмма стандарта прегненолона (1 мг/мл).

Клетки HEK293T/pcDNA3.1/pCoxIV-P450_{scc}-2A-GFP демонстрируют *in vivo* ХГЛ активность, которая сравнима с активностью клеток, синтезирующих все белки ХГЛ системы быка ($2,1 \pm 0,4$ пг прегненолона/трансфицированная клетка $\times 24$ ч ($280,1 \pm 47,6$ нг прегненолона/мл культуры $\times 24$ ч) и $1,2 \pm 0,2$ пг прегненолона/трансфицированная клетка $\times 24$ ч соответственно). Следовательно, в отсутствие AdR и Adx P450_{scc} быка проявляет активность в результате взаимодействия с локализованными в митохондриях HEK293T эндогенными редокс-белками.

Данное исследование показало, что в клетках HEK293T отсутствуют цитохром P450_{scc} и 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа, и, в то же время, в митохондриях HEK293T присутствуют электрон-транспортные белки, способные обеспечить эффективное функционирование цитохрома P450_{scc}, что позволяет рассматривать клетки HEK293T как нестероидогенные и пригодные для экспрессии генов и изучения характеристик стероидогенных белков.

5. Зависимость эффективности расщепления CHL-2A от последовательности пептида 2A и расположения белков-компонентов в составе 2A-полипротеина

С целью увеличения содержания индивидуальных белков при синтезе CHL-2A в *S. cerevisiae* и, соответственно, активности рекомбинантной ХГЛ системы была предпринята попытка увеличить эффективность расщепления второго пептида 2A в составе CHL-2A. Проведено тестирование эффективности расщепления различных 2A-пептидов, расположенных в составе полипротеина CHL-2A между белками Adx и AdR. Работа проводилась в трех направлениях: (1) изменение порядка белков-компонентов в составе CHL-2A так как, согласно имеющимся данным, расположенная выше пептида 2A аминокислотная последовательность влияет на эффективность его расщепления; (2) модификация линкера F2A (2A вируса ящура, 2A FMDV) посредством добавления к N-концу F2A аминокислот глицин-серин-глицин (линкер GSG обеспечивает большую подвижность вторичной структуры пептида 2A и увеличивает эффективность расщепления) и (3) замена F2A на пептиды T2A вируса *Thosea asigna* и P2A вируса *Porcine techovirus-1*, характеризующиеся более эффективным расщеплением. Схемы слитых кДНК в составе сконструированных рекомбинантных векторов представлены на Рис. 19.



Обнаружено, что все сконструированные векторы эффективно направляют синтез индивидуальных белков (Рис. 20). Оценка эффективности расщепления 2A-полипротеинов в полученных штаммах дрожжей проведена с использованием денситометрического анализа сигналов Вестерн-блоттинга, визуализированных посредством хемилюминесцентной детекции. Эффективность расщепления первого линкера 2A во всех модифицированных вариантах полипротеина CHL-2A практически не изменилась (Рис. 21). Изменение аминокислотной последовательности, расположенной выше второго пептида F2A, в результате

изменения порядка генов в каскаде экспрессии плазмиды привело к значительному увеличению эффективности его расщепления: $54,41\% \pm 16,50\%$ в клетках *S. cerevisiae/pYeDP/mCHL-F2Arev* против $11,40\% \pm 1,60\%$ в клетках *S. cerevisiae/pYeDP/mCHL-F2A* (Рис. 21). Введение на N-конец второго линкера F2A аминокислот GSG привело лишь к незначительному увеличению эффективности расщепления, эффективность составила $16,82\% \pm 5,10\%$. Вероятно, введение GSG лишь немного ослабляет влияние аминокислотного контекста на пептид 2A, но не ограничивает его полностью. Линкеры P2A и T2A демонстрировали более высокую эффективность расщепления – $62,94\% \pm 8,40\%$ и $67,59\% \pm 2,30\%$ соответственно.

Таким образом, показано, что эффективность расщепления 2A-линкеров в составе 2A-полипротеина существенно варьирует и определяется аминокислотной последовательностью 2A-полипротеина.

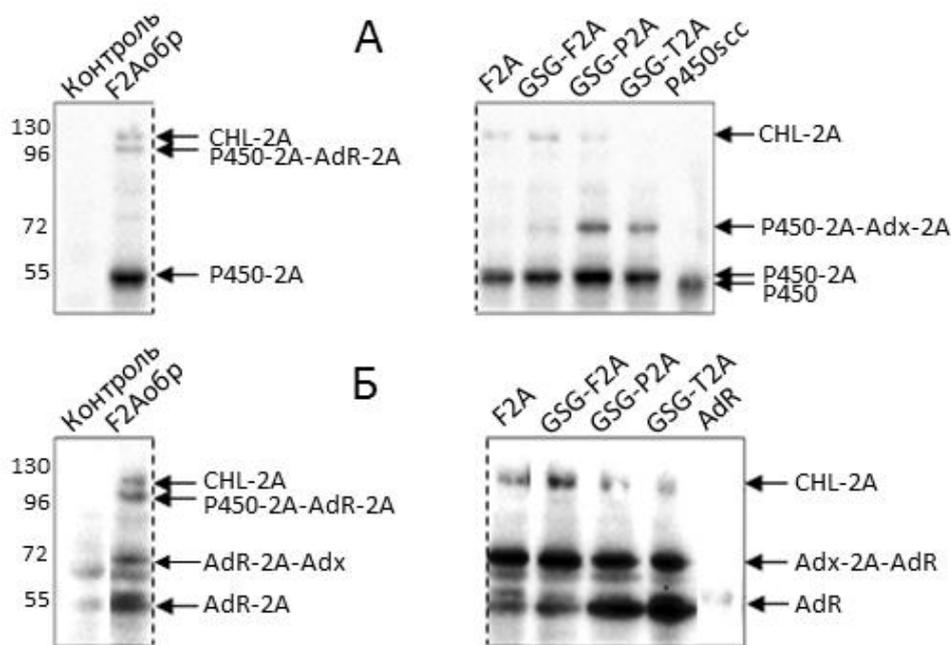


Рис. 20. Вестерн-блоттинг гомогенатов рекомбинантных клеток *S. cerevisiae*. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450scc (А) или AdR (Б).

Активность ХГЛ системы, измеренная в гомогенатах рекомбинантных клеток *S. cerevisiae*, увеличивалась при увеличении эффективности расщепления второго линкера 2A (Таблица 4). Интересен тот факт, что значительно более высокую активность демонстрировала ХГЛ система, присутствующая в клетках *S. cerevisiae/pYeDP/mCHL-F2Arev* - P450scc-2A, AdR-2A и Adx, не содержащий пептида 2A на С-конце. Вероятно, наличие на С-конце небольшого белка Adx (108 а.о.) 18 а.о., происходящих из 2A-пептида, препятствует нормальному функционированию белка.

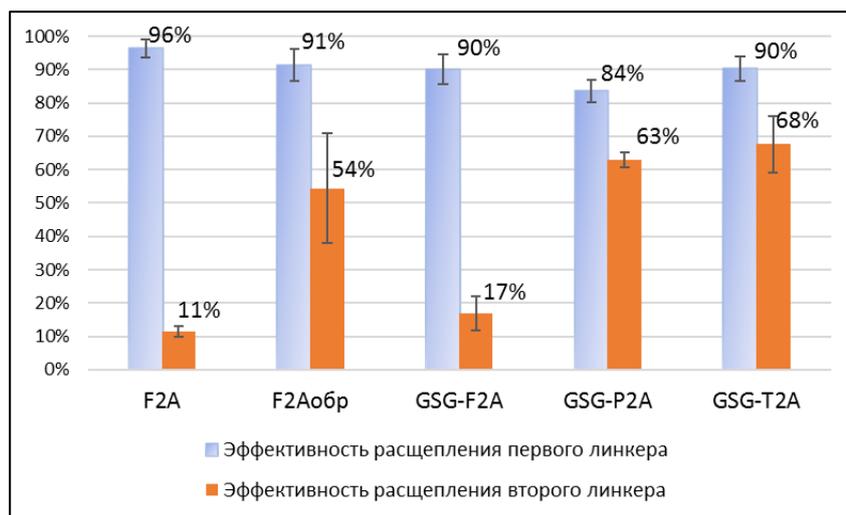


Рис. 21. Эффективность расщепления линкеров 2А в составе 2А-полипротеинов.

Таблица 4. Активность ХГЛ системы, реконструированной в рекомбинантных клетках *S. cerevisiae*, *in vitro*

Вектор	Активность ХГЛ системы, пмоль/мг белка гомогената×ч
pYeDP/mCHL-F2A	5,7±1,36
pYeDP/mCHL-T2A	6,7±1,6
pYeDP/mCHL-F2Arev	12,9±5,4

6. Реконструкция ХГЛ системы в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Для получения рекомбинантного штамма дрожжей *Y. lipolytica* с реконструированной ХГЛ системой быка мы использовали сочетание различных генно-инженерных подходов: (1) использование слитой кДНК CHL-T2A, включающей последовательности саморасщепляющихся линкеров F2A и T2A; (2) мультикопийную интеграцию кДНК CHL-2A (в среднем 10-15 копий на геном) в повторяющиеся элементы генома (участки LTRzeta ретротранспозона Ylt1) гаплоидных клеток дрожжей *Y. lipolytica* и (3) скрещивание гаплоидных трансформантов с целью увеличения количества копий кДНК CHL-T2A на клетку.

Клетки *Y. lipolytica* гаплоидных штаммов E150 и E129L разного полового типа трансформированы плазмидой p67/CHL, несущей слитую кДНК P450_{scc}-F2A-Adx-T2A-AdR (Рис. 22). Мультикопийная интеграция кДНК CHL-T2A в геном гаплоидных трансформантов *Y. lipolytica* подтверждена результатами Саузерн-гибридизации (Рис. 23). В качестве зонда для гибридизации использован меченый фрагмент промотора pICL1D вектора p67/CHL (Рис. 22). Данный зонд позволял идентифицировать как собственный фрагмент гена *ICL1* дрожжей (1 копия, продукт длиной 2100 п.о.), содержащийся в геноме в количестве одной копии, так и интегрированные в геном кассеты экспрессии с гетерологичными генами (продукт длиной 3164 п.о.).

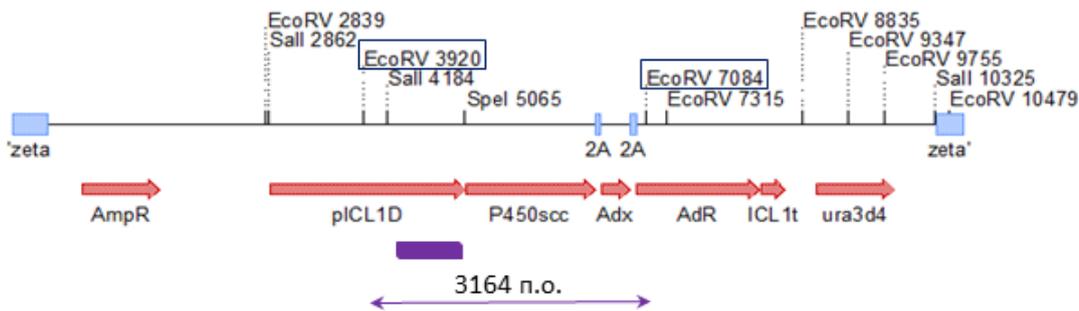


Рис. 22. Схема линейризованного интегративного вектора p67/CHL, использованного для трансформации клеток *Y. lipolytica*. Фиолетовым прямоугольником обозначен зонд, использованный при проведении Саузерн-гибридизации.

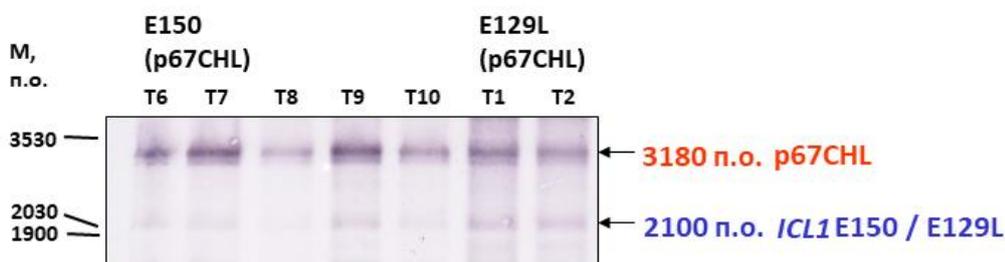


Рис. 23. Анализ интеграции кДНК CHL-T2A в геном гаплоидных трансформантов E150/p67CHL и E129L/p67CHL методом Саузерн-гибридизации. Нижняя детектируемая полоса соответствует участку гена *ICL1*, верхняя регистрируемая полоса соответствует участку интегрированного вектора. Буквами и цифрами Tn обозначены гаплоидные штаммы E150/p67CHL и E129L/p67CHL.

В результате скрещивания гаплоидных трансформантов T7 штамма E150 и T1 штамма E129L (Рис. 23) получен диплоидный прототрофный штамм DE131. Методом Вестерн-блоттинга в гомогенатах клеток штамма DE131 идентифицированы целевые белки ХГЛ системы – P450-2A и AdR, а также слитые белки P450-2A-Adx-2A и Adx-2A-AdR (Рис. 24). В связи с невысоким уровнем экспрессии гетерологичных генов не удалось детектировать индивидуальный белок Adx-2A, однако, поскольку в составе CHL-T2A Adx расположен между P450scc и AdR, можно утверждать, что он также синтезируется в клетках штамма DE131.

ХГЛ активность штамма *Y. lipolytica* DE131, определенная с использованием ВЭЖХ (Рис. 25), составила 594 мкг прегненолона/л сгущенной суспензии клеток×24 ч. Таким образом, полученный штамм DE131 *Y. lipolytica* обеспечивает эффективную конверсию *in vivo* вносимого в среду холестерина в прегненолон и может впоследствии использоваться для фундаментальных исследований и практического применения.

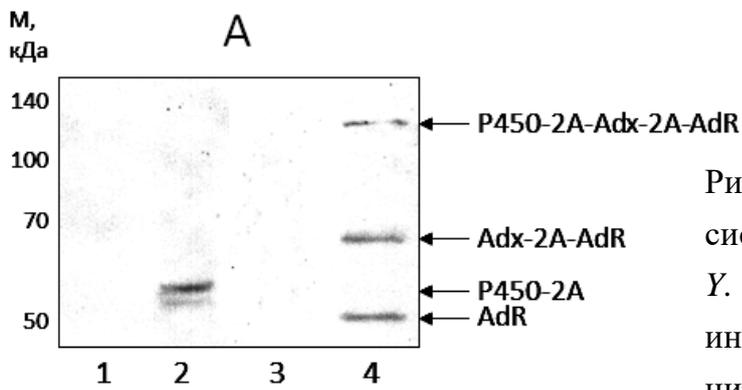


Рис. 24. Идентификация белков ХГЛ системы в рекомбинантных клетках *Y. lipolytica*. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450_{ssc} (А 1,2), AdR (А 3,4) и Adx (Б). А: 1,3, Б: 2 – гомогенат нетрансформированных клеток *Y. lipolytica* штамма E129L, А: 2,4, Б: 3 – гомогенат клеток *Y. lipolytica* штамма DE131, Б: 1 – гомогенат клеток *E. coli*/pBar_Triple.

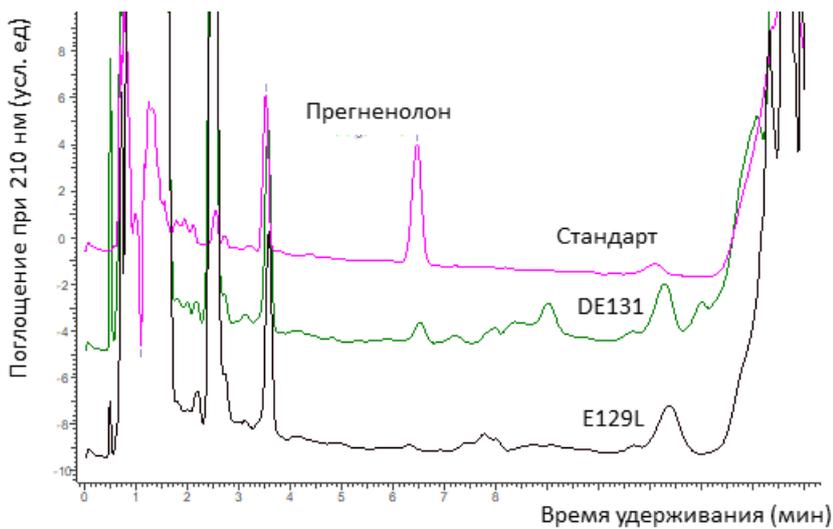
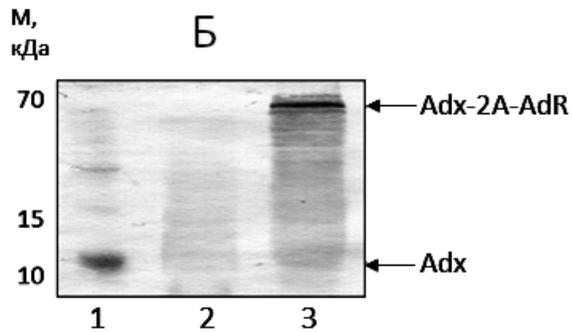


Рис. 25. ВЭЖХ-анализ органических экстрактов суспензии контрольных (E129L) и рекомбинантных (DE131) клеток *Y. lipolytica*.

Выводы:

1. Изменение порядка генов, кодирующих белки ХГЛ системы (цитохром P450_{scc}, AdR и Adx) в каскаде экспрессии полицистронной плазмиды приводит к изменению в клетках *E. coli* стехиометрического соотношения рекомбинантных белков, и, как следствие, к изменению активности реконструированной ХГЛ системы. Критическим фактором, лимитирующим ХГЛ активность штамма, является эффективность поглощения субстрата клетками.
2. Аминокислотные остатки Иле351, Иле461 и Лей355 в последовательности цитохрома P450_{scc} и Сер112 в последовательности Adx являются важными для их функционирования.
3. Впервые функционально активная ХГЛ система была реконструирована в клетках дрожжей *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica* и человека (линии НЕК293Т) в форме саморасщепляющегося полипротеина, включающего белки ХГЛ системы, разделенные пептидами 2А вируса ящура.
4. Присутствие на С-конце цитохрома P450_{scc} дополнительных 18 аминокислотных остатков, происходящих из 2А-пептида, не препятствует проявлению его каталитической активности.
5. Изменение порядка белков-компонентов в составе 2А-полипротеина и замена пептида 2А вируса ящура на пептид 2А вирусов *Thosea asigna* или *Porcine techovirus-1* приводит к изменению содержания индивидуальных белков ХГЛ системы и активности P450_{scc} в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.
6. Рекомбинантные дрожжи *Y. lipolytica* штамма DE131 способны *in vivo* осуществлять эффективную биотрансформацию холестерина: ХГЛ активность составляет 0,594 мг прегненолона/л сгущенной культуры клеток за 24 ч.
7. Эффективность расщепления полипротеина CHL-2А и локализация образующихся белков в клетках дрожжей *S. cerevisiae* и клетках человека НЕК293Т не зависят от типа эукариотической клетки, а определяются его аминокислотной последовательностью.
8. В митохондриях клеток НЕК293Т отсутствуют цитохром P450_{scc} и 3β-гидроксистероиддегидрогеназа, и присутствуют электрон-транспортные белки, способные обеспечить функционирование цитохрома P450_{scc}, что позволяет рассматривать клетки НЕК293Т как нестероидогенные и пригодные для экспрессии генов и изучения характеристик стероидогенных белков.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ, в том числе 4 статьи по теме диссертации, опубликованных в рецензируемых 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.

Список статей, опубликованных по теме диссертации

1. **Efimova V.S.**, Isaeva L.V., Rubtsov M.A., Novikova L.A. Analysis of *in vivo* activity of the bovine cholesterol hydroxylase/lyase system proteins expressed in *Escherichia coli*.// *Molecular Biotechnology*. 2019. V.61, №4, p.261-273.
2. Glyakina A.V., Strizhov N.I., Karpov M.V., Dovidchenko N.V., Matkarimov B.T., Isaeva L.V., **Efimova V.S.**, Rubtsov M.A., Novikova L.A., Donova M.V., Galzitskaya O.V. Ile351, Leu355 and Ile461 residues are essential for catalytic activity of bovine cytochrome P450_{scc} (CYP11A1).// *Steroids*. 2019. V.143, p.80-90.
3. **Efimova V.S.**, Isaeva L.V., Labudina A.A., Tashlitsky V.N., Rubtsov M.A., Novikova L.A. Polycistronic expression of the mitochondrial steroidogenic P450_{scc} system in the HEK293T cell line.// *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019. V.120, №3, p.3124-3136.
4. **Efimova V.S.**, Isaeva L.V., Makeeva D.S., Rubtsov M.A., Novikova L.A. Expression of cholesterol hydroxylase/lyase system proteins in yeast *S. cerevisiae* cells as a self-processing polyprotein.// *Molecular Biotechnology*. 2017. V.59, №9-10, p.394-406.

Материалы конференций

1. Labudina A.A., **Efimova V.S.**, Isaeva L.V., Rubtsov M.A., Novikova L.A. Polycistronic expression of mitochondrial steroidogenic P450_{scc} system in the nonsteroidogenic HEK293T cell line.// *JWMS Archives*. 2016. V.2, №2, p.124.
2. **Ефимова В.С.**, Исаева Л.В., Макеева Д.С., Новикова Л.А., Рубцов М.А. Реконструкция ферментной системы цитохрома P450_{scc} в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. Ломоносов-2015: XXII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых: секция «Биология»: 13-17 апреля 2015, Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. – М.: МАКС Пресс – с. 255.
3. **Efimova V.**, Isaeva L., Makeeva D., Rubtsov M., Novikova L. Expression of bovine cytochrome P450_{scc} enzyme system in *Saccharomyces cerevisiae* cells as a self-processing polyprotein. *FEBS Journal*. 2015. V.282 (Suppl. 1), p.92.
4. **Efimova V.**, Faletrov Y., Isaeva L., Novikova L., Rubtsov M., Shkumatov V. Interaction of NBD-labelled fluorescent steroids and a fatty acid with *Escherichia coli*. *FEBS Journal*. 2015. V.282 (Suppl. 1), p.135.
5. **Efimova V.S.**, Faletrov Y.V., Isaeva L.V., Novikova L.A., Shkumatov V.M., Rubtsov M.A. Cholesterol-like NBD-labeled fluorescent compounds as potential substrates for steroid-converting enzymes expressed in *Escherichia coli*. *Гены и клетки*. 2015; Т.10.