

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Ефимова Вера Сергеевна

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

03.01.03 – Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор биологических наук

Людмила Александровна Новикова,

кандидат биологических наук

Михаил Александрович Рубцов

Москва – 2019

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
1. ВВЕДЕНИЕ.....	6
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1 Монооксигеназные системы цитохромов P450	11
2.1.1 Цитохромы P450	11
2.1.2 Молекулярная структура цитохромов P450.....	12
2.1.3 Монооксигеназные системы цитохромов P450	13
2.1.4 Каталитический цикл цитохромов P450	18
2.2 Стероидогенез в организме млекопитающих	19
2.2.1 Стероидные гормоны и их роль	19
2.2.2 Стероидогенез.....	20
2.2.3 Стероидогенные цитохромы P450	21
2.3 Холестерингидроксилазная/лиазная (ХГЛ) система коры надпочечников млекопитающих.....	23
2.3.1 Состав и функционирование ХГЛ системы.....	23
2.3.2 Характеристика и структурная организация цитохрома P450scs (CYP11A1)	25
2.3.3 Характеристика и структурная организация аденодоксинредуктазы (AdR).....	28
2.3.4 Характеристика и структурная организация аденодоксина (Adx)	29
2.3.5 Характеристика комплексов Adx-P450scs и Adx-AdR	31
2.4 Модельные системы и подходы, используемые для реконструкции монооксигеназных систем цитохромов P450 в гетерологичных клетках.....	33
2.4.1 Использование клеток бактерий и дрожжей для экспрессии генов цитохромов P450	33
2.4.2 Методы совместной экспрессии генов, используемые для реконструкции систем цитохромов P450 в гетерологичных клетках	36
2.5 Метод совместной экспрессии генов, основанный на применении нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид 2A вируса ящура и 2A-подобных пептидов	41
2.5.1 Особенности трансляции белков вируса ящура	41
2.5.2 Механизм расщепления пептида 2A.....	43
2.5.3 Характеристика последовательности пептида 2A вируса ящура и 2A-подобных последовательностей.....	45
2.5.4 Применение последовательности, кодирующей пептид 2A, для совместной экспрессии генов.....	46
2.5.5 Совместная экспрессия генов с использованием последовательностей 2A для продукции белков, применяемых в медицине и биотехнологии.....	49
2.6 Экспрессия генов белков ХГЛ системы в гетерологичных клетках	52
2.7 Практическое применение трансгенных микроорганизмов с реконструированными системами млекопитающих, гидроксилирующими стероиды.....	55
2.7.1 Трансгенные микроорганизмы для биотехнологии	55
2.7.2 Трансгенные микроорганизмы для фармакологических исследований	58
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	61
3.1 Материалы.....	61
3.1.1 Реактивы и ферменты.....	61
3.1.2 Используемые штаммы микроорганизмов и плазмиды	61
3.2 Методы	62
3.2.1 Методы работы с ДНК	62
3.2.2 Конструирование плазмид.....	63

3.2.3 Методы работы с белками	74
3.2.4 Методы, использованные при работе с клетками <i>Escherichia coli</i>	76
3.2.5 Методы, использованные при работе с клетками дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
3.2.6 Методы, использованные при работе с клетками дрожжей <i>Y. lipolytica</i>	80
3.2.7 Методы, использованные при работе с клетками НЕК293Т	84
4 РЕЗУЛЬТАТЫ	87
4.1 Реконструкция ХГЛ системы в клетках <i>E. coli</i>	87
4.1.1 Конструирование плазмид для совместной экспрессии кДНК белков ХГЛ системы	88
4.1.2 Синтез белков ХГЛ системы в рекомбинантных клетках	89
4.1.3 Каталитическая активность белков ХГЛ системы быка, синтезирующихся в клетках бактерий	91
4.1.4 Биотрансформация холестерина рекомбинантными клетками <i>E. coli</i> /pTrc99A/CHL	93
4.1.5 Влияние химических агентов на эффективность биотрансформации холестерина	95
4.1.6 Изучение влияния аминокислотных остатков, расположенных в активном центре молекулы цитохрома P450 _{ssc} , на эффективность его функционирования	98
4.2 Реконструкция ХГЛ системы в клетках <i>S. cerevisiae</i>	101
4.2.1 Конструирование бактериальной плазмиды, включающей линкерные последовательности, кодирующие пептид 2А вируса ящура	101
4.2.2 Синтез белков ХГЛ системы в клетках <i>E. coli</i>	103
4.2.3 Синтез белков ХГЛ системы в клетках <i>S. cerevisiae</i>	105
4.2.4 Функциональная активность ХГЛ системы в рекомбинантных клетках <i>S. cerevisiae</i>	109
4.3 Реконструкция ХГЛ системы быка в клетках человека линии НЕК293Т	109
4.3.1 Конструирование вектора для экспрессии генов белков ХГЛ системы в клетках линии НЕК293Т	109
4.3.2 Флуоресцентная микроскопия трансфицированных клеток	110
4.3.3 Анализ экспрессии генов белков ХГЛ системы в клетках НЕК293Т с использованием ПААГ и Вестерн-блоттинга	112
4.3.4 Активность белков ХГЛ системы в клетках линии НЕК293Т	114
4.3.5 Анализ ХГЛ активности клеток НЕК293Т, осуществляющих синтез цитохрома P450 _{ssc} быка	117
4.4 Зависимость эффективности расщепления 2А-полипротеина от последовательности пептида 2А и расположения белков-компонентов в составе 2А-полипротеина	119
4.4.1 Конструирование плазмид	120
4.4.2 Анализ синтеза полипротеина CHL-2А и эффективности расщепления линкеров 2А	121
4.4.3 Активность ХГЛ системы, реконструированной в клетках <i>S. cerevisiae</i>	123
4.5 Реконструкция ХГЛ системы в клетках дрожжей <i>Yarrowia lipolytica</i>	124
4.5.1 Получение гаплоидных трансформантов <i>Y. lipolytica</i>	125
4.5.2 Получение и анализ диплоидного штамма <i>Y. lipolytica</i>	127
5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	129
5.1 Реконструкция ХГЛ системы в клетках <i>E. coli</i>	130
5.2 Реконструкция ХГЛ системы в клетках дрожжей <i>S. cerevisiae</i> с использованием подхода, основанного на применении саморасщепляющегося пептида 2А	133
5.3 Реконструкция ХГЛ системы с использованием подхода, основанного на применении саморасщепляющегося пептида 2А, в клетках линии НЕК293Т	136

5.4 Зависимость эффективности расщепления 2А-полипротеина от последовательности пептида 2А и расположения белков-компонентов в составе полипротеина	140
5.5 Реконструкция ХГЛ системы в клетках дрожжей <i>Y. lipolytica</i>	141
6 ВЫВОДЫ	143
7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	144
БЛАГОДАРНОСТИ	164

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

АТФ – аденозинтрифосфат

БСА – бычий сывороточный альбумин

3 β -ГСД – 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа/изомераза (ЕС1.1.1.51)

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДМСО – диметилсульфоксид

дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфат

ДСН – додецилсульфат натрия

ИПТГ - изопропил- β -D-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

М – маркеры молекулярной массы белков

МЦД – β -метилциклодекстрин

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

т.п.н. – тысяча пар нуклеотидных остатков

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид

ХГЛ – холестерингидроксилаза/лиаза (цитохром Р450 холестерингидроксилаза/ 20,22-лиаза)

ХГЛ система – холестерингидроксилазная/лиазная система

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

Adx – адренодоксин, [2Fe-2S]-ферредоксин из коры надпочечников;

AdR – FAD-содержащая NADPH-адренодоксинредуктаза

FAD – флавинадениндинуклеотид

FMDV – вирус ящура (*foot-and-mouth disease virus*)

2A FMDV – пептид 2A вируса ящура

NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленный)

NADH – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленный)

Р450_{scs} – CYP11A1, цитохром Р450_{scs}, цитохром Р450 холестерингидроксилаза/ 20,22-лиаза

PBS – фосфатный буферный раствор

RBS - участок связывания рибосомы (*ribosome binding site*)

1. ВВЕДЕНИЕ

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_{scc} и 3 β -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_{scc}, адрендоксинредуктазу (AdR) и адрендоксин (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_{ssc} 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_{ssc} 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_{ssc} 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 9 работ, в том числе 4 статьи опубликованы 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; T.10.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Моноксигеназные системы цитохромов P450

2.1.1 Цитохромы P450

Цитохромы P450 представляют собой семейство гем-содержащих ферментов, являющихся монооксигеназами. Данные ферменты участвуют в биосинтезе таких важных для живых организмов соединений, как стероидные вещества, жирные кислоты, эйкозаноиды, желчные кислоты, выполняют биотрансформацию лекарственных препаратов и ксенобиотиков, а также участвуют в биоактивации химических канцерогенов. Они выполняют целый спектр регио- и стереоселективных реакций: преимущественно, это гидроксилирование, но кроме того, эпоксидование, дезаминирование, дезалкилирование, дегалогенирование и перекисное окисление (Hannemann et al., 2007, Bernhardt and Urlacher, 2014).

Впервые цитохром P450 был обнаружен при исследовании выделенных микросом крысы и описан Клингбергом в конце 1950-х годов (Klingenberg, 1958). Свое название P450 (пигмент 450) цитохромы P450 получили в связи с присутствием характерной полосы поглощения при длине волны 450 нм в спектре поглощения комплекса восстановленного фермента и монооксида углерода (СО-разностном спектре) (Omura and Sato, 1964). В настоящее время обнаружено большое количество изоформ цитохрома P450 (более 5000 генов). Они обнаружены у вирусов, простейших, архей, бактерий, животных, растений и грибов (Stavropoulou et al., 2018). В связи с идентификацией все большего числа цитохромов P450 для данных ферментов потребовалась четкая классификация, основанная на гомологии аминокислотных последовательностей белков (Nelson et al., 1993). Все гены, кодирующие изоформы цитохромов P450, обозначаются *CYP* (cytochrome P450), продукты экспрессии генов также обозначаются аббревиатурой *CYP*. Все цитохромы P450 образуют суперсемейство, которое подразделяется на семейства, обозначаемые цифрами (гомология аминокислотных последовательностей внутри одного семейства превышает 40%). Внутри семейств выделяют подсемейства, обозначаемые буквами (гомология аминокислотных последовательностей внутри подсемейства превышает 55%), затем каждому белку внутри подсемейства присваивается второй номер. Нумерация генов цитохромов P450 осуществлялась хронологически, в порядке их открытия, вне зависимости от того, в каком организме был открыт конкретный ген, поэтому, например, четыре гена *CYP3A* человека имеют нумерацию *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* и *CYP3A34* (Neubert et al., 2013).

2.1.2 Молекулярная структура цитохромов P450

Аминокислотная последовательность цитохромов из различных семейств характеризуется достаточно низкой степенью гомологии (часто менее 20%). Тем не менее, вторичные и третичные структуры данных белков высоко консервативны, что определяет общий механизм осуществляемых каталитических реакций (Werck-Reichhart and Feyereisen, 2000). Бактериальные цитохромы P450 являются растворимыми белками. Первая кристаллическая структура была получена для растворимого цитохрома P450_{cam} бактерии *Pseudomonas putida* (Poulos et al., 1985). Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что все цитохромы P450 состоят из одинаковых структурных элементов: 12 α -спиралей, обозначаемых латинскими буквами A–L, и расположенных между ними петлевых участков (Sugimoto and Shiro, 2012; Guengerich et al., 2016). Цитохромы P450 млекопитающих представляют собой белки, встроенные в мембрану. В отличие от бактериальных цитохромов P450, цитохромы P450 млекопитающих характеризуются наличием дополнительных спиралей, в основном располагающихся в петлевом участке F/G. Например, такие дополнительные спирали A' и K'' были обнаружены в митохондриальном цитохроме P450_{scc} (Mast et al., 2011). Данные спирали обеспечивают интеграцию белка в мембрану, формируют канал для взаимодействия с субстратом и обеспечивают его узнавание (Рис. 1).

Все цитохромы P450 содержат в своем составе гем - гидрофобную плоскую кольцевую структуру протопорфирина IX, в центре которой четыре атома азота координируют один атом восстановленного Fe²⁺. Спираль C, D, I, L, а также β -слои 1 и 2 составляют структурное ядро молекулы P450, части которого контактируют с гемом, а также образуют проксимальную поверхность, с которой связываются белки-партнеры цитохрома P450. (Johnson and Stout, 2013).

Цитохромы P450 взаимодействуют с широким спектром разнообразных субстратов, что обеспечивается различиями в активном центре фермента. Наиболее важную роль во взаимодействии бактериальных и эукариотических цитохромов с субстратом и обеспечении регио- и стереоселективного гидроксирования играют петли между спиралью B и C, располагающиеся над гемом, спираль I, участвующая в образовании активного центра всех P450 (Storbeck et al., 2004), а также петля между спиралью F и G (Sugimoto and Shiro, 2012).

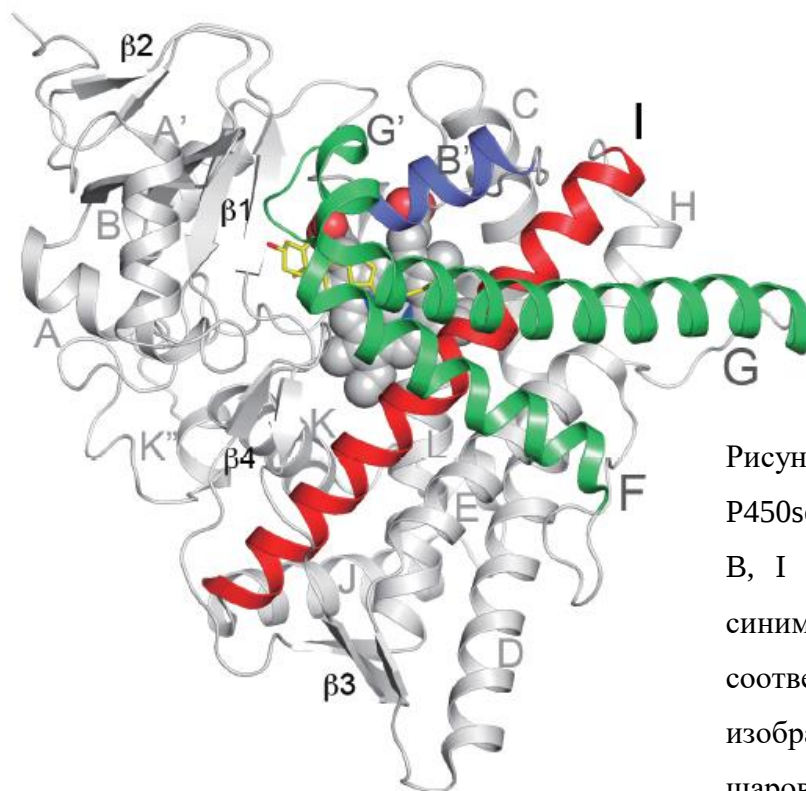


Рисунок 1. Структура цитохрома P450ssc млекопитающих. Спиральи B, I и участок F/G изображены синим, красным и зеленым цветом, соответственно. Атомы азота гема изображены в виде красных шаров, субстрат холестерин изображен желтым цветом (Sugimoto and Shiro, 2012).

2.1.3 Монооксигеназные системы цитохромов P450

Как указано ранее, цитохромы P450 являются монооксигеназами. Большинство ферментов, принадлежащих к данной группе монооксигеназ, являются гидроксилазами, катализирующими реакции окисления молекулярным кислородом органических соединений.

Большая часть цитохромов P450 функционирует в составе монооксигеназных систем, включающих, помимо цитохрома P450, донор электронов и один или два белка-переносчика электронов. В роли доноров, как правило, выступают NADH или NADPH. В зависимости от типа и количества белков-переносчиков электронов, входящих в состав монооксигеназных системы, их подразделяют на 10 классов. При этом большинство монооксигеназных систем представляет собой системы I и II классов (Hannemann et al., 2007).

P450-системы I класса состоят из трех отдельных белков: цитохрома P450, переносчика электронов - ферредоксина - и ФАД-содержащей редуктазы, осуществляющей транспорт восстановительных эквивалентов от NADH или NADPH (Рис. 2.1). К системам данного класса относятся бактериальные монооксигеназные системы и митохондриальные монооксигеназные системы млекопитающих. Все белки, входящие в

состав бактериальных систем цитохрома P450 растворимы, цитохромы P450 млекопитающих являются связанными с мембраной белками. Бактериальные цитохромы участвуют в метаболизме субстратов, служащих источником углерода, жирных кислот, разложении ксенобиотиков и синтезе вторичных метаболитов, например, антибиотиков и фунгицидов. Примером бактериальной монооксигеназной системы I класса является система цитохрома P450cam бактерии *Pseudomonas putida*. Данная система осуществляет первый этап разложения D-камфоры – основного источника углерода для данных бактерий. Помимо цитохрома в состав системы входят переносчик электронов [2Fe–2S] ферредоксин – путидаредоксин – и ФАД-содержащая НАДН-зависимая ферредоксинредуктаза – путидаредоксин редуктаза.

Митохондриальные монооксигеназные системы млекопитающих играют ключевую роль в синтезе стероидных гормонов, жирных кислот, трансформации и регулировании уровня активной формы витамина D3 (Ohyama et al., 1991, Slominski et al., 2014). Примером монооксигеназной системы млекопитающих I класса является объект данного исследования -холестерингидроксилазная/лиазная (ХГЛ) система млекопитающих, характеристики которой будут рассмотрена в данном обзоре позже (см. главу обзора литературы 2.3 «Холестерингидроксилазная/лиазная (ХГЛ) система коры надпочечников млекопитающих»).

Монооксигеназные P450-системы II класса наиболее широко представлены у эукариотических организмов. Данные системы локализуются в эндоплазматическом ретикулуме и включают в себя два компонента: цитохром P450 и NADPH-зависимую цитохром P450 редуктазу, причем оба белка погружены в мембрану (Рис. 2.И). Альтернативный вариант микросомальной системы II класса включает цитохром P450, цитохром b5 и NADH-цитохром b5 редуктазу. По-видимому, в процессе эволюции редуктаза монооксигеназной системы II класса образовалась из двух белков. Об этом можно судить по гомологии последовательности N-концевой части белка с последовательностью FMN-содержащего бактериального флаводоксина и гомологии последовательности С-концевой части с последовательностью FAD-содержащей ферредоксин NADP⁺-редуктазы (Porter and Kasper, 1986). Единственная прокариотическая монооксигеназная система II класса была описана для бактерии *Streptomyces carbophilus* (Serizawa and Matsuoka, 1991). В ее состав входят цитохром CYP105A3 и NADH-зависимая P450-редуктаза, выполняющие реакцию превращения мевастатина в правастатин – тканеспецифичный ингибитор синтеза холестерина, используемый в медицине для снижения уровня холестерина и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний.

Р450-системы III класса трехкомпонентные и напоминают по составу бактериальные и митохондриальные системы I класса – они также включают в себя цитохром Р450, NAD(P)H-зависимую FAD-содержащую ферредоксинредуктазу и небольшой белок-переносчик электронов. Отличие от систем первого класса заключается в том, что перенос электронов на Р450 осуществляется не за счет железо-серного кластера белка ферредоксина, а за счет содержащего FMN-группу белка флаводоксина (Рис. 2.III). Примерами систем данного класса являются система цитохрома CYP176A1 бактерии *Citrobacter braakii* и система цитохрома CYP107H *Bacillus subtilis*. Интересно отметить, что флаводоксин и флаводоксинредуктаза представлены в *E. coli*, несмотря на отсутствие в данном организме эндогенных цитохромов Р450.

Р450-системы IV класса обнаружены исключительно у экстремальных термофилов. Редокс белки данных систем адаптированы специально под используемые доноры электронов, отличные от NAD(P)H. Например, CYP119A1 бактерии *Sulfolobus solfataricus* функционирует в сопряжении с ферредоксином и ферредоксиноксидоредуктазой 2-оксокислот, восстанавливая пировиноградную кислоту (Puchkaev and Ortiz de Montellano, 2005) (Рис. 2.IV).

Моноксигеназные Р450-системы V класса значительно отличаются от ранее описанных систем: в их состав входят два белковых компонента – слитой белок, состоящий из цитохрома Р450 и ферредоксина, и NAD(P)H-зависимая редуктаза (Рис. 2.V). Единственная известная на настоящий момент система V класса представлена в бактерии *Methylococcus capsulatus*: С-конец гем-содержащего домена цитохрома Р450 в данной системе слит с [3Fe–4S]-ферредоксином через богатый аланином линкер, обеспечивающий гибкость всего белка и эффективное взаимодействие доменов. При этом домен цитохрома Р450 и ферредоксиновый домен *Methylococcus capsulatus* демонстрируют значительную гомологию с белками моноксигеназной системы I класса *Mycobacterium tuberculosis*, что позволяет рассматривать моноксигеназную систему V класса как результат эволюции системы I класса (Jackson et al., 2002).

Р450-моноксигеназная система VI класса также состоит из двух белков и отличается от системы V класса тем, что С-концевой ферредоксиновый домен заменяется на N-концевой флаводоксиновый домен. Помимо слитого белка флаводоксин-цитохром Р450 в состав системы входит NAD(P)H-зависимая редуктаза (Рис. 2.VI). Единственный пример системы данного типа встречается в микроорганизме *Rhodococcus rhodochrous* (Seth-Smith et al., 2002).

Моноксигеназные Р450-системы VII класса демонстрируют принципиально другой тип организации системы. Они представляют собой один белок, включающий два

функциональных домена: N-концевой домен, подобный цитохрому P450, и C-концевой редуктазный домен фталатдиоксигеназы. Два домена разделены линкером из 16 аминокислот. Редуктазный домен содержит три функциональных участка, это FMN-связывающий, NADH-связывающий и [2Fe-2S]-ферредоксиновый центры (Рис. 2.VII).

Монооксигеназные P450-системы VIII класса также представляет собой один белок, включающий 2 домена: цитохром P450-подобный домен и домен, подобный P450-редуктазе, разделенные коротким линкером. При этом редуктазный домен включает в свой состав не только FMN-связывающий и NADH-связывающий участки, но и участок, подобный [2Fe-2S]-ферредоксину. В случае систем VIII класса C-конец цитохрома P450 слит с флавооксином и ФАД-зависимой редуктазой (Рис. 2.VIII). Системы цитохромов P450 данного класса представлены в прокариотических организмах (например, *Bacillus megaterium* (Narhi and Fulco, 1986)) и низших эукариотах.

Единственным представителем **монооксигеназной P450-системы IX класса** является редуктаза оксида азота (NO) (Рис. 2.IX). Данный фермент был обнаружен в цитоплазматической и митохондриальной фракции гриба *Fusarium oxysporum* и представляет единственный пример растворимого цитохрома P450 эукариот. Редуктаза оксида азота участвует в анаэробном дыхании, превращая NO в N₂O, используя NADH в качестве донора электронов (Cook et al., 2016).

Монооксигеназные P450-системы X класса функционируют, осуществляя внутримолекулярный транспорт электронов. В отличие от типичных монооксигеназ P450, данные ферменты не нуждаются в белках-переносчиках, донорах электронов и кислороде. Данные ферменты используют гидропероксидные группы полиненасыщенных жирных кислот в качестве доноров кислорода и образуют таким образом новые кислород-углеродные связи в продуктах реакции (Рис. 2.X). Данные системы обнаружены только у растений и млекопитающих, их представителями являются синтаза оксидов алленов, лиаза гидропероксидов жирных кислот, синтаза дивиниловых эфиров, синтазы простаглицлинов и тромбоксанов. В качестве доноров кислорода P450 X класса используют гидропероксидные группы субстратов (Hannemann et al., 2007).

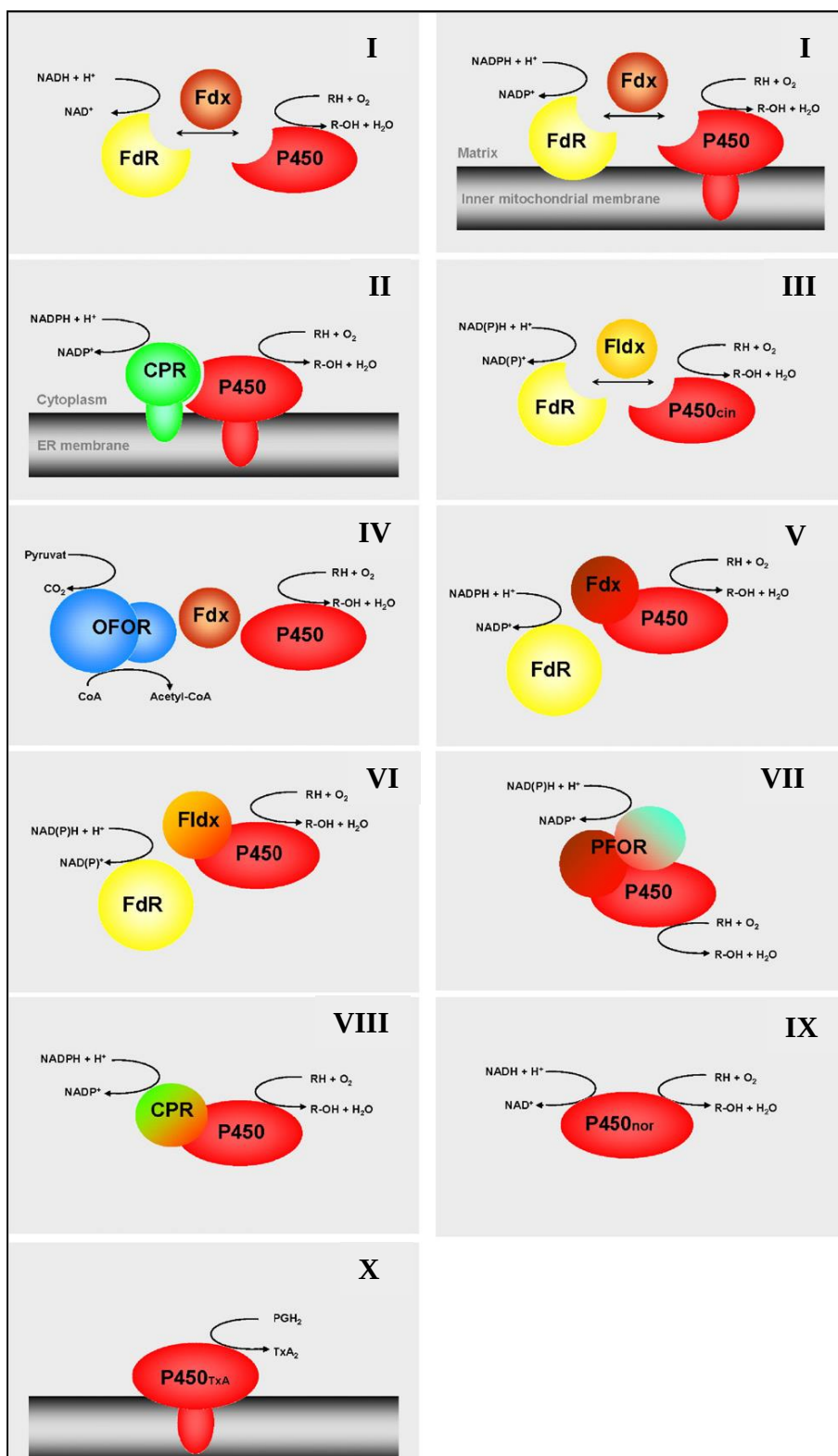
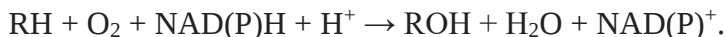


Рисунок 2. Схематическое изображение организации P-450-монооксигеназных систем разных классов (рисунок адаптирован из Hannemann et al., 2007).

2.1.4 Каталитический цикл цитохромов P450

Данные, представленные выше, демонстрируют многообразие изоформ цитохрома P450 и P450-монооксигеназных систем, существующих в природе. Несмотря на это, все цитохромы P450 осуществляют каталитическую реакцию, схема которой выглядит следующим образом:



Каталитический цикл ферментативного окисления субстратов цитохромами P450 довольно сложен и включает несколько этапов (Рис. 3). На первом этапе происходит связывание субстрата с активным центром фермента вблизи гема (Рис. 3.2). Связывание субстрата ведет к конформационной перестройке активного центра цитохрома P450, происходит освобождение молекулы воды, связанной в активном центре цитохрома P450. Связывание субстрата ведет к появлению одного или нескольких неспаренных электронов на внешней орбитали атома железа и переходу железа в высокоспиновое состояние (Рис. 3.3). Данное изменение энергии объясняет наблюдаемый СО-разностный спектр – комплекс P450 и СО характеризуется максимумом поглощения при длине волны 450 нм. Конформационное изменение P450, происходящее при связывании субстрата с ферментом запускает начало процесса переноса электронов – первый электрон переходит с NAD(P)H на группу FAD или FMN в составе молекулы редуктазы цитохрома P450, затем электроны перемещаются на гем цитохрома P450, изменяя степень окисления железа порфиринового кольца с Fe³⁺ на Fe²⁺. После этого с гемом ковалентно связывается молекулярный кислород (Рис. 3.4). Далее происходит перенос на гем цитохрома P450 второго электрона, следствием чего является образование высоко нуклеофильной нестабильной пероксидной группы (Рис. 3.5). Быстрое протонирование пероксидной группы ведет к выделению одной молекулы воды и образованию интермедиата – соединения цитохрома P450 I (Рис. 3.6). Данное промежуточное вещество является высоко реакционноспособным и окисляет связанный субстрат, включая в молекулу субстрата атом кислорода. При высвобождении субстрата его место в активном центре занимает молекула воды (Cook et al., 2016).

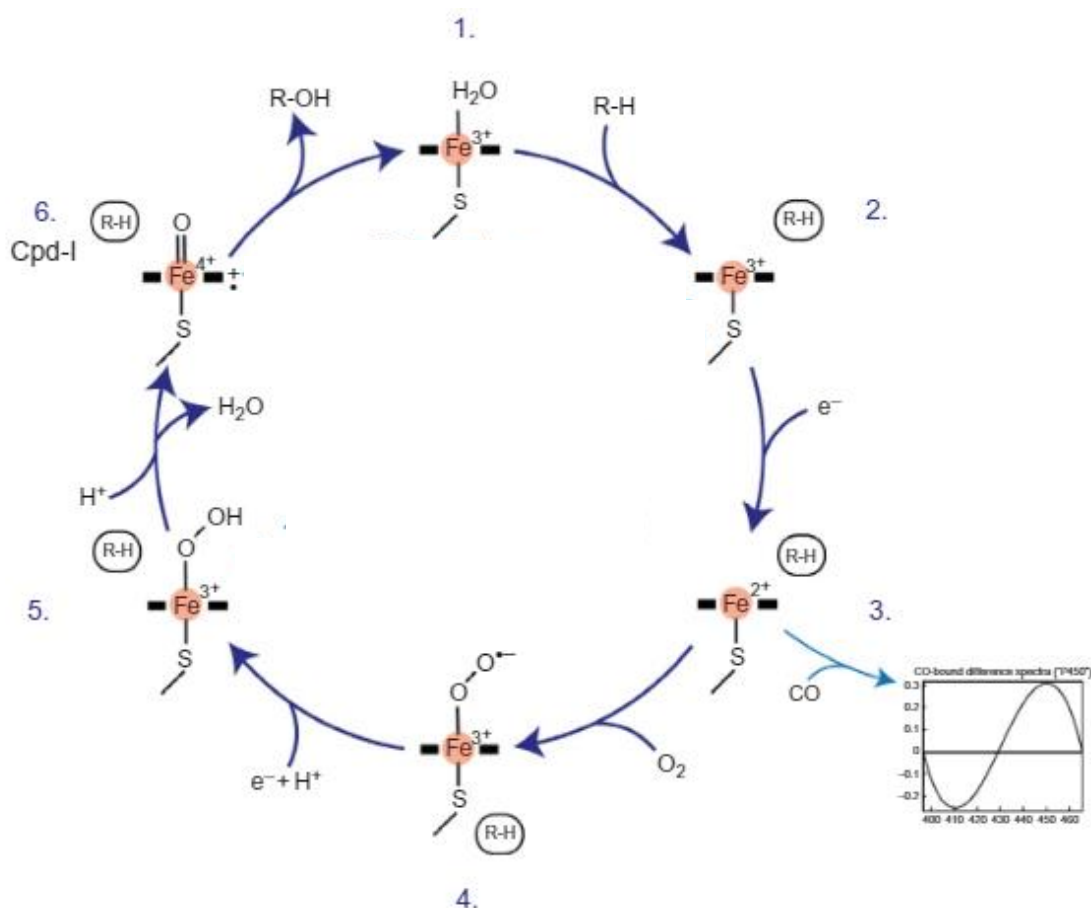


Рисунок 3. Схема каталитического цикла цитохрома P450 (рисунок адаптирован из статьи Cook et al., 2016).

2.2 Стероидогенез в организме млекопитающих

2.2.1 Стероидные гормоны и их роль

Стероидные гормоны млекопитающих представляют собой небольшие липофильные молекулы, циркулирующие в кровеносном русле и контролирующие целый спектр физиологических реакций организма: метаболизм, электролитный состав крови, эмбриональное развитие, половую дифференциацию, протекание беременности, иммунный ответ и другие. В основном стероидные гормоны млекопитающих синтезируются в стероидогенных органах: в корковом слое надпочечников синтезируются кортикостероиды (глюкокортикоиды и минералкортикоиды), а в половых железах - половые гормоны (эстрогены и андрогены). Среди женских половых гормонов наиболее значимую роль играют эстрадиол и прогестерон, а основными мужскими половыми гормонами являются тестостерон и дегидроэпиандростерон (ДГЭА). Стероидные гормоны обеспечивают регуляцию жизненных функций в организме млекопитающих посредством

взаимодействия с ядерными рецепторами (рецептором эстрогена, рецептором андрогена и др.), представляющими собой лиганд-зависимые транскрипционные факторы (Zheng and Murphy, 2016).

2.2.2 Стероидогенез

Все стероидные гормоны образуются в процессе стероидогенеза из одного предшественника – молекулы холестерина. Большая часть холестерина поступает в эндокринные клетки из плазмы крови, где он преимущественно связан с липопротеинами низкой плотности (ЛПНП), и только около 30-40% холестерина образуется в эндокринных клетках *de novo* из ацетил-КоА. Поступление комплекса холестерина с ЛПНП в клетки происходит посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза и регулируется адренокортикотропным гормоном (АКТГ) в надпочечниках, фолликул-стимулирующим гормоном (ФСГ) в яичниках и лютеинизирующим гормоном (ЛГ) в яичниках и семенниках (Eacker et al., 2008). В дальнейшем холестерин может метаболизироваться, использоваться клеткой для образования клеточных структур или храниться в виде липидных капель.

Первая реакция стероидогенеза млекопитающих протекает в митохондриях, поэтому после попадания в клетки необходим транспорт нерастворимых молекул холестерина во внутреннюю мембрану митохондрий. Транспорт холестерина из цитозоля клетки в митохондрии осуществляет белок StAR (steroidogenic acute regulatory protein – белок экстренной регуляции стероидогенеза). В случае совместной экспрессии в нестероидогенных клетках линии COS-1 генов, кодирующих белки CYP11A1, адренодоксина и StAR выход продукта реакции трансформации холестерина прегненолона, увеличивается более, чем в 4 раза, по сравнению с вариантом совместной экспрессии только генов, кодирующих CYP11A1 и адренодоксин (Sugawara et al., 1995).

Белок StAR локализуется и функционирует во внешней митохондриальной мембране клеток стероидогенных органов (Bose et al., 2002). Одна молекула StAR способна связывать одну молекулу холестерина (Tsujishita and Hurley, 2000), при этом известно, что способность белка связывать и высвобождать молекулу холестерина зависит от pH среды: в цитозоле с нейтральным или слабощелочным pH StAR демонстрирует свойства расплавленной глобулы и связывается с холестерином, после чего он транспортирует холестерин в межмембранное пространство митохондрий, в котором значительно более низкое значение pH. Высвобождение молекулы холестерина происходит в результате протонирования и смещения С-концевой α -спирали белка StAR, блокирующей полость, в которой происходит связывание субстрата (Baker et al., 2005, Miller, 2017a, Miller, 2017b).

2.2.3 Стероидогенные цитохромы P450

Стероидогенез осуществляется в организме млекопитающих с участием шести цитохромов P450: CYP11A1 (P450_{scc}), CYP11B1 (P450_{c11β}), CYP11B2 (P450_{c11AS}), CYP17 (P450_{c17α}), CYP19, CYP21 (P450_{c21}) и двух гидроксистероиддегидрогеназ (ГСД): 3β-ГСД и 17β-ГСД. Схема стероидогенеза представлена на Рис. 4.

Стероидогенные цитохромы P450 относятся к двум классам – это цитохромы P450 I класса, локализованные в митохондриях, и микросомальные цитохромы P450 II класса. К первому классу относятся 3 фермента из шести: CYP11A1, катализирующий первую и лимитирующую стадию стероидогенеза – превращение холестерина в прегненолон (Chung et al., 1986), CYP11B1 – стероид 11β-гидроксилаза, осуществляющая трансформацию 11-дезоксикортизола в кортизол и дезоксикортикостерона в кортикостерон (White et al., 1994), и CYP11B2, представляющий собой альдостеронсинтазу и превращающий дезоксикортикостерон в альдостерон (Fardella and Miller, 1996). Остальные три ключевых фермента относятся ко второму классу: CYP17A1 является 17α-гидроксилазой и 17,20-лиазой, обеспечивающей превращение прегненолона в 17-ОН-прегненолон и прогестерона в 17-ОН-прогестерон, а также дальнейшее превращение гидроксилированных по ¹⁷C стероидов в дегидроэпиандростерон (ДГЭА) и андростендион; фермент CYP19 (ароматаза) обеспечивает превращение андрогенов в эстрогены (андростендиона в эстрон и тестостерона в эстрадиол); CYP21 обеспечивает 21-гидроксилирование прогестерона и 17α-гидроксипрогестерона, выполняя ключевую роль в синтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов (Monostory and Dvorak, 2011).

Как видно из представленной схемы (Рис. 4), синтез кортизола – конечного продукта процесса стероидогенеза в коре надпочечников, является примером вовлечения в процесс как митохондриальных, так и микросомальных ферментов: холестерин поступает в митохондрии, митохондриальный CYP11A1 осуществляет превращение холестерина в прегненолон, затем прегненолон транспортируется в эндоплазматический ретикулум, где подвергается последовательному воздействию 3β-гидроксистероиддегидрогеназы, CYP17 и CYP21. Полученный в результате превращений 11-дезоксикортизол затем снова возвращается в митохондрии, где претерпевает превращение в кортизол, выполняемое CYP11B1 (Black et al., 1994). Кроме того, большинство цитохромов P450 обладают альтернативными активностями, реализуемыми одной формой белка, что обеспечивает непрерывность процесса стероидогенеза при возникновении некоторых мутаций в генах, кодирующих стероидогенные ферменты. Тканеспецифическая экспрессия данных ферментов, широкий спектр выполняемых реакций, а также доступность различных

субстратов и кофакторов ведет к разнообразию стероидогенных реакций в различных стероидогенных тканях млекопитающих. (Issop et al., 2013).

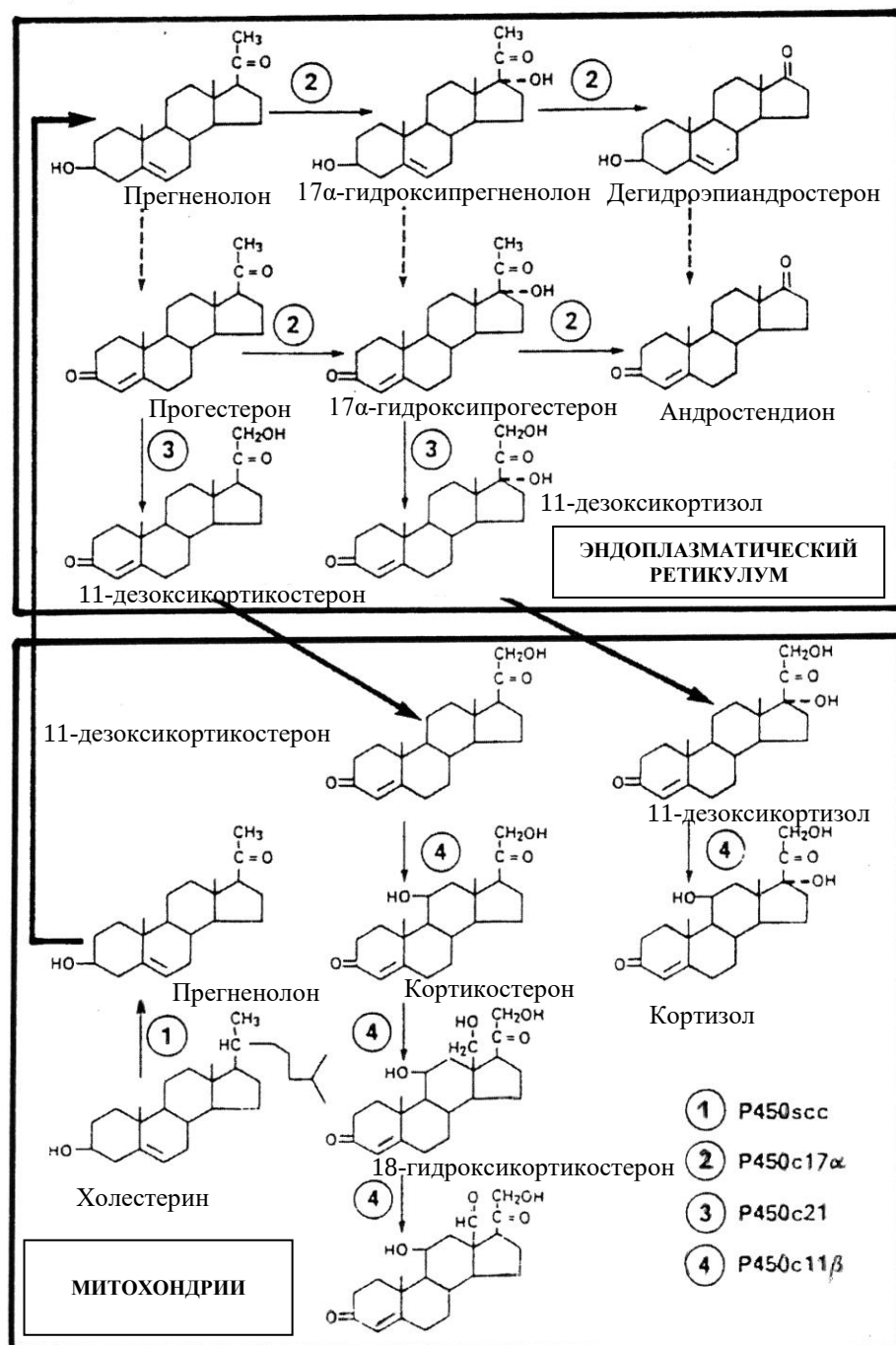


Рисунок 4. Схема стероидогенеза в клетках коры надпочечников (рисунок адаптирован из Bernhardt, 1995).

2.3 Холестерингидроксилазная/лиазная (ХГЛ) система коры надпочечников млекопитающих

2.3.1 Состав и функционирование ХГЛ системы

Холестерингидроксилазная/лиазная (ХГЛ) система представляет собой сложно организованную ферментатическую P450-систему I класса, в состав которой входят цитохром P450_{sc} (от англ. "side-chain cleavage" - отщепляющий боковую цепь) и два белка-переносчика электронов: [2Fe-2S] ферредоксин - адренodoxин (Adx), и NADPH-зависимая флавиновая редуктаза – адренodoxинредуктаза (AdR) (Orme-Johnson, 1990). ХГЛ система локализуется в митохондриях клеток стероидогенных тканей млекопитающих и выполняет первую стадию стероидогенеза - превращение холестерина в прегненолон. Прегненолон является предшественником всех стероидных гормонов в организме млекопитающих, а ХГЛ реакция лимитирует скорость всего процесса стероидогенеза. Схематическое изображение ХГЛ системы представлено на Рис. 5.

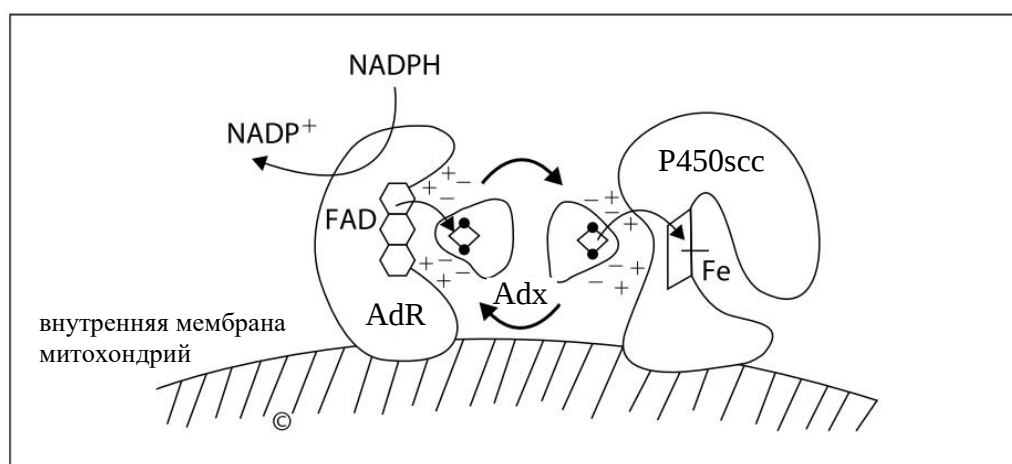


Рисунок 5. Схематическое изображение ХГЛ системы (адаптировано из Flück and Miller, 2008).

Трансформация холестерина с образованием прегненолона включает в себя три реакции: два последовательных гидроксилирования молекулы холестерина по положениям C20 и C22 боковой цепи и расщепление связи C20-C22 в молекуле 20,22-дигидроксихолестерина с образованием прегненолона и изокапронового альдегида (схема реакции приведена на Рис. 6). Для осуществления каждой монооксигеназной реакции требуются два электрона, активирующих молекулу кислорода. Перенос электронов осуществляется от донора восстановительных эквивалентов NADPH на адренodoxинредуктазу, затем на адренodoxин и на гем цитохрома P450_{sc} (Lin et al.,

1990). Электроны перемещаются по электрон-транспортной цепи за счет разности окислительно-восстановительных потенциалов между ее первым ($\text{NADPH} = -320 \text{ mV}$) и последним ($\text{O}_2 = +800 \text{ mV}$) компонентом (Рис. 7).

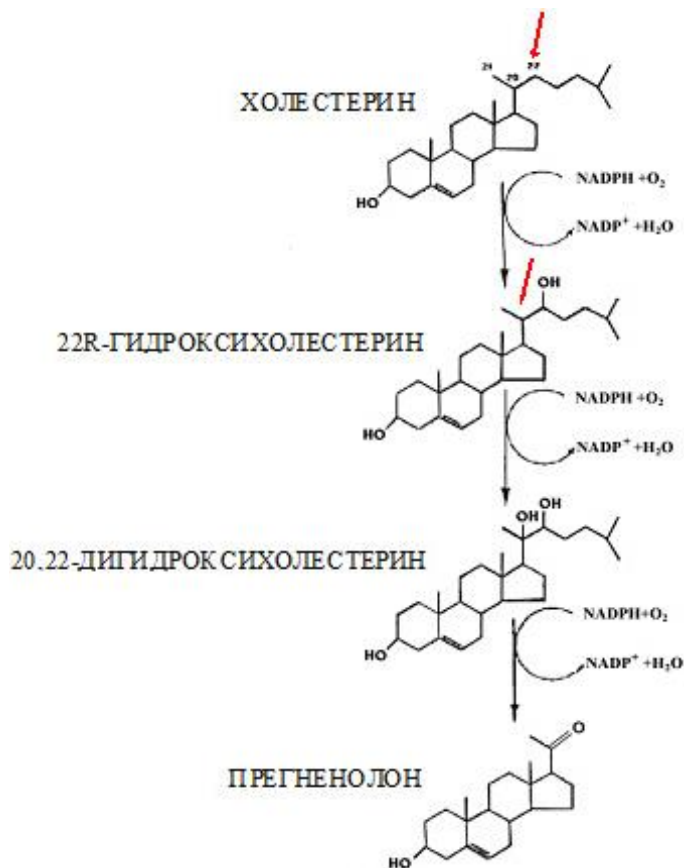


Рисунок 6. Схема реакций, катализируемых цитохромом P450scc. Стрелками указано положение атомов углерода, по которым осуществляется гидроксирование.

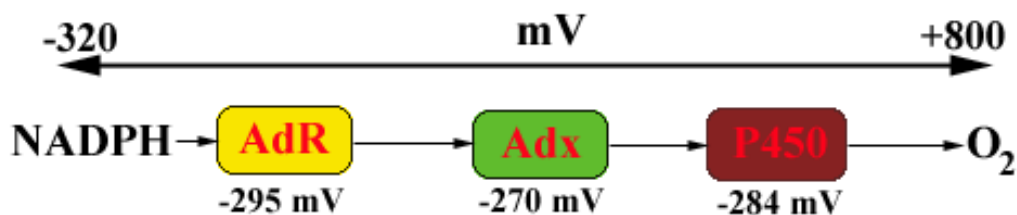


Рисунок 7. Схема электрон-транспортной цепи (Lin et al., 1990).

Цитохром P450scc работает очень медленно: одна молекула фермента обеспечивает превращение всего шести молекул холестерина в прегненолон за одну минуту (Kuwada et al., 1991).

Цитохром P450scc является белком внутренней митохондриальной мембраны и ориентирован в мембране так, что его активный центр обращён в матрикс митохондрии (Churchill and Kimura, 1979). AdR при образовании ХГЛ комплекса ассоциируется с

мембраной, а небольшой белок Adx локализован в матриксе митохондрий (Hanucoglu et al., 1990) (Рис. 5). Локализация белков ХГЛ системы имеет ключевое значение для осуществления процесса трансформации холестерина в прегненолон, поскольку источник восстановительных эквивалентов NADPH находится в матриксе, а субстрат цитохрома P450_{ssc} холестерин поступает во внутреннюю мембрану митохондрий.

Стехиометрия компонентов ХГЛ системы в настоящее время окончательно не определена. Тем не менее, согласно имеющимся данным, содержание цитохрома P450_{ssc} в митохондриях коры надпочечников быка превышает содержание AdR – соотношение содержания белков P450_{ssc}, AdR и Adx в разных работах оценивалось, например, как 8:1:3 (Hanukoglu and Hanukoglu, 1986) и 2,9:1:7,7 (Usanov et al., 1987). При взаимодействии трех очищенных белков P450_{ssc}, Adx и AdR максимальная активность ХГЛ системы наблюдается при соотношении белков P450_{ssc}, Adx и AdR 1:2:1 (Чашин, 1985), что может соответствовать оптимальной стехиометрии для белков-компонентов ХГЛ системы.

2.3.2 Характеристика и структурная организация цитохрома P450_{ssc} (CYP11A1)

Цитохром P450_{ssc} относится к классу цитохромов типа b (Nelson et al., 1993) и содержит гем (зрелая форма цитохрома P450_{ssc} содержит 1 моль гема на моль белка). Гем представляет собой железопорфирин IX. Синтез цитохрома P450_{ssc} (CYP11A1, EC 1.14.15.6) в организме млекопитающих преимущественно происходит в клетках стероидогенных тканей – в коре надпочечников, половых железах и плаценте. Однако, кроме этого, значительное количество мРНК CYP11A1 было детектировано в коже, тканях головного мозга, почки, аорты, печени, поджелудочной и предстательной желез (Mellon et al., 1991, Pezzi et al., 2003, Slominski et al., 2014).

CYP11A1 кодируется одним геном *CYP11A1*. Белок синтезируется в цитоплазме в форме предшественника, несущего N-концевую адресующую в митохондрии препоследовательность (длиной 39 и 36 аминокислот у человека и быка, соответственно). После попадания в митохондрии P450_{ssc} подвергается процессингу под действием протеиназы, связанной с внутренней мембраной, после чего зрелая форма белка связывает гем, приобретает конечную конформацию и встраивается во внутреннюю митохондриальную мембрану (Nabi et al., 1983; Omura and Ito, 1991). Зрелый цитохром P450_{ssc} быка имеет длину 481 а.о. и молекулярную массу 53 кДа (Chashchin et al., 1986). Цитохромы P450_{ssc} из разных видов млекопитающих характеризуются высокой степенью гомологии аминокислотных последовательностей; так, для P450_{ssc} из надпочечников быка и человека она превышает 70% (Payne and Hales, 2004).

Цитохром P450_{ssc} является белком, встроенным в мембрану, поэтому структурные исследования данного белка представляют большую проблему. Однако, относительно недавно появились работы, в которых были получены кристаллы P450_{ssc} и проведен детальный анализ его структуры. Так, в работе (Mast et al., 2011) получена кристаллическая структура P450_{ssc} в комплексе с промежуточным продуктом реакции 22R-гидроксистерина. Кроме того, был получен и описан кристалл искусственного гибрида P450_{ssc} и Adx, соединенных аминокислотным линкером, что позволило выяснить детали взаимодействия P450_{ssc} и аденодоксина (Strushkevich et al., 2011).

В результате выравнивания аминокислотных последовательностей цитохрома P450_{ssc} из разных видов млекопитающих, кристаллографических исследований и использования метода сайт-направленного мутагенеза в сочетании с биохимическими методами была определена организация функционально важных участков P450_{ssc}: активного центра, участка взаимодействия с субстратом, участка взаимодействия с мембраной и участка взаимодействия с аденодоксином. Одна из полученных моделей цитохрома P450_{ssc} представлена на Рис. 8.

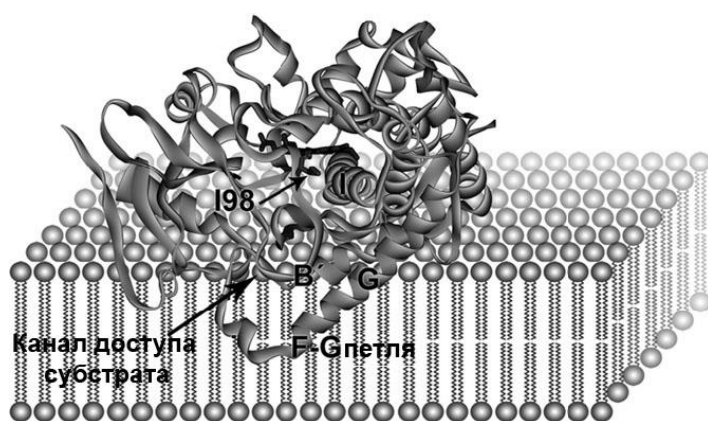


Рисунок 8. Модель цитохрома P450_{ssc}, ассоциированного с внутренней митохондриальной мембраной. Стрелкой показан вход в гидрофобный тоннель (рисунок адаптирован из Storbeck et al., 2004).

Из результатов проведенных исследований следует, что цитохром P450_{ssc} имеет каноническую укладку, характерную для всех цитохромов P450, и две дополнительные спирали: A' и K'' (Mast et al., 2011). В активном центре цитохрома содержится молекула гема, представляющая собой железопорфирин IX. В образовании активного центра участвуют 39 аминокислотных остатков из 14 вторичных структур (Mast et al., 2011). Активный центр имеет вытянутую форму и ориентирован в направлении внутренней мембраны митохондрий: из мембраны холестерин попадает непосредственно в гидрофобный тоннель, ведущий в активный центр (Storbeck et al., 2004). В образовании гидрофобного домена принимают участие петля F-G и спираль A', которые кроме того обеспечивают закоривание цитохрома в мембране (Strushkevich et al., 2011, Pikuleva,

2004). Позиционирование холестерина в активном центре P450_{scs} обеспечивается за счет его взаимодействия с множеством гидрофобных аминокислотных остатков P450_{scs} (Рис. 9). Кроме того, в работе (Mast et al., 2011) показано, что в активном центре фермента находится значительное количество молекул воды (92 молекулы), при этом 3 β -гидроксил субстрата фермента (холестерина, 22R-гидроксихолестерина и 20 α ,22R-дигидроксихолестерина) не контактирует напрямую с аминокислотами белка, а образует водородные связи с молекулами воды, находящимися в активном центре. Такой способ взаимодействия фермента с субстратом авторы называли «мягким узнаванием» субстрата.

Участок, обеспечивающий взаимодействие P450_{scs} с адренodoxином будет рассмотрен ниже при описании комплекса P450_{scs}-Adx.

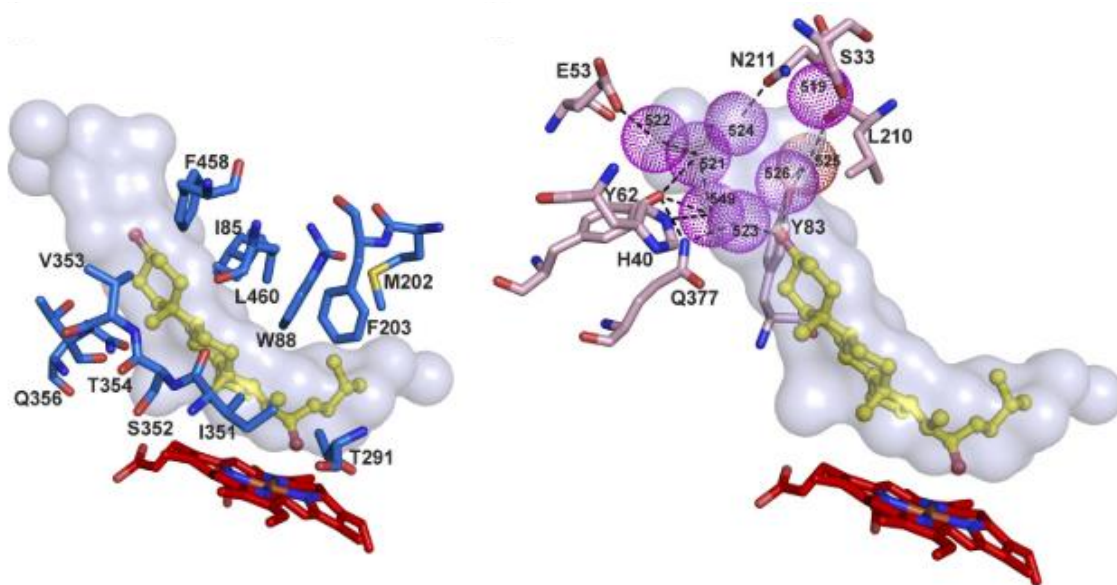


Рисунок 9. Схематическое изображение взаимодействия субстрата 22R-гидроксихолестерина (22-ГХ) с цитохромом P450_{scs}. Голубым цветом изображены а.о., располагающиеся на расстоянии до 4 Å от 22-ГХ, фиолетовыми сферами показаны молекулы воды, образующие водородные связи с 3 β -гидроксильной группой 22-ГХ и а.о., располагающиеся у входа в активный центр (изображены розовым цветом). Гем показан красным, 22-ГХ - желтыми шарами и линиями. Белая полупрозрачная полость соответствует полости активного центра P450_{scs} (рисунок адаптирован из Mast et al., 2011).

2.3.3 Характеристика и структурная организация адренодоксинредуктазы (AdR)

Адренодоксинредуктаза (AdR, NADPH:ферредоксин оксидоредуктаза, ЕС 1.18.1.2) относится к глутатионредуктазам - семейству дисульфидоксидоредуктаз, содержащих в качестве простетической группы флаavin, связанный нековалентно с молекулой белка.

AdR кодируется двумя кДНК, различающимися наличием вставки из 18 пар нуклеотидов в кодирующей области. Например, у человека синтезируется две формы AdR: 18- и 18+ (Solish et al., 1988). Форма 18+ составляет около 1% от суммарного количества мРНК адренодоксинредуктазы, однако, она неактивна, и ее функция не выяснена. Каталитическую активность проявляет только форма белка 18- (Lin et al., 1990). Гены адренодоксинредуктазы и адренодоксина экспрессируются во всех тканях организма человека (Miller, 2005).

Адренодоксинредуктаза синтезируется в цитоплазме в форме белка-предшественника. После транспорта в митохондрии адренодоксинредуктаза человека теряет адресующую последовательность длиной в 32 аминокислотных остатка, превращаясь в зрелую форму белка длиной 465 а.о., характеризующуюся молекулярной массой 51,1 кДа (Lin et al., 1990). Степень гомологии последовательностей адренодоксинредуктазы быка и человека составляет более 85% (Nonaka et al., 1987). Адренодоксинредуктаза слабо ассоциирована с внутренней митохондриальной мембраной посредством ионных взаимодействий (Hanukoglu et al., 1990, Ishimura and Fujita, 1997).

Согласно данным рентгеноструктурного анализа (Marg et al., 1992) AdR имеет в своем составе 16 α -спиралей и 18 β -слоев, которые образуют два функциональных домена с похожей топологией цепей. Оба домена характеризуются наличием нескольких параллельных β -слоев в центре, окруженных α -спиралями. Один из доменов обеспечивает связывание простетической группы FAD, которая располагается перпендикулярно С-концам параллельных β -слоев. Второй домен предназначен для связывания ко-фактора NADP и имеет дополнительный фрагмент, состоящий из 3 антипараллельных β -слоев (Ziegler et al., 1999, Ziegler and Schulz, 2000). Структура комплекса AdR:NADP⁺ представлена на Рис. 10.

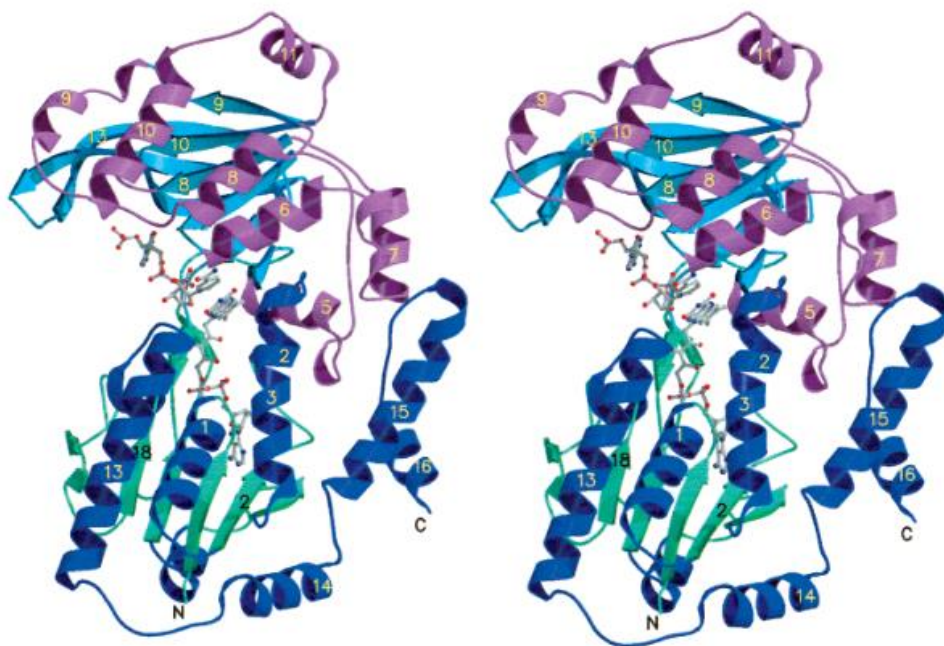


Рисунок 10. Структура комплекса AdR:NADP⁺ (Ziegler and Schulz, 2000). NADP⁺ (вверху) и FAD (внизу) представлены в виде шаростержневых моделей. NADP-связывающий домен обозначен фиолетовым и голубым цветом, FAD-связывающий домен обозначен синим и бирюзовым цветом.

2.3.4 Характеристика и структурная организация адренодоксина (Adx)

Адренодоксин (Adx) относится к семейству белков ферредоксинов. Ферредоксины млекопитающих представляют собой небольшие содержащие [2Fe-2S]-кластер растворимые белки, осуществляющие перенос электронов с ферредоксинредуктазы на митохондриальные цитохромы P450. Ферредоксины млекопитающих демонстрируют высокую степень гомологии аминокислотной последовательности (>90%).

Ферредоксин коры надпочечников, адренодоксин (Adx), является переносчиком электронов от NADPH-зависимой адренодоксинредуктазы на ряд митохондриальных цитохромов P450, в том числе на цитохром P450_{scs}, обеспечивающий превращение холестерина в прегненолон, а также на цитохромы CYP11B1 и CYP11B2, катализирующие образование кортизола и альдостерона (Bernhardt, 1995).

Адренодоксин синтезируется в цитозоле клеток стероидогенных тканей в форме предшественника, содержащего N-концевую амфифильную адресующую последовательность длиной 58 а.о., обеспечивающую транспорт белка в митохондрии. Попадая в митохондрии, Adx претерпевает процессинг с образованием зрелой формы белка длиной 128 а.о., имеющей молекулярную массу 14,4 кДа (Matocha and Waterman, 1984).

Первичная структура Adx млекопитающих характеризуется наличием трех характерных аминокислотных мотивов: 1-й мотив (а.о. Цис46-Гис56) включает три консервативных цистеина, координирующих центр [2Fe-2S]; 2-й мотив содержит кластер отрицательно заряженных а.о. (Глу65-Асп79) и обеспечивает связывание белка с AdR и P450; и 3-й мотив (Сер88-Глн93) включает в себя последовательность а.о., окружающую четвертый консервативный цистеин, координирующий [2Fe-2S] (Bairoch et al., 1997). Аминокислотный остаток Про108 в молекуле Adx является консервативным для всех ферредоксинов животных, и его наличие критично для правильного сворачивания белка (Uhlmann et al., 1994).

Согласно данным рентгеноструктурного анализа (Müller et al., 1998, Müller et al., 2001), молекула Adx состоит из крупного корового домена, содержащего [2Fe-2S]-кластер, и небольшого домена, отвечающего за взаимодействие с AdR и цитохромом P450_{scs} (Рис. 11).

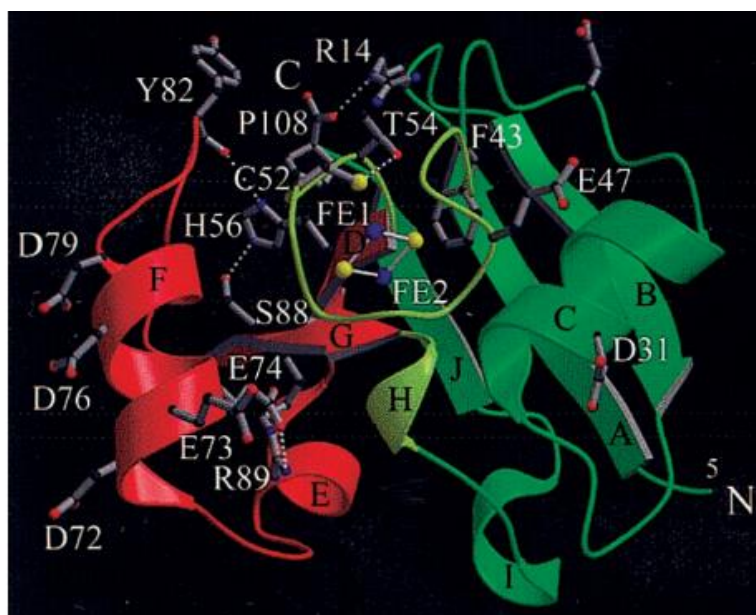


Рисунок 11. Модель адренодоксина. Красным цветом изображен домен, отвечающий за взаимодействие Adx с AdR и с цитохромом P450_{scs}, зеленым цветом изображен коровый домен; салатовым цветом изображен участок, взаимодействующий с [2Fe-2S]-кластером. [2Fe-2S]-кластер представлен в виде шаростержневой модели (Grinberg et al., 2000).

С целью увеличения каталитической активности Adx в ряде работ были исследованы мутированные формы белка с делетированными с N-конца и C-конца участками. В частности, в работе (Uhlmann et al., 1994) была проанализирована роль C-концевых фрагментов молекулы Adx путем анализа характеристик мутантов Adx4-114 и Adx4-108 с делетированными аминокислотами 1–3 и 115–128 и 109–128, соответственно. В данной работе подробно изучалась кинетика взаимодействия компонентов P450-систем митохондриальных цитохромов CYP11A1 и CYP11B1. Было показано, что C-конец молекулы Adx (аминокислотные остатки 109–128) оказывает влияние на структурную

целостность белка, а также на его взаимодействие с CYP11A1 и CYP11B1 (Uhlmann et al., 1994). В экспериментах *in vitro*, проведенных с использованием реконструированных P450-систем, укороченная версия Adx4-108 обеспечивала более эффективное гидроксилирование субстратов цитохромами CYP11A1 и CYP11B1 (эффективность конверсии субстратов (kcat/Km) увеличивается до 3 и 22 раз соответственно) по сравнению с полноразмерным Adx1-128 дикого типа. Кроме того, было показано, что мутированный аденодоксин Adx1-S112W, который укорочен с С-конца на 16 аминокислот и содержит замену аминокислоты серина на триптофан в 112 положении, формирует *in vitro* более стабильный комплекс с цитохромом P450_{ssc} по сравнению с Adx дикого типа, что приводит к повышению скорости переноса электронов и обеспечивает в системе *in vitro* 100-кратное увеличение эффективности конверсии холестерина в прегненолон (Schiffler et al., 2001, Bernhardt and Urlacher, 2014).

2.3.5 Характеристика комплексов Adx-P450_{ssc} и Adx-AdR

Реакция отщепления боковой цепи холестерина, катализируемая цитохромом P450_{ssc}, требует осуществления эффективного транспорта электронов от NADPH на гем цитохрома P450_{ssc} по электрон-транспортной цепи, которую образуют аденодоксинредуктаза и аденодоксин. Имеется две основных гипотезы, описывающих механизм взаимодействия Adx с AdR и цитохромом P450_{ssc}: во-первых, это кластерный механизм, предполагающий образование тройного комплекса между белками (P450_{ssc}/Adx/AdR) (Турко и др., 1988), второй вариант предполагает так называемый «челночный» механизм - последовательное перемещение аденодоксина между AdR и P450_{ssc} и поочередное связывание с данными белками (Lambeth et al., 1979).

Для определения механизма взаимодействия белков ХГЛ системы исследователи из нескольких научных групп получили кристаллы комплексов белков Adx с AdR и Adx с P450_{ssc} и провели их анализ (Strushkevich et al., 2011, Ziegler et al., 1999, Müller et al., 2001). Согласно полученным данным, первичный контакт между Adx и AdR реализуется за счет электростатического взаимодействия между полярными аминокислотными остатками Асп76 и Асп79 молекулы Adx и Арг244 и Арг240 молекулы AdR. Кроме того, наблюдалось взаимодействие между а.о. Асп39 Adx и Лиз27 AdR. Также было показано, что С-концевой фрагмент молекулы Adx (последние 20 а.о.) участвует в связывании белка с AdR (Uhlmann et al., 1994).

При исследовании комплекса Adx с цитохромом P450_{ssc} было показано, что во взаимодействие с P450_{ssc} вовлечены те же а.о. Асп76 и Асп79, которые участвуют и в образовании комплекса Adx-AdR, а также Асп72, которые контактируют с Лиз343, Лиз403

и Лиз339 молекулы P450_{scc}, соответственно. Дополнительный контакт выявлен между аминокислотой Adx Асп39 и Лиз126 P450_{scc} (Strushkevich et al., 2011, Müller et al., 2001). При этом С-конец молекулы адренодоксина не играет роли во взаимодействии с цитохромом P450_{scc} (Müller et al., 2001, Grinberg et al., 2000).

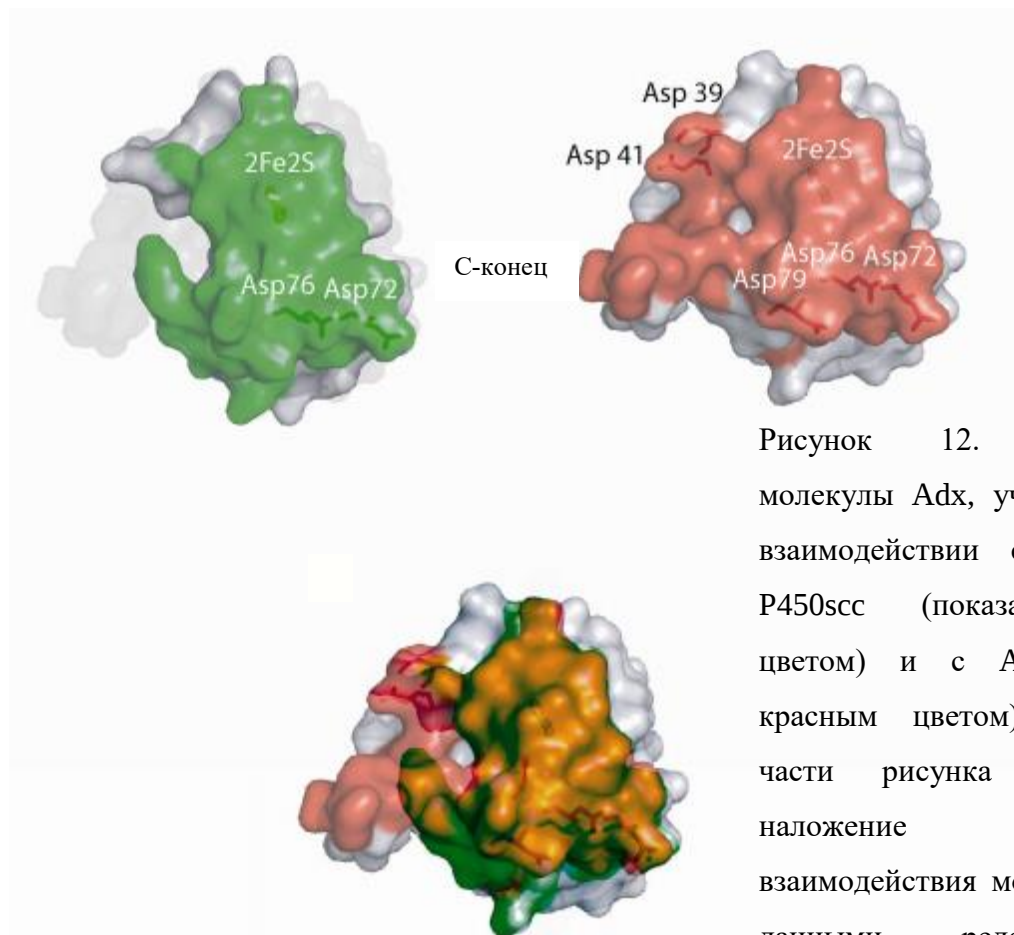


Рисунок 12. Поверхность молекулы Adx, участвующая во взаимодействии с цитохромом P450_{scc} (показана зеленым цветом) и с AdR (показана красным цветом). В нижней части рисунка представлено наложение участков взаимодействия молекулы Adx с данными редокс-партнерами (показано оранжевым цветом).

На Рис. 12. изображены участки молекулы адренодоксина, вступающие во взаимодействие с цитохромом P450_{scc} и с AdR. Из рисунка видно, что участки Adx, обеспечивающие взаимодействие с редокс-партнерами, в значительной степени перекрываются. Опираясь на полученные кристаллографические данные и результаты их анализа исследователи пришли к выводу о том, что образование тройного комплекса P450_{scc}/Adx/AdR представляется маловероятным. Таким образом, полученные данные свидетельствуют в пользу «челночного» механизма функционирования адренодоксина.

2.4 Модельные системы и подходы, используемые для реконструкции монооксигеназных систем цитохромов P450 в гетерологичных клетках

Цитохромы P450 являются ключевыми участниками различных метаболических процессов – они обеспечивают трансформацию целого спектра разнообразных веществ, включая стероиды, ксенобиотики, антибиотики, терпены, алканы, жирные кислоты и др. Интерес к изучению цитохромов P450 также связан с их уникальной способностью выполнять реакции с высокой регио- и стереоселективностью.

Поскольку зрелые цитохромы P450 млекопитающих локализуются в мембранах ЭПР и митохондрий, их выделение из тканей млекопитающих затруднено. Изучение функционирования P450 в *in vitro*-системах также связано с некоторыми трудностями: во-первых, за некоторыми исключениями, цитохромы P450 функционируют в комплексе с белками-партнерами – ферредоксином и цитохром P450 редуктазой, кроме того, для их функционирования необходимо наличие восстановительных эквивалентов. Немаловажно то, что в системе *in vitro* необходимо строго контролировать условия среды, поддерживая температуру, pH и концентрацию солей, оптимальные для работы цитохрома.

Гетерологичная реконструкция систем цитохромов P450 в клетках микроорганизмов – бактерий и дрожжей, проводится с целью создания более простых модельных систем для изучения особенностей строения и функционирования цитохромов P450 и их взаимодействия с белками-партнерами в разных клетках, для изучения действия и метаболизма лекарственных средств, а также для биотехнологического синтеза ценных продуктов, проводимых с использованием рекомбинантных штаммов. Однако, при проведении реконструкции систем цитохромов P450 необходимо изучение спектра собственных P450 микроорганизма, поскольку их каталитические активности могут перекрываться с целевыми реакциями, что ведет к снижению выхода продукта реакции и образованию побочных продуктов.

2.4.1 Использование клеток бактерий и дрожжей для экспрессии генов цитохромов P450

Использование клеток бактерий для экспрессии генов цитохромов P450

Самым простым модельным организмом для реконструкции монооксигеназных систем цитохромов P450 является бактерия *E. coli*. Преимуществом клеток *E. coli* перед другими микроорганизмами является отсутствие в них собственных цитохромов P450, что обеспечивает возможность изучения рекомбинантных P450 в отсутствие фона и снижает вероятность образования побочных продуктов (Nelson et al., 1993). К другим

преимуществам можно отнести более быстрый рост культуры, более высокий уровень экспрессии белков Р450-систем и их каталитической активности (Hausjell et al., 2018).

Цитохромы Р450 млекопитающих содержат сигнальные последовательности, предназначенные для их адресования в эндоплазматический ретикулум или митохондрии. Ввиду отсутствия в бактериальной клетке органелл, соответствующих адресующим последовательностям этих белков, некоторые гетерологичные цитохромы Р450 демонстрируют тенденцию к агрегации и скоплению в особых образованиях, так называемых тельцах включения или подвергаются в клетках протеолитической деградации (см., например, Nazarov et al., 2003).

Проблему встраивания цитохрома в мембрану *E. coli* можно решить несколькими способами. Во-первых, это удаление или модификация части кДНК гена с 5'-конца с целью получения растворимой или ассоциированной с мембраной формы белка (Hausjell et al., 2018). Второй метод – это замена эукариотической адресующей последовательности на последовательность, обеспечивающую мембранную локализацию бактериального белка. Еще одним подходом является полное удаление N-концевой адресующей препоследовательности цитохрома Р450 (Wada et al., 1991). Эффективная модификация N-концевой последовательности цитохрома Р45017 α , увеличившая выход белка и обеспечившая его активное встраивание в цитоплазматическую мембрану бактерий, была впервые проведена в работе (Barnes et al., 1991). Исследователи оптимизировали первые восемь кодонов 5'-участка кДНК цитохрома таким образом, чтобы вторая аминокислота в белке была заменена на аланин, а общее содержание нуклеотидных пар А=Т в данном участке было увеличено. Данный подход позволил минимизировать вероятность образования вторичных структур в участке связывания мРНК с рибосомой. Проведенная в работе (Sueyoshi et al., 1995) модификация 5'-последовательности кДНК микросомального цитохрома Р4502а-4 мыши для замены гидрофобного N-конца белка на амфифильный пептид привела в результате к экспрессии в *E. coli* растворимой формы цитохрома Р4502а-4, при этом уровень его экспрессии был увеличен в 4 раза. Преимуществом экспрессии растворимой формы цитохрома является возможность использования его для последующей кристаллизации и изучения структуры белка. Таким образом была изучена структура нескольких цитохромов Р450 человека (Yano et al., 2005, Smith et al., 2007).

В литературе отмечены примеры сопряжения рекомбинантного цитохрома Р450 с собственными белками-переносчиками электронов бактерий. В этом случае может отсутствовать потребность в гетерологичной продукции белков-партнеров цитохрома Р450 в клетках используемых клетках и, следовательно, в проведении дополнительных генетических модификаций. В реконструированной *in vitro* системе было показано, что

переносчики электронов *E. coli* Fld и FldR способны функционально сопрягаться с рекомбинантным цитохромом P450c17 быка, обеспечивая протекание 17 α -гидроксилазной реакции (Jenkins and Waterman, 1994). Аналогичным образом, в системе *in vitro* поддерживать функциональную активность цитохрома P450c17 быка могут Fld и FldR цианобактерии *Anabaena*. Однако, такие системы часто менее активны, чем ферментные системы, включающие белки одного организма. Так, например, активность системы P450c17_{Bov}/Fld_{An}/FldR_{An} была в 2-3 раза выше активности системы P450c17_{Bov}/Fld_{E.coli}/FldR_{E.coli}, однако, она значительно уступает активности природной гомологичной системы цитохрома P450c17 (Jenkins et al., 1997a, Jenkins et al., 1997b), что указывает на неоптимальное функционирование рекомбинантного цитохрома P450 в сопряжении с бактериальными редокс-белками.

Использование клеток дрожжей для экспрессии генов цитохромов P450

Для реконструкции цитохромов P450 также используют клетки дрожжей, при этом наиболее популярным модельным организмом являются пекарские дрожжи – *Saccharomyces cerevisiae*, поскольку они являются наиболее простой в обращении культурой клеток, кроме того, для работы с данными клетками разработано большое количество плазмидных векторов. В отличие от бактерий дрожжи являются эукариотическим организмом, способны обеспечивать посттрансляционные модификации белков, характерные для эукариотических организмов, а также имеют мембранные органоиды, в том числе эндоплазматический ретикулум и митохондрии, в мембраны которых могут встраиваться эукариотические P450. Дрожжи характеризуются высокой скоростью роста на недорогих питательных средах (время удвоения 1,5-2 часа) и их культуры достигают высокой плотности (до 100 г сухого веса клеток на 1 л культуры). Следует также отметить, что дрожжи являются общепризнанно безопасными организмами (GRAS – generally recognized as safe) и используются для производства продуктов питания и фармацевтических субстанций (Dumas et al., 2006). Тем не менее, при синтезе мембранных белков в клетках дрожжей ученые сталкиваются с проблемами, аналогичными описанным выше. Для увеличения эффективности синтеза рекомбинантных белков в дрожжах так же, как и при синтезе в бактериях, последовательности кДНК белков часто необходимо модифицировать. Например, было показано, что синтезированный в клетках *S. cerevisiae* предшественник цитохрома prP450scs быка эффективно импортируется в митохондрии, но с низкой эффективностью процессируется в зрелую форму – большая часть белка накапливалась в матриксе митохондрий и впоследствии подвергалась протеолитической деградации. По-видимому,

дрожжевые протеиназы, осуществляющие процессинг, могут узнавать сигнальную последовательность белков млекопитающих, однако, узнавание происходит с меньшей эффективностью. В экспериментах по импорту в изолированные митохондрии дрожжей цитохрома P450_{ssc} быка в результате замены природной последовательности митохондриальной локализации на адресующую в митохондрии препоследовательность IV субъединицы цитохром *c*-оксидазы дрожжей эффективность процессинга и интеграции P450_{ssc} в мембрану увеличивалась, по меньшей мере, на два порядка. Однако при этом только около 1/10 всего транспортированного в митохондрии P450 интегрируется в мембрану и демонстрирует каталитическую активность (Kovaleva et al., 2003). В то же время в клетках *S. cerevisiae* была успешно синтезирована зрелая форма цитохрома P450_{ssc}, который осуществлял эффективную конверсию аналога холестерина дрожжей – эргоста-5-енола – в прегненолон (Szczebara et al., 2003).

Белки-переносчики электронов дрожжей также способны поддерживать функциональную активность цитохромов P450 млекопитающих. Так, например, в результате сопряжения рекомбинантной альдостеронсинтазы (CYP11B2) (Bureik et al., 2002) и стероид-11 β -гидроксилазы (CYP11B1) человека (Drăgan et al., 2005) и эндогенных переносчиков *etp1* (аналога адренодоксина млекопитающих) и *Arh1* (аналога адренодоксинредуктазы млекопитающих) в дрожжах *S. pombe* была продемонстрирована конверсия 11-дезоксикортикостерона в кортикостерон и 11-дезоксикортизола в кортизол соответственно.

2.4.2 Методы совместной экспрессии генов, используемые для реконструкции систем цитохромов P450 в гетерологичных клетках

С целью увеличения активности рекомбинантных цитохромов P450 в клетках микроорганизмов, совместно с геном P450 в клетку вводят гены электрон-транспортных белков, составляющих функционально активную систему с данным цитохромом. Для совместной экспрессии нескольких гетерологичных генов в клетках бактерий и дрожжей, кодирующих целевые белки, применяется большое количество разнообразных методов, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Ниже приведено подробное описание методов, используемых для совместной экспрессии генов, кодирующих белки-компоненты монооксигеназных систем цитохромов P450-

Создание слитых белков

Известно, что слитой цитохром P450 102A1 (P450BM3) – гидроксилаза жирных кислот бактерии *Bacillus megatherium* – обладает очень высокой каталитической активностью и самым высоким числом оборотов среди всех известных цитохромов P450. Данный белок состоит из 2-х слитых доменов - P450 и домена редуктазы, содержащего участки связывания FAD и FMN (Sevrioukova and Peterson, 1995). Позже были открыты слитые P450-монооксигеназные системы эукариот, включающие цитохромы P450, принадлежащие к семейству CYP505. Например, клетки плесневого гриба *Aspergillus fumigatus* синтезируют чрезвычайно активный слитой белок CYP505X (Weis et al., 2009). Ввиду высокой активности слитых P450-монооксигеназных систем предполагалось, что создание искусственных слитых белков, включающих белки P450-монооксигеназных систем из одного или различных организмов, ускорит транспорт электронов между компонентами системы и решит проблему размыкания каталитического цикла, в результате которого потребление восстановительного эквивалента не ведет к превращению субстрата ферментом, а кислород восстанавливается в супероксид, молекулу перекиси водорода или воды (Bernhardt and Urlacher, 2014).

В литературе представлены примеры создания слитых двухкомпонентных и трехкомпонентных слитых P450-монооксигеназных систем. Так, например, были сконструированы слитые белки, в состав которых входили различные цитохромы P450 человека (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1 и CYP3A4) и редуктаза цитохрома P450. Измеренная *in vivo* активность этих белков в клетках *E. coli* была сравнимой с активностью системы, реконструированной из индивидуальных белков (Parikh et al., 1997). В работе (Inui et al., 2007) для создания слитого белка также применяли микросомальный цитохром CYP3A4 и редуктазу цитохрома P450, дополнительно вводя в открытую рамку считывания ген цитохрома b5. Цитохром b5 обеспечивает передачу второго электрона на P450, тем самым увеличивая активность реакции. Полученный белок CYP3A4-Red-b5 демонстрировал более высокую активность, чем система, составленная из индивидуальных P450, редуктазы и цитохрома b5.

Детальный анализ особенностей функционирования слитого белка, включающего цитохром P450cam, путидаредоксин (Pdx) и путидаредоксинредуктазу (PdR) и синтезированного в клетках *E. coli*, был проведен в работе (Sibbesen et al., 1996). Природная система P450cam включает в себя белки P450cam, Pdx и PdR в стехиометрическом соотношении 1:8:20 и демонстрирует очень высокую активность. Активность наиболее эффективного из слитых белков – PdR-Pdx-P450cam – была сравнима с активностью системы из индивидуальных белков в стехиометрическом

соотношении 1:1:1, но примерно на порядок ниже природной системы с оптимальным стехиометрическим отношением. При этом активность слитого белка с измененным порядком кДНК P450cam-PdR-Pdx была значительно ниже. Авторы показали, что скорость транспорта электронов между Pdx и PdR не уступает таковой в реконструированной системе из индивидуальных белков, а между потреблением NADH и окислением камфоры наблюдается полное сопряжение. Таким образом, лимитирующей скоростью реакции стадией является взаимодействие Pdx и P450cam, что подтверждается увеличением активности системы при добавлении индивидуального Pdx, а также при взаимодействии индивидуального P450cam со слитым белком PdR-Pdx.

Однако, в отношении тройных слитых белков, включающих цитохром P450, ферредоксин и ферредоксинредуктазу, были получены противоречивые выводы. При экспрессии в клетках линии COS-1 слитых белков preP450scs-AdR-Adx (Harikrishna et al., 1993, Black et al., 1994) и preP45027A1-AdR-Adx (Dilworth et al., 1996) активность системы, как и в случае PdR-Pdx-P450cam, превышает активность соответствующей системы, состоящей из индивидуальных белков. При этом активность слитого белка зависит от порядка кДНК в его составе, а наиболее активными являются версии с расположением кДНК ферредоксина на С-конце белка. С другой стороны, например, при экспрессии в COS-1 клетках слитого белка preP450c11-Adx-AdR полученная система оказалась менее эффективной, чем цитохром P450c11, функционирующий в составе монооксигеназной системы, реконструированной из индивидуальных белков (Cao et al., 2000).

В целом, можно отметить, что способ реконструкции систем цитохромов P450 путем создания слитых белков часто не эффективен. По всей видимости, низкая каталитическая активность слитого белка связана с затрудненным сворачиванием протяженной белковой молекулы или ее протеолизом, а также с наличием стерических ограничений для взаимодействия компонентов слитого белка друг с другом (Shet et al., 1997, Nazarov, 2003).

Совместная экспрессия кДНК, кодирующих белки системы цитохрома P450, в составе одной экспрессионной кассеты

кДНК гетерологичных белков можно объединить в составе одной экспрессионной кассеты под контролем одного промотора и терминатора, встроив перед каждой из кДНК короткий сайт посадки рибосомы (для последующей экспрессии кассеты в клетках бактерий) или более объемную последовательность IRES (Internal Ribosome Entry Site — участок внутренней посадки рибосомы, для последующей экспрессии кассеты в

эукариотических клетках). При таком подходе с кассеты экспрессии будет синтезироваться общая полицистронная мРНК, обеспечивающая синтез индивидуальных белков. В литературе отсутствуют примеры применения последовательности IRES для совместной трансляции белков монооксигеназных систем, вероятно, вследствие большого размера и, соответственно, неудобства использования данной последовательности. Однако, метод полицистронной экспрессии генов в клетках бактерий часто применяется для реконструкции систем цитохромов P450.

В работе (Gillam et al., 1999) с использованием бицистронной плазмиды, кодирующей гены цитохрома P4502E1 и редуктазы цитохрома P450 человека в клетках *E. coli* реконструирована активная P450-система; в экспериментах в системе *in vitro* с использованием мембранной фракции клеток *E. coli* осуществлялась конверсия субстрата индола в индиго – синий краситель, применяющийся в промышленности. С использованием трицистронной плазмиды, кодирующей гены цитохрома CYP109B1 *Bacillus subtilis*, а также путидаредоксина и путидаредоксинредуктазы из бактерии *Pseudomonas putida* в клетках *E. coli* реконструирована система, способная к превращению (+)-валенсена в (+)-нуткатон – природный ароматизатор, содержащийся в маслах грейпфрута (Girhard et al., 2009). Для увеличения активности синтеза и снижения вероятности формирования побочных продуктов реакции в данной работе авторы изменяли условия культивирования клеток – они культивировали клетки *E. coli* в двухфазной системе, состоящей из водной фазы и 10% додекана, с добавлением 2% ДМСО. При использовании двухфазной системы уровень синтеза побочных продуктов реакции снизился с 35% до 3% от общего количества продукта реакции, а активность системы составила 120 мг целевого продукта на 1 л культуры клеток. Дополнительные примеры применения данного подхода для реконструкции P450-систем в клетках, будут рассмотрены ниже (см. главы 2.6 «Экспрессия генов белков ХГЛ системы в гетерологичных клетках» и 2.7 «Практическое применение трансгенных микроорганизмов с реконструированными стероидгидроксилирующими системами млекопитающих»).

Введение целевых генов в отдельные экспрессионные кассеты, включенные в состав одного или нескольких векторов

Целевые гены могут быть экспрессированы в составе индивидуальных кассет экспрессии. В таком случае каждый ген находится под контролем собственного промотора и терминатора. Отдельные кассеты экспрессии могут располагаться как в составе одного вектора, так и в составе нескольких отдельных векторов. Для исключения вероятности рекомбинации между плазмидами или между участками внутри плазмиды

для каждой экспрессионной кассеты необходимо использовать различные промоторы и терминаторы. Кроме того, при применении нескольких различных векторов необходимо, чтобы они содержали различные селективные маркеры. Однако, недостатком такого подхода является то, что различные промоторы могут обеспечивать различный уровень экспрессии отдельных генов.

В работе (Sakaki et al., 1992) гены цитохрома P450c27 крысы, аденодоксина и аденодоксинредуктазы быка были совместно экспрессированы в составе трех отдельных кассет экспрессии, расположенных внутри одного вектора. Последовательность митохондриальной локализации цитохрома P450c27 была заменена на микросомальную адресующую последовательность цитохрома P450c17 быка, аденодоксин и аденодоксинредуктазу экспрессировали в зрелой форме. Интересно, что полученная в данной работе монооксигеназная система демонстрировала каталитическую активность в клетках *E. coli in vivo*, несмотря на пространственное разобщение ее компонентов (P450c27 транспортировался в ЭПР, а Adx и AdR оставались в цитозоле).

В работе (Voice et al., 1999) впервые был осуществлен совместный синтез цитохрома CYP3A4, редуктазы цитохрома P450 и цитохрома b5 человека в клетках *E. coli*. При этом гены CYP3A4 и редуктазы были введены в состав одной плазмиды, а ген цитохрома b5 был экспрессирован с использованием другой плазмиды. В работе было показано, что добавление к системе цитохрома CYP3A4 цитохрома b5 приводит к увеличению стабильности CYP3A4 и увеличением скорости окисления нифедипина и 6 β -гидроксилирования тестостерона в 1,5-2 раза.

В работе (Hannemann et al., 2006) была продемонстрирована совместная экспрессия в клетках *E. coli* генов аденодоксина и аденодоксинредуктазы быка, локализованных в составе одной бицистронной плазмиды, и гена цитохрома CYP106A2 *Bacillus megatherium*, локализованного в другой моноцистронной плазмиде. Полученные клетки бактерий успешно осуществляли превращение 11-дезоксикортикостерона в 15 β -дезоксикортикостерон.

Еще одним подходом, обеспечивающим введение нескольких гетерологичных кДНК в геном дрожжей, редко используемым в настоящее время, является **подход, основанный на использовании мультикопийных плазмид**, интегрирующихся в повторяющиеся элементы генома дрожжей, такие как локус rDNA (Steinborn et al., 2007), Ту-элемент дрожжей *S. cerevisiae* (Boeke et al., 1988) или LTR zeta ретротранспозона Ylt1 дрожжей *Y. lipolytica* (Juretzek et al., 2001, Forster et al., 2007). В нашей лаборатории впервые с использованием одновременной трансформации смесью трех интегративных векторов с

идентичным селективным маркером, коинтегрирующихся в локусы rDNA или LTR zeta, в клетках дрожжей *Y. lipolytica* реконструирована активная ХГЛ система (Novikova et al., 2009). Поскольку в клетках наблюдался низкий уровень экспрессии гетерологичных генов и низкая активность, эта работа сейчас продолжается с целью оптимизации условий экспрессии генов гетерологичных белков.

Еще один интересный подход, способный обеспечить одновременное введение нескольких чужеродных генов в клетку, разработанный не так давно, основан на **использовании плазмид, включающих нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид 2А вируса ящура**, встроенную между коэкспрессируемыми кДНК. Данный подход использован в настоящей работе, ранее он не использовался для реконструкции в клетках энзиматических систем цитохромов P450. Подробно данный подход будет рассмотрен в следующей главе.

В связи с тем, что спектр микроорганизмов, использующихся в современных исследованиях, постоянно расширяется, а каждый из существующих на данный момент методических подходов, используемых для совместной экспрессии белков, имеет свои плюсы и ограничения, развитие методологии реконструкции чужеродных полиферментных систем в различных микроорганизмах-хозяевах по-прежнему представляется актуальной и интересной задачей.

2.5 Метод совместной экспрессии генов, основанный на применении нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид 2А вируса ящура и 2А-подобных пептидов

2.5.1 Особенности трансляции белков вируса ящура

Вирус ящура (*foot and mouth disease virus – FMDV*) принадлежит к роду Афтовирус семейства Пикорнавирусы. Его геном представляет собой одноцепочечную РНК положительной полярности длиной около 8,5 т.п.н., кодирующую одну открытую рамку считывания. Таким образом, в результате трансляции образуется один полипротеин длиной примерно 250 кДа, который, однако, не детектируется в инфицированных клетках вследствие быстрого ко- и посттрансляционного процессинга с образованием отдельных белков. мРНК вируса ящура имеет протяженную 3'-некодирующую область, короткую 5'-некодирующую область и кодирующий участок, условно подразделяемый на 4 части – L^{Pro}, P1, P2 и P3 - в соответствии с функциями закодированных белков (см. Рис. 13). Фрагмент L^{Pro} кодирует папаин-подобную протеиназу. В участке P1 закодированы

структурные белки капсида (VP4, VP2, VP3 и VP1), в участке P2 закодированы белки 2A, 2B и 2C, участок P3 кодирует белки 3A, 3B, 3C^{Pro} и 3D^{Pol}. Белки 3C^{Pro} и 3D^{Pol} являются протеиназой и РНК-зависимой РНК-полимеразой, соответственно. Непосредственно после трансляции протеиназа L^{Pro} расщепляет связь между фрагментом полипептида L^{Pro} и фрагментом P1, таким образом самостоятельно процессируясь в отдельный белок. Протеиназа 3C^{Pro} обеспечивает расщепление фрагмента полипротеина P1-2A на отдельные белки, а также осуществляет процессинг фрагментов P2 и P3 (Belsham, 1993; Kjær and Belsham, 2018).

Отделение фрагмента полипротеина P1-2A от остальной части полипротеина происходит непосредственно во время трансляции по принципиально иному механизму – во время синтеза белка в консервативном участке на С-конце пептида происходит «проскок» рибосомы, после чего рибосома реинициирует синтез белка, располагающегося ниже 2A пептида. В результате данного процесса образуются два индивидуальных белка (Gao et al., 2016).

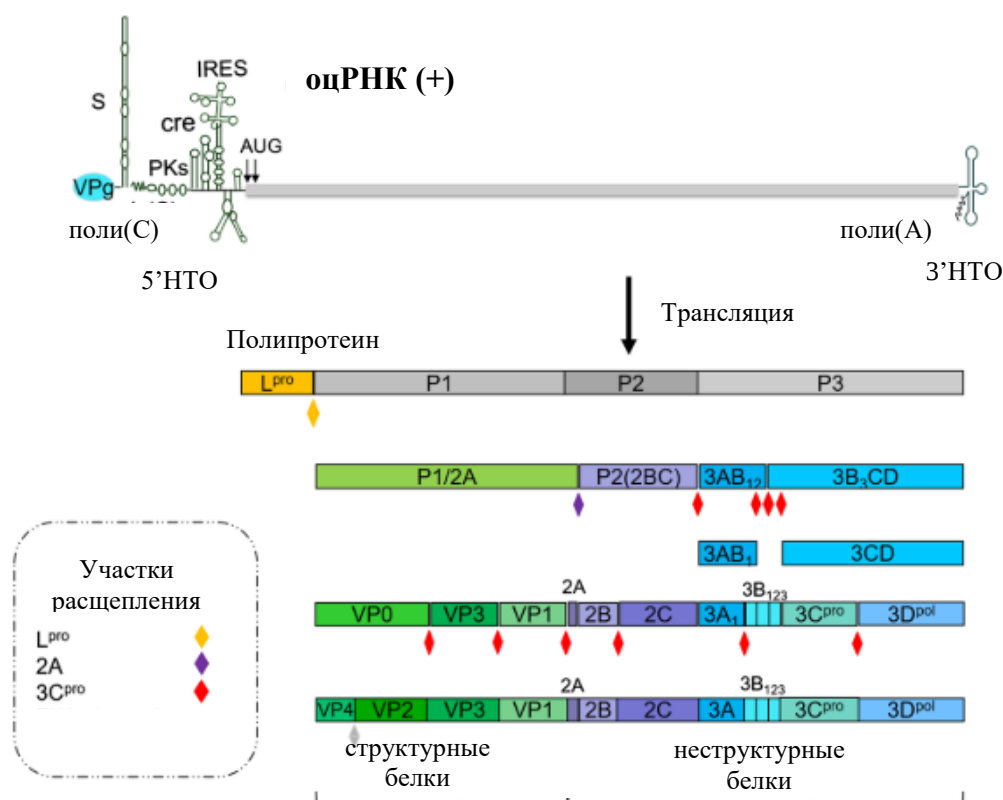


Рисунок 13. Схематическое изображение генома вируса ящура и процессинга синтезируемого вирусного полипротеина (рисунок адаптирован из Gao et al., 2016).

2.5.2 Механизм расщепления пептида 2А

Детальное исследование последовательности 2А началось в группе Мартина Райана в начале 1990-х годов. В 1991 г. группа ученых рассматривала две гипотезы: либо пептид 2А может представлять собой «саморасщепляющуюся последовательность», либо этот 2А-пептид расщепляется протеиназой клетки-хозяина (Ryan et al., 1991). В 1994 г. впервые была создана ДНК-конструкция, в которой кДНК, кодирующую пептид 2А длиной 19 а.о., поместили в чужеродный ДНК-контекст между двумя репортерными генами – геном хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) и геном β -глюкуронидазы (GUS). Было показано, что синтезируемый полипротеин CAT-2А-GUS расщепляется с образованием двух продуктов: белка CAT-2А и белка GUS, несущего дополнительный пролин (остаток пептида 2А) на N-конце. Эффективность расщепления составила около 80%. Таким образом, оказалось, что небольшой пептид длиной 19 а.о., включающий в себя 18 а.о. пептида 2А и N-концевой пролин белка 2В, представляет собой автономную расщепляющуюся последовательность, и его расщепление не зависит от действия вирусных протеиназ. При этом некоторые особенности расщепления, такие как очень быстрая скорость расщепления, устойчивость расщепления к действию ингибиторов протеиназ, отсутствие в пептиде аминокислотных мотивов, характерных для протеиназ и слишком маленький размер 2А пептида указывали на то, что данный пептид сам по себе не является протеиназой. Кроме того, исходя из полученных данных, авторы заключили, что расщепление 2А протеиназой клетки хозяина также представляется маловероятным, при этом возможно, что «последовательность 2А вируса ящура каким-то образом препятствует образованию нормальной пептидной связи в ходе трансляции» (Ryan and Drew, 1994). Данная гипотеза была подтверждена экспериментами: было обнаружено, что количество N-концевого продукта расщепления 2А-полипротеина превышает содержание С-концевого компонента полипротеина. При экспрессии полипротеина GFP-2А-GUS и полипротеина с измененным порядком компонентов GUS-2А-GFP *in vitro* количество N-концевого компонента (GFP-2А или GUS-2А) всегда превышало количество С-концевого компонента (GUS или GFP, соответственно), при этом в различных экспериментах соотношение N- и С-концевого компонентов полипротеина варьировало от 2:1 до 10:1 (Donnelly et al., 2001a).

С целью более тщательного изучения механизма расщепления был проведен эксперимент по трансляции полипротеина GFP-2А-GUS в присутствии антибиотика пуромицина. Известно, что пуромицин включается на С-конец синтезируемого белка, что ведет к преждевременной остановке трансляции. При этом включение пуромицина с большей вероятностью может происходить в тех участках мРНК, где рибосома

приостанавливает трансляцию (совершает «паузу»). В результате проведенного эксперимента с использованием антител к пуромину был обнаружен единственный продукт трансляции - GFP-2A-Puro. Включение пуромидина указывало на наличие кинетически медленного этапа трансляции в области С-конца пептида 2А, в ходе которого может происходить гидролиз сложноэфирной связи и формирование двух индивидуальных белков (Donnelly et al., 2001a). В работе (Doronina et al., 2008) было показано, что эукариотические факторы терминации трансляции eRF1 и eRF3 играют ключевую роль в процессе расщепления линкера 2А. Авторы исследовали процессинг полипротеина, включающего пептид 2А, в экстрактах клеток *S. cerevisiae* со сниженной продукцией фактора eRF1 и клеток *S. cerevisiae*, синтезирующих фактор eRF3 со сниженной ГТФазной активностью. В первом случае эффективность расщепления полипротеина снижалась примерно на 40%, что вело к преимущественному синтезу полноразмерного полипротеина. В случае нарушения функционирования фактора eRF3 рибосомы не могли пройти участок «паузы», что приводило к преимущественному синтезу первого компонента полипротеина, в то время как количество продуцируемого второго компонента и полноразмерного полипротеина было значительно снижено.

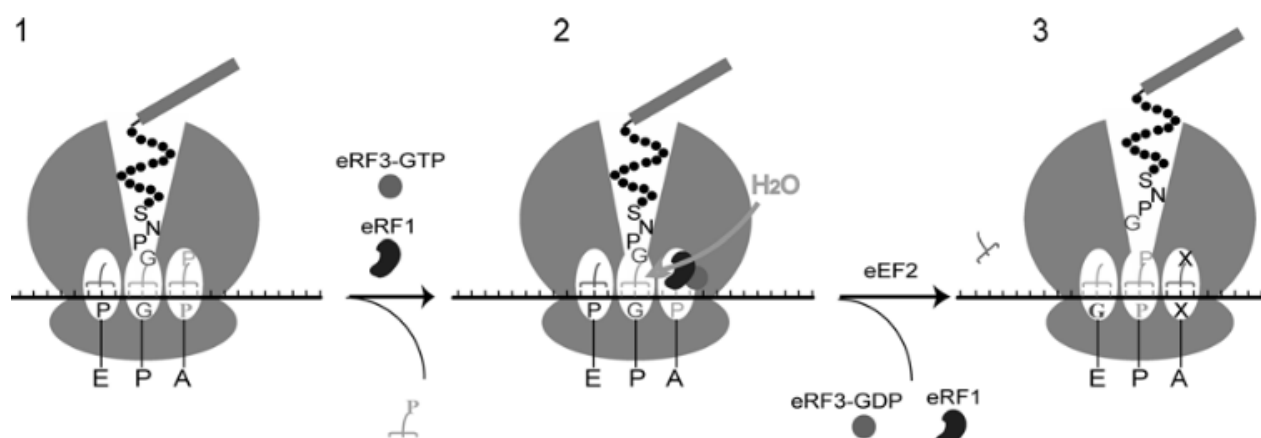


Рисунок 14. Механизм действия пептида 2А. Описание см. в тексте. eRF – эукариотические факторы терминации трансляции (Yan et al., 2010).

В результате проведенных экспериментов авторы предложили следующий механизм образования разрыва в консервативном участке пептида 2А: рибосома синтезирует белок до включения глицина в 18 положении линкера 2А. Затем рибосома смещается таким образом, что кодоны 18Гли и 19Про оказываются, соответственно, в Р- и А-участках пептидилтрансферазного центра. На этом этапе конформация 2А создает напряжение в пептидил-трансферазном центре рибосомы, препятствует нуклеофильной атаке пролил-тРНК, но способствует связыванию с рибосомой фактора терминации, который

осуществляет гидролиз сложноэфирной связи. Затем, предположительно, пептид 2А остается связанным с рибосомой и способствует возобновлению трансляции. Пролил-тРНК^{Pro} входит в А-участок и затем перемещается в Р-участок, после чего продолжается синтез следующего индивидуального белка, первой аминокислотой в котором является пролин (Doronina et al., 2008, De Felipe et al., 2003).

2.5.3 Характеристика последовательности пептида 2А вируса ящура и 2А-подобных последовательностей

В ходе изучения пептида 2А вируса ящура было показано, что минимальный размер последовательности 2А, демонстрирующей расщепление, составляет 13 а.о. вместе с N-концевым пролином белка 2В (Ryan and Drew, 1994). При этом сравнительный анализ аминокислотных последовательностей пептидов 2А представителей нескольких родов Пикорнавирусов (в частности афтовировусов и кардиовирусов) выявил наличие консенсусной последовательности -DxEхNPGP-, необходимой для расщепления – расщепление происходит между С-концевыми глицином и пролином (Donnelly et al., 1997). Модификация консервативных аминокислотных остатков приводила к полному прекращению расщепления пептида (Donnelly et al., 2001b). Модификация аминокислотных остатков, не являющихся строго консервативными, также вела к снижению эффективности расщепления пептида, однако, не предотвращала расщепление полностью (Ryan et al., 1991). Пептид 2А демонстрирует активность при введении его в любой аминокислотный контекст, однако, окружающие пептид аминокислотные последовательности, особенно предшествующие 2А-пептиду аминокислотные остатки, влияют на эффективность его расщепления. В связи с тем, что эффективность расщепления 2А-пептида зависит от пространственной структуры, которую принимает аминокислотная последовательность (жесткая α -спираль), исследователи утверждают, что именно последовательность аминокислот, а не последовательность нуклеотидов имеет ключевое значение для активности линкера. Так, в работе (Gao et al., 2014) была проанализирована зависимость эффективности расщепления пептида 2А от синонимичной замены кодона ключевого остатка 18Гли и показано, что эффективность расщепления оставалась неизменной на уровне 88%.

В различных исследованиях эффективность расщепления пептида 2А вируса ящура варьировала от 40% (Kim et al., 2011) до 100% (Roongsawang et al., 2010, Szymczak et al., 2004). В работах по изучению саморасщепляющейся последовательности 2А было продемонстрировано два способа увеличения эффективности расщепления линкеров. Первый способ состоит в удлинении линкера с N-конца путем добавления к нему

аминокислот белка 1D, располагающегося в геноме вируса ящура перед пептидом 2A (Ryan et al., 1991, Donnelly et al., 1997, Donnelly et al., 2001b). Так, в работе (Donnelly et al., 2001b) эффективность расщепления полипротеина GFP-2A-GUS составляла около 90%. Добавление 5 а.о. с С-конца белка 1D увеличивало эффективность расщепления до 96%, а добавление 14 а.о. – до 99%. В другой работе, выполненной на линии клеток почки новорожденного хомяка (ВНК-21) и на легочных макрофагах свиньи (Groot Bramel-Verheij et al., 2000) добавление семи аминокислот (APVKQLL) с С-конца белка 1D вело к увеличению эффективности расщепления пептида 2A на 15%. Второй способ увеличения эффективности расщепления состоит в добавлении на N-конец пептида 2A сочетания аминокислот Гли-Сер-Гли. Данный аминокислотный линкер увеличивает подвижность аминокислотной последовательности пептида 2A, что ведет к более эффективному сворачиванию пептида с приобретением необходимой пространственной структуры. Кроме того, линкер Гли-Сер-Гли ограничивает влияние на пептид предшествующего аминокислотного контекста (Holst et al., 2006). Так, например, в некоторых случаях применение линкера Гли-Сер-Гли ведет к увеличению эффективности расщепления пептида 2A до 100% (Szymczak-Workman et al., 2012).

Помимо описанной ранее последовательности 2A вируса ящура в начале 2000-х годов были впервые описаны «2А-подобные» последовательности, обнаруженные у других вирусов. В частности, такие последовательности были найдены у других представителей семейства Пикорнавирусов, вирусов насекомых и Ротавирусов типа С (Donnelly et al., 2001b, Szymczak et al., 2004, Osborn et al., 2005). Наиболее широкое применение в биотехнологии и медицине помимо пептида 2A вируса ящура (2A FMDV, F2A), нашли характеризующиеся высокой эффективностью расщепления «2А-подобные» пептиды вируса *Thosea asigna* (T2A), вируса *Porcine techovirus-1* (P2A) и вируса *Equine rhinitis A* (E2A).

2.5.4 Применение последовательности, кодирующей пептид 2A, для совместной экспрессии генов

Применение для совместной экспрессии генов полицистронных кассет с включенной кДНК, кодирующей саморасщепляющийся линкер 2A вируса ящура, началось относительно недавно, но уже получило широкое распространение. Единственным недостатком использования 2A для этих целей является то, что при расщеплении 2A-полипротеина 18 а.о., происходящих из пептида 2A, остаются связанными с С-концом предшествующего белка, а С-концевой пролин пептида 2A становится первой аминокислотой нижележащего компонента полипротеина. Тем не менее, пептид 2A

демонстрирует следующие преимущества: 1) использование пептида 2А обеспечивает трансляцию нескольких индивидуальных белков в эквимольных количествах с одной рамки считывания под контролем одного промотора; 2) небольшой размер пептида (54 – 74 п. о.); 3) при использовании нескольких пептидов 2А эффективность расщепления одного пептида не зависит от эффективности расщепления других; 4) возможность совместной продукции белков вне зависимости от типа эукариотической клетки (поскольку расщепление происходит в рибосоме, а структура рибосом эукариотических организмов высоко консервативна (Minskaia and Ryan, 2013)).

Было показано, что применение линкера 2А позволяет обеспечивать совместный синтез белков с различными адресующими последовательностями и, соответственно, направлять полученные белки в различные компартменты клетки. В целом, при наличии у обоих белков-компонентов 2А-полипротеина адресующих последовательностей и эффективном расщеплении линкера 2А белки локализуются согласно своим адресующим последовательностям (Provost et al., 2007, Rasala et al., 2014, Sun et al., 2017). В работе (Amrani et al., 2004) было продемонстрировано эффективное посттрансляционное адресование белков в хлоропласты с использованием сигнального пептида, при этом эффективный транспорт белков наблюдался вне зависимости от их расположения в составе полипротеина – до или после пептида 2А, а белки, не несущие адресующей последовательности, оставались в цитоплазме. Однако, в некоторых работах описаны случаи ошибочного адресования белка, который не несет адресующей последовательности, или даже имеет определенную препоследовательность. Так, часть белка или весь синтезирующийся белок, образующийся из двухкомпонентного 2А-полипротеина, закодированный ниже последовательности 2А, может направляться в целевой компартмент первого белка. В работе (De Felipe and Ryan, 2004) впервые было отмечено «проскальзывание» второго компонента 2А-полипротеина в транслокон вслед за первым компонентом 2А-полипротеина при его импорте в ЭР, наблюдавшееся как в отсутствие так и при наличии у белка с неправильной локализацией сигнального пептида для посттрансляционного адресования в ядро или митохондрию. Позднее ученые объяснили данное явление тем, что в ходе котрансляционного транспорта расщепление 2А линкера угнетается, и второй компонент полипротеина входит в целевую органеллу в составе нерасщепленного полипротеина (De Felipe et al., 2010). Таким образом, в некоторых случаях ошибочное адресование обусловлено недостаточно эффективным расщеплением линкера, что ведет к адресованию гибридного белка в соответствии с препоследовательностью первого компонента полипротеина. Например, в работе (Sun et al., 2017) с использованием линкера 2А вируса ящура была проведена совместная

экспрессия белка GFP, несущего сигнал адресования в хлоропласты, и белка RFP, не несущего адресующей последовательности. Исследователи наблюдали, что в случае экспрессии полипротеина preGFP-2A-RFP белок GFP эффективно направлялся в хлоропласты, при этом в хлоропластах также была отмечена слабая красная флуоресценция. В случае экспрессии полипротеина RFP-2A-preGFP белок RFP оставался в цитоплазме, GFP эффективно транспортировался в хлоропласты, однако, в цитоплазме также наблюдалась слабая зеленая флуоресценция. Авторы объясняют такое распределение белков наличием небольшого количества нерасщепленных полипротеинов. В большинстве случаев проблема ошибочного адресования может быть решена путем увеличения эффективности расщепления 2A-линкера (см. выше) или замены 2A-линкера на более эффективный, например, на последовательности T2A, P2A и E2A. Так в статье (Kim et al., 2011) авторы исследовали локализацию зеленого флуоресцентного белка EGFP, несущего последовательность ядерной локализации (nls-EGFP), и красного флуоресцентного белка mCherry, несущего последовательность мембранной локализации (mCherry-CAAX), гены которых в кассете экспрессии соединяли различными линкерами 2A. Белки направлялись точно в целевые органеллы, согласно их адресующим последовательностям только в случае применения эффективного линкера T2A. Эффективность расщепления последовательностей 2A снижалась в следующем порядке: T2A>P2A>F2A>E2A. При использовании менее эффективных 2A-последовательностей красная флуоресценция mCherry наблюдалась как в мембране, так и в ядре и цитоплазме. В другой статье (Daniels et al., 2014) авторы исследовали 2A-полипротеин, состоящий из красного флуоресцентного белка dsRed, слитого с последовательностью ядерной локализации, и EGFP, несущего последовательность мембранной локализации; гены данных белков были закодированы в составе одной кассеты экспрессии и разделены различными последовательностями 2A. Эффективность расщепления последовательностей 2A снижалась в следующем порядке: P2A>T2A>E2A>F2A. В случае применения P2A авторы наблюдали красную флуоресценцию в ядре и зеленую флуоресценцию в цитоплазматической мембране. Однако, чем менее эффективный линкер они использовали, тем более интенсивную перинуклеарную и менее интенсивную мембранную зеленую флуоресценцию они наблюдали. Еще один механизм неправильного адресования белков, экспрессирующихся в составе саморасщепляющегося 2A-полипротеина, описан в работе (Samalova et al., 2006): авторы показали, что сам по себе пептид 2A может служить сигналом адресования в вакуоли растений. Кроме того, наблюдаемые результаты в отношении адресования могут искажаться деградацией большого нерасщепившегося нефункционального полипротеина в клетке. Так, в

исследовании (Rothwell et al., 2010) наличие деградации было подтверждено наличием ко-локализации нерасщепившегося 2А-полипротеина с Rab7 – маркером поздних эндосом.

О применении пептидов 2А вируса ящура и 2А-подобных последовательностей в клетках прокариотических организмов в литературе имеется ограниченное количество данных. В клетках *E. coli* была экспрессирована слитая кДНК, включающая гены хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) и β -глюкуронидазы, соединенные последовательностью 2А (CAT-2А-GUS) (Donnelly et al., 1997). Учитывая отсутствие индивидуальных белков, авторы сделали вывод о том, что механизм расщепления пептида 2А реализуется исключительно в эукариотической системе трансляции. В работе (Park et al., 2008) в клетках *E. coli* также не наблюдалось расщепления полипротеина, состоящего из лигазы и серотонин-N-гидроксицинамоилтрансферазы, соединенных пептидом 2А вируса ящура. Позднее в клетках *E. coli* была экспрессирована кДНК, включающая четыре копии генов, кодирующих белок VP-1, разделенные последовательностями 2А вируса ящура (Dechamma, et al., 2008). Первый белок VP-1 в составе полипротеина содержал Гистаг, что позволяло элюировать продукты трансляции, некоторые из которых соответствовали по молекулярной массе мономеры, димеру, тримеру и тетрамеру VP-1. Авторы заключили, что разрыв аминокислотной последовательности происходит на С-конце каждого из пептидов 2А с низкой эффективностью.

2.5.5 Совместная экспрессия генов с использованием последовательностей 2А для продукции белков, применяемых в медицине и биотехнологии

Примеры использования указанного подхода для продукции белков в медицинских целях:

В работе (Fang et al., 2005), гены тяжелой и легкой цепи терапевтического антитела DC101 (rAAV8-DC101) соединяли в одной кассете экспрессии с использованием линкера F2А или с использованием последовательности IRES. Проведенный анализ показал, что продукция антител в линии клеток НЕК293Т, трансфицированных конструкцией, содержащей последовательность 2А, в 9 раз превышает выход, наблюдавшийся при использовании вектора, включающего последовательность IRES.

В работе (Chng et al., 2015) технологию с использованием пептида 2А применили для синтеза моноклональных антител (трастузумаба, адалимумаба и бевацизумаба), используемых в клинической практике, в линии клеток СНО. Гены тяжелой и легкой цепи антитела соединяли линкером 2А. В работе были проанализированы 4 различных последовательности 2А – F2А, E2А, P2А и T2А. Для увеличения эффективности

расщепления 2А-линкера к N-концу последовательности 2А добавляли аминокислоты GSG, а перед GSG - сайт расщепления протеиназы фурина, обеспечивающий отрезание пептида 2А от предшествующего белка. Наиболее эффективное расщепление демонстрировал линкер Т2А (около 90%), что обеспечивало самый высокий уровень продукции антител. Далее в порядке убывания эффективности располагались линкеры Р2А, F2А, E2А. Интересно, что добавление аминокислот GSG незначительно сказывалось на эффективности расщепления Т2А и E2А, однако увеличивало эффективность расщепления F2А примерно в два раза и Р2А примерно в 10 раз. Полученный при использовании GSG-Т2А титр антител составил 357-600 мг/л.

В работе (Lin et al., 2018) в составе одной рамки считывания с использованием линкера 2А были коэкспрессированы гены легкой и тяжелой цепи антитела к эпитопному пептиду вируса Эбола. В качестве организма-продуцента авторы выбрали растения табака. В результате получен высокий выход антител с высокой аффинностью к эпитопному пептиду вируса Эбола.

В работе (Lorenzo et al., 2015) был сконструирован лентивирусный вектор, кодирующий две субъединицы интерлейкина-12, разделенные последовательностью Р2А, под контролем индуцируемого воспалением промотора. Интерлейкин-12 (ИЛ-12) представляет собой провоспалительный цитокин, который обладает противораковыми свойствами. Полученный вектор обеспечивает эквимоллярную продукцию субъединиц р40 и р35 ИЛ-12 в участках, где происходит воспаление. Кроме того, использование вирусного вектора с большой вероятностью ведет к запуску интерферонового ответа, усиливающего противоопухолевые свойства ИЛ-12.

В работе (Szymczak et al., 2004) авторы соединили в составе одной кассеты экспрессии 4 гена, кодирующих различные белки CD3 (CD3ε, γ, δ, ζ), участвующие в формировании комплекса Т-клеточный рецептор:CD3. Полученная генетическая конструкция обеспечивала продукцию четырех белков в эквимоллярном соотношении. С использованием ретровирусного вектора, содержащего полученную кассету экспрессии, авторы провели трансдукцию костного мозга мышей, дефицитных по всем четырем генам CD3, что привело к успешному возобновлению развития Т-клеток.

Единственным примером использования 2А для экспрессии гена цитохрома Р450 является работа (Lengler et al., 2005). Ген цитохрома CYP2B1 крысы соединяли линкером 2А в составе одной кассеты экспрессии с геном зеленого флуоресцентного белка. CYP2B1 человека участвует в метаболизме различных лекарственных препаратов. Работа была проведена на линии клеток НЕК293. При расположении гена CYP2B1 на первом месте в кассете экспрессии его каталитическая активность снижалась примерно в 2 раза, а при

перемещении гена на вторую позицию каталитическая активность фермента составляла от 70 до 100% от активности, наблюдавшейся при трансформации клеток плазмидой с индивидуальным геном CYP2B1. Эти данные указывают на возможное снижение активности цитохрома P450 при наличии остатка 2A на его С-конце.

Примеры использования указанного подхода для продукции белков в биотехнологии:

В работе (Ha et al., 2010) авторы выполнили в клетках эндосперма риса совместную экспрессию генов фитоенсинтазы и каротиндесатуразы, кодирующих белки, которых участвуют в синтезе каротиноидов, с целью получения новой линии биотехнологически ценного золотого риса. В данной работе авторы сравнили эффективность коэкспрессии генов с использованием линкера 2A и последовательности IRES тобамовируса крестоцветных и показали, что применение последовательности 2A обеспечивает в 9 раз более высокий уровень продукции β -каротина, чем применение последовательности IRES.

В работе (Beekwilder et al., 2014) в клетках *S. cerevisiae* был реконструирован путь синтеза ароматизатора β -ионона. Для этого авторы соединили в одной кассете экспрессии три гена белков, обеспечивающих синтез β -каротина, с использованием последовательностей линкера T2A и включили в вектор в составе отдельной кассеты экспрессии ген диоксигеназы, расщепляющей цепь β -каротина с образованием β -ионона и геранилацетона. Общий выход целевого продукта β -ионона в работе составил $0,22 \pm 0,06$ мг/г сухого веса клеток. Интересно, что в данной работе авторы также предприняли попытку использовать линкер P2A. Однако, он был не функционален в клетках *S. cerevisiae*. Авторы объяснили этот факт тем, что конформация пептида P2A, возможно, не способна индуцировать конформационные изменения дрожжевой рибосомы.

В работе (Roongsawang et al., 2010) авторы коэкспрессировали с использованием последовательности линкера 2A вируса ящура гены фитазы и ксиланазы *Aspergillus niger* в дрожжах *Pichia pastoris*. Было показано, что клетки дрожжей обеспечивают синтез и выведение в среду культивирования стехиометрически равных количеств фитазы и ксиланазы, имеющих важное значение для пищевой промышленности.

В работе (de Amorim Araújo et al., 2015) в дрожжах *Pichia pastoris* была осуществлена коэкспрессия генов эндоглюканазы II и циллобиогидролазы II аскомицета *Trichoderma reesei* с использованием последовательности 2A вируса ящура. Клетки дрожжей синтезировали эквимоллярные количества обеих целлюлаз, а также обеспечивали надлежащее гликозилирование белков. Оба фермента были каталитически активны, при этом наличие остатка пептида 2A на С-конце белка циллобиогидролазы II не снижало его

каталитическую активность. В результате был получен штамм дрожжей *Pichia pastoris*, продуцирующих целлобиозу.

2.6 Экспрессия генов белков ХГЛ системы в гетерологичных клетках

Изучение специфики топогенеза и функционирования компонентов ХГЛ системы млекопитающих непосредственно в митохондриях клеток стероидогенных органов затруднено ввиду трудоемкого выделения и культивирования данных клеток, а также наличия в них большого числа изоформ цитохромов P450, выполняющих целый каскад стероидогенеза, из которого невозможно выделить одну целевую реакцию. Первые исследования компонентов ХГЛ системы были направлены на клонирование кДНК белков ХГЛ системы и изучение ее белков в гетерологичных системах на основе клеток млекопитающих, дрожжей и бактерий (например, Morochashi et al., 1984). В 1991 г. в клетках *E. coli* впервые экспрессирована зрелая форма цитохрома P450_{ssc}. Было показано, что зрелый P450_{ssc} встраивается в цитоплазматическую мембрану бактериальных клеток, демонстрирует СО-разностный спектр, характерный для нативного P450_{ssc}, а также проявляет ферментативную активность при добавлении к препарату мембран очищенных белков Adx и AdR (Wada et al., 1991). Таким образом, клетки *E. coli* являются подходящей моделью для изучения стероидогенных ферментов. В экспериментах по импорту синтезированного *in vitro* предшественника цитохрома P450_{ssc} быка в изолированные дрожжевые митохондрии было обнаружено, что белок транслоцируется в митохондрии, однако, его превращение в зрелую форму затруднено. В митохондриях коры надпочечников preP450_{ssc} подвергается процессингу с образованием зрелой формы, которая встраивается во внутреннюю мембрану митохондрий, но в случае дрожжевых митохондрий белок-предшественник подвергался протеолизу или накапливался в матриксе в виде агрегатов (Savel'ev et al., 1998). С целью решения данной проблемы были проведены эксперименты по замене собственного адресующего сигнала цитохрома P450_{ssc} на препоследовательность, адресующую белок в митохондрии дрожжей. В нашей лаборатории была использована препоследовательность субъединицы IV дрожжевой цитохром с-оксидазы (preCoxIV). Белок preCoxIV-mP450_{ssc} эффективно импортировался в митохондрии и процессировался с образованием зрелой формы. Однако, лишь небольшая часть импортированных молекул (около 1/10) включалась во внутреннюю мембрану митохондрий, где белок проявляет каталитическую активность (Savel'ev et al., 1998).

Впервые реконструкция трех-компонентной ХГЛ системы – цитохрома P450_{scc}, аденодоксина и аденодоксинредуктазы – была осуществлена в гетерологичных клетках в форме слитых белков. В работе (Harikrishna et al., 1993), осуществлена продукция слитых белков P450_{scc}-Adx-AdR и P450_{scc}-AdR-Adx в линии нестероидогенных клеток COS-1. Полученные слитые энзиматические системы проявляли каталитическую активность, которая была сравнима с активностью, регистрируемой в клетках, трансфицированных тремя отдельными плазмидами, несущими гены белков ХГЛ системы, при этом активность слитого белка P450_{scc}-AdR-Adx была примерно в 5 раз выше активности белка P450_{scc}-Adx-AdR и составляла 9,1 нг прегненолона/мл среды×24 ч. В нашей лаборатории кДНК, кодирующие слитые белки, включающие три компонента ХГЛ системы, были экспрессированы в клетках *E. coli* и *S. cerevisiae*, однако данные слитые белки подвергались эффективному протеолизу и их каталитическая активность была незначительной (Nazarov et al., 2003).

Позднее в нашей лаборатории на базе вектора pTrc99A/P450_{scc} (Wada et al., 1991) были сконструированы полицистронные бактериальные плазмиды, несущие гены трех компонентов ХГЛ системы – зрелого P450_{scc} быка, а также зрелых Adx и AdR человека. Первая конструкция pTrc99A/P450_{scc}/AdR/Ad включала кДНК P450_{scc}, AdR и Adx в составе одной экспрессионной кассеты, во второй конструкции pTrc/P450-AdR.Ad кДНК P450_{scc} и AdR находились в составе одной экспрессионной кассеты, а ген Adx был встроен в ту же плазмиду в составе отдельной транскрипционной единицы (Шашкова и др., 2006). Так как в некоторых исследованиях было продемонстрировано, что максимальная активность ХГЛ системы *in vivo* наблюдается, если содержание Adx в клетке превышает содержание P450_{scc} и AdR (например, Schiffer et al., 2015), предполагалось, что использование плазмиды pTrc/P450-AdR.Ad обеспечит более высокий уровень экспрессии гена Adx с собственной короткой молекулы мРНК, что может вести к увеличению активности реконструированной ХГЛ системы. Однако, использование вектора pTrc/P450-AdR.Ad не привело к заметному увеличению содержания Adx относительно содержания других белков системы. Плазмиды pTrc99A/P450_{scc}/AdR/Ad и pTrc/P450-AdR.Ad эффективно направляли в клетках *E. coli* синтез индивидуальных белков P450_{scc}, Adx и AdR, которые демонстрировали каталитическую активность в условиях *in vitro*, однако, каталитическая активность P450_{scc} была низкой. Позже в нашей лаборатории была сконструирована полицистронная плазмида pBar_Triple, включающая кДНК зрелых форм P450_{scc}, Adx и AdR быка. Активность реконструированной гомологичной ХГЛ системы быка почти на порядок превысила активность гетерологичной системы (P450_{scc} быка и Adx и AdR человека),

однако, величина ХГЛ активности, измеренная в клетках *E. coli* в условиях *in vivo*, не превышала $0,42 \pm 0,015$ мг прегненолона/л культуры клеток×24 ч (Makeeva et al., 2013).

Так как активность ХГЛ системы, ранее реконструированной в клетках *E. coli* и *S. cerevisiae*, была очень низкой, используемые системы экспрессии и условия, в которых осуществляется синтез P450_{ssc}, Adx и AdR (используемые клетки, условия культивирования клеток) нуждается в оптимизации.

В случае реконструкции ХГЛ системы в клетках микроорганизмов отдельной проблемой является поступление гидрофобного субстрата реакции – холестерина – в клетки. Продуктивность трансгенных микроорганизмов может быть увеличена при использовании агентов, способствующих увеличению растворимости стероидов и (или) пермеабиллизации клеточной мембраны (различных органических растворителей, детергентов, веществ с поверхностно-активными свойствами, жидких полимеров, циклодекстринов, антибиотиков и др.) (Donova and Egorova, 2012). Как показано в работе (Wallimann et al., 1997), β-циклодекстрины, в частности, используются для повышения растворимости субстратов цитохрома P450_{ssc} - холестерина и витамина D₃, с которыми они образуют водорастворимые комплексы включения. Кроме того, циклодекстрины могут оказывать влияние на состояние мембран клеток микроорганизмов, повышая их проницаемость и облегчая транспорт в клетки различных соединений (Donova and Egorova, 2012). В работе (Makeeva et al., 2013) холестерин вводили в клетки с использованием солюбилизирующих агентов – β-метилциклодекстрина и Твин-80. Было показано, что выход продукта биотрансформации холестерина клетками *E. coli*/pBar_Triple при внесении холестерина в среду роста клеток в водном растворе МЦД (конечная концентрация МЦД - 0,35%, *m/V*) в ~30 раз превышал выход продукта, регистрируемый при внесении холестерина в форме суспензии, стабилизированной Твин 80 (конечная концентрация Твин 80 - 1 г/л).

Относительно недавно ХГЛ система была реконструирована в клетках *Bacillus megatherium*. Данная бактерия характеризуется наличием в клетке особых телец включения, содержащих поли(3-гидроксibuтират) (ПГБ) и окруженных монослоем из фосфолипидов и белков (Gerber et al., 2015). Для увеличения эффективности поглощения бактерией гидрофобных субстратов в среду культивирования добавляли солюбилизирующие агенты – смесь 2-гидроксипропил-β-циклодекстрина и сапонины. В работе было показано, что поглощаемые бактерией гидрофобные субстраты (холестерин, 7-дегидрохолестерин и β-ситостерин) накапливались в тельцах включения, содержащих ПГБ, а синтезируемые гетерологичные белки P450_{ssc} и AdR встраивались в окружающий тельца включения монослой из фосфолипидов и белков. Близкое расположение субстрата

и метаболизирующих его белков в пространстве в сочетании с эффективным поглощением субстрата привели к значительному увеличению эффективности конверсии субстратов в прегненолон и 7-дегидропрегненолон: эффективность конверсии холестерина составила 115 мг прегненолона/л суспензии клеток×48 ч.

В работе (Szczubara et al, 2003) описано создание рекомбинантного штамма *S. cerevisiae*, в котором была реконструирована часть пути стероидогенеза млекопитающих: синтез кортизола с использованием спирта в качестве источника углерода. Путем введения в геном *S. cerevisiae* 9 гетерологичных генов, в частности генов, кодирующих зрелые формы P450_{scs}, Adx и AdR, и инактивации 4 генов клетки-хозяина в клетках дрожжей были объединены стероидогенные пути двух организмов – биосинтез эргостерола клетки-хозяина и биосинтез кортизола, характерный для клеток млекопитающих. В результате введения гена $\Delta 7$ - редуктазы растений полученный штамм оказался способным синтезировать из эргостерола новый интермедиат – эргоста-5-енол, который, в свою очередь, может служить исходным субстратом для цитохрома P450_{scs}. Таким образом, была решена проблема поступления гидрофобного субстрата цитохрома P450_{scs} в клетки дрожжей через клеточную стенку. Данная работа продемонстрировала принципиальную возможность реконструкции активных стероидогенных систем в клетках микроорганизмов.

2.7 Практическое применение трансгенных микроорганизмов с реконструированными системами млекопитающих, гидроксилирующими стероиды

2.7.1 Трансгенные микроорганизмы для биотехнологии

Стероидные соединения имеют важнейшее значение для медицины. Лекарственные препараты на основе стероидов используются для лечения онкологических (например, гормон-зависимый рак молочной и предстательной желез, рак прямой кишки), воспалительных (например, ревматоидный артрит, бронхит), аллергических заболеваний (астма, экзема, анафилактический шок), профилактики и лечения ВИЧ-инфекции, а также для лечения других заболеваний (Donova and Egorova, 2012; Tong and Dong, 2009). К настоящему времени для применения в медицине утверждено около 300 стероидных препаратов, это наиболее продаваемая категория лекарственных средств после антибиотиков, при этом их производство и продажи продолжают увеличиваться (Tong and Dong, 2009).

Для производства стероидных лекарственных препаратов традиционно используют сочетание трех подходов:

1. Экстракция стеролов из тканей растений и животных,
2. Химический синтез и
3. Биотрансформация с использованием штаммов микроорганизмов.

Первый подход применяют для получения исходных веществ, которые можно преобразовать химически и микробиологически с получением активных фармацевтических субстанций стероидной природы. В первую очередь, в качестве сырья используются природные стеролы, экстрагируемые из растений: сапогенин, диогенин, соласодин, кроме того, могут использоваться холестерин, ситостерин, дезоксихолевая кислота и др. (Herráiz, 2017).

Химический синтез стероидных веществ сложен и трудоемок. Важнейшую роль в данном процессе играет осуществление регио- и стереоселективного гидроксирования по целевым атомам углерода молекул стероидных интермедиатов. Гидроксильную группу можно ввести в молекулу с использованием реакций гидролиза, нуклеофильного замещения, восстановления, реакций с участием свободных радикалов и т. д. Однако, все эти реакции не достаточно селективны для введения хиральной гидроксильной группы в целевое положение молекулы, поэтому химический синтез стероидов характеризуется низким выходом целевого продукта реакции при высокой стоимости процесса производства (Donova and Egorova, 2012; Urlacher et al., 2004). Применение на некоторых стадиях синтеза природных и трансгенных микроорганизмов, синтезирующих стероидогенные цитохромы P450, существенно упрощает процесс синтеза стероидных препаратов. Так, введение двух стадий микробиологической трансформации с использованием штаммов *Rhizopus arrhizus* ATCC 11145 и *Aspergillus niger* ATCC 9142 значительно снизило трудоемкость, продолжительность и стоимость химического синтеза кортизона из дезоксихолевой кислоты: количество стадий процесса сократилось с 31 до 11, а стоимость 1 г продукта снизилась с 200 долл. США до 1 долл. США (Carballeira et al., 2009).

Преимуществами микробиологической конверсии является высокая регио- и стереоспецифичность реакций, возможность проведения нескольких реакций одним микроорганизмом, а также более высокая экологичность процессов, поскольку отсутствует необходимость использования органических растворителей и жестких условий реакций.

Микроорганизмы могут выполнять три типа биопроцессов: (1) трансформировать природные стеролы в стероидные интермедиаты, (2) трансформировать стероидные

вещества с образованием новых стероидных веществ и (3) осуществлять синтез стероидов *de novo* из нестероидных субстратов. Примером биопроцессов 1 типа является использование актинобактерий родов *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus* для превращения холестерина и других природных стеролов в стероидные интермедиаты, например, 4-андростен-3,17-диона, 1,4-андростадиен-3,17-диона и др. (Donova et al., 2005). Примером трансгенного микроорганизма, осуществляющего биопроцессы данного типа, является бактерия *B. megatherium*, в клетках которой была успешно осуществлена реконструкция ХГЛ системы быка. Полученные трансгенные клетки *B. megatherium* обеспечивали превращение холестерина в прегненолон, скорость конверсии в полученной системе достигала 115 мг прегненолона/л суспензии клеток×48 ч (Gerber et al., 2015, см. раздел обзора литературы 2.6 «Экспрессия генов белков ХГЛ системы в гетерологичных клетках»). Чаще всего для применения в биотехнологии получают рекомбинантные штаммы микроорганизмов, выполняющие биопроцессы 2 типа. Примером такого процесса является уже упоминавшееся ранее применение грибов *Rhizopus arrhizus* для выполнения реакций 11 α -гидроксилирования стероидных интермедиатов. В работе (Brixius-Anderko et al., 2015) с использованием метода полицистронной экспрессии в *E. coli* была проведена оптимизация функционирования цитохрома CYP21A2 с целью получения фармацевтически ценного продукта премедрола. Премедрол является предшественником медроло (6-метилпреднизолона) – синтетического глюкокортикоида, применяемого в медицине для лечения таких заболеваний, как аллергические реакции, рассеянный склероз и ревматоидный артрит. С использованием би- и трицистронных плазмид, несущих кДНК гена цитохрома и генов различных белков-переносчиков электронов авторы смогли проанализировать активность гомологичных энзиматических систем, состоящих из CYP21A2 быка и его белка-партнера - цитохром P450 редуктазы быка; CYP21A2 быка, адренодоксина и адренодоксинредуктазы быка, а также активность гетерологичной системы, включавшей CYP21A2 быка и белки-переносчики *Schizosaccharomyces pombe* – Arh1 и etp1fd. Активность полученной гетерологичной системы превышала активность природной системы более, чем в 3 раза, и выход продукта реакции составил 320 мг/мл в сутки. В той же группе под руководством профессора Бернхардт в клетках *E. coli* была успешно проведена реконструкция системы CYP11B1, осуществляющей превращение 11-дезоксикортизола в кортизол. В данной работе авторы соединили в составе полицистронной плазмиды кДНК CYP11B1 быка, AdR человека и от одной до четырех копий гена Adx человека. Предполагалось, что увеличение стехиометрического отношения небольшого белка адренодоксина к остальным белкам будет положительно влиять на активность всей системы. Действительно, максимальная

активность системы и, соответственно, выход продукта кортизола были достигнуты при использовании трех копий гена *Adx* (Schiffer et al., 2015). Единственным известным к настоящему времени примером процесса стероидогенеза *de novo*, реконструированного в клетках микроорганизмов, является реконструкция полного синтеза кортизола с использованием этанола в качестве источника углерода в клетках *S. cerevisiae*. Путем введения в геном *S. cerevisiae* 9 гетерологичных генов и инактивации 4 генов клетки-хозяина в клетках дрожжей были объединены стероидогенные пути двух организмов: биосинтез эргостерола клетки-хозяина и биосинтез гидрокортизона, характерный для клеток млекопитающих (Szczepara et al., 2003, см. раздел обзора литературы 2.6 «Экспрессия генов белков ХГЛ системы в гетерологичных клетках»).

2.7.2 Трансгенные микроорганизмы для фармакологических исследований

Стероидогенные цитохромы P450 играют ключевую роль в жизни и размножении живых организмов, поэтому нарушение их функционирования ведет к недостаточной или избыточной продукции стероидных гормонов и, как следствие, развитию серьезных заболеваний. Цитохром P450_{ssc} катализирует первую ключевую стадию стероидогенеза. Мутации в гене *CYP11A1*, кодирующем данный белок, чаще всего являются летальными, поскольку ведут к прекращению синтеза в плаценте прогестерона, который необходим для нормального развития плода и предотвращения спонтанного аборта (Nebert et al., 2013). Ген *CYP17A1* кодирует цитохром P450_{c17}, участвующий в расщеплении 21-углеродных 17-гидроксистероидов с образованием 19-углеродных стероидных предшественников половых гормонов и кортизола. Как следствие, мутация в гене *CYP17A1* ведет к половому инфантилизму, а также гипертензии, вызванной гиперпродукцией дезоксикортикостерона, компенсирующей недостаток кортизола. Гиперэкспрессия гена *CYP17A1* и избыточная продукция андрогенов играет важнейшую роль в развитии доброкачественной гиперплазии и рака предстательной железы (Auchus, 2001, Tong and Dong, 2009). Нарушение продукции CYP21, участвующего в синтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов, ведет к развитию врожденной гиперплазии надпочечников, проявляющейся в вирилизации плода и солевом истощении различной степени тяжести, вплоть до летального (Speiser, 2010). За конечные этапы синтеза минералокортикоидов и глюкокортикоидов – продукцию альдостерона и кортизола – отвечают альдостеронсинтаза (CYP11B2) и 11 β -гидроксилаза (CYP11B1), соответственно. Хронический повышенный уровень альдостерона в плазме связан с такими заболеваниями, как застойная сердечная недостаточность, фиброз и гипертрофия миокарда и желудочковая аритмия (Ehmer et al., 2002), а избыточная продукция кортизола ведет к развитию синдрома Кушинга,

характеризующегося гипергликемией, нарушением жирового обмена, а также атрофическими и дистрофическими изменениями в костях, мышцах, коже, внутренних органах (Hakki and Bernhardt, 2006). Фермент ароматаза (CYP19A1) выполняет ароматизацию андрогенов с образованием эстрогенов. Помимо регуляции развития и функционирования половых органов эстрогены выполняют еще одну важную функцию – эстрадиол, образующийся из тестостерона в эпифизах костей, регулирует замыкание зоны роста эпифиза и, соответственно, регулирует процесс роста. Люди с недостаточной продукцией ароматазы характеризуются замедленным созреванием эпифизов, нарушением роста и остеопенией (Nebert et al., 2013). Женские половые гормоны также играют важную роль в развитии рака молочной железы (Knutson and Lange, 2014).

Для терапии заболеваний, вызванных избыточной продукцией тех или иных гормонов, применяются селективные ингибиторы соответствующих цитохромов P450. Широкое применение в медицине получили ингибиторы CYP17A1 для лечения рака и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (Hartmann et al., 2004, Handratta et al., 2005 Drăgan et al., 2006), ингибиторы ароматазы для лечения рака молочной железы и яичников (Hartmann et al., 2004,; Saberi et al., 2005), ингибиторы CYP11B2 для лечения гиперальдостеронизма и опосредованной им гипертензии, ишемии и фиброза миокарда (Bureik et al., 2004; Ulmschneider et al., 2005). Некоторые изоформы стероидогенных цитохромов P450 характеризуются высоким сходством аминокислотных последовательностей, что делает их проблемной мишенью для ингибиторов, поскольку существует риск заблокировать как целевую, так и дополнительные реакции стероидогенеза. Так, например, зрелые формы белков CYP11B1 и CYP11B2 содержат всего 29 разных а.о. из 479 а.о. (около 6%) (Belkina et al., 2001). Таким образом, необходимо проведение тщательных обширных испытаний разрабатываемых ингибиторов цитохромов P450. Проведение испытаний данных препаратов на животных не всегда приемлемо: в связи с наличием видоспецифичных различий в свойствах некоторых цитохромов P450 не всегда можно экстраполировать данные, полученные, например, в испытаниях на грызунах, на метаболические процессы, протекающие в организме человека. Так, если у человека синтез кортизола и альдостерона катализируют CYP11B1 и CYP11B2, соответственно, то у крупного рогатого скота обе реакции выполняет один цитохром P450, а у крыс их катализируют три изоформы белка (Mellon et al., 1995). Использование рекомбинантных клеток микроорганизмов с реконструированными стероидогенными системами цитохромов P450 представляется ценной альтернативой проведению экспериментов на модельных животных. Данный подход позволяет провести быстрый и дешевый скрининг потенциальных ингибиторов цитохромов P450, отобрать

наиболее эффективные и селективные ингибиторы, а также оценить их общее токсическое воздействие. Подобные тест-системы были созданы, например, на базе клеток *E. coli* (Ehmer et al., 2000, Ehmer et al., 2002), *S. cerevisiae* (Novikova et al., 2009) и *S. pombe* (Drăgan et al., 2006). В клетках *E. coli* были совместно экспрессированы гены CYP17A1 человека и редуктазы цитохрома P450 крысы. Полученные клетки использовали для тестирования ингибиторов CYP17A1, используемых для лечения рака предстательной железы (Ehmer et al., 2000, Ehmer et al., 2002). Также в качестве тест-системы для скрининга ингибиторов CYP17 были использованы штаммы дрожжей *S. pombe*, продуцирующие CYP17 или CYP21 человека, характеризующиеся высокой степенью гомологии; активность гетерологичных белков поддерживали эндогенные белки-переносчики электронов дрожжей. Полученные клетки можно было использовать для определения рабочих концентраций ингибиторов, а также отбора веществ, которые не оказывают влияния на активность CYP21 (Drăgan et al., 2006). Аналогичную тест-систему для скрининга ингибиторов CYP11B2 представляли собой трансгенные дрожжи *S. pombe*, синтезирующие CYP11B1 или CYP11B2 человека (Bureik et al., 2004; Muller-Vieira et al., 2005).

Представленные данные демонстрируют, что создание трансгенных микроорганизмов для целей биотехнологии и фармакологии является актуальным направлением научных исследований. Полученные штаммы с успехом можно использовать для получения стероидных гормонов, а также для скрининга и направленного синтеза соединений, молекулярными мишенями которых являются цитохромы P450.

3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Материалы

3.1.1 Реактивы и ферменты

В работе были использованы эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимеразы, ДНК-лигаза, РНКаза А, наборы для выделения плазмидной ДНК, элюции и очистки фрагментов ДНК из агарозного геля, наборы для биотинового мечения ДНК и хромогенной детекции биотинилированной ДНК производства фирмы Thermo Fisher Scientific (США), δ -аминолевулиновая кислота, изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), диаминобензидинтетрагидрохлоридгидрат (ДАБ), 22R-гидроксистерин, 20 α -гидроксистерин, холестерин, холестеролоксидаза, конъюгат антикроличьих антител с пероксидазой хрена, антибиотики производства Sigma-Aldrich (США), среды и буферные растворы для культивирования клеток млекопитающих (DMEM), DPBS, Версен, трипсин-ЭДТА производства ПанЭко (Россия). Среда для культивирования бактерий и дрожжей готовили с использованием реагентов производства Difco (США). Первичные кроличьи поликлональные антитела были любезно предоставлены В. М. Шкуматовым (Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Белоруссия). Олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы в компании Евrogen (Россия).

3.1.2 Используемые штаммы микроорганизмов и плазмиды

Используемые штаммы бактерий:

E. coli DH5 α , генотип: supE44 Δ lac U169 (ϕ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1end A1 gyrA96 thi-1 relA1, «Gibco-BRL».

Используемые штаммы дрожжей:

S. cerevisiae 2805, генотип: MAT α , pep4::his3, prb1-b, can1, gal2, his3b, ura3-52, (Rhee et al., 1989), любезно предоставлен С.-К. Ри (S.-K. Rhee, GERI, Корея);

Y. lipolytica E129L, генотип: MAT α LEU2 lys11-23 ura3-302 (SUC2) xpr2-322 (Kruse et al., 2004) и

Y. lipolytica E150, генотип: MAT β his-1 leu2-270 ura3-302 (SUC2) xpr2-322 (Barth, Gaillardin, 1996) любезно предоставлены Г. Бартом и Ш. Мауерсбергером (G. Barth, S. Mauersberger, Институт микробиологии, Дрезденский технический университет, Германия).

Используемые линии клеток млекопитающих: HEK293T (ATCC, США)

Использованные плазмиды:

pUC19 (New England Biolabs, Соединенное Королевство); pTrc99A/P450scs (Wada et al., 1991) (любезно предоставлены М. Ватерманом (M.R.Waterman, University of Texas, Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA)); pYeDP1/8-2 (Pompon, 1988) (любезно предоставлен Д. Помпоном (D. Pompon, Centre de Genetique Moleculaire, Gif-sur-Yvette, France)); p67PT (Juretzek, 1999); pcDNA3.1/CT-GFP (Thermo Fisher Scientific, США).

Все сконструированные в ходе данной работы плазмиды описаны в разделе «Конструирование плазмид».

3.2 Методы

3.2.1 Методы работы с ДНК

Все генно-инженерные манипуляции с рекомбинантными ДНК проводились с использованием стандартных протоколов (Sambrook et al., 1989).

Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофоретическое разделение молекул ДНК проводили в агарозном геле (концентрация агарозы 0,8 – 2%), содержащем 0,5 мкг/мл этидия бромид, с использованием буфера TAE (40 mM Трис-ацетат, 1 mM ЭДТА, pH 7,6) в камерах производства Bio-Rad (США) при напряжении 10 В/см² геля. Вместе с исследуемыми образцами на гель наносили маркеры молекулярной массы ДНК производства компании Thermo Fisher Scientific. Визуализацию полос проводили в УФ-свете с длиной волны 280 нм или 366 нм при аналитическом и препаративном электрофорезе, соответственно. ДНК выделяли из геля с использованием набора реактивов QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Голландия).

Рестриктивный анализ ДНК

Рестриктирование молекул ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции производства Thermo Fisher Scientific в соответствии с рекомендациями производителя. В реакцию добавляли 0,5-5 мкг ДНК. Инкубацию проводили при температуре 37°C в течение 30-180 мин. Лигирование фрагментов ДНК проводили с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 в буфере, поставляемом производителем, в течение 60 минут при комнатной температуре.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

В состав реакционной смеси для ПЦР входил однократный буфер для ДНК-полимеразы, 1-10 нг матрицы ДНК, по 10 мкМ прямого и обратного праймеров, дНТФ в

концентрации 200 нМ и 1 – 2 единицы активности ДНК-полимеразы на 20 мкл реакционной смеси. В работе использовались Taq-полимеразу, Pfu-полимеразу и соответствующие буферные растворы производства Thermo Fisher Scientific. Все реакции выполняли на ПЦР-амплификаторе C1000 ThermalCycler фирмы Bio-Rad.

3.2.2 Конструирование плазмид

Плазмиды для продукции белков ХГ/Л системы быка в клетках бактерий

Для экспрессии кДНК гетерологических белков в клетках *E. coli* в основном использовали плазмиды, сконструированные на основе вектора pTrc99A. Плазмида pTrc99A (Amann et al., 1988) (Рис. 15), несет сильный гибридный промотор trp/lac(trc), терминатор транскрипции rrnB, а также ген устойчивости к ампициллину (bla). В качестве базового вектора использовался вектор pTrc99A/P450ssc (pTrc99A/mCYP11A1) (Wada et al., 1991), содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую зрелую форму цитохрома P450ssc из коры надпочечников быка, любезно предоставленный М. Ватерманом (Prof. M.R. Watermann, Vanderbilt University, School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA).

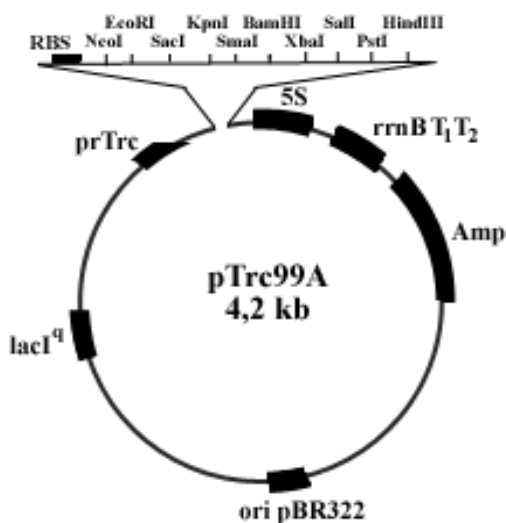


Рисунок 15. Схема вектора pTrc99A: prTrc-гибридный trp/lac промотор; RBS - участок связывания рибосомы; rrnBT1T2- терминатор; ori pBR322- origin-участок для репликации в *E. coli*.

pTrc99A/CHL

На первом этапе конструирования в pTrc99A/P450ssc встраивали участок связывания рибосомы (RBS) и кДНК AdR. Вектор pTrc99A/P450ssc обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bgl*II и *Kpn*I для удаления части последовательности кДНК P450ssc с терминирующим кодоном. Остов вектора, несущий промотор, RBS и 5'-концевую часть гена P450ssc, в дальнейшем использовали в реакции лигирования. 3'-концевую часть гена P450ssc получали путем амплификации с матрицы pTrc99A/P450ssc с использованием

праймеров ptrc1 и ptrc2 (Таблица 1). Прямой праймер содержал сайт посадки эндонуклеазы рестрикции *Bgl*II, обратный праймер — стоп-кодон и уникальные сайты *Sac*II и *Xho*I. После обработки *Bgl*II/*Sac*II полученный ПЦР-фрагмент использовали для лигирования. Последовательность кДНК, включающую ген AdR, вырезали из плазмиды pBar_Twin, используя рестрикцию *Nde*I/*Hind*III, встраивали в промежуточный вектор pFLuc (New England Biolabs, Соединенное Королевство), а затем из промежуточной плазмиды посредством рестрикции *Sac*II/*Kpn*I вырезали фрагмент, кодирующий AdR с предшествующим RBS. В результате лигирования трех фрагментов получен промежуточный вектор pTrc99A/P450scc/AdR. На втором этапе конструирования в плазмиду pTrc99A/P450scc/AdR встраивали последовательность ДНК, кодирующую RBS-Adx1-108, полученную путем амплификации с использованием pBar_Triple в качестве матрицы и праймеров ptrc3 и ptrc4 (Таблица 1). ПЦР-фрагмент обрабатывали *Xho*I и *Sac*II и встраивали в вектор pTrc99A/P450scc/AdR по тем же сайтам. В результате была получена плаزمида pTrc99A/CHL, включающая трицистронную кассету экспрессии: RBS-P450-RBS-Adx-RBS-AdR.

pTrc99A/CHL(Adx)*

Мутированная версия Adx (Adx1-S112W), обозначенная здесь как Adx*, с предшествующей последовательностью RBS получена посредством ПЦР-амплификации с использованием pBar_Triple в качестве матрицы и праймеров ptrc5 и ptrc6 (Таблица 1). В результате лигирования ПЦР-фрагмента, обработанного *Xho*I и *Sac*II, с рестрицированным по тем же сайтам вектором pTrc99A/P450scc/AdR получена плазмида pTrc99A/CHL(Adx*), включающая кассету экспрессии: RBS-P450-RBS-Adx*-RBS-AdR.

pTrc99A/CHL(2Adx)*

Для встраивания в плазмиду pTrc99A/CHL(Adx*) второй копии мутированного гена Adx* с помощью праймеров ptrc3 и ptrc7 (Таблица 1) получена последовательность *Xho*I-RBS-Adx*-*Sac*I. В результате лигирования ПЦР-фрагмента, обработанного *Xho*I/*Sac*I, и вектора pTrc99A/CHL(Adx*), рестрицированного по тем же сайтам, получена плазмида pTrc99A/CHL(2Adx*), содержащая две копии кДНК, кодирующей Adx1-S112W.

Таблица 1. Используемые в работе олигонуклеотиды.

Название олиго-нуклеотида	5'-3' последовательность нуклеотида (сайты рестрикции выделены жирным шрифтом и курсивом)	Сайты рестрикции
ptrc1	ACT GAGATCT TCTACCAG	<i>Bgl</i> II
ptrc2	TCGAC CGCGG AGTG CTCGAG CTCTCCGGTCACG	<i>Sac</i> II, <i>Xho</i> I
ptrc3	CGGGG CTCGAGA AGGAGATATACCATGAGCAG	<i>Xho</i> I
ptrc4	TGTT CCGCGG ATGGTTATCAAGGTACTCGAACAG	<i>Sac</i> II
ptrc5	ACTGG CTCGAGATCCGAGCT CGAAGAAGGAGATATACCATG	<i>Xho</i> I, <i>Sac</i> I
ptrc6	CCTG CCGCGG ATGGTTATCACCACACGGCATCAGGTACTCGAACAG	<i>Sac</i> II
ptrc7	CTG GAGCTC ATTGTTATCACCACACGGCATCAGGTACTCGAACAG	<i>Sac</i> I
ptrc8	ACTGAGATCTTCTACCAG	<i>Bgl</i> II
ptrc9	CTG CTCGAG CGCCTGGGGCGGGT	<i>Xho</i> I
ptrc2A1	TCGAG CAGCTGTTGAATTTTGACTTGTGAAGTTGGCTGGAGACGTC GAGTCCAACCCTGGG CTAGG ATT GGTAC	<i>Xho</i> I, <i>Avr</i> II, <i>Kpn</i> I
ptrc2A2	CAATCCTAGG CCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCAGCCAACTTCAAC AAGTCAAAATTCAACAGCTGC	<i>Kpn</i> I, <i>Avr</i> II, <i>Xho</i> I
ptrc2A3	CTAGG ATT GAGCTC TTGAATTTTGACTTGTGAAGTTGGCTGGAGAC GTCGAGTCCAACCCTGGGCCCCA	<i>Avr</i> II, <i>Sac</i> I, <i>Nde</i> I
ptrc2A4	TATG GGGCCCAGGGTTGGACTCGACGTCTCCAGCCAACTTCAACAAG TCAAAATTCAAG GAGCTCAATC	<i>Nde</i> I, <i>Sac</i> I, <i>Avr</i> II
ptrc10	GGG CTAGG ATGGAAGATAAAATAACAGT	<i>Avr</i> II
ptrc11	AT GAGCTC AGGTACTCGAACAGTCA	<i>Sac</i> I
pyedp1	CGAGAG TCTAG AAAAATGCTTAGTACAAAGACC	<i>Xba</i> I
pyedp2	GG CCCATGGC ATAGATG	<i>Nco</i> I
f2a1	CGGTTCTGGTTTGAATTTTCGATTTGTTGAAGTTGGCTGGTGATGTTGA ATCTAATCCAGGTCCACA	
f2a2	TATGT GGACCTGGATTAGATTCAACATCACCAGCCAACTTCAACAAA TCGAAATTCAAACCAGAACCG GAGCT	<i>Nde</i> I, <i>Sac</i> I
t2a1	CGGTTCTGGTGAAGGTAGAGGTTCTTTGTTGACTTGTGGTGAT GTTGAAGAAAATCCAGGTCCACA	
t2a2	TATGT GGACCTGGATTTTCTTCAACATCACCACAAGTCAACAA AGAACCTCTACCTTCAACAGAACCG GAGCT	<i>Nde</i> I, <i>Sac</i> I
p2a1	ACCT GAGCTC GGTTCTGGTGCTACAAATTTCTTTTGTGAAGCA AGCTGGTGATGTTGAAGAAAATCCAGGTC	<i>Sac</i> I
p2a2	CCCCGCG GAGCTC TCAAGTC	<i>Sac</i> I
pyedp-rev1	CAGGCG GAGCTC CAGCTGTTG	<i>Sac</i> I
pyedp-rev2	CAAGTCGGT ACCGCATG CTCAAGGTACTCGAAC	<i>Sph</i> I, <i>Kpn</i> I
pyedp-rev3	AGTACCT CTCGAG TTGAATTTTG	<i>Xho</i> I
pyedp-rev4	CGGGT GAGCTC GTGCCCCAGCAG	<i>Sac</i> I

Название олиго-нуклеотида	5'-3' последовательность нуклеотида (сайты рестрикции выделены жирным шрифтом и курсивом)	Сайты рестрикции
p67-spei-d	GTATATATAG ATCT GGGGA	<i>Bgl</i> II
p67-spei-rev	TGGATA CTAGT TTTTTGTATG	<i>Spe</i> I
p67-sphi-rev	AAGCTT GCATGC CTGG	<i>Sph</i> I
chl.start.spei.d	ATTACCG ACTAGT ACCATGCTTAGTACA	<i>Spe</i> I
chl.end.sphi.r	CCCGCG GCATGCT CAGTGCCCCAGCAG	<i>Sph</i> I
pcdna1	TCAAAATAAT CTAG ATATTGATG	<i>Xba</i> I
pcdna2	AGAAAGA ATTC ATGCTTTCACCTAC	<i>Eco</i> RI
pcdna3	CTAGGT CTAG ACCCAGGGTTGGACTC	<i>Xba</i> I

Конструирование плазмид, включающих мутированную кДНК цитохрома P450_{scc}, на базе вектора *pTrc99A/CHL*

Для направленного мутагенеза использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР); использованные праймеры представлены в Таблице 2. При замене указанных аминокислот на Ала из четырех возможных кодонов, кодирующих Ала, выбран кодон GCC, согласно частоте встречаемости кодонов для Ала в геноме микроорганизмов.

Таблица 2 Праймеры и фрагменты, использованные при конструировании мутированных кДНК цитохрома P450_{scc}

Последовательность праймера (5'-3')	Фрагмент, полученный в результате ПЦР	Использовался для замены а.о.
P450_1_d: ACTGAGATCTTCTACCAG I351_rev: GTCACGGAG GCGGGG TGGAGTC	Мегапраймер M1 (~ 300 п.н.)	Ile351Ala
M1 SacII_rev: TGTTC CGCGG ATGGTTATCAAGG TA CTCGAACAG	<i>Bgl</i> II-P450I351A-Ax(1-108)- <i>Sac</i> II* (1112 п.н.)	Ile351Ala
P450_1_d: ACTGAGATCTTCTACCAG L355_rev: ATCTCTG GCGG TCACGGAGATG	Мегапраймер M2 (~ 300 п.н.)	Leu355Ala
M2 SacII_rev: TGTTC CGCGG ATGGTTATCAAGG TA CTCGAACAG	<i>Bgl</i> II-P450I355A-Ax(1-108)- <i>Sac</i> II* (1112 п.о.)	Ile355Ala
P450_ <i>Nhe</i> I_d: CCACTTCTCAAAG CTAG CTAGCATCAAGG I461_rev: CGGCGTCAG GCGG AGGTTG	Мегапраймер M3 (~ 300 п.н.)	Ile461Ala
M2 SacII_rev: TGTTC CGCGG ATGGTTATCAAGG TA CTCGAACAG	<i>Nhe</i> I-P450I461A-Ax(1-108)- <i>Sac</i> II** (825 п.н.),	Ile461Ala
M1 SacII_rev: TGTTC CGCGG ATGGTTATCAAGG TA CTCGAACAG	<i>Bgl</i> II-P450I351A/L355A -Ax(1-108)- <i>Sac</i> II* (1112 п.о.)	Ile351Ala, Leu355Ala
M2 SacII_rev: TGTTC CGCGG ATGGTTATCAAGG TA CTCGAACAG	<i>Bgl</i> II-P450L355A/I461A -Ax(1-108)- <i>Sac</i> II* (1112 п.о.)	Leu355Al, Ile461Ala

Последовательность праймера (5'-3')	Фрагмент, полученный в результате ПЦР	Использовался для замены а.о.
M1 SacII_rev TGTTCGCGGATGGTTATCAAGGTACTCGAACAG	BglIII-P450I351A/L355A/I461A - Ax(1-108)-SacII* (1112 п.о.)	Ile351Ala, Leu355Al, Ile461Ala

Введение одиночных мутаций Ile351Ala, Leu355Ala и Ile461Ala в кДНК P450scs.

Схема эксперимента для введения каждой из одиночных мутаций (Ile351Ala, Leu355Ala или Ile461Ala) включала 2 раунда амплификации ДНК методом ПЦР с использованием трех праймеров, один из которых являлся мутагеном (Таблица 2). В качестве матрицы мы использовали плазмиду pTrc99A/CHL.

Для введения мутации Ile351Ala в кДНК P450scs на первой стадии с использованием праймеров P450_1_d и Ile351_rev, получали мегапраймер M1 (~ 300 п.н.). Далее с использованием мегапраймера M1 и праймера SacII_rev был получен фрагмент BglIII-P450I351A-Ax(1-108)-SacII (1112 п.н.), кодирующий часть последовательности гена P450scs (от сайта BglIII до терминирующего кодона) и ген Ax. Введение мутаций Leu355Ala и Ile461Ala в кДНК P450scs проводили аналогичным образом. Использованные праймеры (для Leu355Ala: P450_1_d и L355_rev в первом цикле ПЦР, M2 и SacII_rev – во втором цикле ПЦР; для Ile461Ala: P450_NheI_d и Ile461_rev в первом цикле ПЦР, M3 и SacII_rev во втором цикле ПЦР) приведены в Таблице 2.

После проведения второго цикла ПЦР целевые ПЦР-фрагменты элюировали из агарозного геля и обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NheI и SacII. В результате были получены три фрагмента кДНК P450scs с мутациями Ile351Ala, Leu355Ala и Ile461Ala: NheI-P450I351A-Ax(1-108)-SacII, NheI-P450L355A-Ax(1-108)-SacII и NheI-P450I461A-Ax(1-108)-SacII соответственно.

Конструирование pTrc99A/CHL(P450I351A), pTrc99A/CHL(P450L355A) и pTrc99A/CHL(P450I461A)

В результате лигирования фрагмента NheI-P450I351A-Ax(1-108)-SacII и вектора pTrc99A/CHL, из которого посредством рестрикции по тем же сайтам (NheI/SacII) был удален немутированный фрагмент NheI-P450-Ax(1-108)-SacII, получена плазида pTrc99A/CHL(P450I351A), содержащая кДНК, кодирующую цитохром P450scs с мутацией Ile351Ala, обозначенный здесь как P450I351A. Аналогичным образом были получены плазмиды pTrc99A/CHL(P450L355A) и pTrc99A/CHL(P450I461A).

Конструирование pTrc99A/CHL(P450I351A/L355A) осуществляли, используя схемы, аналогичные приведенным выше. В данном эксперименте использовали праймеры M1 (мегапраймер с мутацией Ile351Ala) и SacII_rev (Таблица 2), а в качестве матрицы и

базового вектора для клонирования - плазмиду pTrc99A/CHL(P450L355A), содержащую ген P450_{scs} с мутацией L355A.

Конструирование pTrc99A/CHL(P450I351A/L355A/I461A)

С использованием мегапраймера M2, праймера SacII_rev (Таблица 2) и матрицы pTrc99A/CHL(P450I461A) используя схемы, аналогичные приведенным выше, методом ПЦР-амплификации получали мутированный фрагмент ДНК BglII-P450L355A/I461A-Ax(1-108)-SacII и далее плазмиду pTrc99A/CHL(P450L355A/I461A), включающую ген P450_{scs} с двумя мутациями P450L355A/I461A. На следующей стадии эту плазмиду использовали в качестве матрицы при проведении ПЦР с применением праймеров M1 (мегапраймер с мутацией Pe351Ala) и SacII_rev (Таблица 2). После обработки NheI/SacII полученный ПЦР-фрагмент использовали для лигирования с рестрицированным NheI/SacII вектором pTrc99A/CHL, из которого был удален фрагмент NheI-P450-Ax(1-108)-SacII. В результате получена плазида pTrc99A/CHL(P450I351A/L355A/I461A).

pTrc99A/CHL-2A

Конструирование плазмиды, содержащей кДНК всех трех белков ХГЛ системы, разделенных линкерами 2A вируса ящура, производилось на базе вектора pTrc99A/mP450_{scs}. На первой стадии конструирования 3'-концевой участок гена P450_{scs} амплифицировали с матрицы pTrc99A/mP450_{scs} с использованием праймеров ptrc8 и ptrc9 (Таблица 1) с целью произвести делецию стоп-кодона. Полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BglII и XhoI и использовали в лигировании. Базовый вектор pTrc99A/mP450_{scs} обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BglII и KpnI. В реакции лигирования использовали предварительно подготовленный ПЦР-фрагмент, остов вектора и двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность 2A пептида вируса ящура (20 а.о.: -QLLNFDLLKLAGDVESNPGP-), полученный путем отжига двух комплементарных одноцепочечных олигонуклеотидов ptrc2A1 и ptrc2A2 (Таблица 1). В результате лигирования трех фрагментов была получена промежуточная плазмидная конструкция pTrc99A/mP450_{scs}'-2A₁. Затем вектор pTrc99A/mP450_{scs}'-2A₁ обрабатывали эндонуклеазами AvrII и KpnI. Ген адренодоксинредуктазы получали путем рестрикции плазмиды pBar/Twin (Hannemann et al., 2006) эндонуклеазами NdeI и KpnI. В реакции лигирования использовали остов вектора, несущий кДНК цитохрома P450 и линкер 2A, ген AdR и двухцепочечный олигонуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность 2A пептида вируса ящура (19 а.о.: LLNFDLLKLAGDVESNPGP) и полученный путем отжига двух комплементарных одноцепочечных олигонуклеотидов ptrc2A3 ptrc2A4 (Таблица 1). При

лигировании трех фрагментов был получен промежуточный вектор pTrc99A/mP450scc'-2A1-2A2-AdR. На третьем этапе конструирования в полученную плазмиду встраивали кДНК Adx4-108. Стоп-кодон в гене адренодоксина удаляли методом ПЦР с использованием праймеров ptrc10 и ptrc11 (Таблица 1) и плазмиды pBar/Twin в качестве матрицы. Полученный ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами *AvrII* и *SacI* и лигировали с вектором pTrc99A/mP450scc'-2A1-2A2-AdR, обработанным аналогичным образом. В результате был получен вектор pTrc99A/CHL-2A, несущий экспрессионную кассету P450-2A-Adx-2A-AdR.

Плазмиды для продукции белков ХГЛ системы быка в клетках дрожжей *S. cerevisiae*

Для экспрессии кДНК гетерологических белков в клетках дрожжей *S. cerevisiae* использовали плазмиды, сконструированные на основе шаттл-вектора pYeDP1/8-2 (Rompro, 1988) (Рис. 16), который содержит гибридный дрожжевой промотор Gal10-CYC1 (индуцируемый галактозой), два ориджина репликации в *S. cerevisiae* и *E. coli*, терминатор tPGK (терминатор гена киназы глицерофосфата) и селективные маркеры: ген, комплементирующий ауксотрофность штамма *S. cerevisiae* по Ura и ген устойчивости к ампициллину.

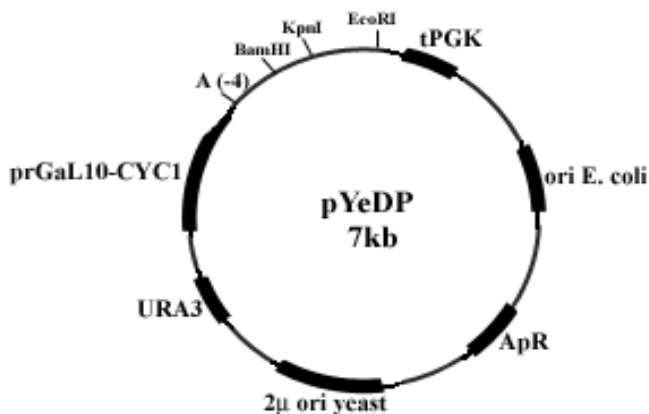


Рисунок 16. Схема шаттл-вектора pYeDP1/8-2. prGal10-CYC1 - промотор; URA3 - ген, комплементирующий ауксотрофность по Ura; tPGK - терминатор; 2μ ori yeast и ori *E. coli* – ориджины репликации в *S. cerevisiae* и *E. coli* соответственно.

pYeDP/pCoxIV-CHL

Вектор pYeDP/pCoxIV-P450scc обрабатывали эндонуклеазами *NheI* и *KpnI* и полученный остов вектора, несущий 5'-конец гена P450, использовали в лигировании. Часть кассеты экспрессии, содержащую 3'-конец гена цитохрома P450, гены адренодоксина и адренодоксинредуктазы, получали путем обработки вектора pTrc99A/CHL-2A эндонуклеазами *NheI* и *KpnI*. В результате лигирования двух фрагментов

ДНК был получен шаттл-вектор pYeDP/pCoxIV-CHL, несущий следующую экспрессионную кассету: pCoxIV-P450scs-2A-Adx-2A-AdR.

pYeDP/mCHL-F2A

Для удаления последовательности митохондриальной локализации была проведена ПЦР-амплификация фрагмента гена цитохрома P450scs с плазмиды pTrc99A/CHL-2A со специально подобными праймерами: ryedp1 и ryedp2 (Таблица 1). В прямой праймер ryedp1 были также введены два дополнительных аденозина перед стартовым кодоном гена цитохрома P450scs, а также сайт посадки эндонуклеазы рестрикции *XbaI*. Полученный ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *NcoI*, достраивали 3'-концы цепей фрагментом Кленова и после этого обрабатывали эндонуклеазой *XbaI*.

Промежуточную ДНК-конструкцию получали на базе вектора pUC19. Плазмиду pUC19 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *XbaI* и *SdaI*, и полученный остов вектора лигировали с фрагментом, полученным при обработке плазмиды pYeDP/pCoxIV-CHL эндонуклеазами *XbaI* и *SdaI*.

Полученную промежуточную конструкцию pUC19-1 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SmaI* и *XbaI*. Полученный остов вектора лигировали с обработанным фрагментом, полученным в результате ПЦР-амплификации. В результате была получена вторая промежуточная ДНК-конструкция pUC19-P450. Фрагмент гена цитохрома P450scs вырезали по сайтам рестрикции *SdaI* и *NheI*. Параллельно таким же образом обрабатывали плазмиду pYeDP/pCoxIV-CHL. Полученные фрагменты лигировали; в результате был получен вектор pYeDP/mCHL-F2A, содержащий кДНК трех зрелых белков ХГЛ системы быка: P450-F2A-Adx-F2A-AdR.

pYeDP/mCHL-F2Arev

На первом этапе конструирования в векторе pTrc99A/CHL-2A фрагмент *KpnI*-2A-AdR-TGA-*SacI* заменили на фрагмент *KpnI*-2A-Adx-TGA-*SacI*, полученный в результате ПЦР-амплификации с использованием праймеров ryedp-rev1, ryedp-rev2 (Таблица 1) и вектора pYeDP/mCHL-F2A в качестве матрицы и обработанный *KpnI/SacI*. В амплифицированный ген Adx был введен стоп-кодон.

Затем полученный вектор pTrc99A/P450scs-2A-Adx-2A-Adx обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SacI* и *XhoI* и лигировали с фрагментом 2A-AdR, амплифицированным с матрицы pYeDP/mCHL-F2A с использованием праймеров ryedp-rev3 и ryedp-rev4 (Таблица 1) и обработанным *SacI/XhoI*. В результате ПЦР-амплификации в гене AdR был удален стоп-кодон. В результате был получен вектор pTrc99A/P450scs-2A-AdR-2A-Adx.

На последнем этапе конструирования часть сконструированной слитой кДНК (*NheI*-P450_{scs}-2A-AdR-2A-Adx-*KpnI*) клонировали в вектор pYeDP/mCHL-F2A, обработанный эндонуклеазами рестрикции *NheI/KpnI*. Полученный вектор был обозначен как pYeDP/mCHL-F2Arev и включал следующую кассету экспрессии: P450-F2A-AdR-F2A-Adx.

pYeDP/mCHL-F2Amod

Промежуточную ДНК-конструкцию собирали на базе вектора pTrc99A/mP450_{scs}'-2A₁-2A₂-AdR (см. выше). Вектор pTrc99A/mP450_{scs}'-2A₁-2A₂-AdR обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SacI* и *KpnI* и элюировали остов вектора, включающий ген цитохрома P450. Плазмиду pYeDP/mCHL-2A обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *KpnI* и элюировали фрагмент ДНК, содержащий ген адренодоксинредуктазы. Полученные фрагменты лигировали с двухцепочечным фрагментом *SacI*-GSGF2A-*NdeI*, полученным в результате отжига олигонуклеотидов f2a1 и f2a2 (Таблица 1) друг на друга. В результате была получена промежуточная конструкция pTrc/mP450-2A-GSGF2A-AdR. На следующем этапе вектор pTrc/mP450-2A-GSGF2A-AdR обрабатывали *KpnI*, затем достраивали концы ДНК ДНК-полимеразой фага T4 и обрабатывали *SacI*. Полученный фрагмент GSG-F2A-AdR клонировали в вектор pYeDP/mCHL-F2A, обработанный *EcoRI*, затем фрагментом Кленова и *SacI*. В результате был получен вектор pYeDP/mCHL-F2Amod, содержащий кассету экспрессии P450-F2A-Adx-GSGF2A-AdR.

Плазида *pYeDP/mCHL-T2A* была получена аналогичным образом с использованием олигонуклеотидов t2a1 и t2a2 (Таблица 1).

pYeDP/mCHL-P2A

С использованием точечных нуклеотидных замен в праймере p2a1 в ходе ПЦР-амплификации линкер T2A был заменен на линкер P2A. Фрагмент, включающий линкер GSGP2A и ген AdR, был получен методом ПЦР с использованием праймеров p2a1 и p2a2 (Таблица 1) и вектора *pYeDP/mCHL-T2A* в качестве матрицы, затем обработан эндонуклеазой рестрикции *SacI*. Вектор *pYeDP/mCHL-F2A* также обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *SacI*, а затем элюировали остов вектора, содержащий ген цитохрома P450 и ген адренодоксина, разделенные 2A линкером вируса ящура. Фрагменты ДНК лигировали с получением вектора *pYeDP/mCHL-P2A*, содержащего кассету экспрессии P450-F2A-Adx-GSGP2A-AdR.

Плазмиды для продукции белков ХГ/Л системы быка в клетках дрожжей *Y. lipolytica*

Для экспрессии кДНК гетерологических белков в клетках дрожжей *Y. lipolytica* использовали плазмиду, сконструированную на основе вектора p67PT, обеспечивающего интеграцию целевых кДНК в повторяющиеся участки генома дрожжей LTR *zeta* из ретротранспозона Ylt1 (Рис. 17).

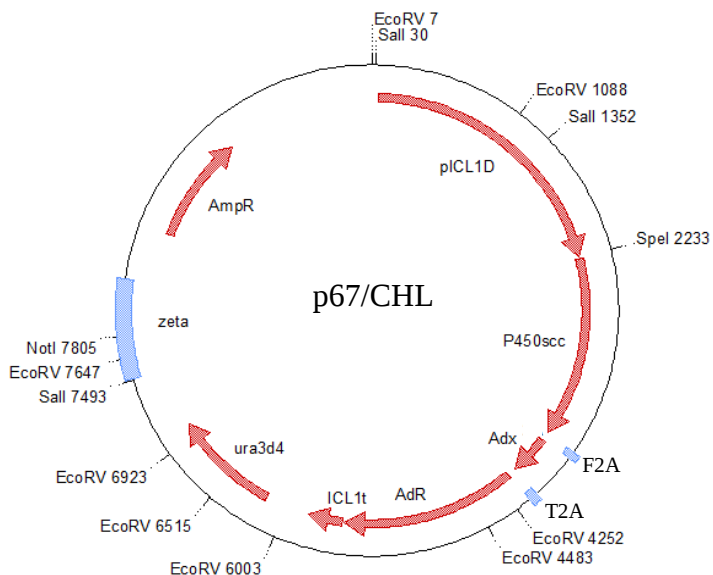


Рисунок 17. Схема вектора p67/CHL. pICL1D - промотор D гена *ICL1*, ICL1t - терминатор гена *ICL1* *Y. lipolytica*, *ura3d4* - селективный маркерный ген, *zeta* - участок гомологии с элементом генома LTR *zeta* из ретротранспозона Ylt1, обеспечивающий интеграцию в

p67PT/CHL

На первом этапе необходимо было ввести участок посадки эндонуклеазы рестрикции *SpeI* в интрон гена *ICL1* в векторе p67PT. С использованием вектора p67PT в качестве ДНК-матрицы и праймеров p67-spei-d и p67-spei-rev методом ПЦР был амплифицирован фрагмент вектора, содержащий сайт рестрикции *SpeI*. Для проведения второй ПЦР-амплификации полученный продукт ПЦР длиной 60 п.о. использовали в качестве мегапраймера, кроме того, использовали праймер p67-sphi-rev и вектор p67PT в качестве ДНК-матрицы. Полученный ПЦР-продукт обрабатывали эндонуклеазами *BglII* и *SphI*, а затем лигировали в вектор p67PT, обработанный аналогичным образом. В результате была получена промежуточная конструкция p67PT/*SpeI*_in_intron с сайтом посадки эндонуклеазы *SpeI*, расположенным на границе между промотором и интроном гена *ICL1*.

Для амплификации кассеты экспрессии, включающей гены цитохрома P450scc, Adx и AdR, разделенные последовательностями, кодирующими пептиды 2A, использовали праймеры chl.start.spei.d и chl.end.sphi.r (Таблица 1), а также вектор pYeDP/mCHL-T2A в качестве матрицы. Полученный продукт ПЦР обрабатывали эндонуклеазами *SpeI* и *SphI* и лигировали с промежуточным вектором p67PT/*SpeI*_in_intron, обработанным

аналогичным образом. Таким образом, интрон гена *ICL1* был заменен на кассету экспрессии P450scs-F2A-Adx-GSGT2A-AdR; был получен вектор p67PT/CHL.

Плазмиды для продукции белков ХГЛ системы быка в клетках линии НЕК293Т

Для экспрессии кДНК гетерологических белков в клетках линии НЕК293Т использовали плазмиды, сконструированные на основе эукариотического вектора pcDNA3.1/CT-GFP (Thermo Fisher Scientific, США). Схема вектора и основные компоненты, входящие в его состав представлены на Рис. 18.

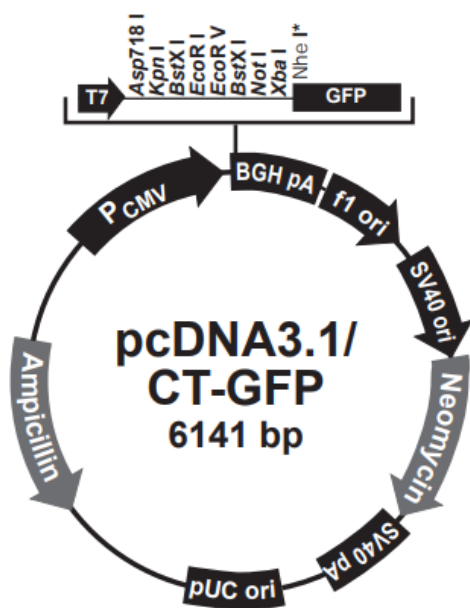


Рисунок 18. Схема эукариотического вектора pcDNA3.1/CT-GFP. P_{CMV} — промотор цитомегаловируса человека, обеспечивающий высокий уровень транскрипции гетерологичных генов, T7 — промотор бактериофага T7, GFP — ген зеленого флуоресцентного белка, SV40 ori — ориджин и промотор SV40, обеспечивающий высокий уровень экспрессии, а также эписомную репликацию в клетках, синтезирующих большой Т-антиген, Neomycin/Ampicillin — гены устойчивости к антибиотикам: неомицину и ампициллину.

pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP

Сначала ДНК-фрагмент -*XbaI*-‘Adx (105-317 п.о.)-2A-AdR-*NheI*- амплифицировали с вектора pYedP/pCoxIV-CHL-2A с использованием праймеров pcdna1 и pyedp2 (Таблица х). Полученный фрагмент обрабатывали *XbaI/NheI* и лигировали с остовом вектора pcDNA3.1/CT-GFP, обработанным аналогичным образом. Полученный промежуточный вектор обрабатывали эндонуклеазой *XbaI* и использовали во второй реакции лигирования. На втором этапе ДНК-фрагмент *XbaI*-P450scs-2A-’Adx (1-105 п.о.)-*XbaI* вырезали из вектора pYedP/pCoxIV-CHL-2A и клонировали в промежуточный вектор с получением плазмиды pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP.

pcDNA3.1/pCoxIV-P450scc-2A-GFP

На первом этапе был амплифицирован фрагмент *-EcoRI-pCoxIV- P450scc-2A-XbaI-* с использованием в качестве ДНК-матрицы очищенного фрагмента вектора *pYEDP/pCoxIV-CHL-2A XbaI-pCoxIV-P450scc-2A-XbaI*, а также праймеров *pcdna2* и *pcdna3* (Таблица 1). Полученный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *XbaI* и использовали в реакции лигирования вместе с остовом вектора *pcDNA3.1/CT-GFP*, также обработанным *EcoRI/XbaI*.

3.2.3 Методы работы с белками

Определение содержания белка в пробах

Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1951), используя БСА в качестве белка-стандарта.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Белки разделяли методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли (Laemmli, 1970). Для концентрирования белков использовали 3% ПААГ (0,13 М Трис-НСl, pH6,8, 3% АА/МБА, 0,1% ДСН, 0,1% ПСА, 1 мкл/мл ТЕМЕД), для разделения – 10-15% ПААГ (0,375 М Трис-НСl, pH8,8, 10-15% АА/МБА, 0,1% ДСН, 0,1% ПСА, 1 мкл/мл ТЕМЕД). Перед внесением в гель в образцы добавляли 4-х кратный буфер для внесения следующего состава: 0,25 М Трис-НСl, pH 6,8, 4% SDS, 10% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий, 5% β-меркаптоэтанол. ПААГ-электрофорез проводили в камерах для электрофореза производства Bio-Rad (США) при силе тока 18 мА (при концентрировании белков) и 36 мА (при разделении белков).

Вестерн-блоттинг

После электрофореза ПАА-гель и нитроцеллюлозную мембрану уравнивали в буфере для переноса белков (БП) на нитроцеллюлозный фильтр в течение 20 мин. Далее в камеру для полусухого переноса белков Bio-Rad (США) укладывали три листа ватмана 3ММ, вырезанных по размеру геля и смоченных в БП, один лист нитроцеллюлозной мембраны, гель и еще три смоченных листа ватмана 3ММ. Перенос осуществляли 1 час при напряжении 20 В. Визуализацию белков после переноса проводили красителем Ропсеау S, затем мембрану дважды промывали водой. Блокирование сайтов неспецифического связывания на НЦ мембране проводили в течение 45 мин в 15 мл буфера для гибридизации (БГ). Мембрану инкубировали в 15 мл БГ, содержащего первичные антитела к целевым белкам (P450scc (6,0 мг/мл), AdR (9,5 мг/мл) или Adx (2,5

мг/мл) при разведении 1:7500, 1:7500 и 1:4500 (v/v), соответственно), в течение 1 часа при температуре 37°C, после чего трижды промывали в ГБ с 0,1% Твин-20. Затем мембрану инкубировали в течение часа в 15 мл ГБ, содержащего 1 мкл конъюгата вторичных антикроличьих антител с пероксидазой хрена (титр 1:15000) и трижды промывали в ГБ с 0,1% Твин-20. Мембрану прокрашивали либо в буфере для детекции, содержащем субстрат пероксидазы ДАБ, либо коммерческим раствором субстрата пероксидазы ТМБ (Sigma-Aldrich), либо с использованием растворов для хемилюминисцентной детекции ECL (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Хемилюминисцентную детекцию иммуноспецифических полос проводили с использованием прибора ChemiDoc™ MP (Bio-Rad). Денситометрический анализ визуализированных полос проводили с использованием программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad).

БП: 48 мМ Трис, 39 мМ глицин, pH 9,2, 0,0375 % ДСН, 20 % метанол;

БГ: PBS 1x, 5% сухого молока;

Буфер для детекции: 100 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ имидазол, 0,05 % Tween 20; 30% перекиси водорода, 0,025% ДАБ.

Раствор Ронсеау S: 1% Ронсеау S, 6% ТХУ.

Определение содержания рекомбинантных белков

Для определения содержания рекомбинантных белков в клеточных фракциях на ПААГ в параллели с исследуемыми белками наносили белки-стандарты, взятые в известном количестве (изолированный цитохром P450scs в интервале 5-250 нг, изолированную адренодоксинредуктазу в интервале 25-250 нг, изолированный Adx в интервале 50-250 нг).

Измерение холестерингидроксилазной активности *in vitro*

Каталитическую активность рекомбинантных белков в отношении 22R-гидроксихолестерина определяли *in vitro* в реконструированной системе, используя гомогенаты клеток *E. coli* или *S. cerevisiae*. Реакционная смесь включала гомогенат клеток (0,5–1 мг суммарного белка) и 22R-гидроксихолестерин (25 нмоль) в 30 мМ растворе натрий-фосфатного буфера (pH 7,2) с добавлением 0,05% Твин-20 (общий объем смеси 0,5 мл). Реакцию индуцировали, добавляя NADPH-генерирующую систему (2 мМ NADP, 10 мМ глюкозо-6-фосфат и 1 ед/мл глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы), и проводили ее в течение 30 мин при 37°C. Затем в реакцию вносили 0,5 ед. холестеролоксидазы для окисления образовавшегося прегненолона с образованием прогестерона. Стероиды

дважды экстрагировали этилацетатом (объемом, соответствующим половине объема пробы), экстракты объединяли и упаривали на концентраторе (SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher Scientific, США). Остатки, полученные после упаривания, растворяли в буфере для приготовления проб, входящем в состав набора реагентов «ИФА-прогестерон» («Хема-Медика», Россия) и в дальнейшем использовали для определения содержания стероидов методом иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ

Определение содержания прогестерона (ферментативной активности P450scc) осуществляли при помощи набора для иммуноферментного определения прогестерона в сыворотке и плазме человека «ИФА-прогестерон» («Хема-Медика», Россия), согласно рекомендациям производителя.

3.2.4 Методы, использованные при работе с клетками *Escherichia coli*

Использованные среды:

LB: 0,5% дрожжевой экстракт, 1% пептон, 1% NaCl. Для получения твердой LB-среды в среду добавляли 1,5% агара.

ТВ: 1,2% бактопептон, 2,4% дрожжевой экстракт, 0,4% глицерин, 0,17 М KH_2PO_4 и 0,72 М K_2HPO_4 .

Приготовление компетентных клеток

Культуру клеток штамма DH5a растили в среде LB в течение ночи на качалке (180 об./мин) при температуре 37°C. На следующий день в 25 мл среды LB среды вносили 1/100 объема ночной культуры и растили 2,5-4 часа при температуре 37°C до получения $\text{OD}_{600}=0,5$. Затем суспензию клеток охлаждали во льду 30 мин, центрифугировали при 2000g в течение 5 мин при температуре 4°C. Полученный осадок суспендировали в 5 мл 0,1 М раствора CaCl_2 , еще раз центрифугировали при 2000g в течение 5 мин при температуре 4°C. Надосадочную жидкость сливали, осадок клеток суспендировали в 1 мл 0,1 М раствора CaCl_2 , добавляли ДМСО двумя порциями до конечной концентрации 7%. Аликвоты компетентных клеток разливали в стерильные пробирки по 100 мкл и замораживали в жидком азоте.

Трансформация

После разморозки на льду к 100 мкл компетентных клеток добавляли 5-10 мкл лигазной смеси (около 200 нг ДНК) или 0,5 мкл плазмидной ДНК (около 50 нг ДНК) и

инкубировали смесь в течение 30 мин на льду. Пробирки инкубировали в течение 1 мин на водяной бане при температуре 42°C в водяной бане, затем добавляли 900 мкл среды LB и помещали на 60 мин в термошейкер с температурой 37°C (180 об./мин). Клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 3000 об./мин) и высевали на чашки Петри с селективным антибиотиком (100 мкг/мл ампициллина).

Экспрессия гетерологичных генов

Одну колонию трансформированных бактерий *E. coli* скалывали в 5 мл жидкой среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и растили в течение ночи при температуре 37°C. Затем культуру разбавляли 1:200 средой TB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессию генов индуцировали добавлением в среду ИПТГ (0,5 мМ). В качестве дополнительного источника гема в среду добавляли δ -аминолевулиновую кислоту (0,5 мМ). Экспрессию гетерологичных генов проводили в течение 24 часов при температуре 22–28°C в условиях хорошей аэрации.

Приготовление бактериальных гомогенатов

Культуру клеток *E. coli* центрифугировали (5000 об./мин, 10 мин), осадок клеток ресуспендировали в буфере (30 мМ фосфата натрия, pH 7,4, 0,75 М сахарозы, 100 мкг/мл лизацима). Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут на качалке, затем центрифугировали (7000 об./мин, 10 мин), ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 0,1 мМ ПМСФ, и обрабатывали ультразвуком на льду (20 кГц, 2 цикла с интервалом между циклами 2 мин, 1 цикл: 10 импульсов по 3 с каждый, перерыв 7 с после каждого импульса). Полученные образцы центрифугировали (7000 об./мин, 10 мин). Полученную надосадочную жидкость – гомогенат – использовали в дальнейшем для Вестерн-блот анализа и измерения активности ХГЛ системы *in vitro*.

Измерение холестерингидроксилазной/лиазной активности в клетках *E. coli in vivo*

После экспрессии гетерологичных генов в течение 24 ч клетки 50 мл культуры клеток центрифугировали (3000g, 10 мин), после чего промывали стерильным 50 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7,4). Суспензию клеток концентрировали в том же буфере до получения конечной концентрации 25 г сырого веса клеток/л. Затем добавляли ИПТГ (1 мМ), АЛА (0,5 мМ), ампициллин (100 мкг/мл), глицерин (2,0%, V/V) и субстрат P450scs. Сгущенную суспензию клеток культивировали при температуре 28°C на качалке

(160 об./мин) в течение 24 ч. Субстрат P450scs холестерин добавляли в смеси с различными химическими веществами: этанолом (1,0%, V/V), ДМСО (6,0%, V/V), β -метилциклодекстрином (0,05%–6%, m/V), 0,5% МЦД в сочетании с сапонином (0,2%, m/V) или лизоцимом (10 мкг/мл) до конечной концентрации 0,5 мМ. Затем отбирали аликвоту культуры клеток (5 мл) и экстрагировали органические вещества этилацетатом (дважды по 2,5 мл). Экстракты упаривали на вакуумном испарителе (SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher Scientific, США). Сухие остатки после упаривания промывали 30 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7,4), затем растворяли в 210 мкл натрий-фосфатного буфера (pH 7,4), содержавшего 0,05% Твин-20 (V/V) и 1 ед. активности холестеролоксидазы, реакцию смесь инкубировали 1 час при температуре 37°C. Количество прогестерона в образцах оценивали с использованием набора реактивов «ИФА-прогестерон» («Хема-Медика», Россия). Результаты, полученные в 3-4 независимых экспериментах, нормировали на 1 л сгущенной суспензии клеток и представляли как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

3.2.5 Методы, использованные при работе с клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Использованные среды:

YPD: 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза;

SD: 0,17% дрожжевые азотистые основания без сульфата аммония и аминокислот, 0,5% сульфат аммония, 2% глюкоза. Для получения твердой среды SD в нее добавляли агар до конечной концентрации 1,5%.

SG: 0,17% дрожжевые азотистые основания без сульфата аммония и аминокислот, 0,5% сульфат аммония, 2% галактоза.

Приготовление компетентных клеток

Одиночную колонию дрожжей засевали в 5 мл среды YPD и растили в течение ночи при температуре 30°C на качалке с интенсивным перемешиванием (180 об./мин). На следующий день 1 мл ночной культуры клеток разводили 20 мл среды YPD и растили при тех же условиях до получения OD₆₀₀ ~ 1,0. Суспензию клеток центрифугировали (5 мин, 3000g), осадок дважды промывали в 10 мл стерильного 0,1 М буфера LiCl/TE (10 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 0,1 мМ ЭДТА, 100 мМ LiCl), затем суспензию клеток центрифугировали. Полученный осадок клеток суспендировали в 200 мкл 0,1 М буфера LiCl/TE. Полученные компетентные клетки использовали для трансформации.

Трансформация

К 100 мкл компетентных клеток добавляли 2-4 мкг плазмидной ДНК, перемешивали и инкубировали 5-10 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 0,3 мл 40% ПЭГ 4000 и инкубировали 45 минут при температуре 30°C и покачивании. Затем к пробе добавляли 40 мкл ДМСО и подвергали клетки тепловому шоку: инкубировали на водяной бане при температуре 42°C в течение 5-8 мин. Клетки осаждали центрифугированием (5000 об./мин, 5 мин), к осадку добавляли 1 мл буфера TE (10 mM Трис-HCl, pH 7,4, 0,1 mM ЭДТА) и снова центрифугировали. Осадок суспендировали в 300 мкл воды и высевали полученную суспензию клеток на чашку Петри с селективной средой SD. Чашки Петри инкубировали при температуре 30°C в течение 2-3 суток до появления колоний трансформированных клеток.

Экспрессия гетерологичных генов в клетках *S. cerevisiae*

Несколько колоний трансформированных клеток скалывали в среду YPD и растили в течение ночи при температуре 30°C в условиях хорошей аэрации (180 об./мин). 1 мл полученной ночной культуры разбавляли 40 мл среды SD и растили суспензию клеток при тех же условиях в течение 24 часов. Затем суспензию клеток центрифугировали, осадок дважды промывали 10 мл стерильной воды, затем суспендировали в 150 мл среды SG (OD600 ~ 1,0). Экспрессию гетерологичных генов в клетках *S. cerevisiae* осуществляли в течение 48-72 часов при температуре 30°C и интенсивном перемешивании.

Получение гомогената и фракционирование клеток *S. cerevisiae*

Фракционирование дрожжевых клеток осуществляли согласно (Hertmann et al., 1994).

Суспензию клеток центрифугировали (4000 об./мин, 5 мин), дважды промывали буфером I, взвешивали осадок клеток. Затем осадок суспендировали в буфере I (1 мл буфера на 0,125 г сырого веса клеток), добавляли 0,3 мг/мл литиказы и инкубировали в 1 час при температуре 30°C для разрушения клеточной оболочки. Затем образцы центрифугировали (4000 об./мин, 5 мин) и промывали буфером I. Далее работали при температуре 0°C. Полученные сферопласты разрушали в стеклянном гомогенизаторе Даунса в необходимом объеме буфера II. Пробы центрифугировали в центрифуге с охлаждением (5000 об./мин, 5 мин) для осаждения крупных клеточных компонентов и неразрушенных клеток. Надосадочную жидкость (гомогенат) отбирали и использовали для Вестерн-блоттинг анализа и определения ХГЛ активности *in vitro*. При необходимости

гомогенат центрифугировали (14000 об./мин, 20 мин) для получения митохондриальной фракции и фракции постмитохондриального супернатанта.

Буфер I: 10 mM трис-HCl pH 7,5, 2 M сорбитол, 0,1 mM ЭДТА, 0,1 mM ДТТ;

Буфер II: 10 mM трис-HCl pH 7,5, 0,65 M сорбитол, 0,1 mM ДТТ, 0,1 mM ЭДТА, 1 mM ПМСФ.

Обработка митохондрий трипсином и протеиназой К

Аликвоты митохондрий, выделенных из дрожжевых клеток, разводили в 100-300 мкл буфера SHKCL (0,6 M сорбитол, 50 mM HEPES-KOH, 80 mM KCl, pH 7,4), затем добавляли в раствор протеиназу К или трипсин до концентрации 50 мкг/мл и инкубировали 30 мин во льду. По окончании реакции фермент ингибировали ФМСФ (конечная концентрация 2 mM) и инкубировали пробы во льду 5 мин. Митохондрии осаждали центрифугированием (12000g, 12 мин), осадки промывали буфером, содержащим ингибитор.

3.2.6 Методы, использованные при работе с клетками дрожжей *Y. lipolytica*

Состав сред:

YPD: 1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза;

YMC (среда для диплоидизации (Barth, Gaillardin, 1996)): 0,5% пептон, 0,3% дрожжевой экстракт, 0,3% солодовый экстракт, 0,05% Na-цитрат, 2% агар.

MG (минимальная среда):

1) минеральные соли (исходный 10×раствор содержит: 3,0 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 г/л KH_2PO_4 , 0,16 г/л $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, 0,70 г/л $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50 г/л NaCl, 0,40 г/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$);

2) редкие микроэлементы (исходный 1000×раствор содержит: 0,5 мг/л H_3BO_3 , 0,04 мг/л $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 мг/л KI, 0,4 мг/л $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 0,2 мг/л $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,4 мг/л $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 мг/л $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$);

3) 0,3 мкг/л тиамин-HCl;

4) при необходимости среда содержала добавки аминокислот: 50 мг/л L-лейцин или 50 мг/л L-гистидин;

5). при необходимости среда содержала 2% глюкозы.

Для получения твердых сред в жидкие среды добавляли 2% агара.

Получение компетентных клеток

Клетки дрожжей штамма E129L или E150 засевали в 10 мл среды YPD и растили в течение ночи. На следующий день культуру клеток с оптической плотностью в пределах 9-15 ед. центрифугировали (5 мин, 4000 об/мин) и осадок дважды промывали в 10 мл стерильного буфера TE (10 mM Трис-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА). Затем осадок клеток суспендировали в 0,1 M Li-ацетатном буфере, pH 6,0 до конечной оптической плотности 5 ед. и инкубировали 1 час при температуре 28°C и слабом покачивании (100 об/мин). Клетки центрифугировали (5 мин, 4000 об/мин) и ресуспендировали в 1/10 объема Li-ацетатного буфера. Полученные компетентные клетки использовали для проведения трансформации.

Трансформация с использованием LiAc

500 нг плазмиды p67PT/CHL, линейаризованной в результате обработки эндонуклеазой *NotI*, смешивали с 5 мкл ДНК-носителя (озвученная ДНК спермы лосося, 4мг/мл) и инкубировали в течение 5 мин при температуре 60°C. Затем раствор ДНК добавляли к 100 мкл компетентных клеток и инкубировали 15 мин при 28°C. Затем добавляли 0,7 мл 40% PEG в 0,1 M Li-ацетатном буфере, pH 6,0 и инкубировали в течение 1 часа при 28°C и слабом перемешивании (150 об./мин). Затем клетки инкубировали при температуре 39°C в течение 10 мин (тепловой шок). После этого добавляли 1,2 мл 0,1 M Li-ацетатного буфера pH 6,0 и перемешивали. По 300 мкл полученной суспензии клеток высевали на чашку Петри с селективной средой MG и растили при температуре 28-30°C в течение 7-10 суток.

Выделение хромосомной ДНК из клеток дрожжей *Y. lipolytica* с использованием стеклянных бус

Клетки дрожжей растили в 10 мл среды до стационарной фазы роста, собирали и промывали 1 раз водой. Осадок клеток ресуспендировали 200 мкл TEST-буфера, к пробе добавляли 200 мкл смеси фенол-хлороформ и 0,3 г стеклянных бус и подвергали смесь эффективному перемешиванию на вортексе в течение 3-4 мин. Далее к суспензии добавляли 200 мкл буфера TE, и центрифугировали 5 мин при 13000 об/мин. Водную фазу переносили в новую пробирку, снова экстрагировали 1 раз 400 мкл смеси фенол-хлороформ и после этого следы фенола удаляли, экстрагируя раствора 400 мкл хлороформа. ДНК осаждали, добавляя 2 объема этанола, осадок ДНК высушивали и ресуспендировали в 40 мкл TE-буфера, содержащего 100 мкг/мл РНКазы А.

TEST-буфер: 10 мМ Трис-НCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 100 мМ NaCl, 2 % Тритон X-100, 1 % ДСН.

Гибридизация по Саузерну

Для Саузерн-блот-анализа 0,6-1 мкг хромосомной ДНК *Y. lipolytica* подвергали полному гидролизу, обрабатывая эндонуклеазой рестрикции *NotI* в течение ночи, и разделяли фрагменты ДНК, проводя электрофорез в 0,8 % агарозном геле без этидий бромида. По окончании электрофореза гель последовательно инкубировали в растворах для депуринизации, в денатурирующем растворе и растворе для нейтрализации, затем промывали дистиллированной водой и осуществляли перенос ДНК с геля на нейлоновую мембрану Hybond-N (Amersham, Великобритания), используя вакуумную систему Vacuum-Blot system, Biometra, отрицательное давление 80 мБар), в токе денатурирующего раствора 20xSSC в течение 4 часов. Мембрану высушивали, затем выдерживали ее в ультрафиолетовом свете (длина волны 312 нм) в течение 3 мин для фиксации ДНК на мембране.

Для получения меченного биотином зонда вектор p67CHL обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *SalI* и *SpeI*. Биотинилирование полученного фрагмента промотора гена изоцитратлиазы *SalI*-pICL1D-*SpeI* длиной 881 п.о. проводили с использованием набора реагентов Thermo Scientific Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно протоколу производителя.

Мембрану и буфер для прегибридизации помещали в стакан для гидридизации и инкубировали в термостате с вращающимся барабаном 4 ч при 42°C. После прегибридизации в стакан вносили денатурированный, биотинилированный ДНК-зонд. Гибридизацию проводили при 42°C в течение ночи.

Отмывку мембраны проводили в чистых стеклянных кассетах: 2 раза промывочным раствором I (10 мин при комнатной температуре), затем 2 раза промывочным раствором II (20 мин при 65°C). Детекцию на мембране фрагментов ДНК, гибридизованных с зондом проводили с использованием набора реагентов для детекции Biotin Chromogenic Detection Kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно протоколу производителя.

Использованные растворы:

Раствор для депуринизации: 0,25 М HCl.

Денатурирующий раствор: 1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH.

Раствор для нейтрализации: 1,5 М NaCl, 0,5 М Трис-НCl, pH 7,5.

20xSSC: 0,3 М цитрата натрия, 3,0 М NaCl.

100x раствор Дернхардта: 2%(w/v) БСА, 2%(w/v) Ficoll™, 2%(w/v) поливинилпирролидон.

Буфер для гибридизации: 6xSSC, 0,5 % (w/v) ДСН, 50% (v/v) деионизированный формамид, 5x раствор Дернхардта.

Промывочный раствор I: 2xSSC, 0,1 % (w/v) ДСН.

Промывочный раствор II: 0,1xSSC, 0,1 % (w/v) ДСН.

Конструирование диплоидных штаммов

Скрещивание гаплоидных штаммов *Y. lipolytica* проводили согласно (Barth, Gaillardin, 1996). Клетки трансформантов разных половых типов E129L (МАТА) и E150 (МАТВ) с комплементарной ауксотрофностью выращивали на чашках со средой YPD в течение 24 часов, затем пересекали их чашки с минимальной МГ, нанося 4 параллельных полосы на чашку, и растили в течение 20 часов при 28°C. Затем методом получения реплик клетки с двух чашек со штаммами разного полового типа переносили на чашки со средой YMC для конъюгации, при этом положение полос на чашках, образованных выросшими клетками разного полового типа, было перпендикулярным друг другу. Полученные чашки инкубировали в течение 24 часов при температуре 25°C, затем методом получения реплик клетки переносили на чашки с агаризованной средой МГ и растили в течение нескольких суток. Диплоидные штаммы, выросшие в местах пересечения полос нанесенных исходных гаплоидных штаммов, переносили на свежие чашки, рассеивали до одиночных колоний, из которых выращивали культуры диплоидных клеток.

Продукция рекомбинантных белков в клетках *Y. lipolytica* и измерение ХГЛ активности

Клетки засеивали в 40 мл среды YPD и растили при температуре 28°C и 200 об/мин в течение суток. Затем измеряли оптическую плотность в культурах, промывали клетки стерильной дистиллированной водой и пересекали в 100 мл селективной среды МГ, уравнивая начальные плотности всех культур. Для индукции синтеза рекомбинантных белков в момент начала инкубации и затем каждые 6 ч в среду добавляли этанол до конечной концентрации 1%, клетки растили в течение суток. Экспрессию гетерологичных генов осуществляли в течение 24 часов. Затем клетки осаждали центрифугированием и переносили в калий-фосфатный буфер и вносили в сгущенную суспензию клеток субстрат цитохрома P450scs холестерин. Инкубацию клеток с субстратом проводили в течение 24 ч при температуре 28°C и слабом покачивании (100 об./мин). Из полученных проб отбирали аликвоты для измерения содержания белка по Лоури, а также проведения анализа продукции гетерологичных белков методом Вестерн-блоттинга. Для определения

активности ХГЛ системы, реконструированной в клетках, проводили экстракцию органических веществ из суспензии клеток в фосфатном буфере этилацетатом, полученный экстракт упаривали, растворяли в абсолютном этаноле и анализировали содержание продукта реакции прегненолона методом ВЭЖХ (см. ниже).

3.2.7 Методы, использованные при работе с клетками HEK293T

Культивация клеток

Культуру клеток HEK-293T вели на чашках Петри или 6-луночных планшетах (GreinerBioOne, Германия) в среде DMEM с аланил-глутамином (Пан-Эко, Россия) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (Gibco, Россия), а также пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Трансфекцию клеток HEK293T проводили с использованием реагента Turbofect (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

Получение гомогенатов и субклеточных фракций

Клетки снимали с чашек Петри с использованием раствора трапсин-ЭДТА (Пан-Эко, Россия), осаждали центрифугированием (2000 об./мин, 5 мин) и ресуспендировали в 11 мл холодного буфера RSB. Затем все манипуляции выполняли на льду. Клетки переносили в гомогенизатор Даунса и инкубировали 10 мин, затем гомогенизировали. К гомогенату клеток добавляли 8 мл 2,5х буфера MS и быстро перемешивали. Неразрушенные клетки и крупные клеточные фрагменты осаждали центрифугированием (1300 g, 5 мин). Надосадочную жидкость переносили в чистую пробирку. Процедуру повторяли трижды. Аликвоты надосадочной жидкости отбирали и использовали как гомогенат клеток.

Фракцию митохондрий осаждали центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость использовали как фракцию постмитохондриального супернатанта, а осадок еще раз промывали 1 мл 1х буфере MS. Полученный осадок использовали как митохондриальную фракцию. Для проведения анализа методом электрофореза в ПААГ полученные гомогенат, фракцию постмитохондриального супернатанта и митохондриальную фракцию и смешивали с 2хбуфером для внесения в ПААГ и кипятили в течение 10 мин.

Состав использованных буферов:

MS Homogenization Buffer (1x): 210 mM маннитол, 70 mM сахароза, 5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 7,5);

MS Homogenization Buffer (2,5x): 525 mM маннитол, 175 mM сахараза, 12,5 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5 mM EDTA (pH 7,5);

RSB Hypo Buffer: 10 mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5).

Окрашивание митохондрий

Митохондрии окрашивали с использованием реагента MitoTracker Orange CMTMRos (Thermo Fisher Scientific, США), обладающего следующими характеристиками: длина волны поглощения и испускания - 554 нм и 576 нм соответственно. Клетки инкубировали в подогретой среде DMEM (37°C) с добавлением MitoTracker до конечной концентрации 500 нмоль/л, в течение 45 минут, после чего среду заменяли на свежую DMEM.

Конфокальная и флуоресцентная микроскопия

Изображения клеток были получены с использованием конфокальной сканирующей системы (Nikon Corporation, Япония), представленной инвертированным микроскопом NikonEclipseTi-E с TIRF-осветителем, конфокальным модулем A1 и конфокальным модулем на основе спиннинг-диска.

Определение ХГЛ активности

Для определения активности цитохрома P450_{ssc} быка в трансфицированных клетках HEK293T *in vivo* клетки выращивали в присутствии или в отсутствии субстрата цитохрома P450_{ssc}. Содержание продуктов реакции определяли в культуральной среде, собранной после инкубации клеток. Через 48 часов после трансфекции клеток векторами pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, pcDNA3.1/pCoxIV-P450_{ssc}-2A-GFP или pcDNA3.1/CT-GFP, клетки промывали бессывороточной средой. Затем добавляли свежую бессывороточную среду и субстрат цитохрома P450_{ssc}, клетки инкубировали при температуре 37°C и содержании CO₂ 5% в течение 24 ч. Субстрат (холестерин, 22R-гидроксихолестерин, 20 α -гидроксихолестерин или 22-NBD-холестерин) добавляли до конечной концентрации 5 мкмоль/л в виде раствора в этаноле. Затем с каждой чашки Петри собирали по 10 мл культуральной среды и экстрагировали органические вещества этилацетатом (3 раза по 2,5 мл). Экстракт упаривали на вакуумном испарителе (SpeedVac Concentrator, Thermo Fisher Scientific, США), остаток после упаривания растворяли в 300 мкл абсолютного этанола. Стероиды анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В некоторых экспериментах была проведена обработка образовавшегося прегненолона холестеролоксидазой для превращения его в прогестерон: органический экстракт растворяли в 150 мкл 30 mM натрий-фосфатного буфера (pH 7,4), затем

добавляли 210 мкл 150 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,4), содержащего 0,05% Твин 20 (V/V) и 1 ед. холестеролоксидазы. Полученную смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч. Затем пробы экстрагировали этилацетатом, упаривали и растворяли остаток в этаноле, как было описано выше.

ВЭЖХ

Для анализа образцов использовали прибор Agilent 1260 (Agilent Technologies, США), оборудованный фотодиодно-матричным детектором. Обращенно-фазовую ВЭЖХ проводили на колонке Zorbax SB-C8 5 мкм (150 × 4,6 мм; Agilent Technologies) в градиенте ацетонитрила. Условия хроматографирования указаны в Таблице 3. Количество стероидов, образовавшихся в клетке в результате биотрансформации субстрата, оценивали с использованием метода внешнего стандарта, вводя стандартный образец прегненолона (1 мг/мл) или прогестерона (1 мг/мл).

Таблица 3. Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Скорость потока	1,5 мл/мин
Температура	30°C
Объем введения	20 мкл
Детекция	210 нм (прегненолон), 242 нм (прогестерон)
Подвижная фаза А	H ₂ O
Подвижная фаза В	Ацетонитрил
Программа градиентной элюции	10 мин 50% “В”; 1 мин 50–100% “В”; 3 мин 100% “В”

4 РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1 Реконструкция ХГЛ системы в клетках *E. coli*

Первый этап работы был направлен на получение рекомбинантных клеток *E. coli* с реконструированной стероидогенной ХГЛ системой быка и поиск условий культивирования, обеспечивающих наиболее эффективную биотрансформацию холестерина данными рекомбинантными клетками.

Совместная экспрессия генов трех белков ХГЛ системы быка в клетках бактерий осуществлялась с использованием одной полицистронной плазмиды, содержащей в составе кассеты экспрессии кДНК, кодирующие цитохром P450_{scs}, Adx и AdR, а также участки связывания рибосом (*ribosome binding site*, RBS), расположенные перед каждой из гетерологичных кДНК. При использовании таких полицистронных конструкций в результате транскрипции образуется одна гибридная мРНК, но наличие RBS перед иницирующими кодонами гетерологичных генов обеспечивает независимую трансляцию индивидуальных белков.

Известно, что активность энзиматических систем зависит от стехиометрического соотношения белков-компонентов. Подробные данные о стехиометрическом соотношении компонентов ХГЛ системы в митохондриях коры надпочечников быка представлены в разделе 2.3.1 «Состав и функционирование ХГЛ системы». Следует отметить, что, согласно представленным данным (например, (Hanukoglu and Hanukoglu, 1986, и Usanov et al., 1987), содержание P450_{scs} в природной ХГЛ системе превышает содержание AdR.

В ряде работ, имеющих в литературе (например, Parikh et al., 1997, и Sawada et al., 1999), показано, что порядок генов в кассете экспрессии рекомбинантных тандемных плазмид может влиять на уровень экспрессии генов и, соответственно, на соотношение ко-экспрессируемых белков в клетке. Например, в случае совместной экспрессии в клетках *E. coli* кДНК цитохрома P450_{27B1}, Adx и AdR изменение порядка кДНК Adx и AdR в кассете экспрессии вело к изменению содержания белков в 3-5 раз, при этом активность цитохрома P450_{27B1} изменялась более, чем в 20 раз (Sawada et al., 1999). При использовании полицистронных конструкций содержание гетерологичных белков зависит, в частности, от структуры протяженной искусственной мРНК, которая может быть неоптимальной для трансляции второго от промотора и последующих белков вследствие образования шпилек или ограничения доступности старт-кодона. Другими важными факторами, влияющими на содержание и, как следствие, на соотношение

отдельных рекомбинантных белков в клетке, являются особенности синтеза и время полужизни данных белков.

В рамках данной работы мы планировали проверить, влияет ли порядок генов цитохрома P450_{scc}, AdR и Adx в каскаде экспрессии используемой плазмиды на содержание рекомбинантных белков-компонентов ХГЛ системы и активность данной системы в клетках *E. coli*. Кроме того, с целью повышения активности реконструированной ХГЛ системы мы предполагали осуществлять экспрессию генов P450_{scc}, AdR и гена, кодирующего мутантную версию Adx1-S112W. Из данных литературы известно, что Adx1-S112W формирует более стабильный комплекс с цитохромом P450_{scc} по сравнению с Adx дикого типа, что приводит к повышению скорости переноса электронов и обеспечивает в системе *in vitro* 100-кратное увеличение эффективности конверсии холестерина в прегненолон (Schiffler et al., 2001).

4.1.1 Конструирование плазмид для совместной экспрессии кДНК белков ХГЛ системы

Для коэкспрессии кДНК, кодирующих белки ХГЛ системы, в клетках *E. coli* мы сконструировали вектор pTrc99A/CHL на базе плазмиды pTrc99A/P450_{scc}, которая успешно использовалась для продукции цитохрома P450_{scc} (Wada et al., 1991, Shkumatov et al., 2006). Полученная плазида pTrc99A/CHL содержит каскад экспрессии со следующим порядком гетерологичных кДНК: RBS-P450_{scc}-RBS-Adx-RBS-AdR (Рис. 19). Порядок гетерологичных кДНК в плазмиде pTrc99A/CHL изменен по сравнению с ранее сконструированной в нашей лаборатории плазмидой pBar_Triple, включающей слитую кДНК RBS-AdR-RBS-Adx-RBS-P450_{scc}. Предполагалось, что помещение гена цитохрома P450_{scc} на первое место в каскаде экспрессии тандемной плазмиды приведет к увеличению уровня экспрессии данного гена и, как следствие, к увеличению соотношения белков P450_{scc}/AdR. Учитывая ключевую роль цитохрома P450_{scc} в ХГЛ системе, мы предполагали, что данное изменение стехиометрического соотношения белков приведет к увеличению эффективности конверсии холестерина в прегненолон.

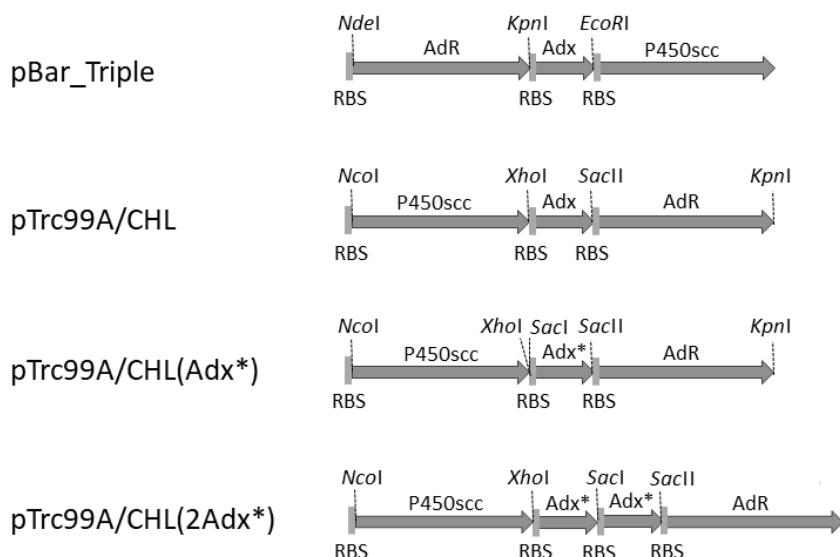


Рисунок 19. Схема расположения кДНК цитохрома P450scс, Adx и AdR в кассетах экспрессии полицистронных плазмид. Adx - кДНК Adx1-108, Adx* - кДНК Adx1-S112W.

При конструировании вектора pTrc99A/CHL с целью повышения активности ХГЛ системы как и в случае pBar_Triple мы использовали укороченную версию адренодоксина – Adx1-108 (на рисунках и далее в тексте обозначен как Adx), которая обеспечивает более эффективное гидроксилирование субстратов цитохромами CYP11A1 и CYP11B1 (Uhlmann et al., 1994). Кроме того, используя вектор pTrc99A/CHL в качестве базового, мы сконструировали две генетические конструкции, содержащие одну копию и две копии гена адренодоксина Adx1-S112W (обозначен как Adx*), кодирующего мутированную версию белка с точечной заменой аминокислоты серина на триптофан в 112 положении. Полученные ДНК-конструкции были обозначены pTrc99A/CHL(Adx*) и pTrc99A/CHL(2Adx*) (Рис. 19). Предполагалось, что замена Adx1-108 на Adx* в составе экспрессионной плазмиды pTrc99A/CHL приведет к повышению активности реконструированной ХГЛ системы, а введение дополнительной копии кДНК Adx* позволит увеличить уровень экспрессии гена Adx и относительное содержание Adx в P450-системе, что приведет к еще большему повышению активности.

4.1.2 Синтез белков ХГЛ системы в рекомбинантных клетках

Клетки *E. coli*, трансформированные плазмидами pBar_Triple, pTrc99A/CHL, pTrc99A/CHL(Adx*) или pTrc99A/CHL(2Adx*), выращивали в селективной среде в условиях индукции транскрипции гетерологичных кДНК в течение 24 ч. На Рис. 20 приведены результаты Вестерн-блот анализа гомогенатов, полученных из клеток *E. coli*, трансформированных плазмидами pBar_Triple, pTrc99A/CHL и pTrc99A/CHL(Adx*), с использованием антител, специфичных к цитохрому P450scс, AdR или Adx: все плазмиды обеспечивали в клетках одновременную экспрессию генов трех рекомбинантных белков: P450scс – 53 кДа, AdR – 51 кДа и Adx – 12 кДа.

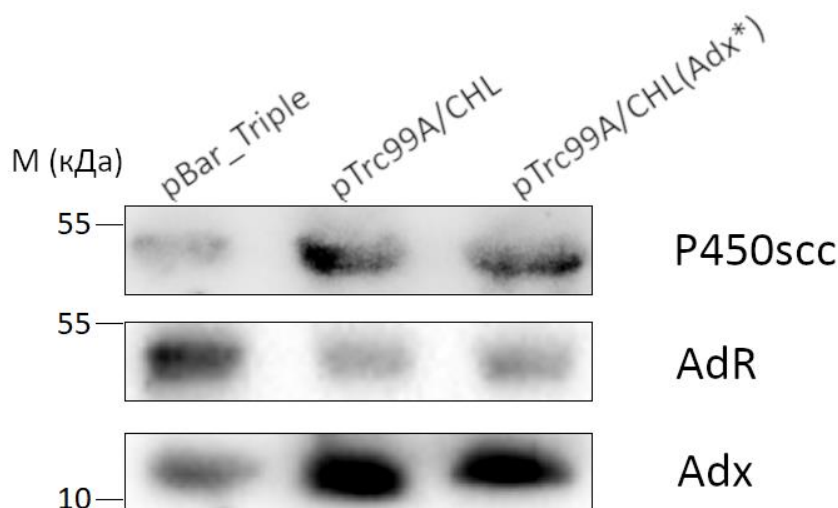


Рисунок 20. Идентификация белков ХГЛ системы, в гомогенатах рекомбинантных клеток *E. coli*. ДСН-ПААГ (10%, 5 мкг общего белка/дор. (верхняя и средняя панели) или 15%, 10 мкг общего белка/дор. (нижняя панель) и Вестерн-блоттинг.

Содержание в клетках белков-компонентов ХГЛ системы было определено методом денситометрического сканирования иммуноспецифичных полос, визуализированных в результате Вестерн-блоттинга, с использованием программного обеспечения Image Lab (Таблица 4). Полученные данные демонстрируют значительное различие в содержании гетерологичных белков в клетках *E. coli*/pBar_Triple и *E. coli*/pTrc99A/CHL, трансформированных плазмидами, несущими кассеты экспрессии с различным порядком кДНК P450scc и AdR (Рис. 19). В сравнении с клетками *E. coli*/pBar_Triple в клетках *E. coli*/pTrc99A/CHL содержание P450scc и Adx возрастает примерно в 2 раза - с $0,145 \pm 0,025$ до $0,290 \pm 0,040$ нмоль/мг общего клеточного белка и с $0,211 \pm 0,062$ до $0,485 \pm 0,157$ нмоль/мг общего клеточного белка соответственно. В то же время содержание AdR снижается примерно в 2 раза - с $0,610 \pm 0,019$ до $0,283 \pm 0,026$ нмоль/мг общего клеточного белка. Рассчитанное стехиометрическое соотношение белков P450scc/Adx/AdR в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидами pBar_Triple и pTrc99A/CHL, составило 1:1,45:4,2 и 1:1,67:0,98 соответственно. Таким образом, перемещение гена P450scc на первое место в кассете экспрессии в плазмиде pTrc99A/CHL привело к изменению стехиометрического соотношения белков в ХГЛ системе.

Таблица 4. Содержание цитохрома P450scc, Adx и AdR в рекомбинантных клетках *E. coli* (нмоль/мг общего клеточного белка)

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

В таблице представлены средние значения $\pm$ стандартное отклонение из трех независимых экспериментов.

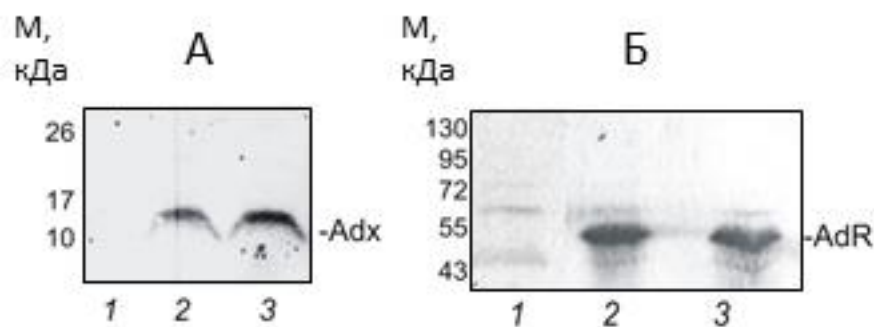


Рисунок 21. Сравнительный анализ уровня экспрессии генов Adx* (А) и AdR (Б) в рекомбинантных клетках *E. coli*/pTrc99A/CHL(Adx*) и *E. coli*/pTrc99A/CHL(2Adx*). ДСН-ПААГ (15%, 10 мкг общего белка/дор. (А), или 10%, 5 мкг общего белка/дор. (Б)) и Вестерн-блоттинг клеточных гомогенатов. 1: гомогенат нетрансформированных клеток; 2: гомогенат клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL(Adx*); 3: гомогенат клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL(2Adx*).

Анализ содержания рекомбинантных белков ХГЛ системы в штамме *E. coli*/pTrc 99A/CHL и штамме *E. coli*/pTrc 99A/CHL(Adx*), синтезирующем мутированный белок Adx*, не выявил значительных различий в уровнях их экспрессии (Рис. 20; Таблица 4). При этом, как следует из результатов, представленных на Рис. 21, введение второй копии гена Adx* в состав плазмиды приводит к увеличению содержания Adx* в клетках. Согласно данным иммуноблоттинга, количество Adx* (определенное с использованием программного обеспечения ScanImage) в клетках, трансформированных плазмидой pTrc99A/CHL(2Adx*), примерно в 2 раза превышает содержание Adx* в клетках, трансформированных pTrc99A/CHL(Adx*). При этом уровни экспрессии цитохрома P450ssc и AdR при введении второй копии кДНК Adx* в состав плазмиды не изменились: Рис. 21 демонстрирует, что в клетках, трансформированных pTrc99A/CHL(Adx*) и pTrc99A/CHL(2Adx*), содержится одинаковое количество белка AdR, кДНК которого расположена в кассете экспрессии последней.

4.1.3 Каталитическая активность белков ХГЛ системы быка, синтезирующихся в клетках бактерий

Гомогенаты клеток всех исследуемых штаммов проявляли ХГЛ активность. Наличие конверсии 22R-гидроксихолестерина в прегненолон регистрировали *in vitro* с использованием метода ИФА. Результаты измерения активности, усредненные по данным четырех независимых экспериментов, за вычетом фоновой величины, полученной для гомогената контрольных клеток *E. coli* штамма DH5α ($0,18 \times 10^{-3}$ нмоль прегненолона/мг

белка гомогената×ч), приведены в Таблице 5. ХГЛ активность, измеренная в гомогенате клеток, трансформированных pTrc99A/CHL, которая составляла $4,0 \pm 1,3$ нмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч, была принята за 100%. Как следует из представленных данных, препараты клеток, полученных с использованием плазмид pTrc99A/CHL и pBar_Triple, демонстрируют близкие величины ХГЛ активности: 100% и 120% соответственно. Таким образом, увеличение содержания P450_{scs} в клетках *E. coli*/pTrc99A/CHL не привело к увеличению активности ХГЛ системы, рассчитанной на мг белка гомогената клеток в сравнении с ее активностью в клетках *E. coli*/pBar_Triple. Возможно, это связано с одновременным снижением содержания AdR в данных клетках (Таблица 4). В то же время удельная активность цитохрома P450_{scs}, рассчитанная как нмоль прегненолона/1 нмоль P450_{scs}×ч, значительно ниже в препарате клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL по сравнению с препаратом клеток *E. coli*/pBar_Triple ($13,8 \pm 4,5$ против $33,1 \pm 8,96$ нмоль прегненолона/1 нмоль P450_{scs}×ч). То есть изменение стехиометрического соотношения компонентов ХГЛ системы в клетках приводит к изменению эффективности функционирования цитохрома P450_{scs}.

Замена Adx1-108 на мутантный вариант Adx* существенно сказывается на эффективности функционирования ХГЛ системы (Таблица 5), при этом активность системы с мутантным Adx* по сравнению с активностью ХГЛ системы P450_{scs}/AdR/Adx1-108 не увеличивается, как ожидалось, а значительно снижается. Как показано в Таблице 5, количество прегненолона, образующегося при использовании гомогената клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL(Adx*), составляло лишь около 12% от количества продукта, образующегося при использовании гомогената клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL. Соответствующая величина для препарата, полученного из клеток, экспрессирующих 2 копии гена Adx*, составила 24%, что также меньше активности системы, экспрессируемой с использованием pTrc99A/CHL, но в 2 раза выше активности, регистрируемой в препарате клеток, несущих плазмиду с одной копией гена Adx*.

Таблица 5. ХГЛ активность, измеренная в гомогенатах рекомбинантных клеток *E. coli*

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

В таблице представлены средние значения активности, рассчитанные с использованием результатов четырех экспериментов. Активность, измеренная в образцах *E.coli*/pTrc99A/CHL ($4,0 \pm 1,3$ нмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч) принята за 100%.

Таким образом, сравнительный анализ не обнаружил положительного влияния использования мутированной версии Adx* (Adx1-S112W) на каталитическую активность ХГЛ системы. В то же время введение дополнительной копии Adx* действительно приводит к увеличению величины регистрируемой активности вследствие изменения стехиометрического соотношения белков в системе в сторону увеличения содержания Adx*.

4.1.4 Биотрансформация холестерина рекомбинантными клетками *E. coli*/pTrc99A/CHL

Рекомбинантный штамм *E. coli*, полученный с использованием вектора pTrc99A/CHL, был протестирован в отношении способности осуществлять биотрансформацию холестерина в прегненолон. Гетерологичные гены экспрессировали в клетках *E. coli*, культивируемых в богатой ТВ среде, затем клетки культивировали в виде сгущенной суспензии (25 г/л) покоящихся клеток (resting cells) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 24 ч в присутствии холестерина (0,5 мМ), который вносили в среду инкубации в виде раствора в этаноле. Вариант инкубации клеток в Na-фосфатном буфере был использован в связи с тем, что при длительном культивировании клеток в богатой ТВ среде, в среде происходит накопление эндогенного метаболита *E. coli* индола, который может ингибировать реакции биотрансформации, катализируемые цитохромами P450 (Ringle et al., 2013, Janocha and Bernhardt, 2013). Например, в работе (Janocha and Bernhardt, 2013) показано, что количество продукта биотрансформации абиетиновой кислоты цитохромом CYP105A1 *Streptomyces griseolus*, образующегося за 24 ч в покоящихся клетках, инкубируемых в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 7,4), в 2 раза превышает выход продукта в растущей в ТВ среде культуре.

Для идентификации образующегося в системе *in vivo* продукта ХГЛ реакции были использованы методы ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Органические соединения из культуры клеток экстрагировали этилацетатом и перед проведением анализа обрабатывали холестеролоксидазой, катализирующей превращение прегненолона, образующегося в результате ХГЛ реакции, в прогестерон (см. раздел «Материалы и методы»). На Рис. 22 представлены фрагменты хроматограмм (области, включающие время удерживания для прогестерона) для образца-стандарта прогестерона (Рис. 22А) и для образца, полученного из культуры рекомбинантных клеток, культивированных в присутствии холестерина (Рис. 22Б). Сравнение хроматографических профилей, полученных методом ВЭЖХ, показало, что в исследуемом органическом экстракте детектируется пик с временем удерживания 8,9 мин, соответствующий прогестерону. Наличие продукта биотрансформации холестерина в полученном образце подтверждено методом масс-спектрометрии. В органическом экстракте, полученном из культуры клеток, идентифицирован пик 315,3 (при измерении в режиме положительных ионов моноизотопных масс с точностью 0,1 Да), который соответствует прогестерону, имеющему молекулярную массу 314,4 (Рис. 23).

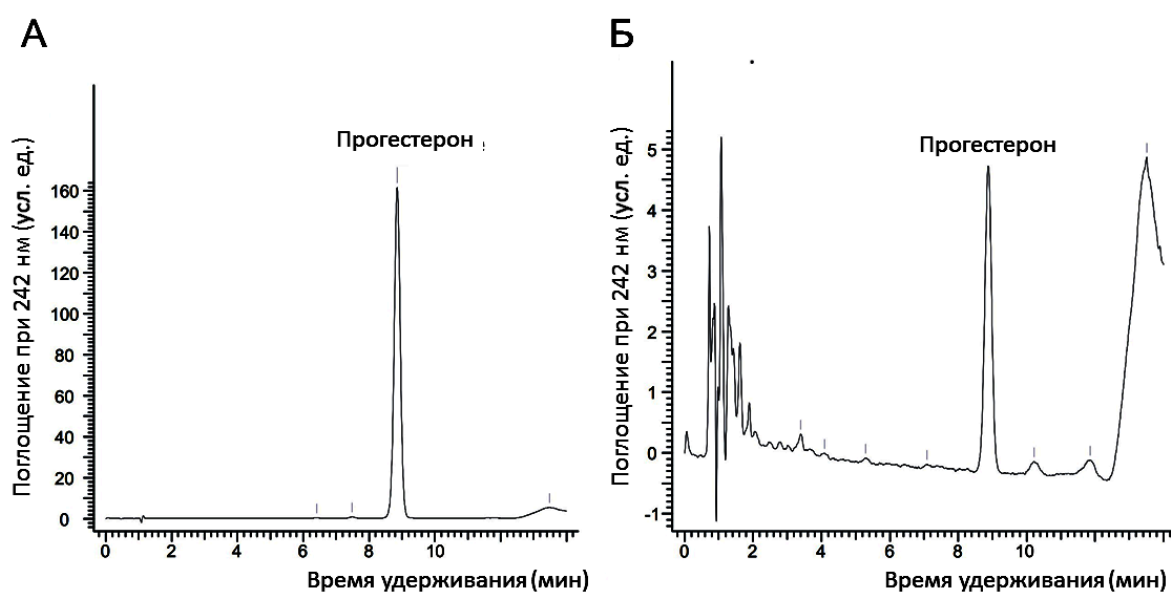


Рисунок 22. Идентификация продукта биотрансформации холестерина клетками *E. coli*/pTgc99A/CHL методом ВЭЖХ. А. Внешний стандарт - прогестерон (1 мкл, 1 мг/мл); Б. Хроматограмма испытуемого образца (20 мкл).

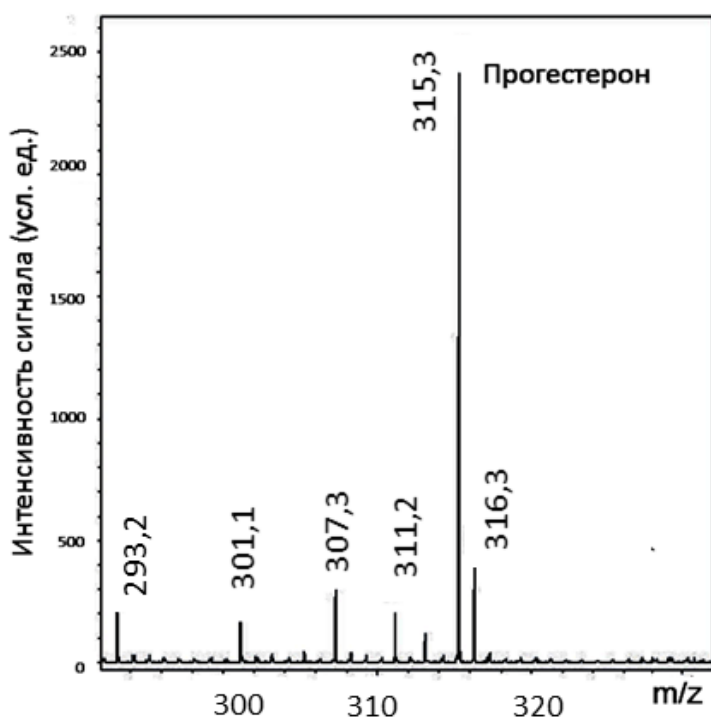


Рисунок 23. Идентификация продукта биотрансформации холестерина клетками *E. coli*/pTrc99A/CHL методом масс-спектрометрии.

Таким образом, методами прямого инструментального анализа показано, что рекомбинантный штамм *E. coli*/pTrc99A/CHL осуществляет превращение холестерина в прегненолон.

4.1.5 Влияние химических агентов на эффективность биотрансформации холестерина

Существенными факторами, влияющими на активность *in vivo* стероидогенных систем, реконструированных в клетках бактерий, являются плохая растворимость гидрофобных стероидных субстратов в водной среде и, как следствие, их неэффективный транспорт в клетки (например, (Shet et al., 1997, Donova and Egorova, 2012)). Продуктивность трансгенных микроорганизмов может быть увеличена при использовании агентов, способствующих растворимости стероидов и/или пермеабилзации клеточной мембраны (различных органических растворителей, детергентов, веществ с поверхностно-активными свойствами, жидких полимеров, циклодекстринов, антибиотиков и др.) (Donova and Egorova, 2012). Как показано в работе (Wallimann et al., 1997), β -циклодекстрины, в частности, используются для повышения растворимости субстратов цитохрома P450_{ssc} - холестерина и витамина D₃, с которыми они образуют водорастворимые комплексы включения. Кроме того, циклодекстрины могут оказывать влияние на состояние мембран клеток микроорганизмов, повышая их проницаемость и облегчая транспорт в клетки различных соединений (Donova and Egorova, 2012).

Ранее в нашей лаборатории было обнаружено, что выход продукта биотрансформации холестерина клетками *E. coli*/pBar_Triple при внесении холестерина в среду роста клеток в водном растворе МЦД (конечная концентрация МЦД - 0,35%, m/V) в ~30 раз превышал выход продукта, регистрируемый при внесении холестерина в форме суспензии, стабилизированной Твин 80 (конечная концентрация Твин 80 - 1 г/л) (Makeeva et al., 2013). В настоящей работе было изучено влияние нескольких соединений, взятых в обычно используемых концентрациях, на активность ХГЛ системы, реконструированной в клетках *E. coli*/pTrc99A/CHL, *in vivo*.

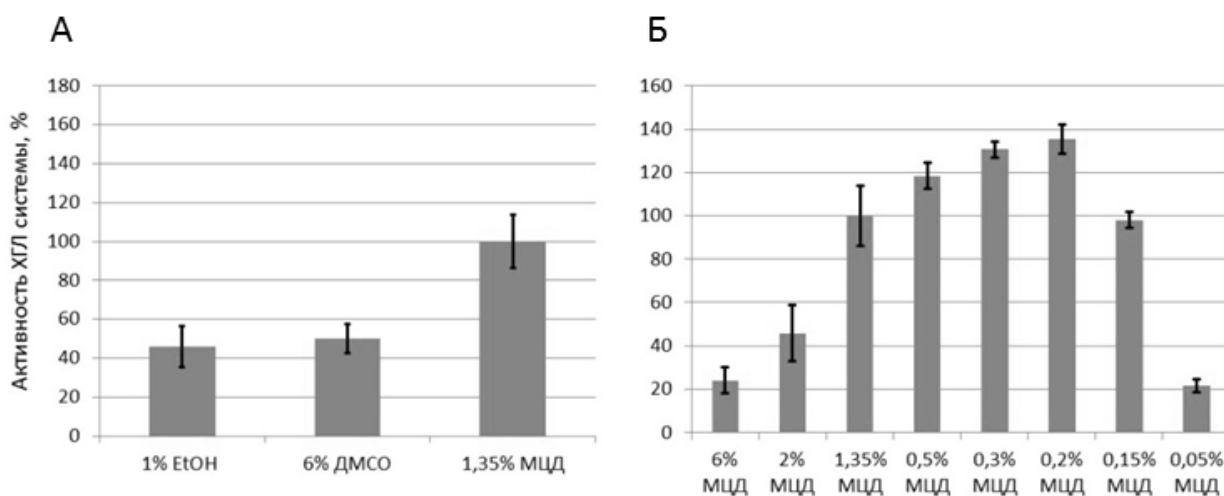


Рисунок 24. Влияние пермеабилизирующих агентов на активность ХГЛ системы в клетках штамма *E. coli*/pTrc99A/CHL. Указаны конечные концентрации химических веществ в среде. Результаты, полученные в 3-5 независимых экспериментах, представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Активность, зарегистрированная в присутствии 1,35% МЦД, принята за 100%.

На Рис. 24А представлены результаты измерения ХГЛ активности индуцированных клеток, инкубированных в виде сгущенной суспензии в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,4) в присутствии этанола (1%, V/V), ДМСО (6%, V/V) или МЦД (1,35%, m/V). За 100% принята активность, зарегистрированная в присутствии 1,35% МЦД, которая составила 108 мкг прегненолона/л сгущенной суспензии $\times$ 24 ч (0,34 мкМ). Из представленных данных видно, что в присутствии 1,35% (m/V) МЦД образуется большее количество продукта биотрансформации, чем в присутствии этанола или ДМСО. В следующем эксперименте сгущенную суспензию клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL инкубировали в присутствии холестерина и разных концентраций МЦД (в диапазоне 0,05% - 6% (m/V)). Рис. 24Б иллюстрирует зависимость эффективности образования прегненолона рекомбинантными клетками от концентрации МЦД в среде культивирования. При

снижении концентрации МЦД в пределах от 6% до 1,35% количество образующегося продукта биотрансформации увеличивается примерно в 5 раз. При дальнейшем снижении концентрации МЦД активность продолжает повышаться, достигая величины 146 мкг прегненолона/л сгущенной суспензии×24 ч при концентрации МЦД равной 0,2%, а при концентрации МЦД 0,15% и 0,05% количество прегненолона, образующегося в пробах, уменьшается в 1,4 и 6 раз соответственно по сравнению с максимальной величиной, вероятно, вследствие неоптимального соотношения МЦД и холестерина в среде культивирования. Ранее в работе (Hesselink et al., 1989) было показано, что добавление β-циклодекстрина в среду культивирования существенно увеличивает эффективность биоконверсии холестерина клетками *Mycobacterium sp.*, при этом оптимальное молярное соотношение МЦД и холестерина составляло 2 моля β-циклодекстрина на моль субстрата. Как следует из результатов, представленных на Рис. 24, добавление МЦД также существенно влияет на выход продукта конверсии холестерина при культивировании клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL, при этом максимальный выход прегненолона зарегистрирован при использовании 0,2% МЦД, что соответствует молярному соотношению МЦД к холестерину 2,8:1 (1,4 мМ МЦД/0,5 мМ холестерина).

При добавлении в среду культивирования клеток двух агентов - 0,5% (m/V) МЦД и 6% ДМСО (m/V), регистрируемая величина активности сильно варьировала в диапазоне от 100 до 623 мкг прегненолона/л, что, вероятно, связано с наличием проблем с формированием стабильной суспензии. Максимальная величина активности в данном случае была более, чем в 4 раза выше активности, регистрируемой в присутствии 0,5% (m/V) МЦД. В то же время добавление в среду культивирования, содержащую 0,5% (m/V) МЦД, гидролазы лизоцима (10 мкг/мл) или вещества с поверхностно-активными свойствами сапона (0,2%, m/V), ослабляющих барьерную функцию клеточной мембраны, не сказывалось на эффективности биотрансформации холестерина.

В результате данного этапа работы создан трансгенный штамм *E. coli*/pTrc99A/CHL с реконструированной ХГЛ системой, способный трансформировать холестерин в прегненолон; продукт биотрансформации был идентифицирован с использованием ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Количество прегненолона, образующегося за 24 ч культивирования сгущенной суспензии клеток в присутствии холестерина существенно варьирует (~0,05–0,62 мг/л) при использовании различных пермеабилизирующих агентов. Таким образом, эффективность функционирования ХГЛ системы, локализованной в клетках *E. coli*, лимитирует плохое проникновение субстрата в клетки, в то время как формирование активных белков протекает без особых осложнений.

4.1.6 Изучение влияния аминокислотных остатков, расположенных в активном центре молекулы цитохрома P450_{ssc}, на эффективность его функционирования

Клетки *E. coli* с реконструированной ХГЛ системой быка были использованы в экспериментах, целью которых являлся анализ влияния определенных аминокислотных остатков активного центра цитохрома P450_{ssc} на эффективность конверсии цитохромом P450_{ssc} стероидных субстратов. Работа проведена в рамках совместного проекта с группой О. В. Галзитской из Института белка РАН г. Пущино и группой М. В. Доновой из Института биохимии и физиологии микроорганизмов РАН г. Пущино.

На настоящий момент в опубликованной литературе имеется небольшое количество данных по активности цитохрома P450_{ssc} в отношении других стероидных субстратов, в частности в отношении растительных стеролов, фитостеролов, структуры которых отличаются от структуры холестерина наличием разветвленной боковой цепи. Известно, что P450_{ssc} способен осуществлять трансформацию β -ситостерина и кампестерина, гидроксилируя и отщепляя, как и в случае холестерина, боковую цепь стероидов, что в результате приводит к образованию прегненолона. Однако, было показано, что активность фермента в отношении β -ситостерина значительно ниже по сравнению с активностью, проявляемой в отношении холестерина (Donova and Egorova, 2012). Для того, чтобы выявить остатки аминокислот, в молекуле цитохрома P450_{ssc}, которые могут влиять на эффективность взаимодействия белка с молекулами субстратов, специалисты из Института белка РАН г. Пущино проанализировали аминокислотные последовательности и 3D-структуры 27 структурных гомологов цитохрома P450_{ssc}, способных взаимодействовать с холестерином и β -ситостерином. Кроме того, были проведены эксперименты по моделированию цитохрома P450_{ssc} быка методом молекулярной динамики, докинг цитохрома P450_{ssc} быка с молекулами субстратов – холестерином и β -ситостерином, а также рассчитана его аффинность в отношении данных субстратов. В результате в связывающем кармане активного центра цитохрома P450_{ssc} быка были идентифицированы три аминокислотных остатка – Иле351, Лей355 и Иле461 – замена которых на аланин могла бы способствовать расширению связывающего кармана P450_{ssc} и усилению активности цитохрома в отношении β -ситостерина. Модели цитохрома P450_{ssc} быка дикого типа и P450_{ssc} с заменами аминокислот в положениях 351, 355 и 461 на аланин представлены на Рис. 25.

С использованием ПЦР в нашей лаборатории были получены мутантные варианты кДНК цитохрома P450_{ssc} с целевыми нуклеотидными заменами. Далее на базе полученного ранее вектора pTrc99A/CHL сконструированы плазмиды для совместной продукции в клетках *E. coli* мутантных форм P450_{ssc} с AdR и Adx. В общей сложности

было получено пять плазмидных конструкций: три конструкции, включающие кДНК P450_{ssc} с заменой одного кодона (pTrc99A/CHL(P450-I351A), pTrc99A/CHL(P450-L355A), pTrc99A/CHL(P450-I461A)), одна конструкция с заменой двух кодонов (pTrc99A/CHL(P450-I351A/L355A)) и одна конструкция с заменой всех трех целевых кодонов (pTrc99A/CHL(P450-I351A/L355A/I461A)).

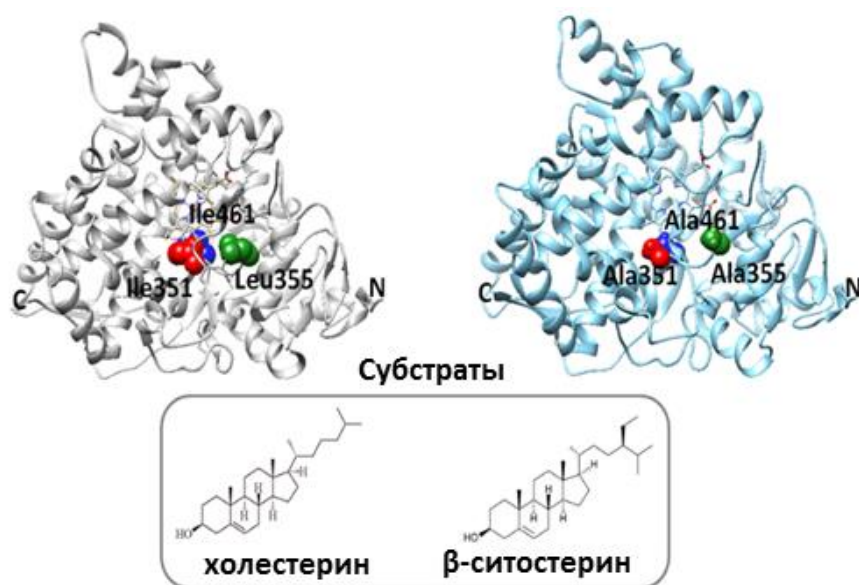


Рисунок 25. Модель цитохрома P450_{ssc} быка дикого типа (слева) и модель P450_{ssc} с заменами аминокислот в положениях 351, 355 и 461 на аланин (справа).

В нижней части рисунка представлены структурные формулы субстратов P450_{ssc}.

Гомогенаты клеток *E. coli*, трансформированных рекомбинантными плазмидами, были проанализированы методом электрофореза в ПААГ с последующим Вестерн-блоттингом с использованием антител к цитохрому P450_{ssc}. В результате проведенного анализа во всех штаммах была визуализирована выраженная полоса, соответствующая полноразмерной форме P450_{ssc} (~53 кДа, Рис. 26). При этом не было обнаружено значительных различий в эффективности синтеза цитохрома P450_{ssc} дикого типа и P450_{ssc} с введенными аминокислотными заменами (Рис. 26). Таким образом, полученные данные указывают на то, что все мутированные белки P450_{ssc} в клетках бактерий стабильны, то есть деградации белка не наблюдается.

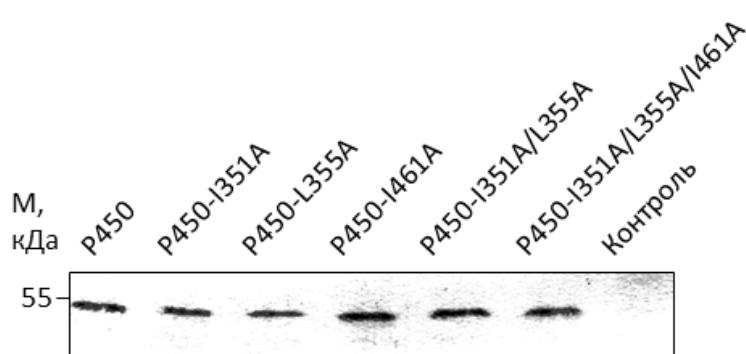


Рисунок 26. Идентификация P450_{ssc} дикого типа и мутированных форм P450_{ssc} в рекомбинантных клетках *E. coli*. ДСН-ПААГ (10%, 5 мкг общего белка/дор.) и Вестерн-блоттинг гомогенатов клеток.

Стеролгидроксилазную/лиазную активность цитохрома P450_{scs} дикого типа и мутантных форм P450_{scs} в отношении 20 α -гидроксихолестерина и β -ситостерина измеряли *in vitro* в гомогенатах рекомбинантных клеток с использованием метода ИФА (см. раздел «Материалы и методы»). В Таблице 6 приведены средние результаты измерений, полученные в 4-6 экспериментах с использованием холестерина и в двух экспериментах с использованием β -ситостерина, за вычетом активности, зарегистрированной в контрольных нетрансформированных клетках *E. coli* штамма DH5 α s ($15,9 \pm 6,3$ и $0,57 \pm 0,07$ пмоль прегненолона/мг белка гомогената $\times$ ч с 20 α -гидроксихолестерином и с β -ситостерином, соответственно). Из полученных результатов следует, что введение каждой из мутаций приводит к резкому снижению каталитической активности цитохрома P450_{scs} как в отношении β -ситостерина, так и в отношении 20 α -гидроксихолестерина, а введение в белок двойной и тройной мутации приводит к полной потере каталитической активности.

Таблица 6. Каталитическая активность *in vitro* цитохрома P450_{scs} дикого типа и мутированных форм цитохрома P450_{scs} (пмоль прегненолона/мг белка гомогената $\times$ ч)

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

Таким образом, было показано, что аминокислотные остатки Иле351, Иле461 и Лей355, располагающиеся в активном центре цитохрома P450_{scs}, критичны для функционирования белка как в отношении стерола с неразветвленной боковой цепью (холестерина), так и в отношении стерола с разветвленной боковой цепью (β -ситостерина).

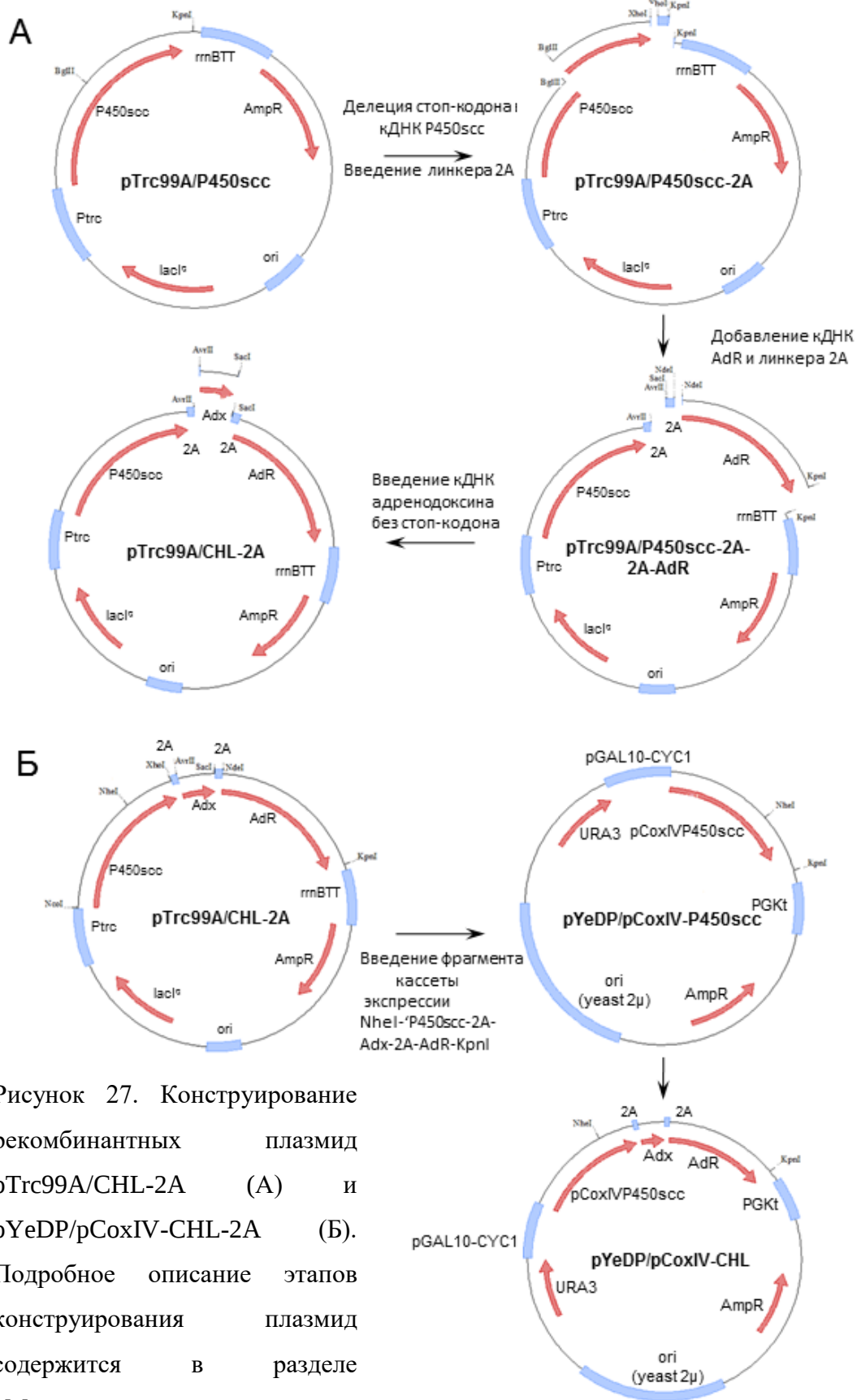
4.2 Реконструкция ХГЛ системы в клетках *S. cerevisiae*

Задачей следующего этапа работы являлось проведение реконструкции ХГЛ системы в клетках дрожжей. В качестве модельного организма для реконструкции были выбраны наиболее простые в работе дрожжи *S. cerevisiae*. Для осуществления реконструкции ХГЛ системы в эукариотических клетках необходимо было использовать метод, способный обеспечить совместную экспрессию гетерологичных кДНК в эукариотических организмах. В качестве такого метода был выбран подход, основанный на применении последовательности, кодирующей саморасщепляющийся пептид 2А вируса ящура (см. раздел обзора литературы 2.5 «Метод совместной экспрессии генов, основанный на применении нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид 2А вируса ящура») Мы предполагали, что использование плазмиды, включающей гены, кодирующие белки ХГЛ системы, разделенные последовательностями кДНК 2А пептида, обеспечит одновременную трансляцию целевых белков в эквимольном соотношении.

4.2.1 Конструирование бактериальной плазмиды, включающей линкерные последовательности, кодирующие пептид 2А вируса ящура

Для коэкспрессии генов белков ХГЛ системы сконструирована гибридная кДНК 5'-[P450scs-2A-Adx-2A-AdR]-3' (5'-[CHL-2A]-3'), включающая под контролем одного промотора в одной рамке считывания гены белков ХГЛ системы, разделенные линкерными последовательностями кДНК пептида 2А вируса ящура. При транскрипции слитой кДНК образуется одна гибридная мРНК. Предполагалось, что в результате трансляции будет обеспечена продукция полипротеина CHL-2A, саморасщепляющегося с образованием белков P450scs-2A, Adx-2A и AdR.

Конструирование слитой кДНК проводилось с использованием клеток *E. coli* в несколько этапов на основе бактериального вектора pTrc99A/mP450scs, содержащего кДНК, кодирующую зрелую форму цитохрома P450scs. Последовательность включения целевых генов и кДНК, кодирующих 2А вируса ящура, в состав базовой плазмиды приведена на Рис. 27А. Полученная плазида pTrc99A/CHL-2A включала в себя кДНК, кодирующие зрелые формы цитохрома P450scs, Adx и AdR. Схема кДНК, включенной в состав плазмиды pTrc99A/CHL-2A, представлена на Рис. 28.1.



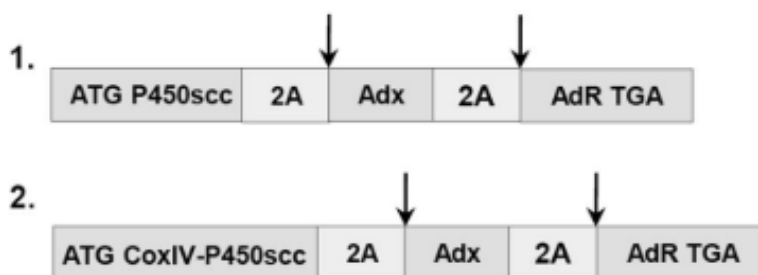


Рисунок 28. Схемы слитых кДНК, экспрессируемых в клетках *E. coli* (1) и *S. cerevisiae* (2), кодирующих саморасщепляющийся полипротеин CHL-2A. Стрелками указаны предполагаемые участки расщепления полипротеина.

4.2.2 Синтез белков ХГЛ системы в клетках *E. coli*

В литературе имеется ограниченное количество данных о возможности использования пептида 2A в клетках прокариот и эти данные противоречивы – в нескольких работах утверждается, что пептид 2A не способен расщепляться в клетках прокариот (Donnelly et al., 1997; Park et al., 2008) и, в то же время, имеется работа, в которой продемонстрировано расщепление 2A пептида в клетках *E. coli* (Dechamma et al., 2008; см. раздел обзора литературы «Применение последовательности, кодирующей пептид 2A, для совместной экспрессии генов»). Так как мы получили штамм клеток *E. coli*, трансформированных сконструированным вектором pTrc99A/CHL-2A, мы решили протестировать возможность расщепления линкера 2A в клетках бактерий.

Анализ экспрессии белков ХГЛ системы был проведен в двух рекомбинантных клонах *E. coli*: штамме, трансформированном плазмидой pTrc99A/P450-2A-2A-AdR, включающей последовательности кДНК цитохрома P450scc и AdR, разделенные двумя линкерами 2A, и штамме, трансформированном плазмидой pTrc99A/CHL-2A, включающей кДНК всех белков ХГЛ-системы, разделенные 2A-линкерами. Анализ клеточных лизатов проводили с помощью электрофореза в ПААГ с последующим иммуноблоттингом с использованием для идентификации рекомбинантных белков антител, специфичных к P450scc, AdR или Adx. На дорожки ПААГ параллельно с пробами, полученными из клеток *E. coli*/pTrc99A/P450-2A-2A-AdR и *E. coli*/pTrc99A/CHL-2A, наносили лизат клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pBar_Triple, обеспечивающей синтез в данных клетках всех трех индивидуальных белков ХГЛ системы (Рис. 29). В результате иммунодетекции обнаружено, что основная масса белков, связывающихся со специфичными антителами, имеет молекулярный вес ~110 кДа в случае штамма *E. coli*/pTrc99A/P450-2A-2A-AdR (Рис. 29А, Б, дор. 4), и ~120 кДа в случае штамма *E. coli*/pTrc99A/CHL-2A (Рис. 29А, Б, дор. 5, Рис. 29В, дор. 4). Эти величины соответствуют молекулярным массам полноразмерных гибридов, включающих

последовательности двух и трех белков ХГЛ системы, соответственно, поскольку ожидаемые молекулярные массы белков, входящих в состав гибридов, составляют: P450_{scs} ~ 53 кДа, Adx ~ 12 кДа, AdR ~ 51 кДа и 2A~2 кДа. Кроме того, в указанных лизатах с помощью иммуноблоттинга детектируется значительное количество белков меньшего размера, среди которых однако не обнаруживается интенсивных полос, соответствующих по молекулярной массе индивидуальным белкам P450_{scs}-2A, Adx-2A или AdR. Выявленные минорные белковые продукты, скорее всего, образуются в результате протеолиза слитых белков, как следствие затрудненного сворачивания протяженной полипептидной цепи. Это согласуется с данными, полученными ранее в нашей лаборатории, свидетельствующими о нестабильности гибридных белков, составленных из белков-компонентов ХГЛ системы, в клетках *E. coli* (Nazarov et al., 2003).

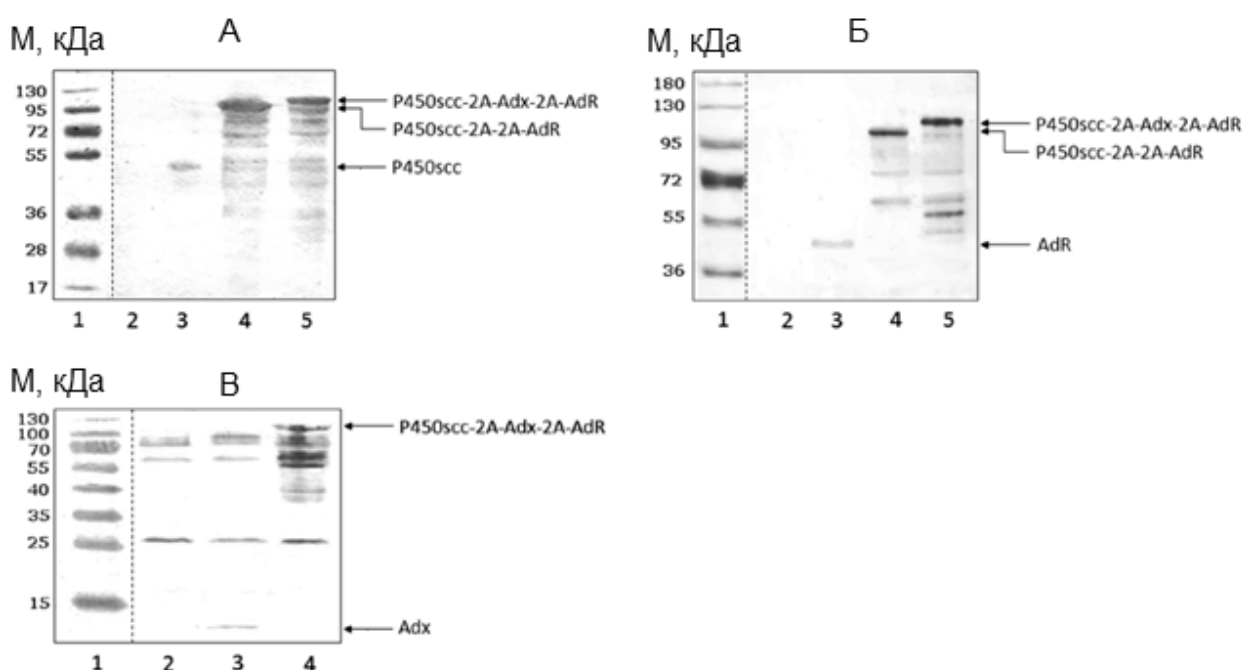


Рисунок 29. Идентификация белков ХГЛ системы в гомогенатах рекомбинантных клеток *E. coli*. ДСН-ПААГ (10% (А, Б) или 15% (В), на дорожки нанесено по 15 мкг (А) или 10 мкг (Б, В) общего белка) и иммуноблоттинг гомогенатов. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450_{scs} (А), AdR (Б) или Adx (В). А–В: 1 - маркеры молекулярной массы белков; 2 – гомогенат контрольных нетрансформированных клеток *E. coli*; 3 – гомогенат клеток *E. coli*/pBar_Triple; А, Б: 4 - гомогенат клеток *E. coli*/pTrc99A/P450_{scs}-2A-2A-AdR; А, Б: 5, В: 4 - гомогенат клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL-2A.

Показано, что ХГЛ активность в отношении 22(R)-гидроксихолестерина, измеренная в гомогенате рекомбинантных клеток *E. coli*, трансформированных pTrc99A/CHL-2A, равна фоновой величине, регистрируемой в гомогенате дикого штамма

E. coli, что указывает на то, что цитохром P450_{scs}, входящий в состав полипротеина CHL-2A или выявленных белков-фрагментов CHL-2A, не проявляет функциональной активности.

Полученные результаты в целом свидетельствуют о том, что в клетках *E. coli* осуществляется синтез полипротеина CHL-2A, при этом расщепления линкерных последовательностей 2A в процессе синтеза CHL-2A не происходит, т.е. 2A-последовательность FMDV в клетках *E. coli* не функциональна.

4.2.3 Синтез белков ХГЛ системы в клетках *S. cerevisiae*

Поскольку эксперименты, проведенные с использованием клеток *E. coli*, подтвердили, что сконструированная кДНК 5'-[CHL-2A]-3' обеспечивает синтез полноразмерного полипротеина (по размеру соответствует ожидаемому, окрашивается при использовании антител ко всем белкам ХГЛ системы (Рис. 29А - В)), данная кДНК была использована для создания вектора для экспрессии генов белков ХГЛ системы в дрожжах *S. cerevisiae*. (Рис. 27Б).

На базе шаттл-вектора pYeDP1/8-2 была создана векторная плазмида pYeDP/pCoxIV-CHL-2A, включающая кДНК, кодирующие зрелые формы AdR и Adx и предшественник P450_{scs} с адресующей препоследовательностью IV субъединицы дрожжевой цитохром с-оксидазы (pCoxIV) (Рис. 28.2). В случае использования данной плазмиды предполагалось получить более однозначный ответ на вопрос, работает ли механизм самопроцессинга полипротеина pCoxIV-P450_{scs}-2A-Adx-2A-AdR (pCoxIV-CHL-2A), поскольку в случае расщепления белка 2A цитохром pCoxIV-P450 должен импортироваться в митохондрии, а Adx и AdR - оставаться в цитоплазме.

С использованием сконструированного шаттл-вектора pYeDP/pCoxIV-CHL-2A был получен рекомбинантный клон дрожжей *S. cerevisiae*/pYeDP/pCoxIV-CHL-2A. Для идентификации синтезированных в дрожжах рекомбинантных белков был проведен анализ лизата трансформированных клеток, выращенных в условиях индукции транскрипции гетерологичных кДНК в течение 48 ч, а также субклеточных фракций с использованием электрофореза в ПААГ и Вестерн-иммуоблоттинга с применением антител к P450_{scs}, Adx и AdR. На дорожки ПААГ параллельно с пробами, полученными из клеток дрожжей, наносили лизат клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pBar_Triple (Рис. 30-32). В результате иммунодетекции в лизате клеток обнаружены цитохром P450_{scs}, слитый с белком 2A (~55 кДа) (Рис. 30А, дор. 3), AdR (~51 кДа) (Рис. 30А, дор. 5) и белок Adx-2A (~14 кДа) (Рис. 30Б, дор. 2). Кроме этих белков при иммунодетекции с использованием антител к AdR и Adx обнаружено значительное

количество гибрида Adx-2A-AdR (~65 кДа) (Рис. 30А, дор. 5, Рис. 30Б, дор. 2), то есть расщепление первого линкера в составе самопроцессирующегося полипротеина является эффективным, а второго - менее эффективным.

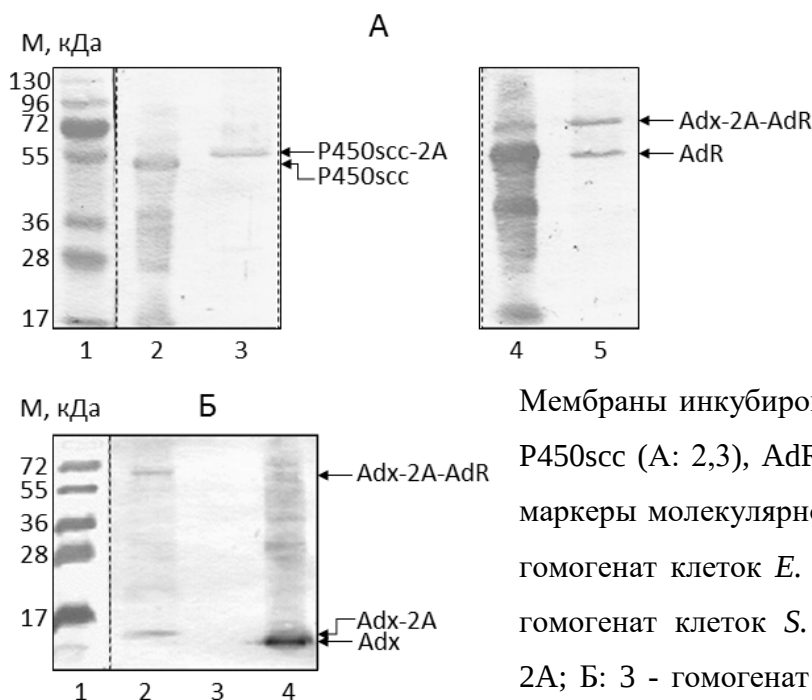


Рис. 30. Идентификация белков ХГЛ системы, в лизате рекомбинантных клеток *S. cerevisiae*. ДСН-ПААГ (10%, 80 мкг общего белка/дор. (А) или 15%, 150 мкг общего белка/дор. (Б)) и Вестерн-блоттинг.

Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450scc (А: 2,3), AdR (А: 4,5) или 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*.

Анализ белков митохондриальной фракции клеток *S. cerevisiae*, экспрессирующих pCoxIV-CHL-2A, с использованием антител против цитохрома P450scc показал, что весь pCoxIV-P450scc-2A, образующийся при расщеплении полипептида, импортируется в митохондрии, подвергаясь протеолитическому процессингу с образованием белка P450scc-2A. Кроме того, в митохондриях в незначительном количестве обнаружены гибридные белки P450scc-2A-Adx-2A и полноразмерный гибрид P450scc-2A-Adx-2A-AdR (CHL-2A), которые, как и pCoxIV-P450scc-2A, несут на N-конце адресующую митохондриальную последовательность pCoxIV и импортируются в митохондрии (Рис. 31А, дор. 3). Во фракции пост-митохондриального супернатанта следов этих белков не наблюдается (Рис. 31А, дор.5).

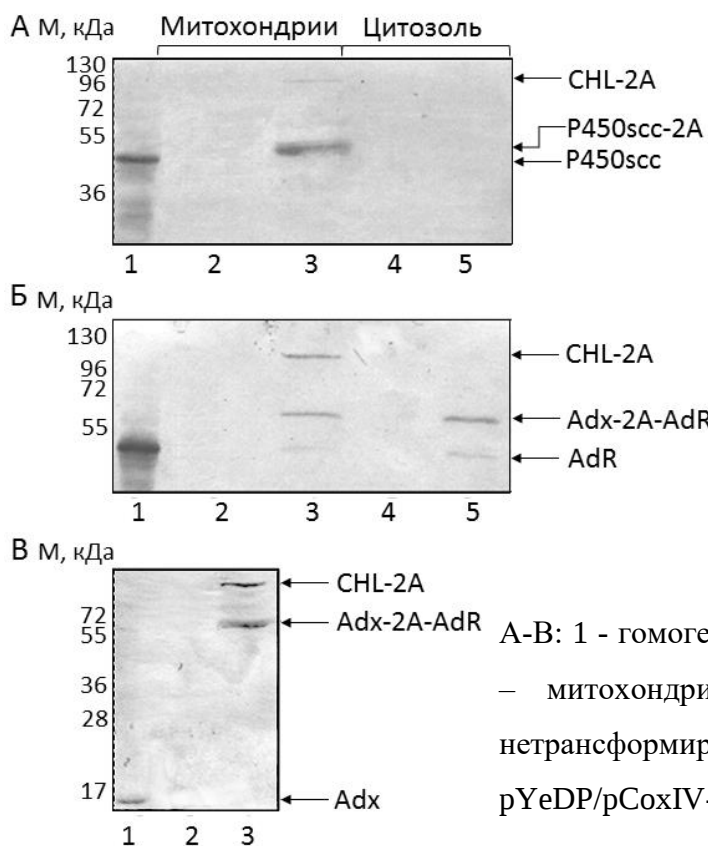


Рис. 31. Анализ локализации рекомбинантных белков в клетках дрожжей. ДСН-ПААГ (10% (А, Б) или 15% (В)), на дорожки нанесено 50 мкг белка митохондриальной фракции и 30 мкг белка фракции постмитохондриального супернатанта (ПМС)) и Вестерн-блоттинг. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450scs (А), AdR (Б) и Adx (В).

А-В: 1 - гомогенат клеток *E. coli*/pBar_Triple; А-В: 2, 3 – митохондрии, А, Б: 4, 5 - фракция ПМС нетрансформированных и трансформированных рYeDP/pCoxIV-CHL-2A клеток *S. cerevisiae*, соответственно.

При проведении анализа клеточных фракций с использованием антисыворотки к AdR обнаружено, что зрелые белки AdR и гибрид Adx-2A-AdR в основном присутствуют во фракции пост-митохондриального супернатанта (Рис. 31Б, дор. 5), однако, некоторое их количество обнаружено в митохондриях, несмотря на отсутствие у белков адресующей последовательности. (Рис. 31Б-В, дор 3). С целью проверки этих данных для исключения возможности присутствия примесей в митохондриальной фракции мы провели дополнительные эксперименты с использованием обработки митохондрий протеиназами. Анализ белков митохондриальной фракции после обработки митохондрий трипсином или протеиназой К показал, что в обработанных митохондриях, как и в исходной митохондриальной фракции, обнаруживаются гибрид Adx-2A-AdR и AdR (Рис. 32А и 32В). Однако, количество индивидуальной редуктазы в митохондриальной фракции, обработанной протеиназой К, снижается относительно количества данного белка в митохондриальной фракции, не обработанной протеиназой К (Рис. 32А, дор. 2 и 3). Данное снижение может объясняться протеолизом молекул AdR, связанных с внешней поверхностью митохондрий.

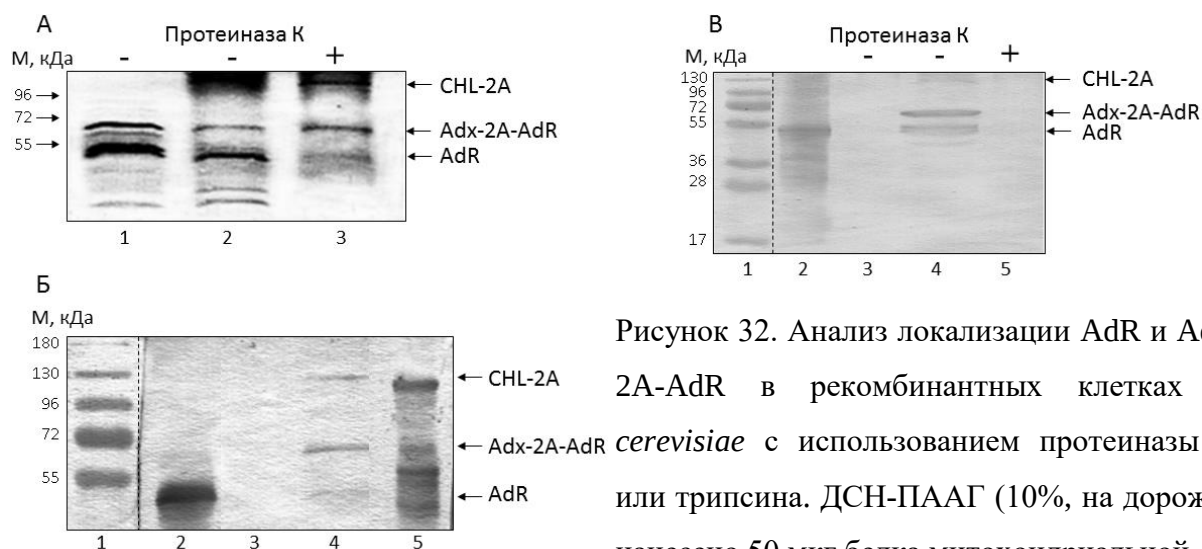


Рисунок 32. Анализ локализации AdR и Adx-2A-AdR в рекомбинантных клетках *S. cerevisiae* с использованием протеиназы К или трипсина. ДСН-ПААГ (10%, на дорожки нанесено 50 мкг белка митохондриальной

фракции и 30 мкг белка фракции постмитохондриального супернатанта (ПМС)) и Вестерн-блоттинг. Мембраны инкубировали с антителами к AdR. А, Б: обработка митохондриальной фракции и фракции ПМС протеиназой К. А: 1 - фракция ПМС до обработки протеиназой К; 2, 3 – митохондрии трансформированных клеток дрожжей до и после обработки протеиназой К, соответственно. Б: 2 – гомогенат клеток *E. coli*/pBar_TripLe; 3 - фракция ПМС нетрансформированных клеток до обработки протеиназой К; 4–5 - фракция ПМС трансформированных клеток до и после обработки протеиназой К соответственно. В: Обработка митохондрий трипсином. 2 - гомогенат клеток *E. coli*/pBar_TripLe; 3, 4 - митохондриальная фракция нетрансформированных и трансформированных клеток дрожжей после обработки трипсином соответственно.

В качестве контрольного эксперимента проведена обработка протеиназой К фракции пост-митохондриального супернатанта, содержащей в значительном количестве AdR и Adx-2A-AdR - протеиназа К способна полностью расщеплять указанные белки (Рис. 32Б).

Данные, полученные в результате определения локализации рекомбинантных белков в клетках дрожжей, указывают на то, что, кроме белков, несущих митохондриальную адресующую последовательность (pCoxIV-P450scs-2A, pCoxIV-P450scs-2A-Adx и полноразмерного гибрида pCoxIV-P450scs-2A-Adx-2A-AdR), в митохондрии дрожжей импортируется часть молекул AdR и гибрида Adx-2A-AdR, не несущих адресующего сигнала.

4.2.4 Функциональная активность ХГЛ системы в рекомбинантных клетках *S. cerevisiae*.

В гомогенате дрожжевых клеток, трансформированных плазмидой pYeDP/pCoxIV-CHL-2A и выращенных в условиях индукции синтеза рекомбинантных белков, с использованием метода ИФА была определена ХГЛ активность. Величина активности цитохрома P450_{ssc} в отношении 22(R)-гидроксистерина составила $4,36 \pm 2,21$ пмоль прегненолона/мг белка гомогената $\times$ ч, что указывает на присутствие в клетках каталитически активных белков ХГЛ системы.

Таким образом, в результате проведенной работы, в клетках дрожжей *S. cerevisiae*, впервые была реконструирована активная энзиматическая система цитохрома P450_{ssc} с использованием подхода, основанного на применении кДНК пептида 2A вируса ящура.

4.3 Реконструкция ХГЛ системы быка в клетках человека линии HEK293T

В литературе имеются данные, указывающие на то, что эффективность расщепления линкеров 2A, а также адресование образующихся компонентов полипротеина зависит от типа клеток, в которых осуществляется его трансляция (см. например, Kim et al., 2011). В связи с тем, что при синтезе полипротеина CHL-2A в дрожжах *S. cerevisiae* мы наблюдали неэффективное расщепление 2A-полипротеина и неправильное адресование части белковых продуктов расщепления, мы решили провести сравнительный анализ экспрессии кДНК, кодирующей полипротеин CHL-2A, в клетках дрожжей и в клетках эмбриональной почки человека (линии HEK293T). Кроме того, мы планировали проверить, возможно ли с использованием подхода, основанного на применении кДНК пептида 2A вируса ящура реконструировать в митохондриях трехкомпонентную энзиматическую систему, если только первый компонент саморасщепляющегося полипротеина несет митохондриальную адресующую последовательность.

4.3.1 Конструирование вектора для экспрессии генов белков ХГЛ системы в клетках линии HEK293T

Для коэкспрессии кДНК белков ХГЛ системы в клетках линии HEK293T на базе эукариотического вектора pcDNA3.1/CT-GFP, содержащего конститутивный промотор цитомегаловируса, мы сконструировали плазмиду pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP. Поскольку мы планировали сравнить результаты экспрессии 2A-содержащего полипротеина pCoxIV-P450_{ssc}-2A-Adx-2A-AdR (pCoxIV-CHL-2A) в клетках дрожжей и

млекопитающих при создании плазмиды на основе pCDNA3.1/CT-GFP мы использовали фрагмент pCoxIV-CHL-2A, идентичный данному фрагменту в составе дрожжевого вектора pYcDP/pCoxIV-CHL-2A. Полученная плазмида pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP включала кДНК, кодирующие предшественник цитохрома P450_{scc}, зрелый белок Adx, а также слитой белок, состоящий из зрелой формы AdR и зеленого флуоресцентного белка (GFP), разделенные линкерными последовательностями кДНК пептида 2A вируса ящура. Все кДНК были слиты в одну рамку считывания (Рис. 33). Предполагалось, что полученный вектор pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP будет направлять синтез полипротеина pCoxIV-CHL-GFP и, в случае успешного самопроцессинга полипротеина будет происходить образование индивидуальных белков pCoxIV-P450_{scc}-2A, Adx-2A и слитого белка AdR-GFP. Теоретически, поскольку кДНК цитохрома P450_{scc} была слита с митохондриальной адресующей последовательностью pCoxIV, а кДНК Adx и AdR не содержали адресующих последовательностей, pCoxIV-P450_{scc} должен был импортироваться в митохондрии, а зрелые белки – оставаться в цитоплазме. Свечение флуоресцентного репортера (GFP), слитого с С-концом полипротеина pCoxIV-CHL-GFP, должно было указывать на успешный синтез полипротеина и, кроме того, позволить нам определить локализацию в клетке содержащих GFP фрагментов полипротеина.

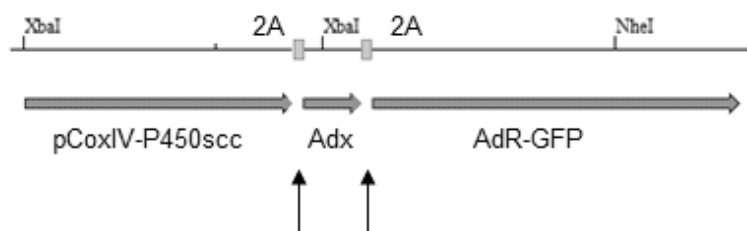


Рисунок 33. Схема кДНК, включенной в состав вектора pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, кодирующей саморасщепляющийся полипротеин pCoxIV-CHL-GFP. Стрелками указаны предполагаемые участки расщепления полипротеина.

4.3.2 Флуоресцентная микроскопия трансфицированных клеток

Клетки линии HEK293T трансфицировали полученным вектором pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP и контрольным вектором pCDNA3.1/CT-GFP. Через 48 часов после трансфекции наличие рекомбинантных белков в клетках анализировали методом флуоресцентной микроскопии. Как показано на Рис. 34, GFP синтезируется в контрольных клетках (Рис. 34, верхний ряд), где он локализуется в ядрах. GFP также синтезируется в клетках, трансфицированных pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP (Рис. 34, нижний ряд), при этом его локализация меняется с ядерной на цитозольную. Наличие сигнала GFP в клетках

HEK293T/pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP указывает на то, что в них происходит синтез полноразмерного полипротеина pCoxIV-CHL-GFP.

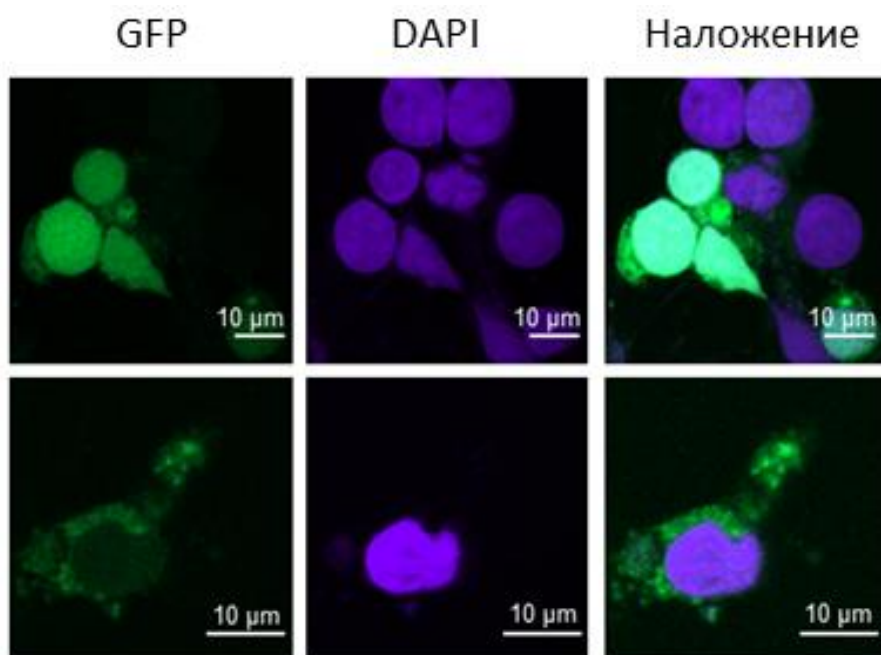


Рисунок 34. Анализ локализации GFP в клетках HEK293T. Конфокальная микроскопия. Верхний ряд – клетки, трансфицированные pCDNA3.1/CT-GFP, нижний ряд - клетки, трансфицированные вектором pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP. Масштаб: 10 мкм.

Для того, чтобы определить, присутствуют ли в митохондриях полипротеин pCoxIV-CHL-GFP или продукты его расщепления, содержащие GFP, через 48 часов после трансфекции клетки были прокрашены митотрекером, после чего была проведена оценка ко-локализации сигналов GFP и митотрекера с использованием конфокального микроскопа. В некоторых участках клеток мы наблюдали перекрывание сигналов GFP и красной флуоресценции митотрекера (Рис. 35), что указывает на наличие в митохондриях GFP-содержащих белков.

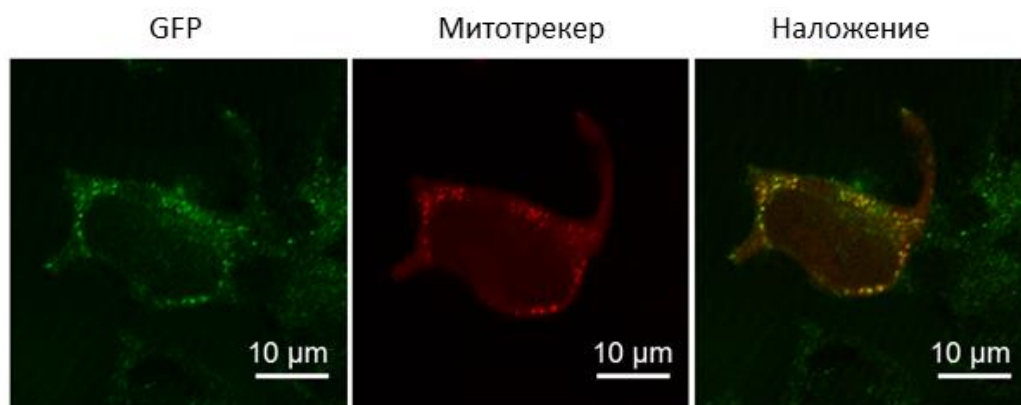


Рисунок 35. Ко-локализация сигналов GFP и митотрекера в клетках, трансфицированных вектором pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP. Масштаб 10 мкм.

4.3.3 Анализ экспрессии генов белков ХГЛ системы в клетках НЕК293Т с использованием ПААГ и Вестерн-блоттинга

Для идентификации синтезируемых белков ХГЛ системы и более точного определения их локализации мы провели анализ гомогенатов и субклеточных фракций трансфицированных клеток методом Вестерн-блоттинга. Через 48 часов после трансфекции клетки лизировали, получали гомогенаты, митохондриальную фракцию и фракцию пост-митохондриального супернатанта, после чего проводили ПААГ и Вестерн-блоттинг с использованием антител против цитохрома P450_{ssc}, Adx и AdR (Рис. 36, Рис. 37). Образцы клеток, трансфицированных вектором pcDNA3.1/CT-GFP, использовали в качестве отрицательного контроля. Параллельно с образцами гомогенатов трансфицированных клеток НЕК293Т на дорожки наносили лизат клеток *E. coli*, трансформированных плазмидой pBar_Triple, направляющей синтез индивидуальных белков P450_{ssc}, Adx и AdR, которые использовались как белки-стандарты (Рис. 36А–В, дор. 1). Следует отметить, что ранее в нашей лаборатории было показано, что используемые антитела к цитохрому P450_{ssc}, Adx и AdR быка демонстрируют аффинность к соответствующим белкам человека (Шашкова и др., 2006).

В результате иммунодетекции в гомогенате клеток, трансфицированных pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, были обнаружены индивидуальные белки с ожидаемыми молекулярными массами P450-2А (55 кДа, Рис. 36А, дор. 3), Adx-2А (14 кДа, Рис. 36В, дор. 3) и слитой белок AdR-GFP (78 кДа, Рис. 36Б, дор. 3). Кроме того, в гомогенатах обнаружено некоторое количество слитого белка P450_{ssc}-2А-Adx-2А (69 кДа, Рис. 36А и 36В, дор. 3) и значительное количество гибридного белка Adx-2А-AdR-GFP (92 кДа, Рис. 36Б и 36В, дор. 3). В контрольных клетках НЕК293Т белки P450_{ssc}, Adx и AdR не обнаружены (Рис. 36А–В, дор. 2).

Тот факт, что основная масса P450_{ssc}-2А присутствует в клетках в виде индивидуального белка, указывает на эффективное расщепление первого линкерного пептида 2А. Наличие значительного количества тройного гибрида Adx-2А-AdR-GFP (Рис. 36Б-В, дор. 3) указывает на значительно более низкую эффективность расщепления второго линкера 2А.

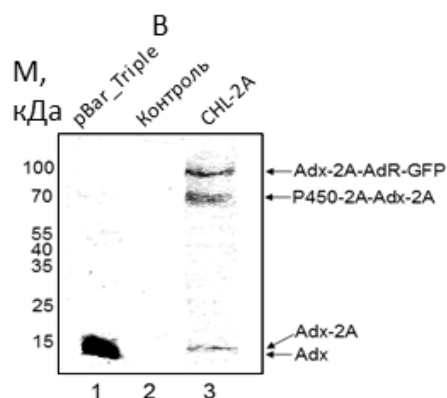
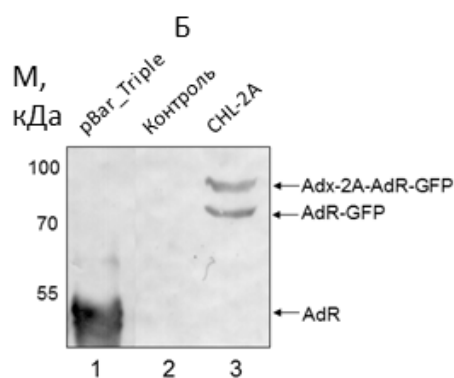
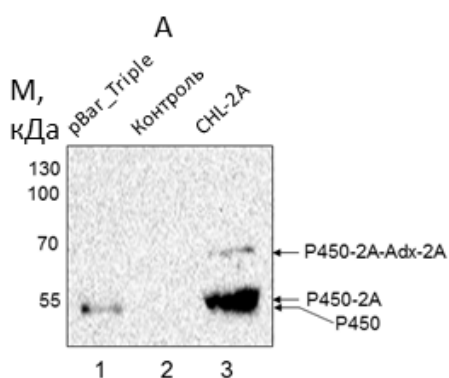


Рисунок 36. Идентификация белков ХГЛ системы в клетках НЕК293Т. ДСН-ПААГ (10% [А, Б] или 15% [В]) и Вестерн-блоттинг гомогенатов клеток (45 мкг общего белка/дор.). Мембраны инкубировали с антителами к P450ssc (А), AdR (Б) и Adx (В). А, Б, В: 1 - гомогенат клеток *E. coli*/pBar_Triple; 2 и 3 – гомогенаты клеток НЕК293Т, трансфицированных pcDNA3.1/CT-GFP и pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP соответственно.

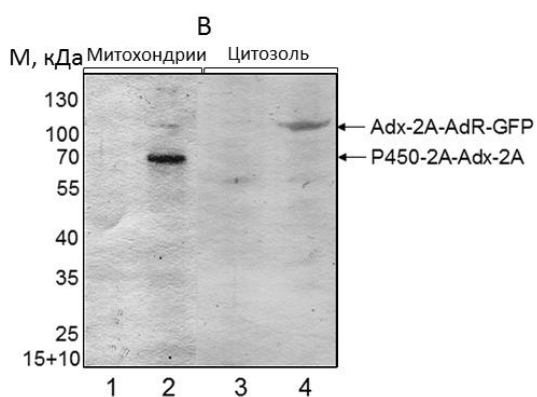
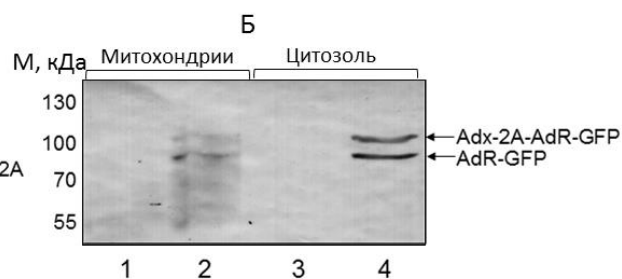
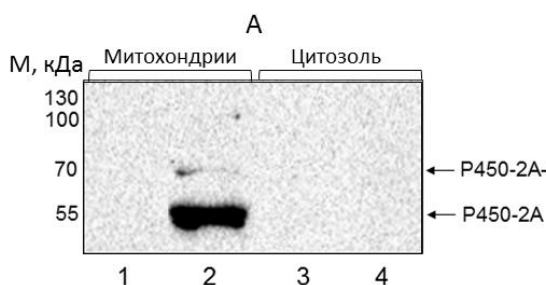


Рисунок 37. Локализация рекомбинантных белков в клетках НЕК293Т. ДСН-ПААГ (10% [А, Б] или 15% [В]), на дорожки наносили 15 мкг (А) или 45 мкг (Б, В) белка митохондриальной фракции и 90 мкг белка фракции постмитохондриального супернатанта (ПМС)) и Вестерн-блоттинг субклеточных фракций. Мембраны инкубировали с антителами к P450ssc (А), AdR (Б) и Adx (В). А–В: 1 и 2 –

митохондриальная фракция, 3 и 4 – фракция ПМС клеток НЕК293Т, трансфицированных pcDNA3.1/CT-GFP и pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP соответственно.

В результате анализа субклеточных фракций обнаружено, что белки, несущие N-концевую митохондриальную адресующую последовательность, образующиеся в результате самопроцессинга полипротеина pCoxIV-CHL-GFP в ходе трансляции, эффективно импортировались в митохондрии. Весь синтезирующийся P450-2A и гибрид P450-2A-Adx-2A детектируются в митохондриальной фракции (Рис. 37А и Рис. 37В, дор. 2). Индивидуальный белок Adx-2A с низкой молекулярной массой (14 кДа) не детектировался в митохондриях клеток (Рис. 37В, дор. 2), но также не детектировался и во фракции постмитохондриального супернатанта, вероятно, вследствие сильного разбавления образца. Основная масса белков AdR-GFP и Adx-2A-AdR-GFP была обнаружена во фракции постмитохондриального супернатанта (Рис. 37Б и Рис. 37В, дор. 4), однако, небольшое количество данных белков также обнаружено в митохондриях (Рис. 37Б и Рис. 37В, дор. 2), несмотря на отсутствие у них митохондриальной адресующей последовательности. Полученный результат коррелирует с результатами флуоресцентной микроскопии, свидетельствующими о присутствии GFP-содержащих белков в митохондриях клеток, которые были представлены выше (Рис. 35).

Таким образом, при синтезе гетерологичного полипротеина CHL-2A в клетках HEK293Т и *S. cerevisiae* наблюдается сходная эффективность расщепления CHL-2A и локализация в клетках продуктов его расщепления.

4.3.4 Активность белков ХГЛ системы в клетках линии HEK293Т

На следующем этапе работы мы проверили, являются ли синтезируемые белки ХГЛ системы быка функционально активными в клетках человека. Активность реконструированной ХГЛ системы оценивали по способности трансфицированных клеток превращать *in vivo* субстраты цитохрома P450_{ssc} в прегненолон. Клетки, трансфицированные плазмидами pcDNA3.1/CT-GFP (контрольные клетки) или pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, инкубировали в бессывороточной среде с добавлением и без добавления субстрата цитохрома P450_{ssc}, как описано в разделе «Материалы и методы». Затем в органическом экстракте культуральной среды методом ВЭЖХ оценивали концентрацию продукта и нормировали полученное количество на одну трансфицированную клетку.

Рис. 38 иллюстрирует активность цитохрома P450_{ssc} в клетках HEK293Т при использовании в качестве субстрата 22R-гидроксихолестерина. Данный субстрат характеризуется более высокой, чем холестерин, растворимостью и равномерно распределяется в клетке (Black et al., 1994). Из представленных данных видно, что в контрольных клетках не происходит трансформации 22R-гидроксихолестерина. Данный

факт указывает на отсутствие функционально активного цитохрома P450_{ssc} в клетках линии HEK293T дикого типа. В органическом экстракте среды, собранной после культивирования клеток, трансфицированных вектором pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, направляющим синтез белков ХГЛ системы быка, регистрировался прегненолон. Следовательно, цитохром P450_{ssc} быка, синтезируемый в клетках линии HEK293T, может превращать 22R-гидроксистерин в прегненолон. Величина активности P450_{ssc} составила $360,0 \pm 75,6$ нг прегненолона/мл культуры $\times 24$ ч или, с учетом эффективности трансфекции, $1,2 \pm 0,2$ пг прегненолона/трансфицированная клетка $\times 24$ ч. В то же время прегненолон не регистрировался в среде, собранной после культивирования клеток, трансфицированных вектором pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP в отсутствие 22R-гидроксистерина, что может указывать на отсутствие в данных клетках эндогенного пула холестерина (или его производных), доступного для цитохрома P450_{ssc}.

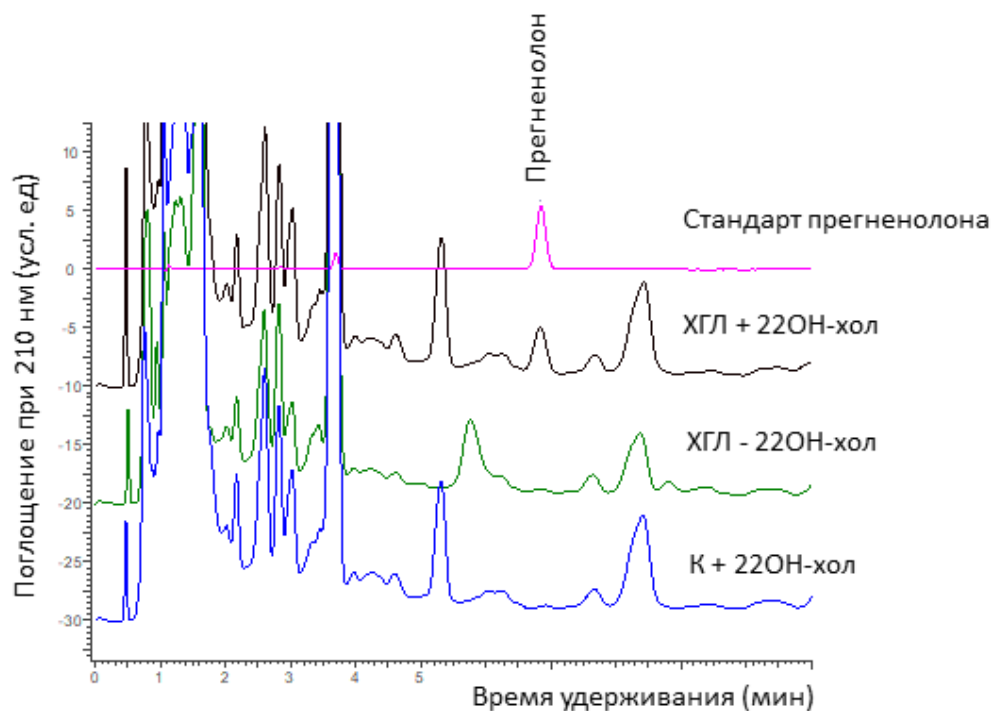


Рисунок 38. ВЭЖХ-анализ органических экстрактов культуральной среды, собранной после инкубации контрольных клеток HEK293T (К) и клеток HEK293T/pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP (ХГЛ). Верхняя кривая — хроматограмма стандарта прегненолона (1 мг/мл).

Хорошо известно, что следующим этапом каскада стероидогенеза в организме млекопитающих является превращение прегненолона в прогестерон, катализируемое β -гидроксистероиддегидрогеназой (β -ГСД). Для того, чтобы выяснить, подвергается ли

прегненолон, образовавшийся в клетках HEK293T в результате реакции, катализируемой цитохромом P450_{SCC}, дальнейшим превращениям, мы провели ВЭЖХ-анализ образцов, полученных из культуральной среды клеток HEK293T/pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP и контрольных клеток, инкубированных в присутствии 22R-гидроксистерина, на наличие прогестерона. Кроме того, мы провели анализ на наличие прогестерона этих же образцов после их обработки холестеролоксидазой (ХО), которая, как и 3 β -ГСД, превращает прегненолон в прогестерон. В образцах, полученных из контрольных клеток, прогестерон отсутствовал (Рис. 39). Прогестерон обнаружен только в экстракте культуральной среды клеток HEK293T/pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP с реконструированной ХГЛ системой, полученном после инкубации клеток в присутствии 22R-гидроксистерина, и обработанном ХО. В этом случае в клетках образуется прегненолон (см. Рис. 38), который под действием ХО трансформируется в прогестерон. В том же экстракте, не обработанном ХО, прогестерон не детектировался.

Полученные результаты указывают на отсутствие прогестерона в клетках HEK293T дикого типа и на отсутствие в данных клетках активной эндогенной 3 β -ГСД, в отличие от природных стероидогенных клеток.

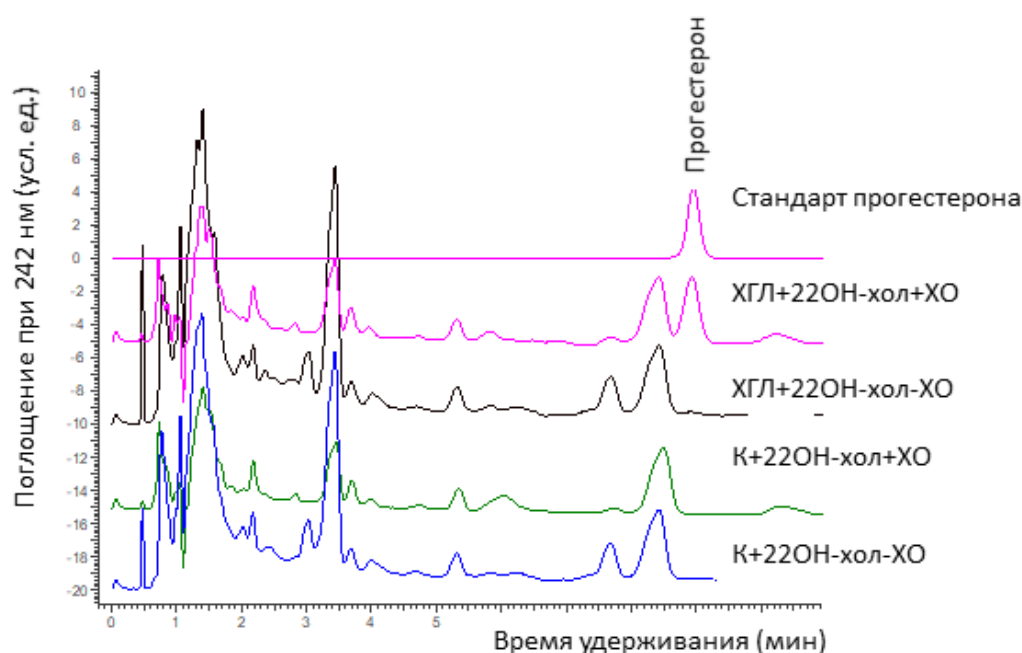


Рис. 39. ВЭЖХ-анализ органических экстрактов культуральной среды, собранной после инкубации контрольных клеток HEK293T (К) и клеток HEK293T/pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP (ХГЛ) в присутствии 22R-гидроксистерина, обработанных (+ХО) и не обработанных (-ХО) холестеролоксидазой. Верхняя кривая – хроматограмма стандарта прегненолона (1 мг/мл).

Было обнаружено, что клетки HEK293T, трансфицированные плазмидой pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, способны осуществлять трансформацию не только 22R-гидроксихолестерина, но также и 20 α -гидроксихолестерина, холестерина и даже объемных молекул флуоресцентно-меченного 22-NBD-холестерина. Рис. 40 иллюстрирует в качестве примера биотрансформацию 22-NBD-холестерина в прегненолон.

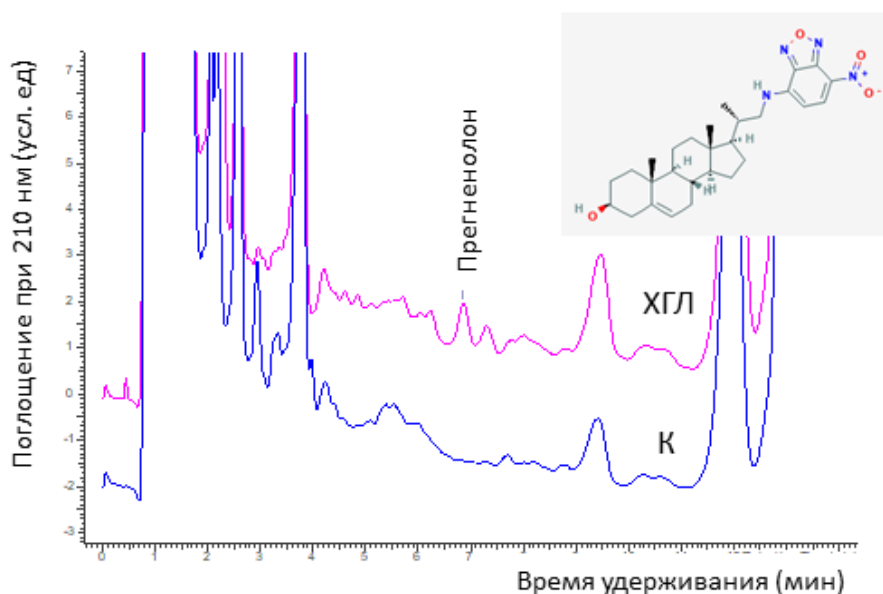


Рисунок 40. ВЭЖХ-анализ органических экстрактов культуральной среды, собранной после инкубации контрольных клеток HEK293T (К) и клеток HEK293T/pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP (ХГЛ) в присутствии 22-NBD-холестерина. Справа приведена структурная формула субстрата.

4.3.5 Анализ ХГЛ активности клеток HEK293T, осуществляющих синтез цитохрома P450_{ssc} быка

Наши результаты показали, что клетки HEK293T, синтезирующие гетерологичные белки ХГЛ системы, демонстрируют стеролгидроксилазную активность (Рис. 38), несмотря на пространственное разобщение гетерологичного P450_{ssc} и большей части гетерологичных переносчиков электронов Adx и AdR (P450_{ssc} локализуется в митохондриях, а значительная часть AdR и Adx – в цитозоле, Рис. 37) и отсутствие эндогенного P450_{ssc} в данных клетках. Для того, чтобы проверить, есть ли в клетках HEK293T эндогенные белки-переносчики электронов, способные обеспечить функционирование рекомбинантного цитохрома P450_{ssc}, мы осуществили синтез в данных клетках P450_{ssc} в отсутствие Adx и AdR.

Мы сконструировали плазмиду pcDNA3.1/pCoxIV-P450_{ssc}-2A-GFP, несущую только ген P450_{ssc} и ген GFP (Рис 41А). Согласно результатам Вестерн-блоттинга в клетках,

трансфицированных данным вектором, осуществляется синтез белка рCoxIV-P450scc-2A-GFP (Рис. 41Б, дор. 2), который расщепляется с образованием рCoxIV-P450scc-2A и GFP. Белок рCoxIV-P450scc-2A эффективно импортируется в митохондрии и процессируется с образованием зрелой формы цитохрома P450scc (Рис. 41Б, дор. 4, 6).

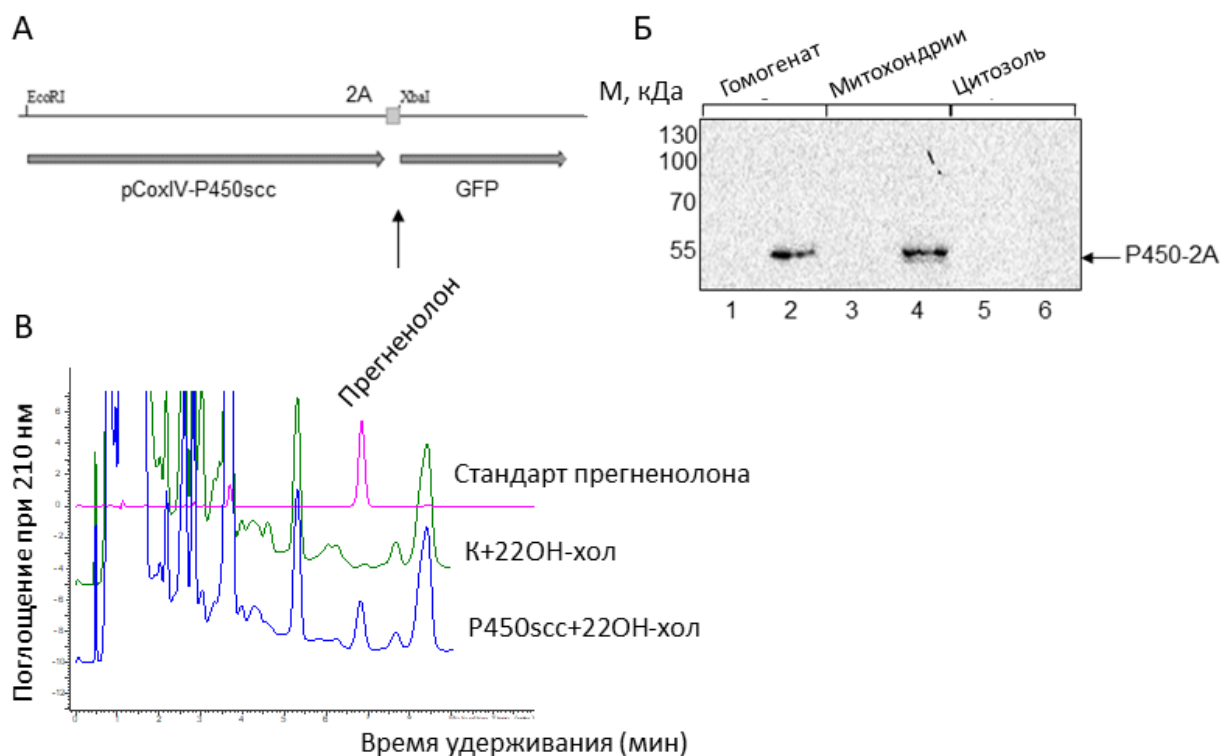


Рисунок 41. А: Схема слитой кДНК, встроенной в вектор pCoxIV-P450scc-2A-GFP. Стрелками указан предполагаемый участок расщепления полипротеина. Б: Идентификация P450scc в гомогенате и субклеточных фракциях клеток HEK293T, трансфицированных векторами pCoxIV-P450scc-2A-GFP (1, 3, 5) и pCoxIV-P450scc-2A-GFP (2, 4, 6). В: ВЭЖХ-анализ органических экстрактов культуральной среды, собранной после инкубации клеток HEK293T/pCoxIV-P450scc-2A-GFP (К) и HEK293T/pCoxIV-P450scc-2A-GFP (P450scc) в присутствии 22R-гидроксихолестерина. Верхняя кривая – хроматограмма стандарта прегненолона (1 мг/мл).

Согласно данным ВЭЖХ, клетки, трансфицированные вектором pCoxIV-P450scc-2A-GFP, осуществляют превращение холестерина в прегненолон, при этом величина активности данных клеток сравнима с активностью клеток, синтезирующих все три компонента 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) в сравнении с $1,2 \pm 0,2$ пг прегненолона/трансфицированная клетка $\times 24$ ч. Полученные данные указывают на то, что функционирование P450scc быка в клетках HEK293T происходит в результате его

взаимодействия с эндогенными редокс-белками. Следовательно, в митохондриях клеток НЕК293Т имеются подобные Adx и AdR быка белки-переносчики электронов, способные функционально сопрягаться с рекомбинантным цитохромом P450scs.

Таким образом, анализируя функционирование белков ХГЛ системы быка в клетках НЕК293Т, мы обнаружили, что в митохондриях клеток НЕК293Т отсутствуют цитохром P450scs и 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа, и, в то же время, присутствуют электрон-транспортные белки, способные обеспечить эффективное функционирование цитохрома P450scs.

4.4 Зависимость эффективности расщепления 2А-полипротеина от последовательности пептида 2А и расположения белков-компонентов в составе 2А-полипротеина

В результате анализа экспрессии кДНК CHL-2A в клетках *S. cerevisiae* и НЕК293Т было обнаружено, что эффективность расщепления полипротеина CHL-2A не зависит от типа эукариотической клетки, в которой происходит трансляция: в клетках НЕК293Т так же, как и в клетках *S. cerevisiae*, в полипротеине CHL-2A эффективно расщеплялся первый пептид 2А, а второй пептид 2А демонстрировал низкую эффективность расщепления. Очевидно, что для повышения эффективности работы ферментной системы необходимо максимально увеличить содержание в ней индивидуальных белков, а значит в нашем случае необходимо максимально увеличить эффективность расщепления второго 2А-линкера. Из данных, представленных в литературе (см. раздел обзора литературы «Характеристика последовательности пептида 2А и 2А-подобных последовательностей») известно, что располагающаяся перед пептидом 2А аминокислотная последовательность оказывает влияние на эффективность расщепления пептида 2А и может значительно подавлять расщепление. Добавление перед пептидом 2А сочетания аминокислот глицин-серин-глицин (GSG) позволяет нивелировать влияние аминокислотного контекста на расщепление пептида, а также обеспечивает большую подвижность вторичной структуры пептида 2А за счет увеличения гибкости предшествующего аминокислотного участка, что, в свою очередь, положительно сказывается на эффективности расщепления пептида 2А. Кроме того, эффективность расщепления 2А-полипротеинов можно увеличить посредством замены 2А FMDV на другие более активные 2А-подобные пептиды: например, пептиды T2А вируса *Thosea asigna*, P2А вируса *Porcine techovirus-1* и E2А вируса *equine rhinitis A*. Однако, следует отметить, что эффективность расщепления

каждой из указанных 2А-последовательностей в каждом конкретном аминокислотном контексте значительно варьирует (см. раздел обзора литературы «Применение последовательности, кодирующей пептид 2А, для совместной экспрессии генов»). На следующем этапе работы мы провели тестирование эффективности расщепления различных 2А-пептидов при их введении в состав полипротеина CHL-2А между белками Adx и AdR.

4.4.1 Конструирование плазмид

Оптимизацию последовательности полипротеина CHL-2А с целью повышения эффективности ее расщепления на индивидуальные белки ХГЛ системы проводили с использованием модельной системы на базе клеток дрожжей *S. cerevisiae*. Мы отказались от использования препоследовательности рCoxIV и сконструировали на базе полученного ранее вектора рYeDP/рCoxIV-CHL-2А вектор рYeDP/мCHL-F2А, включающий кДНК зрелых форм белков-компонентов ХГЛ системы – P450_{scc}, Adx и AdR, разделенные кДНК 2А вируса ящура. В этом случае цитохром P450_{scc} встраивается в цитоплазматическую мембрану клетки, Adx локализуется в цитоплазме, а AdR встраивается в мембрану ЭПР (Duport et al., 2003).

С целью изменения эффективности расщепления полипротеина CHL-2А были использованы три подхода. Во-первых, для оценки влияния на эффективность расщепления второго линкера 2А предшествующей аминокислотной последовательности (С-концевых аминокислот белка AdR) была сконструирована плазида рYeDP/мCHL-F2Arev с измененным порядком генов по сравнению с плазмидой рYeDP/мCHL-F2А: P450_{scc}-F2А-AdR-F2А-Adx в плазмиде рYeDP/мCHL-F2Arev вместо P450_{scc}-F2А-Adx - F2А-AdR в плазмиде рYeDP/мCHL-F2А. Во-вторых, было решено модифицировать последовательность 2А вируса ящура, расположенную между кДНК Adx и AdR, путем добавления на N-конец пептида 2А линкера GSG. Был сконструирован вектор рYeDP/мCHL-F2Amod. Кроме того, были созданы альтернативные ДНК-конструкции с заменой второго 2А-линкера F2А на линкеры Р2А и Т2А. На Рис. 42 представлены нуклеотидные и аминокислотные последовательности использованных 2А-линкеров, на Рис. 43 представлены схемы кДНК, входящих в состав сконструированных векторов.

F2A	CTG TTG AAT TTT GAC TTG TTG AAG TTG GCT GGA GAC GTC L L N F D L L K L A G D V GAG TCC AAC CCT GGG CCT E S N P G P
GSG-F2A	GGT TCT GGT TTG AAT TTC GAT TTG TTG AAG TTG GCT GGT <u>G S G</u> L N F D L L K L A G GAT GTT GAA TCT AAT CCA GGT CCA D V E S N P G P
GSG-P2A	GGT TCT GGT GCT ACA AAT TTC TCT TTG TTG AAG CAA GCT GGT <u>G S G</u> A T N F S L L K Q A G GAT GTT GAA GAA AAT CCA GGT CCA D V E E N P G P
GSG-T2A	GGT TCT GGT GAA GGT AGA GGT TCT TTG TTG ACT TGT GGT <u>G S G</u> E G R G S L L T C G GAT GTT GAA GAA AAT CCA GGT CCA D V E E N P G P

Рисунок 42. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности использованных в работе 2А-линкеров.

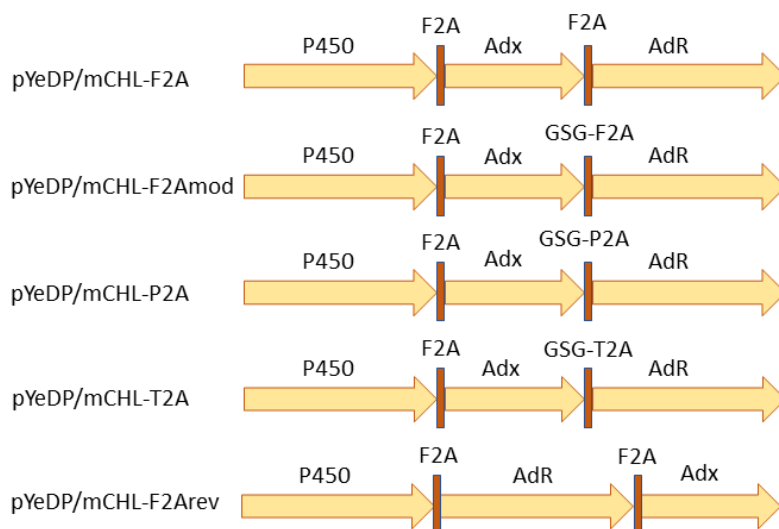


Рисунок 43. Схемы слитых кДНК, включенных в состав сконструированных рекомбинантных векторов.

4.4.2 Анализ синтеза полипротеина CHL-2A и эффективности расщепления линкеров 2A

Вестерн-блот анализ гомогенатов клеток *S. cerevisiae*, трансформированных полученными плазмидами, показал, что все сконструированные векторы эффективно направляют синтез индивидуальных гетерологичных белков в клетках (Рис. 44). В клетках, трансфицированных плазмидами pYeDP/mCHL-F2A, pYeDP/mCHL-F2Amod, pYeDP/mCHL-T2A и pYeDP/mCHL-P2A с порядком генов P450scc-2A-Adx-2A-AdR, были идентифицированы следующие белки: индивидуальные белки P450scc-2A (55 кДа), Adx-2A (14 кДа) и AdR (51 кДа), а также слитые белки P450scc-2A-Adx-2A (69 кДа) и Adx-2A-AdR (65 кДа). В клетках, трансфицированных вектором pYeDP/mCHL-F2Arev с

измененным порядком генов, были обнаружены индивидуальные белки ХГЛ системы - P450_{scs}-2A, AdR-2A (53 кДа) и Adx (12 кДа), а также некоторое количество слитых белков - P450_{scs}-2A-AdR-2A (108 кДа) и AdR-2A-Adx (65 кДа).

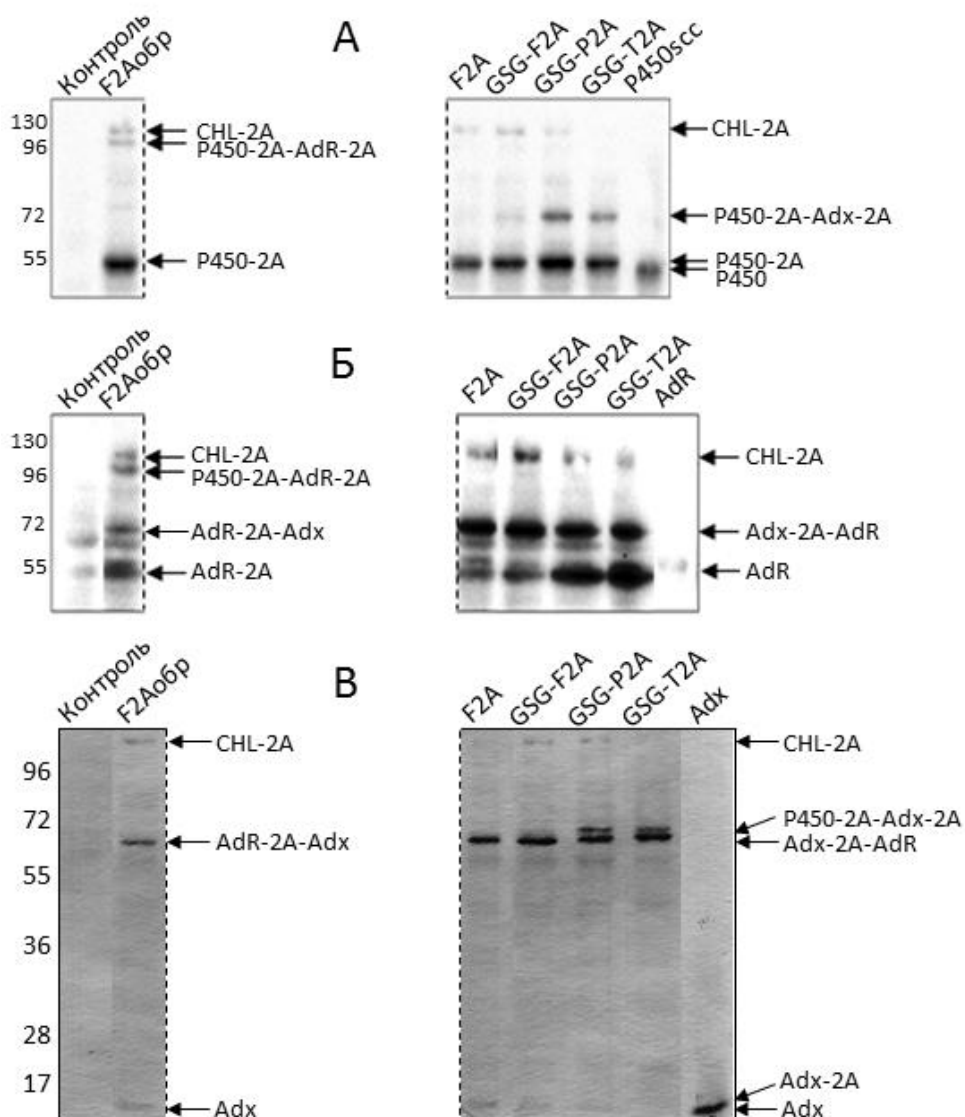


Рисунок 44. Идентификация гетерологичных белков ХГЛ системы в клетках *S. cerevisiae*. ДСН-ПААГ (10% [A, Б] или 15% [B]) и Вестерн-блоттинг гомогенатов клеток (10 мкг общего белка/дор.). Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450_{scs} (A) и AdR (Б) и Adx (B).

С использованием денситометрического анализа визуализированных с применением хемилюминесцентной детекции сигналов Вестерн-блоттинга была проведена оценка эффективности расщепления 2A-полипротеинов в полученных штаммах дрожжей. Обнаружено, что эффективность расщепления первого линкера 2A во всех модифицированных вариантах полипротеина CHL-2A практически одинаковая (Рис. 45). Добавление на N-конец второго линкера F2A аминокислот GSG привело лишь к

незначительному увеличению эффективности его расщепления: от $11,40\% \pm 1,60\%$ в клетках *S. cerevisiae*, трансформированных вектором pYeDP/mCHL-F2A, до $16,82\% \pm 5,10\%$ в клетках *S. cerevisiae*, трансформированных вектором pYeDP/mCHL-F2Amod. Из этого мы можем сделать вывод о том, что введение последовательности GSG лишь немного ослабляет влияние на пептид 2A расположенного выше аминокислотного контекста, но не ограничивает это влияние полностью. Линкеры P2A и T2A демонстрировали более высокую эффективность расщепления – $62,94\% \pm 8,40\%$ и $67,59\% \pm 2,30\%$ соответственно. Из данных, представленных на Рис. 45, видно, что изменения аминокислотной последовательности, расположенной перед вторым пептидом F2A, в результате изменения порядка генов в кассете экспрессии плазмиды привело к значительному увеличению эффективности расщепления F2A. Эффективность расщепления F2A в клетках *S. cerevisiae*, трансформированных вектором pYeDP/mCHL-F2Arev, составила $54,41\% \pm 16,50\%$. Таким образом, показано, что эффективность расщепления 2A-линкеров в составе полипротеина CHL-2A существенно варьирует и определяется аминокислотной последовательностью 2A-полипротеина.

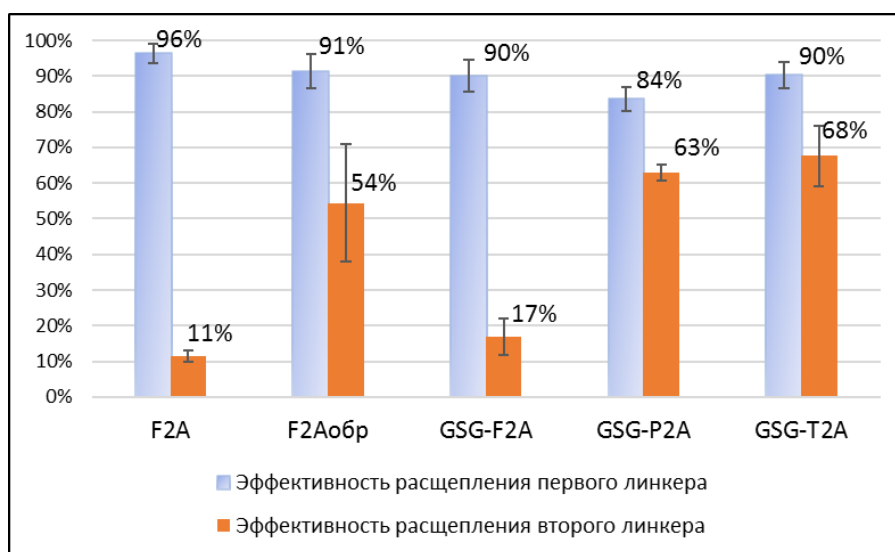


Рисунок 45.
Эффективность расщепления линкеров 2A в составе разных вариантов 2A-полипротеина CHL-2A.

4.4.3 Активность ХГЛ системы, реконструированной в клетках *S. cerevisiae*

В гомогенатах клеток *S. cerevisiae*, трансформированных вектором pYeDP/mCHL-F2A, вектором с измененным порядком генов pYeDP/mCHL-F2Arev и вектором pYeDP/mCHL-T2A, включающим последовательность, кодирующую наиболее эффективный в отношении расщепления пептид T2A, была измерена ХГЛ активность. Обнаружено, что активность ХГЛ системы *in vitro* демонстрировала тенденцию к увеличению при увеличении эффективности расщепления второго линкера 2A в составе CHL-2A (Таблица 7). При замене второго линкера F2A на более эффективный линкер T2A

активность ХГЛ системы увеличилась: от $5,7 \pm 1,36$ пмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч в клетках, трансформированных pYeDP/mCHL-F2A, до $6,7 \pm 1,6$ пмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч в клетках, трансформированных pYeDP/mCHL-T2A. Интересен тот факт, что значительно более высокую активность - $12,9 \pm 5,4$ пмоль прегненолона/мг белка гомогената×ч, демонстрировала ХГЛ система, реконструированная с использованием плазмиды pYeDP/mCHL-F2Arev, несмотря на то, что эффективность расщепления T2A-линкера выше, чем эффективность расщепления линкера F2Aобр. Возможно, это связано с тем, что в указанных клетках присутствуют разные рекомбинантные белки. Так, в клетках *S. cerevisiae*/pYeDP/mCHL-F2A и *S. cerevisiae*/pYeDP/mCHL-T2A синтезируются индивидуальные белки P450scs-2A, AdR и Adx-2A, а в клетках, трансформированных вектором с измененным порядком генов pYeDP/mCHL-F2Arev, присутствуют белки P450scs-2A, AdR-2A и Adx, не содержащий пептида 2A на С-конце. Вероятно, значительное увеличение активности системы связано с тем, что наличие остатка пептида 2A (18 а.о.) на С-конце небольшого белка Adx (108 а.о.) в какой-то мере препятствует его нормальному функционированию.

Таблица 7. Активность ХГЛ системы, реконструированной в рекомбинантных клетках *S. cerevisiae*, *in vitro*

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

Представленные результаты - среднее значение $\pm$ стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов.

4.5 Реконструкция ХГЛ системы в клетках дрожжей *Yarrowia lipolytica*

Целью следующего этапа данной работы являлось осуществление реконструкции белков ХГЛ системы в клетках метилотрофных дрожжей *Y. lipolytica*. «Нетрадиционные» дрожжи *Yarrowia lipolytica* являются перспективным организмом-хозяином для реконструкции ХГЛ системы. Данные дрожжи обладают эффективными системами поглощения и транспорта гидрофобных соединений, а также механизмами выведения продуктов их окисления. Мы предприняли попытку получить клетки *Y. lipolytica*, способные *in vivo* осуществлять биотрансформацию стероидных субстратов в прегненолон. Предполагалось,

что использование данного микроорганизма позволит решить проблему неэффективного проникновения в клетку субстрата ХГЛ реакции - холестерина.

При конструировании рекомбинантного штамма дрожжей *Y. lipolytica* мы использовали сочетание следующих генно-инженерных подходов:

1. Конструирование слитой кДНК CHL-T2A, включающей гены трех белков ХГЛ системы, разделенные последовательностями, кодирующими пептиды F2A и T2A, в одной рамке считывания.
2. Мультикопийная интеграция полученной слитой кДНК CHL-T2A (в среднем 10-15 копий на геном) в повторяющиеся элементы генома гаплоидных клеток дрожжей *Y. lipolytica* (в участки LTRzeta ретротранспозона Ylt1). Вследствие того, что в состав кДНК входят гены всех трех белков ХГЛ системы, предполагалось осуществление интеграции в геном дрожжей не менее 10 копий каждого гена, что приводит к увеличению уровня экспрессии генов в полученном штамме в сравнении с вариантом использования плазмид, включающих один чужеродный ген (Juretzek et al., 2001, Novikova et al., 2009).
3. Скрещивание полученных гаплоидных трансформантов для получения прототрофного диплоидного штамма. Данный подход позволяет удвоить количество копий кДНК CHL-2A в одной клетке.

Мы предполагали, что использование плазмиды, включающей три гена белков-компонентов ХГЛ системы в составе одной кассеты экспрессии, в сочетании с использованием методики мультикопийной трансформации и скрещиванием гаплоидных трансформантов обеспечит высокий уровень экспрессии целевых генов, эффективную продукцию белков-компонентов ХГЛ системы и, возможно, получение клеток, демонстрирующих высокую ХГЛ активность.

4.5.1 Получение гаплоидных трансформантов *Y. lipolytica*

Интегративный вектор p67PT несет плечи гомологии участку LTRzeta, маркер мультикопийной трансформации, а также индуцируемый промотор и терминатор гена изоцитратлиазы (ICL1) (Рис. 46). Маркером мультикопийной трансформации является аллель *ura3d4*, промотор которого укорочен до 8 п. о. Введение в клетку одной копии данного гена не обеспечивает достаточного для жизнедеятельности клеток уровня синтеза урацила, поэтому нормальную скорость роста демонстрируют только те клетки, в геном которых было интегрировано сразу несколько копий гена-маркера (в среднем 10-13, (Juretzek et al, 2001)).

На базе вектора p67 для мультикопийной интеграции была сконструирована плазмида p67/CHL, несущая слитую кДНК P450scc-F2A-Adx-T2A-AdR, аналогичную кДНК, включенной в состав вектора pYeDP/mCHL-T2A (Рис. 43). На Рис. 46 представлена схема линеаризованного вектора p67/CHL. Полученной плазмидой были трансформированы клетки *Y. lipolytica* штаммов E150 и E129L, имеющих разный половой тип.

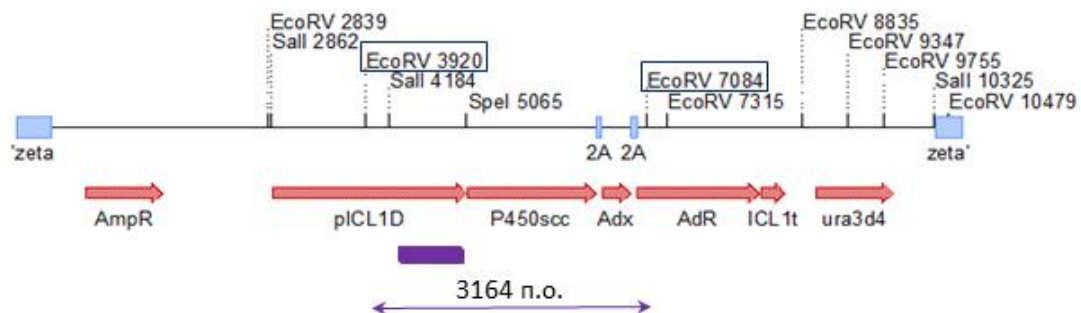


Рисунок 46. Схема линеаризованного интегративного вектора p67/CHL, использованного для трансформации клеток *Y. lipolytica*. Фиолетовым прямоугольником обозначен зонд, использованный при проведении Саузерн-гибридизации.

Интеграция целевых кДНК в геном гаплоидных трансформантов *Y. lipolytica* была подтверждена результатами Саузерн-гибридизации (Рис. 47). В качестве зонда для гибридизации использовали меченый фрагмент промотора pICL1D вектора p67/CHL длиной 881 п.о. (SalI-pICL1D-SpeI) (Рис. 46). Геномную ДНК дрожжей подвергали полному гидролизу с использованием эндонуклеазы рестрикции *EcoRV*, после чего осуществляли гибридизацию с указанным зондом. Данный зонд позволял идентифицировать как собственный фрагмент гена *ICL1* дрожжей (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.). По соотношению интенсивности визуализированной полосы 3164 п.о. и интенсивности полосы 2100 п.о. было определено примерное количество интегрированных в геном копий гетерологичной кДНК и выбраны трансформанты, в геном которых встроилось максимальное количество копий.

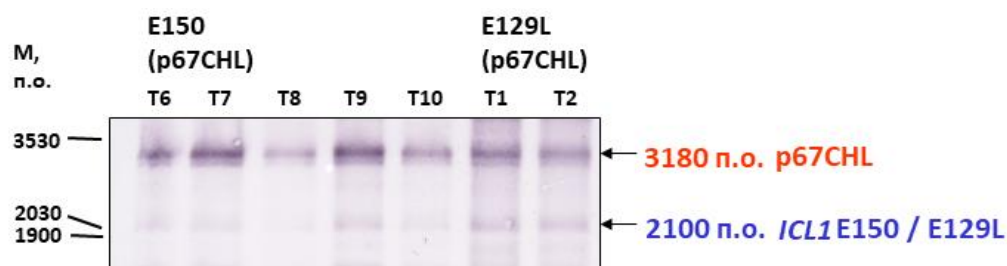


Рисунок 47. Анализ интеграции ДНК CHL-T2A в геном гаплоидных трансформантов E150/p67CHL и E129L/p67CHL методом Саузерн-гибридизации. Нижняя детектируемая полоса соответствует участку гена *ICL1*, верхняя регистрируемая полоса соответствует участку интегрированного вектора. Буквами и цифрами Tn обозначены гаплоидные штаммы E150/p67CHL и E129L/p67CHL.

В результате проведенного анализа для последующего скрещивания были отобраны гаплоидные трансформанты линий T7 штамма E150 и T1 штамма E129L (Рис. 47).

4.5.2 Получение и анализ диплоидного штамма *Y. lipolytica*

В результате скрещивания гаплоидных трансформантов T7 штамма E150 и T1 штамма E129L с комплементарной ауксотрофностью (Рис. 47, Рис. 48), получен диплоидный прототрофный штамм DE131. Методом Вестерн-блоттинга в гомогенатах клеток полученного штамма DE131 идентифицированы целевые белки ХГЛ системы – P450-2A, AdR, а также слитые белки P450-2A-Adx-2A и Adx-2A-AdR (Рис. 49). В связи с невысоким уровнем экспрессии гетерологичных генов не удалось детектировать индивидуальный белок Adx-2A, однако, поскольку ген Adx в составе слитой кДНК CHL-2A расположен между генами P450scs и AdR, можно утверждать, что он также экспрессируется в клетках штамма DE131.

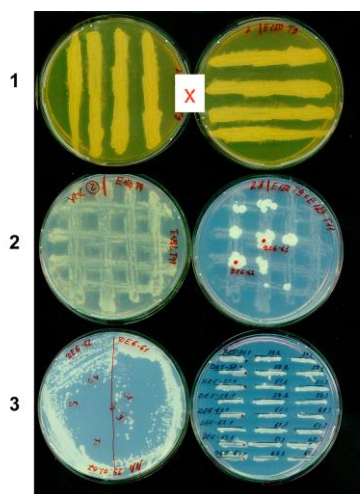


Рисунок 48. Получение диплоидных штаммов. 1 – выращивание гаплоидных трансформантов разного полового типа (*MATA* и *MATB*) на среде YPD; 2 – скрещивание в результате перекрестного «перепечатывания» на чашке со средой YMC, стимулирующей образование зигот; последующее «перепечатывание» и выращивание диплоидов на селективной среде MG; 3 - отбор одиночных колоний и выращивание диплоидных штаммов на среде MG. Детали эксперимента см. в разделе «Материалы и методы».

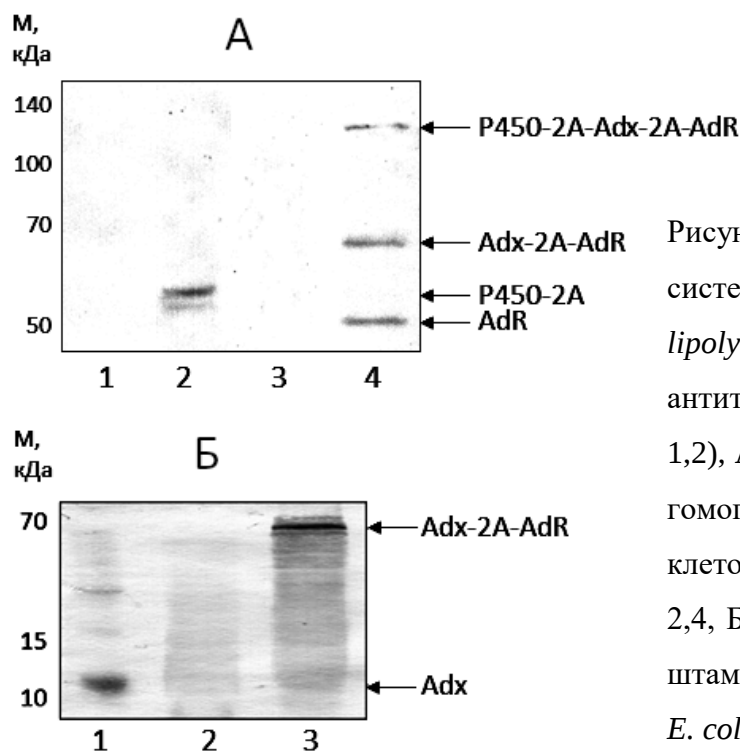


Рисунок 49. Идентификация белков ХГЛ системы в рекомбинантных клетках *Y. lipolytica*. Мембраны инкубировали с антителами к цитохрому P450scs (А 1,2), AdR (А 3,4) и Adx (Б). А: 1,3, Б: 2 – гомогенат нетрансформированных клеток *Y. lipolytica* штамма E129L, А: 2,4, Б: 3 – гомогенат клеток *Y. lipolytica* штамма DE131, Б: 1 - гомогенат клеток *E. coli/pBar_Triple*.

Диплоидный штамм DE131 анализировали в отношении способности осуществлять биотрансформацию холестерина в прегненолон. Клетки культивировали в течение 24 часов в минимальной среде с добавлением индуктора экспрессии гетерологичных генов этанола (конечная концентрация в среде 1%), затем клетки культивировали в виде сгущенной суспензии (25 г/л) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4) в течение 24 ч в присутствии холестерина (0,5 мМ), который вносили в среду инкубации в виде раствора в этаноле. По окончании инкубации органические соединения из культуры клеток экстрагировали этилацетатом и анализировали содержание прегненолона в органическом экстракте методом ВЭЖХ. На Рис. 50 представлены фрагменты хроматограмм (области, включающие время удерживания для прегненолона) образца-стандарта прегненолона, образца, полученного из культуры штамма E129L дикого типа (контроль) и образца, полученного из культуры штамма DE131. Сравнение хроматографических профилей показало, что в исследуемом органическом экстракте, полученном из культуры клеток DE131, культивированных в присутствии холестерина, детектируется пик с временем удерживания 6,46 мин, соответствующий прегненолону. Активность штамма, рассчитанная на основе количества внесенного в хроматограф внешнего стандарта, составила 594 мкг прегненолона/1 л сгущенной суспензии клеток за 24 ч.

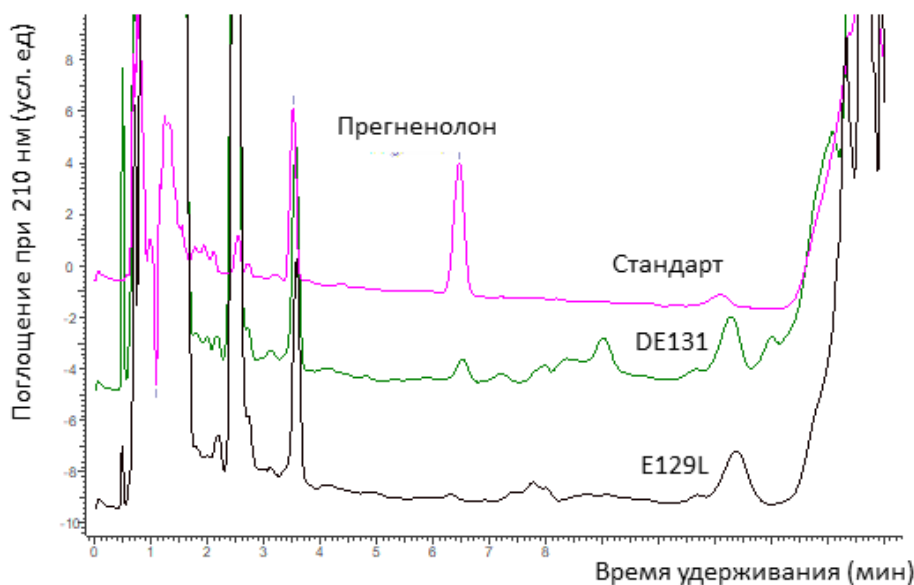


Рисунок 50. ВЭЖХ-анализ органических экстрактов суспензии рекомбинантных клеток *Y. lipolytica*.

Таким образом, был получен штамм *Y. lipolytica* DE131, который обеспечивает *in vivo* эффективную конверсию вносимого в среду инкубации холестерина в прегненолон.

5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время в научной литературе появляется все больше исследований, целью которых является реконструкция энзиматических систем млекопитающих, в частности систем, обеспечивающих синтез физиологически важных соединений, в гетерологичных клетках млекопитающих и микроорганизмов (Harikrishna et al., 1993, Szczebara et al., 2003, Gerber et al., 2015, Ehrhardt et al., 2016, Quehl et al., 2016). В сравнении с системами *in vitro* модельные системы на базе клеток живых организмов позволяют продлить функционирование ферментов благодаря клеточным механизмам, защищающим их от неблагоприятного влияния внешней среды, а также существенно снизить стоимость проводимых исследований (в частности, для цитохромов P450 отсутствует необходимость использования дорогостоящих кофакторов) (Bernhardt and Urlacher, 2014). Имеющиеся работы свидетельствуют о том, что реконструкция энзиматической системы в клетках, где данная система отсутствует, может быть информативной для выяснения принципов ее формирования и функционирования и, кроме того, полученные клетки, например, штаммы микроорганизмов, могут быть успешно использованы в практических целях. Однако, следует отметить, что для успешного создания трансгенных организмов с реконструированной определенной энзиматической системой необходимо

предварительное изучение свойств гетерологичных белков в клетках используемых организмов-хозяев, поскольку функционирование в них данных белков и систем может зависеть от типа клетки или ткани. В данной работе проведена реконструкция ХГЛ системы коры надпочечников быка и изучены некоторые особенности ее функционирования в полученных клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих.

5.1 Реконструкция ХГЛ системы в клетках *E. coli*

Клетки бактерий *E. coli* способны обеспечивать синтез функционально-активных митохондриальных белков млекопитающих благодаря, в частности, таким свойствам, как сходство с митохондриями в отношении основных факторов, вовлеченных в контроль над топогенезом белков (шапероны и протеиназы) (Suzuki et al., 1997), и способность осуществлять процессы пост-трансляционной модификации гетерологичных белков (например, связывание простетических групп) (Guengerich et al., 1993). На первом этапе данной работы 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. Кроме того, в результате сравнительного анализа различных систем экспрессии генов и условий культивирования клеток проведена оптимизация функционирования рекомбинантной ХГЛ системы.

Показано, что изменение расположения гетерологичных кДНК P450scc и кДНК AdR в кассете экспрессии используемой плазмиды приводит к изменению содержания и стехиометрического соотношения гетерологичных белков в клетках, однако это изменение не является значительным (не более, чем в 2 раза) и не приводит к существенному изменению активности ХГЛ системы, рассчитанной на белок гомогената клеток (нмоль прегненолона/мг белка гомогената $\times$ ч). В то же время сравнение удельной активности цитохрома P450scc, регистрируемой в препаратах полученных клеток, показало, что стехиометрическое соотношение белков P450scc/Adx/AdR в ХГЛ системе, соответствующее 1:1,45:4,2 (*E. coli*/pBar_Triple, порядок генов в кассете экспрессии - AdR-Adx-P450scc: 33,1 $\pm$ 8,96 нмоль прегненолона/1 нмоль P450scc $\times$ ч), является более оптимальным для функционирования цитохрома P450scc, чем соотношение 1:1,67:0,98, (*E. coli*/pTrc99A/CHL, порядок генов - P450scc-Adx-AdR: 13,8 $\pm$ 4,5 нмоль прегненолона/1 нмоль P450scc $\times$ ч).

Ранее было показано, что цитохром P450scc, синтезирующийся в клетках *E. coli*, проявляет те же функциональные свойства, что и нативный цитохром P450scc (Wada et al., 1991). В данной работе показано, что ХГЛ активность, регистрируемая в гомогенате

клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL, синтезирующих полный набор компонентов митохондриальной ХГЛ системы быка (P450_{scc}/Adx1-108/AdR), близка к величине активности рекомбинантного P450_{scc}, синтезирующегося в клетках *E. coli*, измеренной в гомогенате клеток в присутствии выделенных из коры надпочечников Adx и AdR (Shashkova et al., 2006), то есть в клетках *E. coli* все синтезирующиеся белки ХГЛ системы находятся в функционально активном состоянии.

Предпринятая нами попытка увеличить активность рекомбинантной ХГЛ системы посредством замены Adx1-108 на мутированную версию Adx* с заменой аминокислоты Ser112 на Trp112, к сожалению, не привела к желаемому результату. Активность ХГЛ системы, включавшей мутированную форму Adx* (Adx1-S112W), напротив, значительно снижалась по сравнению с активностью системы P450_{scc}/Adx1-108/AdR (Таблица 5). Поскольку снижение активности не было связано со снижением уровня экспрессии гена Adx* в сравнении с уровнем экспрессии гена Adx1-108 (Рис. 20), данный результат указывает на то, что Ser112 является одним из ключевых аминокислотных остатков в молекуле Adx. Несовпадение наших результатов с данными, полученными для Adx* *in vitro* в реконструированной системе с использованием изолированных белков, указывающими на повышение активности Adx при введении данной мутации (см. выше (Schiffler et al., 2001)), возможно, связано с влиянием каких-то внутриклеточных факторов на редокс-реакции или на процессы взаимодействия рекомбинантных белков (Adx* с AdR или с P450_{scc}) при функционировании Adx* в составе электрон-транспортной цепи AdR-Adx*-P450_{scc} в живой клетке, что, в свою очередь, влияет на эффективность переноса электронов в системе и активность цитохрома P450_{scc}. В то же время в данной работе продемонстрировано, что активность реконструированной ХГЛ системы можно увеличить посредством увеличения количества копий гена Adx* в составе использованной рекомбинантной плазмиды: введение второй копии гена вело к увеличению содержания Adx* в клетке и к увеличению ХГЛ активности по сравнению с системой P450_{scc}/Adx*/AdR (Рис. 21, Таблица 5).

В данной работе для проведения экспериментов с целью определения влияния различных химических соединений на активность ХГЛ системы *in vivo* успешно использовалась сгущенная культура рекомбинантных клеток (см. раздел 4.1.5 «Влияние химических агентов на эффективность биотрансформации холестерина»). Очевидно, что использование сгущенной суспензии клеток в фосфатном буфере для проведения экспериментов по оптимизации функционирования гетерологичных энзиматических систем в живых бактериальных клетках удобнее и дешевле ввиду использования меньшего объема проб для анализа и меньшего количества необходимых реагентов. С

использованием ВЭЖХ и масс-спектрометрии в культуральной среде, полученной после культивирования клеток *E. coli*/pTrc99A/CHL в присутствии холестерина продемонстрировано присутствие прегненолона - продукта биотрансформации холестерина. Сравнительный анализ ХГЛ активности *in vivo* показал, что количество прегненолона, образующегося за 24 ч культивирования сгущенной суспензии клеток в присутствии холестерина, варьирует в пределах ~0,05–0,62 мг/л в зависимости от типа и концентрации пермеабилизирующих агентов, присутствующих в среде культивирования. Скрининг подходящих ко-растворителей показал, что β-метилциклодекстрин более эффективно чем этанол, ДМСО, лизоцим или сапонин, увеличивает проницаемость клеточной стенки микроорганизмов для холестерина и таким образом увеличивает холестерин-трансформирующую активность клеток.

В результате проведенной работы получены новые данные о функционировании реконструированной ХГЛ системы в отношении стеролов в живых рекомбинантных клетках *E. coli*. В целом, полученные данные указывают на то, что формирование активных белков ХГЛ системы в клетках *E. coli* протекает без особых осложнений, а активность ХГЛ системы, локализованной в клетках, лимитирована плохим проникновением в клетки стероидного субстрата.

Полученные в данной работе клетки *E. coli* с реконструированной ХГЛ системой быка не могут быть использованы в биотехнологических процессах, поскольку не обеспечивают высокой степени трансформации холестерина в прегненолон, однако могут успешно использоваться в дальнейшем для фундаментальных исследований. В данной работе рекомбинантные клетки с реконструированной ХГЛ системой были использованы для проведения анализа влияния определенных аминокислотных остатков, расположенных в активном центре цитохрома P450_{ssc} на эффективность конверсии стероидных субстратов (Раздел 4.1.6 «Изучение влияния аминокислотных остатков, расположенных в активном центре молекулы цитохрома P450_{ssc}, на эффективность конверсии стероидных субстратов»). В результате этого исследования обнаружено, что аминокислоты активного центра цитохрома P450_{ssc} Иле351, Лей355 и Иле461 критичны для функционирования белка: замена любой из данных аминокислот на аланин существенно влияет на взаимодействие цитохрома P450_{ssc} со стеролами с разной структурой боковой цепи (Таблица 6).

Слитая кДНК, полученная в данной работе для коэкспрессии белков ХГЛ системы, может быть использована при создании векторов, которые необходимы для проведения поиска более подходящих для реконструкции ХГЛ системы микроорганизмов-хозяев, способных эффективно поглощать гидрофобные субстраты. Недавно было показано, что в

клетках бактерий рода *Bacillus* эффективно осуществляется синтез гетерологичных белков ХГЛ системы, которые способны эффективно поглощать и метаболизировать гидрофобные субстраты, включая холестерин, 7-дегидроксихолестерин и β -ситостерин за счет особых клеточных структур, содержащих поли(3-гидроксibuтират) и окруженных монослоем из фосфолипидов и белков (Gerber et al., 2015; см. раздел обзора литературы 2.6 «Экспрессия генов белков ХГЛ системы в гетерологичных клетках»). Бактерия *B. megatherium* используется для промышленного биотехнологического производства, например, производства амилаз и витамина B12. Кроме того, данная бактерия демонстрирует высокую стабильность плазмид, высокий выход секреции и отсутствие эндотоксинов. В связи с этим в качестве дальнейшего развития проведенной работы было бы интересно применить в работе с клетками *B. megatherium* полученные кДНК и отработанные методики культивирования бактериальных клеток.

5.2 Реконструкция ХГЛ системы в клетках дрожжей *S. cerevisiae* с использованием подхода, основанного на применении саморасщепляющегося пептида 2А

Изучение функционирования ХГЛ системы, реконструированной в клетках *E. coli*, показало, что в случае бактерии *E. coli* низкая эффективность проникновения субстрата в клетку серьезно лимитирует выход реакции конверсии холестерина в прегненолон и использование пермеабилизирующих агентов лишь в некоторой степени решает эту проблему. Известно, что некоторые микроорганизмы, в отличие от клеток *E. coli*, обладают механизмами импорта гидрофобных субстратов в клетку, а также способны выводить продукты их метаболизма в среду, что делает их весьма привлекательными кандидатами на роль организмов-хозяев для реконструкции ХГЛ системы (Wagner and Alper, 2016). К таким микроорганизмам относятся, в частности, метилотрофные дрожжи *Hansenula polymorpha*, *Pichia methanolica* и *Yarrowia lipolytica*. Поэтому следующий этап работы был направлен на реконструкцию ХГЛ системы в клетках дрожжей. Для осуществления совместной продукции трех белков ХГЛ системы была 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 (см. раздел 4.2 «Реконструкция ХГЛ системы в клетках *S. cerevisiae*»).

На момент начала данной работы в литературе имелись обширные данные по применению пептида 2А для синтеза индивидуальных белков в клетках млекопитающих (Ryan and Drew, 1994, Furler et al., 2001, Simmons et al., 2008, Kim et al., 2011, Chng et al.,

2015), насекомых (Daniels et al., 2014), растений (Amrani et al., 2004, Ha et al., 2010), в то же время, было представлено лишь несколько работ, выполненных с использованием клеток дрожжей (Wang et al., 2007, Roongsawang, et al., 2010, Sun et al., 2012). Поэтому первой нашей задачей было проведение оценки возможности применения указанного подхода с использованием саморасщепляющегося пептида 2A вируса ящура для реконструкции в дрожжах многокомпонентной энзиматической ХГЛ системы. В качестве модельного организма для данного тестирования были выбраны наиболее простые в работе дрожжи *S. cerevisiae*.

Сконструированный в процессе работы вектор pYeDP/pCoxIV-CHL-2A эффективно направлял в клетках *S. cerevisiae* синтез слитого полипротеина pCoxIV-P450scc-2A-Adx-2A-AdR (pCoxIV-CHL-2A), который расщеплялся во время трансляции с образованием функционально активных индивидуальных белков P450scc-2A, Adx-2A и AdR. Однако, наличие в клетках кроме указанных белков значительного количества слитого белка Adx-2A-AdR указывает на то, что первый линкер в составе полипротеина демонстрирует эффективное расщепление, а второй линкер расщепляется неэффективно. Неполное расщепление слитых белков, включающих пептид 2A, ранее было описано в ряде статей (например, Amrani et al., 2004, Halpin et al., 1999), было показано, что эффективность расщепления пептида 2A вируса ящура варьирует в диапазоне от 100% (Roongsawang, et al., 2010, Szymczak et al., 2004) до 40% (Kim et al., 2011). Она может зависеть от длины последовательности 2A (Donnelly et al., 2001a, Rothwell et al., 2010, De Felipe and Ryan, 2004), расположения компонентов в составе полипротеина (Rothwell et al., 2010) и типа клеток, в которых осуществляется трансляция 2A-полипротеина (Kim et al., 2011).

В данной работе показано, что образующиеся в результате расщепления полипротеина pCoxIV-CHL-2A в клетках *S. cerevisiae* белок-предшественник pCoxIV-P450scc-2A и зрелые белки Adx-2A, AdR и Adx-2A-AdR правильно адресуются в митохондрии и цитозоль, соответственно. Однако, адресование некоторой части белков AdR и Adx-2A-AdR было неправильным - они направлялись в митохондрии, несмотря на отсутствие адресующих последовательностей. В литературе имеются данные о том, что индивидуальные белки с адресующими сигнальными последовательностями или не имеющие сигнальной последовательности, образующиеся в результате расщепления 2A-полипротеина, могут быть правильно адресованы в различные субклеточные компартменты. Достаточное количество примеров правильного адресования индивидуальных белков в субклеточные структуры описано для клеток животных (Amrani et al., 2004, Szymczak et al., 2004, De Felipe and Ryan, 2004), растений (Amrani et al., 2004, Ralley et al., 2004, Lee et al., 2012) и дрожжей (Roongsawang, et al., 2010, Sun et al., 2012).

Однако, описаны также примеры неправильного адресования белков-компонентов саморасщепляющихся 2А-полипротеинов, например, когда белок, транслирующийся после пептида 2А, имеющий или не имеющий сигнальной последовательности, по ошибке импортируется в целевой компартмент для первого белка-компонента (De Felipe et al., 2003, Kim et al., 2011, Hadpech et al., 2018). Неправильное адресование может быть связано с рядом причин, например, с наличием сигнал-подобной последовательности в области N-конца белка, транслирующегося после 2А (Kubeil et al., 2016), с адресованием второго компонента полипротеина в составе нерасщепившегося полипротеина вместе с первым компонентом (De Felipe et al., 2003, Kim et al., 2011) или с нарушением функционирования N-концевой сигнальной последовательности второго компонента полипротеина с связи с присутствием на его N-конце одной дополнительной аминокислоты Про – остатка пептида 2А (Hadpech et al., 2018). Кроме того, возможной причиной может являться «проскальзывание» второго белка, расположенного за 2А-линкером, в сформировавшийся транслокон вслед за первым белком в ходе ко-трансляционного импорта. Примеры неправильного адресования компонентов 2А-полипротеинов описаны в разделе обзора литературы 2.4.4 «Применение последовательности, кодирующей пептид 2А, для совместной экспрессии генов».

В работе (Fujiki and Verner, 1993) было показано, что N-концевая адресующая последовательность рCoxIV направляет ко-трансляционный импорт дигидрофолатредуктазы в митохондрии дрожжей *S. cerevisiae*. В нашем случае мы можем предположить, что полипротеин рCoxIV-CHL-2А синтезируется вблизи поверхности митохондрий дрожжей и его первый компонент, рCoxIV-P450_{scc}, ко-трансляционно импортируется в митохондрии. В данном случае часть молекул AdR и Adx-2А-AdR могут попадать в митохондрии через транслокон, образованный для транспорта рCoxIV-P450_{scc}-2А. Попадание AdR в митохондрии может также объясняться возможным наличием у белка сигнал-подобной последовательности, опосредующей ассоциацию зрелой AdR с внутренней митохондриальной мембраной стероидогенных клеток (Kubeil et al., 2016).

В результате проведенной работы в клетках *S. cerevisiae* впервые реконструирована трех-компонентная система цитохрома P450_{scc} в форме самопроцессирующегося полипротеина. Важно отметить, что гетерологичные белки образуют в клетках активную ХГЛ систему, следовательно, наличие 18 дополнительных аминокислот, происходящих из 2А пептида, на С-конце цитохрома P450_{scc} не препятствует проявлению им каталитической активности. В работе также получены результаты, подтверждающие вывод ряда авторов о том, что механизм расщепления 2А реализуется в эукариотической, но не реализуется в прокариотической системе трансляции: в клетках

бактерий *E. coli* индукция синтеза CHL-2A приводит к высокому уровню экспрессии полноразмерного гибридного 2A-полипротеина (Рис. 29) и не детектируется активность ХГЛ системы (см. раздел 4.2.2 «Синтез белков ХГЛ системы в клетках *E. coli*»).

Итак, мы продемонстрировали, что подход, основанный на использовании саморасщепляющегося вирусного пептида 2A, может успешно применяться для реконструкции функционально активной Р450-системы млекопитающих в клетках дрожжей. Однако, в нашем случае расщепление второго линкера в составе самопроцессирующегося полипротеина рCoxIV-CHL-2A было недостаточно эффективным, в результате значительная часть молекул AdR и Adx присутствовала в клетках в составе гибридного белка (Рис. 30). В литературе имеются данные, указывающие на то, что эффективность расщепления линкеров 2A, а также адресование полученных компонентов 2A-полипротеина может зависеть от типа клеток, в которых осуществляется его трансляция (Kim et al., 2011), поэтому на следующем этапе работы мы провели сравнительный анализ экспрессии кДНК, кодирующей полипротеин рCoxIV-CHL-2A, в клетках дрожжей и в клетках млекопитающих (клетках эмбриональной почки человека линии HEK293Т).

5.3 Реконструкция ХГЛ системы с использованием подхода, основанного на применении саморасщепляющегося пептида 2A, в клетках линии HEK293Т

В результате проведенной работы в клетках линии HEK293Т успешно ко-экспрессированы гены цитохрома P450_{ssc}, Adx и AdR, находящиеся в составе полицистронной плазмиды и разделенные последовательностями, кодирующими пептид 2A вируса ящура. В клетках HEK293Т осуществляется эффективная трансляция полноразмерного полипротеина рCoxIV-CHL-GFP, расщепляющегося с образованием индивидуальных белков рCoxIV-P450_{ssc}-2A, Adx-2A и AdR-GFP, а также некоторого количества нерасщепленного белка Adx-2A-AdR-GFP (Рис. 36). Таким образом, эффективность расщепления линкеров 2A вируса ящура, разделяющих P450_{ssc} и Adx и Adx и AdR в составе 2A-полипротеина, аналогична эффективности расщепления линкеров при трансляции полипротеина рCoxIV-CHL-2A в клетках *S. cerevisiae* - почти 100% для первого пептида 2A и менее эффективное расщепление для второго пептида. Как упоминалось выше, в литературе имеются данные о том, что эффективность расщепления одного и того же 2A-полипротеина может варьировать в зависимости от типа клеток, в которых происходит трансляция. Например, расщепление одного и того же полипротеина, компоненты которого были разделены пептидом P2A, было значительно более эффективным при экспрессии его кДНК в клетках эмбриона Данио-рерио, чем в клетках

HeLa, HT1080 и HEK293T. Аналогичная ситуация наблюдалась при использовании пептида T2A: наиболее эффективное расщепление сконструированного T2A-полипротеина отмечено в клетках эмбриона Данио-рерио, меньшая эффективность наблюдалась в клетках HeLa и HEK293T и еще более низкая эффективность - в клетках HT1080 (Kim et al., 2011). Однако, в нашем случае эффективность расщепления первого и второго 2A-линкера полипротеина pCoxIV-CHL-2A одинакова в клетках HEK293T и клетках дрожжей *S. cerevisiae*, то есть, скорее всего, эффективность расщепления pCoxIV-CHL-2A не зависит от типа эукариотической клетки, в которой происходит его трансляция.

Распределение продуктов расщепления полипротеина pCoxIV-CHL-GFP в клетках HEK293T также аналогично распределению образующихся белков-компонентов pCoxIV-CHL-2A в клетках *S. cerevisiae*: белки, несущие митохондриальную адресующую последовательность pCoxIV, эффективно импортируются в митохондрии, белки, не имеющие сигнальной последовательности, обнаружены в цитозоле (Рис. 31, Рис. 37), и кроме того, как и в клетках *S. cerevisiae*, небольшое количество не несущих адресующего сигнала белков AdR-GFP и Adx-2A-AdR-GFP обнаружено в митохондриях. Возможные причины такого неправильного адресования были рассмотрены выше. Полученные результаты указывают на то, что белки, образующиеся из 2A-полипротеина, могут адресоваться в разные компартменты клетки, однако, для эффективного адресования белков в определенный субклеточный компартмент (в нашем случае для адресования белков ХГЛ системы в митохондрии) каждый компонент 2A-полипротеина должен иметь собственный соответствующий адресующий сигнал.

Клетки HEK293T, трансфицированные вектором pCDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP, согласно результатам ВЭЖХ, эффективно метаболизировали 22-гидроксихолестерин, а также холестерин, 20 α -гидроксихолестерин и 22-NBD-холестерин в прегненолон (Рис. 38, Рис. 40). Данные клетки демонстрировали ХГЛ активность несмотря на то, что в митохондриях клеток присутствует небольшое количество гетерологичных AdR и Adx, необходимых для функционирования P450_{ssc}, в то время как их большая часть локализована в цитозоле и не может взаимодействовать с P450_{ssc}, локализованным в митохондриях. Контрольные клетки HEK293T не демонстрировали ХГЛ активности. Мы предположили, что в митохондриях клеток HEK293T могут присутствовать эндогенные переносчики электронов, способные обеспечить функционирование гетерологичного P450_{ssc}. Чтобы проверить данную гипотезу, мы осуществили синтез цитохрома P450_{ssc} в клетках HEK293T в отсутствие рекомбинантных Adx и AdR и определили ХГЛ активность полученных клеток.

Введение генетической конструкции, несущей только ген P450_{ssc}, обеспечивало биотрансформацию 22-гидроксихолестерина трансфицированными клетками. Более того, ХГЛ активность клеток HEK293T, синтезирующих только P450_{ssc}-2A, была сравнима с активностью, регистрируемой при использовании клеток, синтезирующих все белки ХГЛ системы (см. раздел 4.3.5 «Анализ ХГЛ активности клеток HEK293T, осуществляющих синтез цитохрома P450_{ssc} быка»). Эти данные указывают на присутствие в митохондриях клеток HEK293T ферредоксина и ферредоксинредуктазы (AdR и Adx или их аналогов), способных взаимодействовать с цитохромом P450_{ssc} быка. ХГЛ активность, регистрируемая в клетках HEK293T/pcDNA3.1/pCoxIV-P450_{ssc}-GFP - результат эффективного функционального сопряжения цитохрома P450_{ssc} быка и эндогенных электрон-транспортных белков. Отсутствие разницы в активности клеток HEK293T с реконструированной ХГЛ системой и клеток, синтезирующих только P450_{ssc}, вероятно, объясняется тем, что в митохондриях клеток HEK293T/pcDNA3.1/pCoxIV-CHL-GFP присутствует очень небольшое количество гетерологичных редокс-белков AdR и Adx, взаимодействие P450_{ssc} с которыми, в отличие от взаимодействия P450_{ssc} с эндогенными электрон-транспортными белками, не вносит существенного вклада в регистрируемую величину активности.

В данной работе обнаружено также, что образующийся в используемых клетках эмбриональной почки человека (линии HEK293T) прегненолон не подвергается трансформации в прогестерон, как это происходит в стероидогенных клетках. Этот факт указывает на отсутствие в клетках фермента 3 β -ГСД, который катализирует эту реакцию каскада стероидогенеза.

Линия клеток HEK293 получена из почки абортрованного эмбриона человека. Хотя ранее считалось, что линия клеток HEK293 имеет только почечное происхождение, относительно недавно получены данные о том, что данные клетки несут сложный набор маркеров предшественников клеток почки, нервных клеток и клеток надпочечников (Lin et al., 2014, Shaw et al., 2002). На основании результатов полногеномного секвенирования шести линий клеток HEK293 и результатов микроматричного анализа, проведенного в работе (Shaw et al., 2002), исследователи сделали вывод о том, что клетки линии HEK293 являются производными почки и зачатка надпочечников, расположенного непосредственно вблизи почек и образованного из нервного гребня (Lin et al., 2014, Shaw et al., 2002).

Почка считается нестероидогенным органом, хотя в литературе есть информация об экспрессии генов белков ХГЛ системы и в клетках нестероидогенных тканей (например, в клетках печени, мозга и кожи (Brentano et al., 1992, Slominski et al., 2014). В тканях почки

крысы идентифицирована мРНК AdR и Adx (Mellon et al., 1991, Brentano et al., 1992), кроме того, Adx был успешно выделен из почек свиньи (Driscoll and Omdahl, 1986), быка (Maruya et al., 1983) и птиц (Yoon and DeLuca, 1980). Данные литературы, касающиеся экспрессии P450ssc в почках, противоречивы. С одной стороны, в почках взрослых крыс была детектирована мРНК P450ssc (Mellon et al., 1991), а также было продемонстрировано наличие P450ssc во фракции внутренних митохондриальных мембран (Pagotto et al., 2011). С другой стороны, в работе (Dalla Valle et al., 2004) было показано, что мРНК P450ssc содержится в клетках почек новорожденных крыс, но с возрастом уровень мРНК снижается вплоть до полного исчезновения в почках крыс, возраст которых составляет 75 дней; кроме того, мРНК P450ssc не обнаруживается в почках взрослого хомяка (Vilchis et al., 2002). В клетках эмбриональной почки человека была обнаружена экспрессия генов P450ssc и 3 β -ГСД, однако, уровень содержания этих мРНК примерно на два порядка ниже уровня, регистрируемого в стероидогенных тканях плода (Pezzi et al., 2003).

Информации, касающейся экспрессии генов белков-компонентов ХГЛ системы в клетках HEK293, немного: в работе (Shaw et al., 2002) было показано наличие в них сравнительно низкого уровня мРНК P450ssc и AdR, а в работе (Lin et al., 2014) - наличие мРНК AdR. Данные о наличии в клетках HEK293 мРНК Adx были признаны авторами недостоверными (Shaw et al., 2002).

Итак, в данной работе впервые проведен анализ экспрессии слитой кДНК, кодирующей полипротеин, составленный из белков ХГЛ системы быка, разделенных линкерными пептидами 2A вируса ящура, в клетках HEK293T. В результате работы получены и охарактеризованы клетки линии HEK293T, способные осуществлять превращение холестерина и его аналогов в прегненолон. Обнаружено, 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: 1,2 – 2,5 пг прегненолона/клетка $\times$ 24 ч в трансфицированных клетках HEK293T против, например, 0,08 пг прегненолона/клетка $\times$ ч в клетках фолликула крысы (Yu et al., 2012); 1,9 пг прегненолона/клетка $\times$ ч (Chang et al., 2004), 0,05 пг прегненолона/клетка $\times$ ч (Yeh et al., 2004) и 0,044 пг прегненолона/клетка $\times$ ч (Wang et al., 2004) в клетках коры надпочечников крысы (во всех экспериментах использовали 25-ОН-холестерин в качестве субстрата и P450ssc и трилостан в качестве ингибитора 3 β -ГСД). Обнаружено также, что клетки HEK293T содержат электрон-транспортные белки, обеспечивающие эффективное функционирование стероидогенного цитохрома P450ssc в данных клетках, но не содержат (или содержат незначительное количество) P450ssc (CYP11A1) и 3 β -ГСД. С учетом этих данных клетки HEK293T можно

считать нестероидогенными и пригодными для экспрессии в них генов стероидогенных ферментов и изучения их характеристик.

5.4 Зависимость эффективности расщепления 2А-полипротеина от последовательности пептида 2А и расположения белков-компонентов в составе полипротеина

При проведении описанных выше экспериментов показано, что эффективность расщепления слитого полипротеина CHL-2A не зависит от типа эукариотической клетки, в которой происходит его трансляция: в клетках HEK293T так же, как и в клетках *S. cerevisiae*, полипротеин CHL-2A эффективно расщепляется по первому пептиду 2A, а второй пептид 2A расщепляется неэффективно. На следующем этапе работы мы предприняли попытку увеличить эффективность расщепления второго пептида 2A в составе полипротеина CHL-2A посредством оптимизации кДНК, кодирующей данный полипротеин, предполагая, что увеличение содержания индивидуальных белков ХГЛ системы, образующихся из CHL-2A, может привести к увеличению активности системы в рекомбинантных клетках.

Согласно данным литературы (De Felipe et al., 2010, Minskaia and Ryan, 2013), С-концевая аминокислотная последовательность белка, располагающегося перед пептидом 2A, может сильно влиять на эффективность его расщепления. В нашем случае, возможно, С-конец белка Adx, расположенного перед вторым 2A-линкером CHL-2A, значительно ингибирует эффективность процессинга 2A в отличие от С-конца белка P450scs, расположенного перед первым 2A-линкером. Для повышения эффективности расщепления CHL-2A мы изменили аминокислотную последовательность, предшествующую второму пептиду 2A в составе CHL-2A путем изменения порядка генов в кассете экспрессии и соответственно порядка компонентов в составе 2A-полипротеина. Кроме того, вместо второго 2A-линкера в составе CHL-2A мы использовали 2A FMDV с добавленными на N-конец аминокислотами GSG (гибкий аминокислотный линкер) или альтернативные последовательности T2A вируса *Thossea asigna* или P2A вируса *Porcine techovirus-1*. Несмотря на то, что мы не изменяли последовательность С-концевого участка Adx, которая, по-видимому, ингибировала расщепление пептида F2A, линкеры GSG-P2A и GSG-T2A демонстрировали высокую эффективность расщепления. При этом введение линкера GSG лишь незначительно увеличивало эффективность расщепления пептида GSG-F2A. Таким образом, можно утверждать, что линкер GSG отдаляет предшествующую пептиду 2A аминокислотную последовательность и немного ослабляет ее влияние, однако не нивелирует влияние аминокислотного контекста полностью, как

утверждается в некоторых работах (Szymczak et al., 2004). Изменение порядка компонентов в составе полипротеина с P450-F2A-Adx-F2A-AdR на P450-F2A-AdR-F2A-Adx и, как следствие, изменение аминокислотной последовательности, предшествующей второму пептиду 2A, привело к значительному увеличению эффективности расщепления пептида F2A. Итак, мы выяснили, что эффективность расщепления второго линкера 2A в составе CHL-2A изменяется в следующем порядке: F2A < GSG-F2A < F2Aобр < P2A < T2A (Рис. 45).

Каталитическая активность ХГЛ системы, измеренная в гомогенатах клеток, трансформированных векторами pYeDP/mCHL-F2A, pYeDP/mCHL-F2Arev и pYeDP/mCHL-T2A, демонстрировала тенденцию к увеличению при увеличении эффективности расщепления второго линкера 2A. Кроме того, особенно интересен тот факт, что значительно более высокую активность демонстрировала ХГЛ система, присутствующая в клетках *S. cerevisiae*/pYeDP/mCHL-F2Arev, состоящая из P450_{scc}-2A, AdR-2A и Adx, не содержащего пептида 2A на С-конце. Известно, что С-конец молекулы Adx (до 108 аминокислоты), особенно Про108, имеет ключевое значение для поддержания структурной целостности железо-серного кластера (Uhlmann, 1994), поэтому весьма вероятно, что наличие 18 а.о., происходящих из 2A-пептида, на С-конце небольшого белка Adx (108 а.о.) значительно ингибирует его активность.

5.5 Реконструкция ХГЛ системы в клетках дрожжей *Y. lipolytica*

Целью заключительного этапа данной работы было осуществить реконструкцию ХГЛ системы в клетках метилотрофных дрожжей *Y. lipolytica* с использованием подхода, основанного на применении саморасщепляющихся вирусных пептидов 2A.

Дрожжи *Y. lipolytica* были утверждены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) как общепризнано безопасные организмы (generally recognized as safe – GRAS) и широко используются в биотехнологической промышленности, например, для синтеза белка одноклеточных организмов (single-cell protein) и лимонной кислоты (Nicaud, 2012). Одним из преимуществ дрожжей *Y. lipolytica* в плане их использования для получения рекомбинантных штаммов является наличие разработанных, основанных на гомологичной рекомбинации методик мультикопийной интеграции целевых генов в повторяющиеся элементы генома дрожжей (участки rDNA или участки LTRzeta ретротранспозона Ylt1) с использованием специальных интегративных векторов.

В данной работе мы попытались достичь максимально высокого уровня экспрессии гетерологичных генов в клетках *Y. lipolytica* с использованием сочетания трех

методических подходов. Во-первых, была сконструирована слитая кДНК, включающая гены всех трех белков ХГЛ системы P450_{scc}, Adx и AdR, разделенные последовательностями, кодирующими пептиды F2A вируса ящура и T2A вируса *Thosea asigna*. То есть для реконструкции ХГЛ системы в клетках *Y. lipolytica* была использована кДНК, кодирующая слитой полипротеин, который наиболее эффективно из всех исследованных нами 2А-полипротеинов расщепляется на индивидуальные компоненты. Во-вторых, использовался 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 штамм *Y. lipolytica* проявлял ХГЛ активность *in vivo*: активность составила 594 мкг/л сгущенной суспензии×24 ч. Несмотря на то, что ХГЛ активность полученного штамма *Y. lipolytica* достаточно низкая, его способность к биотрансформации холестерина в прегненолон *in vivo* указывает на возможность проведения оптимизации условий культивирования штамма с целью увеличения его активности, что, возможно, сделает его пригодным для применения в биотехнологических целях.

6 ВЫВОДЫ

1. Изменение порядка генов, кодирующих белки ХГЛ системы (цитохром P450_{ssc}, AdR и Adx) в кассете 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_{ssc} 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 HEK293T) в форме саморасщепляющегося полипротеина, включающего белки ХГЛ системы, разделенные пептидами 2А вируса ящура.
4. Присутствие на С-конце цитохрома P450_{ssc} дополнительных 18 аминокислотных остатков, происходящих из 2А-пептида, не препятствует проявлению его каталитической активности.
4. 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_{ssc} в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.
5. 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.
6. Эффективность расщепления полипротеина CHL-2А и локализация образующихся белков в клетках дрожжей *S. cerevisiae* и клетках человека HEK293T не зависят от типа эукариотической клетки, а определяются его аминокислотной последовательностью.
7. В митохондриях клеток HEK293T отсутствуют цитохром P450_{ssc} и 3β-гидроксистероиддегидрогеназа, и присутствуют электрон-транспортные белки, способные обеспечить функционирование цитохрома P450_{ssc}, что позволяет рассматривать клетки HEK293T как нестероидогенные и пригодные для экспрессии генов и изучения характеристик стероидогенных белков.

7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Турко, И.В., Адамович, Т.Б., Кириллова, С.А., Усанов, С.А., Чашин, В.Л. (1988). Ковалентно связанный комплекс цитохрома P450 с аденодоксином. *Биохимия*, 53, 1810-1816.
2. Чашин В.Л. (1985). Структура и функция монооксигеназных систем митохондрий коры надпочечников. Дисс. докт. хим. наук, Институт биоорганической химии АН Белоруси, Минск, с. 270.
3. Шашкова Т. В., Лузиков В. Н. и Новикова Л. А. (2006). Совместная экспрессия всех компонентов холестерингидроксилазной/лиазной системы в клетках *Escherichia coli*. *Биохимия*, 71, 996–1001.
4. Amann, E., Ochs, B., Abel, K.-J. (1988) Tightly regulated tac promoter vectors useful for expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*, 69, 301-315.
5. Amrani, A. E., Barakate, A., Askari, B. M., Li, X., Roberts, A. G., Ryan, M. D., Halpin, C. (2004). Coordinate expression and independent subcellular targeting of multiple proteins from a single transgene. *Plant Physiology*, 135, 16–24.
6. Auchus, R. J. (2001) Genetics, pathophysiology, and management of human deficiencies of P450c17. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America*, 30, 101–119.
7. Bairoch, A., Bucher, P., & Hofmann, K. (1997). The PROSITE database, its status in 1997. *Nucleic Acids Research*, 25, 217–221.
8. Baker, B.Y, Yaworsky, D.C, & Miller, W.L. (2005). A pH-dependent molten globule transition is required for activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(50), 41753-41760.
9. Barnes, H. J., Arlotto, M. P., & Waterman, M. R. (1991). Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17R-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 5597–5601.
10. Barth, G., & Gaillardin, C. (1996) *Yarrowia lipolytica*. In Nonconventional yeasts in biotechnology (Wolf, K., ed.), A Handbook, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 313-388.
11. Beekwilder, J., van Rossum, H. M., Koopman, F., Sonntag, F., Buchhaupt, M., Schrader, J., Hall, R. D., Bosch, D., Pronk, J. T., van Maris, A. J., & Daran, J. M. (2014). Polycistronic expression of a β -carotene biosynthetic pathway in *Saccharomyces cerevisiae* coupled to β -ionone production. *Journal of Biotechnology*, 192 Pt B, 383-392.

12. Belkina, N. V., Lisurek, M., Ivanov, A. S., & Bernhardt, R. (2001). Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 87(4), 197-207.
13. Belsham, G. J. (1993). Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 60(3), 241-260.
14. Bernhardt, R. (1995). Cytochrome P450: structure, function, and generation of reactive oxygen species. *Rev Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127, 137-221.
15. Bernhardt, R., Urlacher, V.B. (2014). Cytochromes P450 as promising catalysts for biotechnological application: chances and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(14), 6185-203.
16. Black, S.M., Harikrishna, J.A., Szklarz, G.D., & Miller, W.L. (1994). The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450_{scc}. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7247-7251.
17. Boeke, J. D., Xu, H., & Fink, G. R. (1988). A general method for the chromosomal amplification of genes in yeast. *Science*, 239(4837), 280-282.
18. Bose, H.S., Lingappa, V.R., & Miller, W.L. (2002). The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane. *Endocrine Research*, 28, 295-308.
19. Brentano, S. T., Black, S. M., Lin, D. & Miller, W. L. (1992) cAMP post-transcriptionally diminishes the abundance of adrenodoxin reductase mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 4099-4103.
20. Brixius-Anderko, S., Schiffer, L., Hannemann, F., Janocha, B., & Bernhardt, R. (2015). A CYP21A2 based whole-cell system in *Escherichia coli* for the biotechnological production of premedrol. *Microbial Cell Factories*, 14, 135.
21. Bureik, M., Hubel, K., Dragan, C. A., Scher, J., Becker, H., Lenz, N., & Bernhardt, R. (2004) Development of test systems for the discovery of selective human aldosterone synthase (CYP11B2) and 11beta-hydroxylase (CYP11B1) inhibitors. Discovery of a new lead compound for the therapy of congestive heart failure, myocardial fibrosis and hypertension. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 217, 249-254.
22. Bureik, M., Schiffler, B., Hiraoka, Y., Vogel, F., & Bernhardt, R. (2002). Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, etp1. *Biochemistry*, 41(7), 2311-2321.

23. Cao, P. R., Bülow, H., Dumas, B., & Bernhardt, R. (2000). Construction and characterization of a catalytic fusion protein system: P-450(11beta)-adrenodoxin reductase-adrenodoxin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1476(2), 253-264.
24. Carballeira, J. D., Quezada, M. A., Hoyos, P., Simeó, Y., Hernaiz, M. J., Alcantara, A. R., & Sinisterra, J. V. (2009) Microbial cells as catalysts for stereo selective redox reactions. *Biotechnology Advances*, 27(6), 686–714.
25. Chang, L. L., Wun, W. S. A., Lin, Y. L. & Wang, P. S. (2004) Effects of S-petasin on cyclic AMP production and enzyme activity of P450scc in rat zona fasciculata-reticularis cells. *European Journal of Pharmacology*, 489(1-2), 29-37.
26. Chashchin, V.L., Usanov, S.A., Lapko, V.N., Adamovich, T.B., Shkumatov, V.M., & Akhrem, A.A. (1986). Chemistry of Peptides and Proteins (Voelter, W., Bayer, E., Ovchinnikov, Yu., Ivanov, V., eds.), Berlin –New York: Walter de Greyter and Co, pp. 177-189.
27. Chng, J., Wang, T., Nian, R., Lau, A., Hoi, K. M., Ho, S. C., Gagnon, P., Bi, X., & Yang, Y. (2015). Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs*, 7(2), 403-412.
28. Chung, B.C., Matteson, K.J., Voutilainen, R., Mohandas, T.K., & Miller, W.L. (1986). Human cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450scc: cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15, and expression in the placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(23), 8962-8966.
29. Churchill, P.F., & Kimura, T. (1979). Topological studies of cytochromes P-450scc and P-45011 beta in bovine adrenocortical inner mitochondrial membranes. Effects of controlled tryptic digestion. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(20), 10443-10448.
30. Cook, D. J, Finnigan, J. D, Cook, K., Black, G. W., & Charnock, S. J. Cytochromes P450: History, Classes, Catalytic Mechanism, and Industrial Application. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 105, 105-126.
31. Dalla Valle, L., Toffolo, V., Vianello, S., Belvedere, P. & Colombo, L. (2004) Expression of cytochrome P450scc mRNA and protein in the rat kidney from birth to adulthood. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 88(1), 79-89.
32. Daniels, R. W., Rossano, A. J., Macleod, G. T., & Ganetzky, B. (2014). Expression of multiple transgenes from a single construct using viral 2A peptides in Drosophila. *PLoS ONE*, 9, e100637.
33. De Amorim Araújo, J., Ferreira, T. C., Rubini, M. R., Duran, A. G., De Marco, J. L., de Moraes, L. M., & Torres, F. A. (2015). Coexpression of cellulases in *Pichia pastoris* as a self-processing protein fusion. *AMB Express*, 5(1), 84.

34. De Felipe, P., & Ryan, M. D. (2004). Targeting of proteins derived from self-processing polyproteins containing multiple signal sequences. *Traffic*, 5, 616–626.
35. De Felipe, P., Hughes, L. E., Ryan, M. D., & Brown, J. D. (2003). Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *The Journal of biological chemistry*, 278, 11441–11448.
36. De Felipe, P., Luke, G. A., Brown, J. D., & Ryan, M. D. (2010). Inhibition of 2A-mediated ‘cleavage’ of certain artificial polyproteins bearing N-terminal signal sequences. *Biotechnology Journal*, 5, 213–223.
37. Dechamma, H. J., AshokKumar, C., Nagarajan, G., & Suryanarayana, V. V. (2008). Processing of multimer FMD virus VP1-2A protein expressed in *E. coli* into monomers. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46, 760–763.
38. Dilworth, F.J., Black, S.M., Guo, Y.D., Miller, W.L., & Jones, G. (1996). Construction of a P450c27 fusion enzyme: a useful tool for analysis of vitamin D3 25-hydroxylase activity. *Biochemical Journal*, 320 (Pt 1), 267-271.
39. Donnelly, M. L. L., Gani, D., Flint, M., Monaghan, S., & Ryan, M. D. (1997). The cleavage activities of aphthovirus and cardiovirus 2A proteins. *Journal of General Virology*, 78, 13–21.
40. Donnelly, M. L. L., Luke, G., Mehrotra, A., Li, X., Hughes, L. E., Gani, D., & Ryan, M. D. (2001a) Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein ‘cleavage’ mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: a putative ribosomal ‘skip’. *Journal of General Virology*, 82, 1013–1025.
41. Donnelly, M. L., Hughes, L. E., Luke, G., Mendoza, H., ten Dam, E., Gani, D., & Ryan, M. D. (2001b) The “cleavage” activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring “2A-like” sequences. *Journal of General Virology*, 82, 1027–1041.
42. Donova, M. V., & Egorova, O. V. (2012). Microbial steroid transformations: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(6), 1423-1447.
43. Donova, M. V., Dovbnya, D. V., Sukhodolskaya, G. V., Khomutov, S. M., Nikolayeva, V. M., Kwon, I., & Han, K. (2005). Microbial conversion of sterol-containing soybean oil production waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80, 55-60.
44. Doronina, V. A., Wu, C., de Felipe, P., Sachs, M. S., Ryan, M. D., & Brown, J. D. (2008). Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon. *Molecular and Cellular Biology*, 28(13), 4227-4239.
45. Drăgan, C. A., Hartmann, R. W., & Bureik, M. (2006). A fission yeast-based test system for the determination of IC50 values of anti-prostate tumor drugs acting on CYP21. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21(5), 547-556.

46. Drăgan, C.A., Zearo, S., Hannemann, F., Bernhardt, R., & Bureik, M. (2005). Efficient conversion of 11-deoxycortisol to cortisol (hydrocortisone) by recombinant fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Research*, 5(6-7), 621-625.
47. Driscoll, W. J. & Omdahl, J. L. (1986) Kidney and adrenal mitochondria contain two forms of NADPH-adrenodoxin reductase-dependent iron-sulfur proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 4122-4125.
48. Dumas, B., Brocard-Masson, C., Assemet-Lebrun, K., & Achstetter, T. (2006). Hydrocortisone made in yeast: metabolic engineering turns a unicellular microorganism into a drug-synthesizing factory. *Biotechnology Journal*, 1(3), 299-307.
49. Duport, C., Schoepp, B., Chatelain, E., Spagnoli, R., Dumas, B., & Pompon, D. (2003). Critical role of the plasma membrane for expression of mammalian mitochondrial side chain cleavage activity in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 270(7), 1502-1514.
50. Eacker, S.M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H.L., Gong, E.Y., Lee, K., & Braun, R.E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Molecular Endocrinology*, 22, 623-635.
51. Ehmer, P. B., Bureik, M., Bernhardt, R., Müller, U., & Hartmann, R. W. (2002). Development of a test system for inhibitors of human aldosterone synthase (CYP11B2): screening in fission yeast and evaluation of selectivity in V79 cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 81(2), 173-179.
52. Ehmer, P. B., Jose, J., & Hartmann, R. W. (2000). Development of a simple and rapid assay for the evaluation of inhibitors of human 17 α -hydroxylase-C(17,20)-lyase (P450c17) by coexpression of P450c17 with NADPH-cytochrome-P450-reductase in *Escherichia coli*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 75(1), 57-63.
53. Ehrhardt, M., Gerber, A., Hannemann, F., & Bernhardt, R. (2016). Expression of human CYP27A1 in *B. megaterium* for the efficient hydroxylation of cholesterol, vitamin D3 and 7-dehydrocholesterol. *Journal of Biotechnology*, 218, 34-40.
54. Fang, J., Qian, J. J., Yi, S., Harding, T. C., Tu, G. H., VanRoey, M., & Jooss, K. (2005). Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nature Biotechnology*, 23(5), 584-590.
55. Fardella, C.E., & Miller, W.L. (1996). Molecular biology of mineralocorticoid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 16, 443–470.
56. Flück, C.E., & Miller, W.L. (2008). Disorders of the Human Adrenal Cortex. *Endocr Dev*. Basel, Karger, vol 13, pp 1–18.

57. Förster, A., Jacobs, K., Juretzek, T., Mauersberger, S., & Barth, G. (2007). Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(4), 861-869.
58. Fujiki, M., & Verner, K. (1993). Coupling of cytosolic protein synthesis and mitochondrial protein import in yeast. Evidence for cotranslational import *in vivo*. *The Journal of biological chemistry*, 268, 1914–1920.
59. Furler, S., Paterna, J. C., Weibel, M., & Büeler, H. (2001). Recombinant AAV vectors containing the foot and mouth disease virus 2A sequence confer efficient bicistronic gene expression in cultured cells and rat substantia nigra neurons. *Gene Therapy*, 8, 864–873.
60. Gao, Y., Sun, S. Q., & Guo, H. C. (2016). Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology Journal*, 13, 107.
61. Gao, Z. L., Zhou, J. H., Zhang, J., Ding, Y. Z., & Liu, Y. S. (2014). The silent point mutations at the cleavage site of 2A/2B have no effect on the self-cleavage activity of 2A of foot-and-mouth disease virus. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 101-106.
62. Gerber, A., Kleser, M., Biedendieck, R., Bernhardt, R., & Hannemann, F. (2015). Functionalized PHB granules provide the basis for the efficient side-chain cleavage of cholesterol and analogs in recombinant *Bacillus megaterium*. *Microbial Cell Factories*, 14, 107.
63. Gillam, E. M., Aguinaldo, A. M., Notley, L. M., Kim, D., Mundkowski, R. G., Volkov, A. A., Arnold, F. H., Soucek, P., DeVoss, J. J., & Guengerich, F. P. (1999). Formation of indigo by recombinant mammalian cytochrome P450. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(2), 469-472.
64. Girhard, M., Machida, K., Itoh, M., Schmid, R.D., Arisawa, A., & Urlacher, V.B. (2009). Regioselective biooxidation of (+)-valencene by recombinant *E. coli* expressing CYP109B1 from *Bacillus subtilis* in a two-liquid-phase system. *Microbial Cell Factories*, 8, 36.
65. Grinberg, A.V., Hannemann, F., Schiffler, B., Müller, J., Heinemann, U., Bernhardt, R. (2000). Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties. *Proteins*, 40(4), 590-612.
66. Groot Bramel-Verheije, M. H., Rottier, P. J., & Meulenberg, J. J. (2000). Expression of a foreign epitope by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 278(2), 380-389.
67. Guengerich, F. P., Gillam, E. M. J., Ohmori, S., Sandhu, P., Brian, W. R., Sari, M.–A., & Iwasaki, M. (1993). Expression of human cytochrome P450 enzymes in yeast and bacteria and relevance to studies on catalytic specificity. *Toxicology*, 1993, 82, 21-37.
68. Guengerich, F.P., Waterman, M.R., & Egli, M. (2016). Recent structural insights into cytochrome P450 function. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37, 625–640.

69. Ha, S.-H., Liang, Y. S., Jung, H., Ahn, M.-J., Suh, S.-C., Kweon, S.-J., Kim, D. H., Kim, Y. M., & Kim, J. K. (2010). Application of two bicistronic systems involving 2A and IRES sequences to the biosynthesis of carotenoids in rice endosperm. *Plant Biotechnology Journal*, 8, 928–938.
70. Hadpech, S., Jinathep, W., Saoin, S., Thongkum, W., Chupradit, K., Yasamut, U., Moonmuang, S. & Tayapiwatana, C. (2018) Impairment of a membrane-targeting protein translated from a downstream gene of a “self-cleaving” T2A peptide conjunction. *Protein Expression and Purification*, 150, 17-25.
71. Hakki, T., & Bernhardt, R. (2006). CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(1), 27-52.
72. Halpin, C., Cooke, S. E., Barakate, A., El Amrani, A., & Ryan, M. D. (1999). Self-processing 2A-polypeptides - A system for coordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. *The Plant Journal*, 17, 453–459.
73. Handratta, V. D., Vasaitis, T. S., Njar, V. C., Gediya, L. K., Kataria, R., Chopra, P., Newman, D. Jr., Farquhar, R., Guo, Z., Qiu, Y., & Brodie, A.M. (2005) Novel C-17-heteroaryl steroidal CYP17 inhibitors/antiandrogens: synthesis, *in vitro* biological activity, pharmacokinetics, and antitumor activity in the LAPC4 human prostate cancer xenograft model. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 2972-2984.
74. Hannemann, F., Virus, C., & Bernhardt, R. (2006). Design of an *Escherichia coli* system for whole cell mediated steroid synthesis and molecular evolution of steroid hydroxylases. *Journal of Biotechnology*, 124(1), 172-181.
75. Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M., & Bernhardt, R. (2007) Cytochrome P450 systems-biological variations of electron transport chains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1770(3), 330-344.
76. Hanukoglu, I., & Hanukoglu, Z. (1986). Stoichiometry of mitochondrial cytochromes P-450, adrenodoxin and adrenodoxin reductase in adrenal cortex and corpus luteum. Implications for membrane organization and gene regulation. *European Journal of Biochemistry*, 157, 27–31.
77. Hanukoglu, I., & Hanukoglu, Z. (1986). Stoichiometry of mitochondrial cytochromes P-450, adrenodoxin and adrenodoxin reductase in adrenal cortex and corpus luteum. Implications for membrane organization and gene regulation. *European Journal of Biochemistry*, 157, 27–31.
78. Hanukoglu, I., Suh, B.S., Himmelhoch, S., & Amsterdam, A. (1990). Induction and mitochondrial localization of cytochrome P450_{scc} system enzymes in normal and transformed ovarian granulosa cells. *The Journal of Cell Biology*, 111(4), 1373-1381.

79. Harikrishna, J.A., Black, S.M., Szklarz, G.D., & Miller, W.L. (1993). Construction and function of fusion enzymes of the human cytochrome P450_{sc} system. *DNA and Cell Biology*, 12(5), 371-379.
80. Hartmann, R. W., Paluszczak, A., Lacan, F., Ricci, G., & Ruzziconi, R. (2004) CYP 17 and CYP 19 inhibitors. Evaluation of fluorine effects on the inhibiting activity of regioselectively fluorinated 1-(Naphthalen-2-ylmethyl)imidazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19, 145-155.
81. Hausjell, J., Halbwirth, H., & Spadiut, O. (2018). Recombinant production of eukaryotic cytochrome P450s in microbial cell factories. *Bioscience Reports*, 38(2). pii: BSR20171290.
82. Herráiz, I. (2017). Chemical Pathways of Corticosteroids, Industrial Synthesis from Sapogenins. *Methods in Molecular Biology*, 1645, 15-27.
83. Herrmann, J. M., Folsch, H., Neupert, W., & Stuart, R. A. (1994). In D. E. Celis (Ed.), *Cell biology handbook*, Vol. 1. San Diego, CA: Academic Press, Inc.
84. Hesselink, P. G. M., van Vliet, S., de Vries, H., & Witholt, B. (1989). Optimization of steroid side-chain cleavage by *Mycobacterium sp.* in the presence of cyclodextrins. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 398–404.
85. Holst, J., Vignali, K. M., Burton, A. R., & Vignali, D. A. (2006). Rapid analysis of T-cell selection *in vivo* using T cell-receptor retrogenic mice. *Nature Methods*, 3(3), 191-197. Erratum in: *Nature Methods*. 2006, 3(4), 327.
86. Inui, H., Maeda, A., Ohkawa, H. (2007). Molecular characterization of specifically active recombinant fused enzymes consisting of CYP3A4, NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase, and cytochrome b5. *Biochemistry*, 46(35), 10213-10221.
87. Ishimura, K., & Fujita, H. (1997). Light and electron microscopic immunohistochemistry of the localization of adrenal steroidogenic enzymes. *Microscopy Research and Technique*, 36(6), 445-453.
88. Issop, L., Rone, M.B., & Papadopoulos, V. (2013). Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371(1-2), 34-46.
89. Jackson, C. J., Lamb, D. C., Marczylo, T. H., Warrilow, A. G., Manning, N. J., Lowe, D. J., Kelly D. E., & Kelly S. L. (2002). A novel sterol 14 α -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus capsulatus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(49), 46959–46965.
90. Janocha, S., & Bernhardt, R. (2013). Design and characterization of an efficient CYP105A1-based whole-cell biocatalyst for the conversion of resin acid diterpenoids in permeabilized *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7639–7649.

91. Jenkins CM, & Waterman MR. (1994). Flavodoxin and NADPH-flavodoxin reductase from *Escherichia coli* support bovine cytochrome P450c17 hydroxylase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27401-27408.
92. Jenkins, C.M., Genzor, C.G., Fillat, M.F., Waterman, M.R., & Gómez-Moreno, C. (1997b). Negatively charged anabaena flavodoxin residues (Asp144 and Glu145) are important for reconstitution of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 22509-22513.
93. Jenkins, C.M., Pikuleva, I., Kagava, N., & Waterman, M.R. (1997a). *Escherichia coli* flavodoxin sepharose as an affinity resin for cytochromes P450 and use to identify a putative cytochrome P450c17/3beta-hydroxysteroid dehydrogenase interaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 347, 93-102.
94. Johnson, E.F, & Stout, C.D. (2013). Structural diversity of eukaryotic membrane cytochrome P450s. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, 17082–17090.
95. Juretzek, T., Le Dall, M., Mauersberger, S., Gaillardin, C., Barth, G., & Nicaud, J. (2001). Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 18(2), 97-113.
96. Juretzek, T., Mauersberger, S., Schunck, W-H., Nicaud, J.-M., Barth, G. (1999) Functional expression of heterologous cytochrome P450 in the yeast *Yarrowia lipolytica* and its use in biotransformation of steroids. *Current Genetics*, 35, 307-311.
97. Kim, J., Lee, S., Li, L., Park, H., Park, J., Lee, K., Kim, M. K., Shin, B. A., & Choi, S. Y. (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE*, 6, e18556.
98. Kjær, J., & Belsham, G. J. (2018). Modifications to the Foot-and-Mouth Disease Virus 2A Peptide: Influence on Polyprotein Processing and Virus Replication. *Journal of Virology*, 92(8), pii: e02218-17.
99. Klingenberg, M. (1958). Pigments of Rat Liver Microsomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 75(2), 376-386.
100. Knutson, T. P., & Lange, C. A. (2014). Tracking progesterone receptor-mediated actions in breast cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(1), 114-125.
101. Kovaleva, I.E., Novikova, L.A., Nazarov, P.A., Grivennikov, S.I., & Luzikov, V.N. (2003). Effects of various N-terminal addressing signals on sorting and folding of mammalian CYP11A1 in yeast mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 270(2), 222-229.
102. Kruse, K., Förster, A., Juretzek T, Mauersberger, S., & Barth, G. (2004) Method for the biotechnological production of citric acid by means of a genetically modified yeast *Yarrowia lipolytica*. WO2004/009828, DE10333144.

- 103.Kubeil, C., Yeung, J. C. I., Tuckey, R. C., Rodgers, R. J., & Martin, L. L. (2016). Membrane-mediated protein-protein interactions of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 with its associated electron transport proteins. *ChemPlusChem*, 81, 995–1002.
- 104.Kuwada, M., Kitajima, R., Suzuki, H., & Horie, S. (1991). Purification and properties of cytochrome P-450 (SCC) pig testis mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 176, 1501–1508.
- 105.Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- 106.Lambeth, J.D., Seybert, D.W., & Kamin, H. (1979). Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, 7255-7264.
- 107.Lee, D. S., Lee, K. H., Jung, S., Jo, E. J., Han, K. H., & Bae, H. J. (2012). Synergistic effects of 2A-mediated polyproteins on the production of lignocellulose degradation enzymes in tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4797–4810.
- 108.Lengler, J., Holzmüller, H., Salmons, B., Günzburg, W. H., & Renner, M. (2005). FMDV-2A sequence and protein arrangement contribute to functionality of CYP2B1-reporter fusion protein. *Analytical Biochemistry*, 343(1), 116-124.
- 109.Lin, D., Shi Y., & Miller, W.L. (1990). Cloning and sequence of the human adrenodoxin reductase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 1955-1962.
- 110.Lin, Y. C., Boone, M., Meuris, L., Lemmens, I., Van Roy, N., Soete, A., Reumers, J., Moisse, M., Plaisance, S., Drmanac, R., Chen, J., Speleman, F., Lambrechts, D., Van de Peer, Y., Tavernier, J. & Callewaert, N. (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nature Communications*, 5, 4767.
- 111.Lin, Y., Hung, C. Y., Bhattacharya, C., Nichols, S., Rahimuddin, H., Kittur, F. S., Leung, T., & Xie, J. (2018). An Effective Way of Producing Fully Assembled Antibody in Transgenic Tobacco Plants by Linking Heavy and Light Chains via a Self-Cleaving 2A Peptide. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1379.
- 112.Lorenzo, C., Pérez-Chacón, G., Garaulet, G., Mallorquín, Z., Zapata, J. M., & Rodríguez, A. (2015). Efficient expression of bioactive murine IL12 as a self-processing P2A polypeptide driven by inflammation-regulated promoters in tumor cell lines. *Cancer Gene Therapy*, 22(11), 542-551.
- 113.Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193, 265–270.

114. Makeeva, D. S., Dovbnya, D. V., Donova, M. V., & Novikova, L. A. (2013). Functional reconstruction of bovine P450_{scc} steroidogenic system in *Escherichia coli*. *American Journal of Molecular Biology*, 3, 173–182.
115. Marg, A., Kuban, R.J., Behlke, J., Dettmer, R., & Ruckpaul, K. (1992). Crystallization and X-ray examination of bovine adrenodoxin. *Journal of Molecular Biology*, 227, 945-947.
116. Maruya, N., Hiwatashi, A., Ichikawa, Y. & Yamano, T. (1983) Purification and characterization of renal ferredoxin from bovine renal mitochondria. *The Journal of Biochemistry*, 93, 1239-1247.
117. Mast, N., Annalora, A.J., Lodowski, D.T., Palczewski, K., Stout, C.D., & Pikuleva, I.A. (2011). Structural basis for three- step sequential catalysis by the cholesterol side chain cleavage enzyme CYP11A1. *The Journal of Biological Chemistry*, 286, 5607–5613.
118. Matocha, M.F., & Waterman, M.R. (1984). Discriminatory procysing of the precursor forms of cytochrome P450_{scc} and adrenodoxin by adrenocortical and heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 8672-8678.
119. Mellon, S. H., Bair, S. R., & Monis, H. (1995). P450_{c11B3} mRNA, transcribed from a third P450_{c11} gene, is expressed in a tissue-specific, developmentally, and hormonally regulated fashion in the rodent adrenal and encodes a protein with both 11-hydroxylase and 18-hydroxylase activities. *The Journal of Biological Chemistry*, 270, 1643–1649.
120. Mellon, S. H., Kushner, J. A. & Vaisse, C. (1991) Expression and regulation of adrenodoxin and P450_{scc} mRNA in rodent tissues. *DNA and Cell Biology*, 10, 339-347.
121. Miller, W.L. (2005). Minireview: regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology*, 46(6), 2544-2550.
122. Miller, W.L. (2017a). Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 165(Pt A), 18-37.
123. Miller, W.L. (2017b) Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(11), 771-793.
124. Minskaia, E., & Ryan, M. D. (2013). Protein coexpression using FMDV 2A: effect of "linker" residues. *BioMed Research International*, 2013, 291730.
125. Monostory, K., & Dvorak, Z. (2011). Steroid regulation of drug-metabolizing cytochromes P450. *Current Drug Metabolism*, 12(2), 154-172.
126. Morochashi, K., Fuji-Kuriyama, Y., Okada, Y., Sogawa, Y., Hirose, T., & Inayama, S. (1984). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA from mRNA of mitochondrial cytochrome P450_{scc} of bovine adrenal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 4647–4651.

127. Müller, A., Müller, J.J., Muller, Y.A., Uhlmann, H., Bernhardt, R., & Heinemann, U. (1998). New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108). *Structure*, 6(3), 269-280.
128. Müller, J.J., Lapko, A., Bourenkov, G., Ruckpaul, K., Heinemann, U. (2001). Adrenodoxin reductase-adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2786-2789.
129. Muller-Vieira, U., Angotti, M., & Hartmann, R. W. (2005) The adrenocortical tumor cell line NCI-H295R as an *in vitro* screening system for the evaluation of CYP11B2 (aldosterone synthase) and CYP11B1 (steroid-11beta-hydroxylase) inhibitors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 96, 259–270.
130. Nabi, N., Kominami, S., Takemori, S., & Omura, T. (1983). Contributions of cytoplasmic free and membrane-bound ribosomes to the synthesis of mitochondrial cytochrome P450 (SCC) and P450 (11-beta and microsomal cytochrome P450 (C-21) in bovine adrenal cortex. *The Journal of Biochemistry*, 94, 1517-1527.
131. Narhi, L. O., & Fulco, A. J. (1986). Characterization of a catalytically self-sufficient 119,000-Dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 261(16), 7160–7169.
132. Nazarov, P. A., Drutsa, V. L., Miller, W. L., Shkumatov, V. M., Luzikov, V. N., & Novikova, L. A. (2003). Formation and functioning of fused cholesterol side-chain cleavage enzymes. *DNA Cellular Biology*, 22, 243–252.
133. Nebert, D. W., Wikvall, K., & Miller, W. L. (2013). Human cytochromes P450 in health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 368(1612), 20120431.
134. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzalez, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., & Nebert, D.W. (1993). The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA and Cell Biology*, 12(1), 1–51.
135. Nicaud, J. M. (2012) *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 29(10), 409-418.
136. Nonaka, Y., Murakami, H., Yabusaki, Y., Karamitsu, S., Kagamiama, H., Yamano, T., & Okamoto, M. (1987). Molecular cloning and sequence analysis of full-length cDNA for mRNA of adrenodoxin oxidoreductase from bovine adrenal cortex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 145, 1239-1247.
137. Novikova, L. A., Faletrov, Y. V., Kovaleva, I. E., Mauersberger, S., Luzikov, V. N., & Shkumatov, V. M. (2009). From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering. *Biochemistry (Moscow)*, 74(13), 1482-1504.

- 138.Ohyama, Y., Noshiro, M., & Okuda, K. (1991). Cloning and expression of cDNA encoding 25-hydroxyvitamin D3 24-hydroxylase. *FEBS Letters*, 278(2), 195–198.
- 139.Omura, T., & Ito, A. (1991). Biosynthesis and intracellular sorting of mitochondrial forms of cytochrome P450. *Methods in Enzymology*, 206, 75-81.
- 140.Omura, T., & Sato, R. (1964). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 2379–2385.
- 141.Orme-Johnson, N.R. (1990). Distinctive properties of adrenal cortex mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1020(3), 213-231.
- 142.Osborn, M. J., Panoskaltsis-Mortari, A., McElmurry, R. T., Bell, S. K., Vignali, D. A., Ryan, M. D., Wilber, A. C., McIvor, R. S., Tolar, J., & Blazar, B. R. (2005). A picornaviral 2A-like sequence-based tricistronic vector allowing for high-level therapeutic gene expression coupled to a dual-reporter system. *Molecular Therapy*, 12, 569–574.
- 143.Pagotto, M. A., Roldán, M. L., Pagotto, R. M., Lugano, M. C., Pisani, G. B., Rogic, G., Molinas, S. M., Trumper, L., Pignataro, O. P. & Monasterolo, L. A. (2011) Localization and functional activity of cytochrome P450 side chain cleavage enzyme (CYP11A1) in the adult rat kidney. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 332(1-2), 253-260.
- 144.Parikh, A., Gillam, E. M., & Guengerich, F. P. (1997). Drug metabolism by *Escherichia coli* expressing human cytochromes P450. *Nature Biotechnology*, 15, 784–788.
- 145.Park, M., Kang, K., Park, S., Kim, Y. S., Ha, S.-H., Lee, S. W., Ahn, M. J., Bae, J. M., & Back, K. (2008). Expression of serotonin derivative synthetic genes on a single self-processing polypeptide and the production of serotonin derivatives in microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 43–49.
- 146.Payne, A.H., & Hales, D.B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*, 25, 947-970.
- 147.Pezzi, V., Mathis, J. M., Rainey, W. E. & Carr, B. R. (2003) Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 87, 181-189.
- 148.Pikuleva, I.A. (2004). Putative F-G loop is involved in association with the membrane in P450_{scc} (P450 11A1). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215, 161–164.
- 149.Pompon, D. (1988) cDNA cloning and functional expression in *S. cerevisiae* of beta-naphthoflavine-induced rabbit liver P450 LM4 and LM6. *European Journal of Biochemistry*, 177, 285-293.

- 150.Porter, D., & Kasper, C.B. (1986). NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: Flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. *Biochemistry*, 25(7), 1682–1687.
- 151.Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C., & Kraut, J. (1985). The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *The Journal of Biological Chemistry*, 260, 16122–16130.
- 152.Provost, E., Rhee, J., & Leach, S. D. (2007). Viral 2A peptides allow expression of multiple proteins from a single ORF in transgenic zebrafish embryos. *Genesis*, 45(10), 625–629.
- 153.Puchkaev, A. V., & Ortiz de Montellano, P. R. (2005). The *Sulfolobus solfataricus* electron donor partners of thermophilic CYP119: An unusual non-NAD(P)H-dependent cytochrome P450 system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 434(1), 169–177.
- 154.Quehl, P., Hollender, J., Schüürmann, J., Brossette, T., Maas, R., & Jose J. (2016). Co-expression of active human cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 reductase on the cell surface of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 15, 26.
- 155.Ralley, L., Enfissi, E. M., Misawa, N., Schuch, W., Bramley, P. M., & Fraser, P. D. (2004). Metabolic engineering of ketocarotenoid formation in higher plants. *The Plant Journal*, 39, 477–486.
- 156.Rasala, B. A., Chao, S. S., Pier, M., Barrera, D. J., & Mayfield, S. P. (2014). Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. *PLOS One*, 9(4), e94028.
- 157.Rhee, S.K., Ichio, T., & Wickner, R.B. (1989). Structure and nuclear localization signal of the SKI3 antiviral protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 5, 149–158.
- 158.Ringle, M., Khatri, Y., Zapp, J., Hannemann, F., & Bernhardt, R. (2013). Application of a new versatile electron transfer system for cytochrome P450-based *Escherichia coli* whole-cell bioconversions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7741–7754.
- 159.Roongsawang, N., Promdonkoy, P., Wongwanichpokhin, M., Sornlake, W., Puseenam, A., Eurwilaichitr, L., & Tanapongpipat, S. (2010). Coexpression of fungal phytase and xylanase utilizing the cisacting hydrolase element in *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 10, 909–916.
- 160.Rothwell, D. G., Crossley, R., Bridgeman, J. S., Sheard, V., Zhang, Y., Sharp, T. V., Hawkins, R. E., Gilham, D. E., & McKay, T. R. (2010). Functional expression of secreted proteins from a bicistronic retroviral cassette based on foot-and-mouth disease virus 2A can be position dependent. *Human Gene Therapy*, 21, 1631–1637.
- 161.Ryan, M. D., & Drew, J. (1994). Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *The EMBO Journal*, 13, 928–933.

162. Ryan, M. D., King, A. M., & Thomas, G. P. (1991). Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *Journal of General Virology*, 72 (Pt 11), 2727-2732.
163. Saberi, M. R., Shah, K., & Simons, C. (2005) Benzofuran- and furan-2-yl-(phenyl)-3-pyridylmethanols: synthesis and inhibition of P450 aromatase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 20, 135-141.
164. Sakaki, T., Akiyoshi-Shibata, M., Yabusaki, Y., & Ohkawa, H. (1992). Organella-targeted expression of rat liver cytochrome P450c27 in yeast. Genetically engineered alteration of mitochondrial P450 into a microsomal form creates a novel functional electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 16497-16502.
165. Samalova, M., Fricker, M., & Moore, I. (2006). Ratiometric fluorescence-imaging assays of plant membrane traffic using polyproteins. *Traffic*, 7(12), 1701-1723.
166. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (2nd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
167. Savel'ev, A. S., Novikova, L. A., Kovaleva, I. E., Luzikov, V. N., Neupert, W., & Langer, T. (1998). ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20596-20602.
168. Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S., Takeyama, K., Kato, S., & Inouye, K. (1999). Enzymatic properties of human 25-hydroxy-vitamin D3 1 α -hydroxylase. *European Journal of Biochemistry*, 265, 959–956.
169. Schiffer, L., Anderko, S., Hobler, A., Hannemann, F., Kagawa, N., & Bernhardt, R. (2015). A recombinant CYP11B1 dependent *Escherichia coli* biocatalyst for selective cortisol production and optimization towards a preparative scale. *Microbial Cell Factories*, 14, 25.
170. Schiffler, B., Kiefer, M., Wilken, A., Hannemann, F., Adolph, H. W., & Bernhardt, R. (2001). The interaction of bovine adreno- doxin with CYP11A1 (cytochrome P450_{scc}) and CYP11B1 (cytochrome P450_{11 β}). Acceleration of reduction and substrate conversion by site-directed mutagenesis of adrenodoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 36225–36232.
171. Serizawa, N., & Matsuoka, T. (1991). A two component-type cytochrome P-450 monooxygenase system in a prokaryote that catalyzes hydroxylation of ML-236B to pravastatin, a tissue-selective inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1084(1), 35-40.
172. Seth-Smith, H. M. B., Rosser, S. J., Basran, A., Travis, E. R., Dabbs, E. R., Nicklin, S., & Bruce, N. C. (2002). Cloning, sequencing, and characterization of the hexahydro-1,3,5-tri- nitro-

- 1,3,5-triazine degradation gene cluster from *Rhodococcus rhodochrous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 4764–4771.
173. Sevrioukova, I.F., Peterson, J.A. (1995). NADPH-P-450 reductase: structural and functional comparisons of the eukaryotic and prokaryotic isoforms. *Biochimie*, 77(7-8), 562-572.
174. Shashkova, T. V., Luzikov, V. N., & Novikova, L. A. (2006). Coexpression of all constituents of the cholesterol hydroxylase/lyase system in *Escherichia coli* cells. *Biochemistry*, 71, 810–814.
175. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. & Graham, F. L. (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *The FASEB Journal*, 16, 869-871.
176. Shet, M. S., Fisher, C. W., & Estabrook, R. W. (1997). The function of recombinant cytochrome P450s in intact *Escherichia coli* cells: The 17 alpha-hydroxylation of progesterone and pregnenolone by P450c17. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339, 218–225.
177. Shkumatov, V. M., Radyuk, V. G., Falertov, Y. V., Vinogradova, A. A., Luzikov, V. N., & Novikova, L. A. (2006). Expression of cytochrome P450scc in *Escherichia coli* cells: Intracellular location and interaction with bacterial redox proteins. *Biochemistry*, 71, 884–892.
178. Sibbesen, O., DeVoss, J. J., & Ortiz de Montellano, P. R. (1996) Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome P450cam triple fusion protein. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 22462–22469.
179. Simmons, A. D., Moskalenko, M., Creson, J., Fang, J., Yi, S., VanRoey, M. J., Allison, J. P. & Jooss, K. (2008). Local secretion of anti-CTLA-4 enhances the therapeutic efficacy of a cancer immunotherapy with reduced evidence of systemic autoimmunity. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 57, 1263–1270.
180. Slominski, A.T., Zmijewski, M.A., Semak, I., Zbytek, B., Pisarchik, A., Li, W., Zjawiony, J., & Tuckey, R.C. (2014). Cytochromes p450 and skin cancer: role of local endocrine pathways. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14(1), 77–96.
181. Smith, B. D., Sanders, J. L., Porubsky, P. R., Lushington, G. H., Stout, C. D., & Scott, E. E. (2007). Structure of the human lung cytochrome P450 2A13. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 17306–17313.
182. Solish, S.B., Picado-Leonard, J., Morel, Y., Kuhn, R.W., Mohandas, T.K., Hanukoglu, I., & Miller, W.L. (1988). Human adrenodoxin reductase: Two mRNAs encoded by a single gene on chromosome 17cen-q25 are expressed in steroidogenic tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 7104-7108.
183. Speiser, P. W. (2010) Growth and development: congenital adrenal hyperplasia-glucocorticoids and height. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(1), 14-15.

184. Stavropoulou, E., Pircalabioru, G.G., & Bezirtzoglou, E. (2018). The role of cytochromes P450 in infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 89.
185. Steinborn, G., Gellissen, G., & Kunze, G. (2007). A novel vector element providing multicopy vector integration in *Arxula adenivorans*. *FEMS Yeast Research*, 7(7), 1197-1205.
186. Storbeck, K.H., Swart, P., Graham, S., & Swart, A.C. (2004). The influence of the amino acid substitution I98K on the catalytic activity of baboon cytochrome P450 side-chain cleavage (CYP11A1). *Endocrine Research*, 30, 761–767.
187. Strushkevich, N., MacKenzie, F., Cherkasova, T., Grabovec, I., Usanov, S., & Park, H.-W. (2011). Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 10139–10143.
188. Sueyoshi, T., Park, L. J., Moore, R., Juvonen, R. O., & Negishi, M. (1995). Molecular engineering of microsomal P450 2a-4 to a stable, water-soluble enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322, 265– 271.
189. Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss, J.F. III, Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, K.P., Hart, I.M., Clark, B.J., & Stocco, D.M. (1995). Human steroidogenic acute regulatory protein (StAR): Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and an expressed pseudo-gene to chromosome 13. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 4778–4782.
190. Sugimoto, H., & Shiro, Y. (2012). Diversity and substrate specificity in the structures of steroidogenic cytochrome P450 enzymes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 35, 818–823.
191. Sun, H., Zhou, N., Wang, H., Huang, D., & Lang, Z. (2017). Processing and targeting of proteins derived from polyprotein with 2A and LP4/2A as peptide linkers in a maize expression system. *PLOS One*, 12(3), e0174804.
192. Sun, Y.-F., Lin, Y., Zhang, J.-H., Zheng, S.-P., Ye, Y.-R., Liang, X.-X. & Han, S. Y. (2012). Double *Candida antarctica* lipase B codisplay on *Pichia pastoris* cell surface based on a self-processing foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1539–1550.
193. Suzuki, C. K., Rep, M., van Dijl, J. M., Suda, K., Grivell, L. A., & Schatz, G. (1997). ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 22, 118–123.
194. Szczebara, F.M., Chandelier, C., Villeret, C., Masurel, A., Bourot, S., Duport, C., Blanchard, S., Groisillier, A., Testet, E., Costaglioli, P., Cauet, G., Degryse, E., Balbuena, D., Winter, J., Achstetter, T., Spagnoli, R., Pompon, D., & Dumas, B. (2003). Total biosynthesis of hydrocortisone from a simple carbon source in yeast. *Nature Biotechnology*, 21(2), 143-149.

- 195.Szymczak, A., Workman, C., Wang, Y., Vignali, K., Dilioglou, S., Vanin, E., & Vignali, D. A. (2004). Correction of multi-gene deficiency *in vivo* using a single ‘self-cleaving’ 2A peptide-based retroviral vector. *Nature Biotechnology*, 22, 589–594.
- 196.Szymczak-Workman, A. L., Vignali, K. M., & Vignali, D. A. (2012). Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2012(2), 199-204.
- 197.Tong, W.-Y., & Dong, X. (2009) Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent Patents on Biotechnology*, 3, 141–153.
- 198.Tsujishita, Y., & Hurley, J.H. (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7, 408–414.
- 199.Uhlmann, H., Kraft, R., & Bernhardt, R. (1994). C-terminal region of adrenodoxin affects its structural integrity and deter- mines differences in its electron transfer function to cytochrome P-450. *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 22557–22564.
- 200.Ulmschneider, S., Muller-Vieira, U., Klein, C. D., Antes, I., Lengauer, T., & Hartmann, R. W. (2005) Synthesis and evaluation of (pyridylmethylene) tetrahydronaphthalenes-indanes and structurally modified derivatives: potent and selective inhibitors of aldosterone synthase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 1563-1575.
- 201.Urlacher, V. B., Lutz-Wahl, S., & Schmid, R. D. (2004). Microbial P450 enzymes in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(3), 317-325.
- 202.Usanov, S. A., Chernogolov, A. A., Petrashin, A. I., Akhrem, A. A., & Chashchin, V. L. (1987). Immunochemical study of the cholesterol hydroxylating system topology and stoichiometry of the electron transport chain components in mitochondrial membrane. *Biological Membranes*, 4, 1102–1116.
- 203.Vilchis, F., Chávez, B., Larrea, F., Timossi, C. & Montiel, F. (2002) The cDNA cloning and tissue expression of the cytochrome P450_{scc} from Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*). *General and Comparative Endocrinology*, 126(3), 279-286.
- 204.Voice, M. W., Zhang, Y., Wolf, C. R., Burchell, B., & Friedberg, T. (1999). Effects of human cytochrome b5 on CYP3A4 activity and stability *in vivo*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 366, 116-124.
- 205.Wada, A., Mathew, P.A., Barnes, H.J., Sanders, D., Estabrook, R.W. & Waterman, M.R. (1991). Expression of functional bovine cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 (P450_{scc}) in *E. coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 290, 376-380.
- 206.Wagner, J. M. & Alper, H. S. (2016) Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, 89, 126-136.

207. Wallimann, P., Marti, T., Furer, A., & Diederich, F. (1997). Steroids in molecular recognition. *Chemical Reviews*, 97, 1567–1608.
208. Wang, S. W., Pu, H. F., Kan, S. F., Tseng, C. I., Lo, M. J. & Wang, P. S. (2004) Inhibitory effects of digoxin and digitoxin on corticosterone production in rat zona fasciculata-reticularis cells. *British Journal of Pharmacology*, 142, 1123-1130.
209. Wang, S., Yao, Q., Tao, J., Qiao, Y., & Zhang, Z. (2007). Coordinate expression of glycine betaine synthesis genes linked by the FMDV 2A region in a single open reading frame in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 891–899.
210. Weis, R., Winkler, M., Schittmayer, M., Kambourakis, S., Vink, M., Rozzell, J.D., & Glieder, A. (2009). A diversified library of bacterial and fungal bifunctional cytochrome P450 enzymes for drug metabolite synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351, 2140–2146.
211. Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology*, 1(6), REVIEWS3003.
212. White, P.C., Curnow, K. M., & Pascoe, L. (1994). Disorders of steroid 11 β -hydroxylase isozymes. *Endocrine Reviews*, 15, 421–438.
213. Yan, F., Doronina, V. A., Sharma, P., & Brown, J. D. (2010). Orchestrating ribosomal activity from inside: effects of the nascent chain on the peptidyltransferase centre. *Biochemical Society Transactions*, 38(6), 1576-1580.
214. Yano, J. K., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Stout, C. D., & Johnson, E. F. (2005). Structures of human microsomal cytochrome P450 2A6 complexed with coumarin and methoxsalen. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 822–823.
215. Yeh, Y. H., Chou, J. C., Weng, T. C., Lieu, F. K., Lin, J. Y., Yeh, C. C., Hu, S., Wang, P. S., Idova, G. & Wang, S. W. (2016) Effects of acrolein on the production of corticosterone in male rats. *Steroids*, 111, 139-147.
216. Yoon, P. S. & DeLuca, H. F. (1980) Purification and properties of chick renal mitochondrial ferredoxin. *Biochemistry*, 19, 2165-2171.
217. Yu, P. L., Lin, T. M., Wang, S. W. & Wang, P. S. (2012) Antisteroidogenic effects of hydrogen peroxide on rat granulosa cells. *Free Radical Research*, 46, 718-725.
218. Zheng, Y., & Murphy, L.C. (2016). Regulation of steroid hormone receptors and coregulators during the cell cycle highlights potential novel function in addition to roles as transcription factors. *Nuclear Receptor Signaling*, 14, e001.
219. Ziegler G.A. & Schulz G.E. (2000). Crystal Structures of Adrenodoxin Reductase in Complex with NADP⁺ and NADPH Suggesting a Mechanism for the Electron Transfer of an Enzyme Family. *Biochemistry*, 39, 10986-10995.

220.Ziegler, G.A., Vornheim, C., Hanukoglu, I., & Schulz, G.E. (1999). The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 289, 981–990.

БЛАГОДАРНОСТИ

Я благодарю своих научных руководителей Людмилу Александровну Новикову и Михаила Александровича Рубцова за их труд, помощь в работе, поддержку, а также ценные советы при написании данной работы.

Благодарю Людмилу Витальевну Исаеву за огромную помощь при проведении экспериментов, а также д-ра Штефана Маусбергера за обучение тонкостям работы с клетками «нетрадиционных» дрожжей. Благодарю Вадима Нероновича Ташлицкого, Марину Васильевну Себерякову и Дарью Марковну Поташникову за помощь в проведении некоторых экспериментов.

Кроме того, я хочу сказать спасибо моим родителям и друзьям за моральную поддержку и терпение, проявленное во время выполнения данной работы.