Успехи биологической химии, т. 59, 2019, с. 473-512

СТЕРОИДОГЕННЫЙ РЕГУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК: ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ, ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ И РЕГУЛЯЦИИ

©2019 г. К. В. ТУГАЕВА^{1, 2}, Н. Н. СЛУЧАНКО^{1, 3}

 ¹ Институт биохимии имени А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва;
 ² Кафедра биохимии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва;
 ³ Кафедра биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва.

I. Введение. II. Стероидогенез и внутриклеточный транспорт холестерола. Ключевые белки-переносчики липидов. III. Структурная организация STARD1 и его взаимодействие с лигандами. IV. Механизм связывания холестерола и функционирование STARD1. V. Особенности регуляции STARD1. VI. Взаимодействие STARD1 с другими белками. VII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Гормоны – обширная группа биологически активных веществ, синтезируемых железами внутренней секреции и участвующих в регуляции роста и развития организма. Действие гормона может быть направлено на соседние клетки (паракринная сигнализация) или на

Принятые сокращения: hCG – хорионический гонадотропин человека (human Chorionic Gonadotropin); IMM – внутренняя митохондриальная мембрана (Inner Mitochondrial Membrane); LAM-белки – липид-переносящие белки (LTPs), заякоренные в участках контакта мембран (LTPs Anchored at Membrane Contact Sites); LCAH – липоидная врожденная гиперплазия надпочечников (Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia); LTP – липид-переносящие белки (Lipid Transfer Proteins); nsLTPs – неспецифические липид-переносящие белки (non-specific LTP); OMM – внешняя митохондриальная мембрана (Outer Mitochondrial Membrane); P450scc – CYP11A1, цитохром P450 холестерингидроксилаза/20,22-лиаза (scc от англ. side chain cleavage); STARD1 – стероидогенный регуляторный белок (STeroidogenic Acute Regulatory Protein 1, синоним StAR); TSPO – периферический бензодиазепиновый рецептор (Translocator Protein); VDAC – потенциалзависимый анионный канал (Voltage-Dependent Anion Channel); TФ – транскрипционный фактор.

Адрес для корреспонденции: kri94_08@mail.ru, nikolai.sluchanko@mail.ru.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00428 «мол_а» и гранта РНФ № 17-74-10053.

удаленные от места его синтеза клетки (эндокринная сигнализация) [1]. По химической структуре у человека выделяют три группы гормонов: производные арахидоновой кислоты (эйкозанойды), аминокислоты и их производные (включая пептиды и белки) и стероиды (производные холестерола). Для всех стероидных гормонов характерна система из четырех сопряженных колец (циклопентанпергидрофенантреновое ядро), а различные эффекты и специализацию стероидов обеспечивают сочетания гидрокси-, кето-, и ацильных функциональных групп.

Стероидные гормоны вовлечены в контроль многих процессов организма, среди которых поддержание метаболизма, регуляция температуры и водно-солевого баланса, обеспечение воспалительного ответа и мышечного сокращения [1]. Поскольку стероиды оказывают мощное физиологическое действие и в высоких концентрациях становятся токсичными, живые организмы, и в частности позвоночные животные, выработали механизмы быстрого увеличения и резкого снижения синтеза этих гормонов [2].

В стероидогенных клетках надпочечников и половых желез имеется лишь незначительный базовый запас стероидов. Под действием тропных гормонов происходит «включение» стероидогенеза – многоступенчатого процесса синтеза стероидных гормонов. Непосредственно в стероидогенез вовлечено более десятка ферментов, мутации в некоторых из них приводят к заболеваниям, объединенным в группу врожденных гиперплазий надпочечников (Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH) (рис. 1) [3, 4]. В 95% случаев стероидогенез нарушается на стадии превращения прогестерона или 17α-гидроксипрогестерона в 11-дезоксикортикостерон или 11-дезоксикортизол, соответственно, ферментом цитохромом Р450 21-гидроксилазой (на рис. 1 обозначен цифрой 3) [3].

Кроме эффективного функционирования ферментов, непосредственно осуществляющих каскад реакций, приводящих к образованию активных стероидных гормонов, для осуществления процесса стероидогенеза ключевую роль играет доставка в стероидогенные клетки холестерола – стероидного субстрата, необходимого для их синтеза. Нарушение этого процесса вызывает вторую по распространенности и наиболее тяжелую форму заболевания – липоидную врожденную гиперплазию надпочечников (Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia, LCAH). Для людей с LCAH характерны уменьшение веса и гиперпигментация кожи, гиперкалиемия и гипонатриемия, а также сниженное содержание стероидных гормонов [5]. Несмотря на то, что заболеванию подвержены как женщины, так и мужчины, все пациенты,

Белок STARD1 и его роль в стероидогенезе



Рис. 1. Общая схема стероидогенеза в гипотетической стероидогенной клетке, синтезирующей половые гормоны и гормоны надпочечников.

На схеме представлен фрагмент цитоплазмы клетки с митохондрией и гладким эндоплазматическим ретикулумом (ЭПР). Кружками отмечены интермедиаты (Апрегненолон; Б – прогестерон; В – 11-дезоксикортикостерон; Г – кортикостерон; $\underline{\Pi}$ – альдостерон; $\underline{E} - 17\alpha$ -гидроксипрегненолон; $\underline{W} - 17\alpha$ -гидроксипрогестерон; 3-11-дезоксикортизол; И – кортизол; К – дегидроэпиандростерон; Л – андростендион; М – эстрон; Н – эстрадиол; О – андростендиол; П – тестостерон). Цифрами обозначены ферменты, катализирующие соответствующие реакции: 1 – цитохром Р450 холестерингидроксилаза/20,22-лиаза, Р450scc (СУР11А1); 2-3β-гидростероиддегидрогеназа, 3β-HSD; 3-цитохром Р450 21-гидроксилаза, Р450c21 (СҮР21); 4 – цитохром Р450 11β-гидроксилаза, Р450c11 (СҮР11В1); 5-цитохром Р450 альдостеронсинтаза, Р450с18 (СҮР11В2); 6-цитохром Р450 17α-гидроксилаза/17,20-лиаза, Р450с17 (СҮР17); 7 – 17β-гидроксистероиддегидрогеназа, 17β-HSD; 8 – цитохром P450 ароматаза, P450c19 (CYP19). Три электрон-транспортных белка на схеме не обозначены. Голубые пунктирные линии обозначают перенос интермедиатов из одного компартмента в другой, черные и красные сплошные линии - их превращение соответствующими ферментами. Красным цветом обозначены ферменты, мутации в которых приводят к различным формам врожденной гиперплазии надпочечников (САН). Гормоны, выделенные голубым цветом (Л, О, П), синтезируются в семенниках у мужчин, розовым (М, Н) и фиолетовым (Б) цветами – в яичниках и в желтом теле у женщин, бежевым (В, Г, Д, И) – в надпочечниках.

К.В.Туга	ева,	H.H.	Случан	ко
~			~	

страдающие классической LCAH, из-за недостатка мужских половых гормонов имеют фенотипически женские половые признаки [6–13]. *Неклассическая* форма имеет более мягкие симптомы.

Подобные изменения происходят при нарушении функционирования белка, который «снабжает» первый фермент стероидогенеза P450scc (цитохром P450 холестерингидроксилаза/20,22-лиаза) субстратом – холестеролом. Хотя в клетке холестерол может и пассивно достигать P450scc [14, 15], эффективность этого процесса настолько низка, что свободно диффундирующего количества не хватило бы для производства необходимых доз стероидных гормонов (например, по данным работы [16], уровень продукции кортизола здоровых мужчин составляет 9–11 мг/(м² × день)). Поэтому для активации их синтеза в клетке существует специальный механизм транспортировки холестерола с многоуровневой системой регуляции. В этой связи, за свою роль в активной (острой) фазе стероидогенеза (асиtе phase) этот специализированный белок и получил название стероидогенного регуляторного белка (Steroidogenic Acute Regulatory protein, StAR = STARD1).

На клеточном уровне LCAH проявляется в нарушении переноса холестерола в митохондрии и, вследствие этого, его накопления в цитоплазме. В 1996 году Х. Босе с соавт. была предложена двухстадийная модель развития LCAH [7]. На начальных этапах часть холестерола пассивно поступает в митохондрии по механизму, для осуществления которого не требуется специализированный белок. Это приводит к синтезу минимального количества стероидных гормонов и стимулирует выработку кортикотропина. Последний увеличивает синтез холестерола и способствует его накоплению в цитоплазме в липидных каплях с последующим увеличением клеток надпочечников в объеме. Более подробное описание LCAH и мутаций STARD1, которые с ней ассоциированы, можно найти в недавнем обзоре У. Миллера [17].

На сегодняшний день ни у кого не вызывает сомнений, что именно STARD1 играет первостепенную роль в переносе холестерола в митохондрии. Однако прошло много лет с момента описания гормон-зависимого стероидогенеза в острой фазе до открытия белка STARD1 [18–20]. Краткую историю этого долгого пути можно найти в недавнем обзоре Д. Стокко с соавт.[21].

После того, как стало ясно, что стероидогенез в надпочечниках и половых железах напрямую зависит от синтеза неизвестного на тот момент белка, сразу в нескольких лабораториях начали вести поиск белков-кандидатов. В качестве возможных переносчиков рассматривали несколько белков, в том числе белок-переносчик стеролов

2 (Sterol Carrier Protein 2, SCP2) [22–24], полипептид, активирующий стероидогенез (Steroidogenesis-Activator Protein, SAP) [25], и периферический бензодиазепиновый рецептор [Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR), или Translocator Protein, TSPO (более новое название)] [26]. Несмотря на то, что два десятилетия TSPO считался ключевым фактором активации стероидогенеза, в последние годы были получены сведения, заставляющие пересмотреть необходимость его участия в синтезе стероидных гормонов [27, 28].

Позже была обнаружена и описана группа новых гормон-индуцируемых митохондриальных фосфо-форм белков с молекулярными массами 30 (p30), 32 (p32) и 37 (p37) кДа [19, 29] – продуктов процессинга одного белка предшественника [19]. Прямое влияние на стероидогенез было доказано при трансформации клеток соответствующей кДНК. В опухолевых клетках Лейдига МА-10 мыши появление белков p30–37 способствовало синтезу прогестерона [29, 30]. Аналогично, в нестероидогенных почечных клетках зеленой мартышки COS-1 совместная экспрессия p30–37 и фермента P450scc увеличивала синтез прегненолона в несколько раз [31, 32]. На основе этих открытий белок p30–37 был переименован в STARD1 [29].

Со временем STARD1 был обнаружен и в других тканях, где его роль пока не совсем понятна [33]. Интерес в последние годы обращен к тому, какую роль STARD1 играет в центральной нервной системе, где синтезируется целый ряд нейростероидов [34]. Домены, похожие по структуре на STARD1, были обнаружены во многих белках, участвующих во внутриклеточном транспорте холестерола и других липидов, в том числе в нестероидогенных тканях (см. ниже).

Повышенный интерес к STARD1 не угасает уже на протяжении нескольких десятков лет, однако остается еще много вопросов и противоречий, касающихся принципов функционирования STARD1, регуляции его активности и механизма транспортировки в митохондрии [35]. В данном обзоре мы рассмотрим современный взгляд на актуальные проблемы в области изучения этого уникального белка в контексте регуляции стероидогенеза.

II. СТЕРОИДОГЕНЕЗ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАНСПОРТ ХОЛЕСТЕРОЛА. КЛЮЧЕВЫЕ БЕЛКИ-ПЕРЕНОСЧИКИ ЛИПИДОВ

Стероидные гормоны обнаружены практически у всех живых организмов, но только у моллюсков, членистоногих и позвоночных в ходе эволюции развились специализированные органы для их синтеза [1]. У человека *минералокортикоиды* (например, дезоксикортикостерон,

альдостерон) и *глюкокортикоиды* (кортикостерон, кортизол) синтезируются в коре надпочечников, а *половые гормоны* – в клетках Лейдига семенников (тестостерон) у мужчин и в клетках фолликулов (эстрадиол, эстрон) и желтом теле (прогестерон) у женщин (рис. 1) [36]. Плацента также является стероидогенным органом, где синтезируются преимущественно эстриол (производное эстрона и эстрадиола) и прогестерон [37]. В отдельную группу иногда выделяют *нейростероиды*, например, аллопрегнанолон, андростандиол, этиохоланолон и др. [38, 39].

Общий предшественник всех стероидных гормонов млекопитающих – прегненолон – образуется в результате отщепления боковой цепи от циклопентанпергидрофенантренового остова холестерола под действием фермента P450scc [40], расположенного на внутренней мембране митохондрии (Inner Mitochondrial Membrane, IMM) [41]. Последующие стадии превращения прегненолона в стероидные производные происходят в основном в гладком эндоплазматическом ретикулуме (гладкий ЭПР), за исключением финального «митохондриального» превращения минералокортикоидов и глюкокортикоидов [42] (рис. 1). Несмотря на сложную схему превращений стероидных гормонов, лимитирующей стадией всего процесса является подготовительная, а именно доставка холестерола к IMM [40], где содержится крайне мало холестерола. В клеточных мембранах животных на долю холестерола приходится 30% от всех липидов мембраны [43] и 60-80% от всего холестерола в клетке [44]. Максимальное содержание холестерола – в плазмалемме, что примерно в 40 раз больше, чем суммарно в обеих мембранах митохондрий [45]; эндоплазматические мембраны содержат примерно 0.5-1% от всего клеточного холестерола, чуть больше содержится в мембранах аппарата Гольджи (АГ) [46].

Холестерол и его эфиры транспортируются будучи включенными в липопротеидные комплексы высокой и низкой плотности в крови, а запасаются в цитоплазме клетки в виде липидных капель [47]. Концентрацию эфиров холестерола регулируют два фермента: синтаза и гидролаза, активность которых модулируется тропными гормонами [48]. Перераспределение холестерола в мембранах и компартментах клетки осуществляется за счет двух основных путей: АТР-зависимого везикулярного и невезикулярного транспорта посредством белковпереносчиков [49]. На долю последнего приходится до 70% всего транспорта холестерола [50]. Такой транспорт необходим, например, при переносе холестерола из липидных капель с помощью растворимого белка SNARE и из поздних эндосом белками STARD3 и NPC [51], из плазмалеммы к ЭПР, для транспортировки к внешней

мембране митохондрий (Outer Mitochondrial Membrane, OMM) в стероидогенных клетках из ЭПР (например, белком Lam6/Ltc1) и, наконец, для доставки его в IMM белком STARD1.

Помимо холестерола белками переносятся также другие гидрофобные молекулы: иные стероиды, жирные кислоты, церамиды и др. В случае митохондрий и пероксисом именно невезикулярный транспорт является основным механизмом, снабжающим эти компартменты липидами [49, 51]. Обмен липидов между мембранами ЭПР и других органелл может происходить в местах мембранных контактов (Membrane Contact Sites, MCSs) [49]. Перемещение лигандпереносящего белка в пространстве между двумя мембранами значительно увеличивает скорость передачи липидов, причем некоторые белки могут работать при одновременном заякоривании в обеих мембранах [52].

Важную роль липидов иллюстрирует тот факт, что примерно 5% генома эукариотической клетки кодируют белки, участвующие в метаболизме и транспорте липидов [53]. Число последних с учетом различных функциональных групп может превышать 1000 [54]. Направленный транспорт такого огромного количества соединений в клетках осуществляется за счет белков-переносчиков [49, 53, 55, 56]. В свете определенного сходства принципов функционирования белков-переносчиков липидов их классификация и более подробное рассмотрение представляются целесообразными для лучшего понимания устройства и функционирования STARD1.

У всех организмов, начиная от бактерий и заканчивая человеком, липид-связывающие/переносящие белки (Lipid Transfer Protein, LTP) можно разделить на две большие группы: неспецифично (non-specific, nsLTPs) и специфично связывающие лиганды.

Первая группа широко представлена у растений [57], среди белков человека к ней относят упомянутый выше белок SCP2, связывающий жирные кислоты и их КоА-производные, холестериновые эфиры, фосфо- и другие липиды [58]. nsLTPs как правило небольшие (7–15 кДа), растворимые белки, стабилизированные за счет дисульфидных связей [57].

Вторая группа более обширна и состоит из белков, которые можно классифицировать по нескольким признакам. С одной стороны, на основе лигандной специфичности можно выделить три основные группы: белки, переносящие фосфолипиды, стеролы и сфинголипиды [49]. С другой стороны, по структуре лиганд-связывающего домена белки разделяют по меньшей мере на десять надсемейств [53], в которых домены могут состоять только из α-спиралей (например, гликолипид-переносящий белок (GLycolipid Transfer Protein, GLTP)

или β-складок (например, липокалин) или из обоих типов вторичных структур [53].

Далее мы рассмотрим более подробно группу «α/β» белков на примере двух крупных надсемейств: надсемейства ORP (OSBP-Related Protein) с оксистерол-связывающим белком (OxySterol Binding Protein, OSBP) и его гомологами (Osh), и надсемейства STARkin-белков (рис. 2). В группе STARkin белков выделяют семейство START-белков, содержащих функциональный STARD-домен (STeroidogenic Acute Regulatory Domain), и семейство белков LAM (LTPs Anchored at Membrane contact sites), объединенных по наличию общего по третичной структуре, так называемого STARD-like домена. Многие представители LTP-белков имеют дополнительные сигнальные функции за счет наличия у них других функциональных доменов (рис. 2).

Особый тип пространственной структуры STARD-домена (см. след. раздел) найден в белках у различных организмов, причем количество START-белков варьирует от вида к виду. Так, у растений Arabidopsis thaliana и рода Oryza (O. sativa, O. indica и O. japonica) было выявлено по 35 и 29 START-белков, соответственно [59]. Большинство растительных START-белков являются транскрипционными факторами HD-семейства и содержат homeodomain, специфически связывающий участки ДНК. У человека обнаружено 15 START-белков, разделенных на шесть подсемейств [60, 61] в зависимости от лигандной и тканевой специфичности и сходства первичных структур (см. табл.). У некоторых животных START-белков меньше: Caenorhabditis elegans и Drosophila melanogaster содержат 7 и 4 таких белков, соответственно. Наименьшее количество встречается у бактерий и простейших: из 100 секвенированных бактериальных геномов только у восьми видов были найдены белки, содержащие STARD-домен [59]. Вероятно, в этом случае наличие START-белков связано с горизонтальным переносом генов [59].

В дрожжах START-белки идентифицированы не были, однако вместо этой группы у Saccharomyces cerevisiae есть шесть трансмембранных белков (Lam1–Lam6), содержащих STARD-like домен. За счет наличия заякоривающего трансмембранного домена белки локализованы в контактах между мембранами ЭПР и плазмалеммой (Ysp2p/Lam2p/Ltc4p (здесь и далее указаны альтернативные названия одного и того же белка), Lam4p/Ltc3p, Ysp1p/Lam1p, Sip3p/Lam3p [101]); или в контактах ЭПР/митохондрия и ЭПР/вакуоль (Lam5p/ Ltc2p, Lam6p/Ltc1p) [102, 103]. Количество доменов у белков внутри семейства различается, но для всех характерно наличие трех типов доменов: один (Lam1, Lam3) или два (Lam2, Lam4) STARD-like домена; обязательно PH-гомологичный GRAM-домен и один или два



Рис. 2. Многообразие и доменная организация ОRP и STARkin-белков у растений, дрожжей и человека.

Б. Филогенетическое дерево START-белков человека, построенное на основе выравнивания STARD-доменов в MUSCLE А. Схематическое представление доменных структур некоторых липид-переносящих белков, выделяемых в отдельные семейства. (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/).

Сокращения и обозначения: ankyrin repeats – анкириновые повторы; ВАR – домен белков Bin/amphiphysin/RVS; C2 – C2 фенилаланинами в «кислом» мотиве, ответственном за ЭПР-локализацию (two phenylalanine in an acidic tract motif responsible for ER targeting); FHD – домен, связывающий фосфорилированные белки (Phosphoprotein Binding Domain); GOLD – «Golgi dynamics» domain; HD – homeodomain; KMD – моторный домен кинезина (Kinesin Motor Domain); MENTAL – N-концевой домен MLN64 (MLN64 N-terminal domain); PH – pleckstrin homology; RhoGAP – домен активатора Rho-ГТФаз (Rho-type GTPase-activating protein); домен; DUF1336 – домен с неизвестной функцией 1336 (domain of unknown function 1336); FFAT – участок с двумя остатками SAM - sterile alpha motif, THIO - ацил-СоА тиоэстеразный домен (acyl-CoA thioesterase domain); ZIP - basic region leucine zipper; ZLZ - leucine zipper-loop-zipper.



	Локализация в клетке	5 6	3	Цитоплазма, митох- доставка холестерола в IMM ондрии во время стероидогенеза	 Поздние эндосомы Доставка холестерола в ІММ в плаценте [71], пред- положительно, фотопро- текция в сетчатке [68–70] 	2/6	цее ЭПР [75], пузырьки Транспорт стеролов между 4] эндоцитарного ПІМ и пузырьками эндоци- аппарата [76] тарного аппарата [50]	дце Цитоплазма, АГ, ЭПР Ответ на стресс [60] [80]	 34], Цитоплазма, Роль в сперматогенезе непо- митохондрии [86] нятна 	<u>Продолжение табл. см. на сл. стр.</u>	
	Тканевая локализация	4	Подсемейство STARD 1/	Подсемейство STARD 1/	Подсемейство STARD 1.	Надпочечники, половые железы [66]	Плацента, мозг, желтое пятн сетчатки [68–70]	Подсемейство STARD 4/5	Во многих тканях, наиболыц кол-во в печени и почках [74	Клетки Купфера, почки, серл [79]	Мужские половые железы [8 нервная ткань [85]
	Лиганды	3		Холестерол, NBD-ана- логи, β-ситостерол [62], DHE [63], 7α-пероксихо- лестерол [64], BODIPY- холестерол [65]	Холестерол [67], лютеин [68–70]		Холестерол [72], 7α-гидроксистерол, 7-гидроксипероксистерол [72, 73]	Хопестерол* [77], 25-гидроксихолестерол, NBD-аналог [77], желчные к-ты [78]	Холестерол [81], прегненолон [82], тестостерон [83]		
	РDВ иденти- фикаторы	2		3P0L (Y)	519J (H) 1EM2 (H)		1JSS (M), 5BRL (M)	2R55 (Y)	2MOU (4, AMP)		
	Название	1		STARD1 (StAR)	STARD3 (MLN64)		STARD4	STARD5	STARD6		

Таблица. Особенности START-белков человека

482

К.В.Тугаева, Н.Н.Случанко

Продолжение табл.	6		 7], Регулирует метаболизм ЖК, глиокозы, легочного сурфактанта [91] 	ито- Доставка ФХ в МХ [88], ін- пролиферация, миграция, ьная дифференциация клеток, синтез ФЛ [92]	чные Регуляция клеточного деле- ния и развития опухоли [93]	 Транспорт церамидов из ЭПР в АГ [94] 		[95] Опухолевый супрессор и активатор RhoГTФазы [95]	Подавление клеточного роста	Контроль инсулиновой секреции [96], опухолевый супрессор [97]	<u>Окончание табл. см. на сл. стр.</u>
	5	11	Цитоплазма, ядро [8 митохондрия [90]	Короткая форма – ци плазматичексая, дли ная – митохондриал [88]	Цитоплазма и клеточ мембраны [93].	Цитоплазма и АГ [6	3	Ядро и цитоплазма [2	ł	
	4	Іодсемейство STARD 2/7/10/1	Печень, сердце, мышцы [89]	Половые мужские железы, плацента, хориокарцинома, трофобласты [92]	Повсеместно, суперэкс- прессия в опухоли груди	Нетканеспецифичные, мышцы, сердце, мозг, почки, плацента [61]	Подсемейство STARD 8/12/1.	Плацента, периферическая НС [61], опухоли груди, простаты	Суперэкспрессия в опухолях	Островки поджелудочной железы [96], суперэкспрес- сия в опухолях	
	3	Ι	ΦX [87, 88]		ФХ, ФЭ [87]	Церамиды		1	I	1	
	2		1LN1 [дФХ] (Ч)	1	I	2Z9Z; 2E3R; 3H3S; 2E3N; [аналоги церамидов], (Ч)		I	I	2PSO (4)	
	1		STARD2 (PCTP)	STARD7 (GTT1)	STARD10	STARD11 (CERT)		STARD8 (DLC-3)	STARD12 (DLC-1)	STARD13 (DLC-2)	

6		Компоненты мультидоменной ацетил-КоА	гидролазы		Регулирует сборку веретена деления [100]		
5		Микросомы, ядро [99]	Цитоплазма [61]		Ассоциирован с микротрубочками [100], центриолями		
4	Подсемейство STARD 14/15	В бурой жировой ткани при понижении температуры [98]	Печень, селезенка, мыщцы, яичники [61]	Подсемейство STARD9	Нервная ткань [60]		
3		ЖК (?), КоА производ- ные ЖК, желчных кис-	лот, простагландинов		I		
2		3FO5 (Y)	I		I		
1		STARD14 (ACOT11)	STARD15 (ACOT12)		STARD9 (Kif16a)		

* в более поздних работах [78, 81] связывание холестерола с STARD5 подтвердить не удалось.

Сокращения и обозначения: ACOT 11–12 – ацил-КоА тиоэстераза 11-12 (Acyl-CoA Thioseterase 11-12); CERT – белок, переносящий цера-миды (ceramide transfer protein); DHE – дегидроэргостерол (DeHydroErgosterol); DLC 1-3 – Deleted in Liver Cancer 1-3; GTT1 – гестационный трофобластный опухолевый ген-1 (gestational trophoblastic tumor gene-1); Kiffőa – кинезин 16а из семейства kinesin-3; PCTP – ФХ-переносящий белок (Phosphatidylcholine Transfer Protein); AT – аппалат Гольджи; дФХ – дилиновонифосфатидилхолин; ЖК – жирная кислота; М – мышь; HC – нервная система; ПМ – плазматическая мембрана; ФЛ – фосфолинид; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; Ч – человек; ЭПР – эндоплазматический ретихулум.

484

Окончание табл.

К.В.Тугаева, Н.Н.Случанко

трансмембранных домена (рис. 2) [104–106]. Для изученных белков LAM/Ltc также характерно связывание и транспорт стеролов [101, 103], что вовлекает их в регуляцию гомеостаза [104]. LAM-белки не являются уникальными только для *S.cerevisiae*, они обнаружены по меньшей мере еще у человека и растения резуховидки Таля (*A. thaliana*) [107]. LAM-белки человека мало изучены [107].

Оксистерол-связывающий белок OSBP и его гомологи Osh из дрожжей образуют другое большое семейство белков, специфично связывающих стероиды – ORPs. Белок OSBP у млекопитающих имеет доменную организацию, сходную с белком STARD11, и состоит из PH-домена, FFAT-домена и C-концевого ORD-домена (OSBP-Related Domain) (рис. 2). Аналогично STARD-домену, ORD-домен представляет собой β -складчатую структуру с гидрофобной полостью для молекулы стерола (PDB *1Z17*), однако структурные элементы, закрывающие вход в эту полость, у STARD- и ORD-доменов отличаются [108].

У млекопитающих описано как минимум 12 OSBP-подобных белков, причем лигандная специфичность для большинства из них не определена [109]. У дрожжей *S. cerevisiae* найдено семь белков Osh1p–Osh7p, которые разделяют на три группы по количеству дополнительных доменов.

Таким образом, представители STARkin-семейства имеют разнообразную доменную структуру, связывают различные липиды и активно вовлечены во внутриклеточные процессы. В следующих двух разделах более детальное внимание будет уделено особенностям строения и функционирования белка STARD1, однако можно предполагать относительную универсальность механизма связывания у START и подобных им белков.

III. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ STARD1 И ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ЛИГАНДАМИ

Белок STARD1 высоко консервативен, однако его ортологи могут различаться по количеству аминокислотных остатков (от 264 у панды *Ailuropoda melanoleuca* до 293 у летучей мыши *Myotis davidii*). У человека STARD1 синтезируется в виде 285-аминокислотного предшественника с расчетной молекулярной массой ~32 кДа (из-за кажущейся массы 37 кДа такой полипептид был назван р37, и это название прочно закрепилось в ранней литературе). Полноразмерный белок имеет С-концевой функциональный глобулярный STARD-домен (остатки 76–281, Pfam PF01852), а на N-конце – длинный пептид, склонный к разупорядоченности [110] (рис. 3А).

К.В.Тугаева, Н.Н.Случанко



Рис. 3. Структура STARD1 и его гомологов.

А. Модель полноразмерного STARD1, полученная на основе кристаллической структуры (PDB *3P0L*) с достройкой петли Ω_1 и N-концевого пептида (остатки 1–66) в i-Tasser [111]. Названия ключевых структурных элементов подписаны согласно цвету в составе STARD-домена. Пептид митохондриальной локализации отмечен фиолетовым. Участок процессирования лидерного пептида в матриксе митохондрии показан пунктирной линией.

Б. Сравнение укладки лиганд-связывающих доменов белков STARD3 человека (PDB *1EM2*), STARD4 мыши (PDB *5BRL*), STARD5 человека (PDB *2R55*) со структурой STARD1 человека (PDB *3P0L*).

STARD-домен имеет типичную, так называемую « α/β helix/ grip» укладку, в которой 9 β-складок ограничены двумя концевыми α_1 - и α_4 -спиралями [112]. Стенки гидрофобного кармана формируют центральные β-складки, три α_2 - α_4 спирали и петля Ω_1 между β_5 и β_6 складками [61] (рис. 3А). Формируемая полость объемом ~470Å³ идеально подходит по размеру для одной молекулы холестерола (~430Å³) [82].

N-концевой пептид содержит сигнальную последовательность, направляющую полноразмерный белок в митохондрии, где происходит его процессинг до зрелой формы и деградация. Предполагается, что основной участок протеолиза находится между 63-м и 64-м аминокислотным остатком [113]. Роль митохондриального пептида и импорта STARD1 еще до конца не определена. С одной стороны, удаление до 62 аминокислот с N-конца не приводило к существенной

потере стероидогенной активности белка в культуре клеток COS-1, и она была сопоставима с активностью белка дикого типа, несмотря на то, что такой укороченный белок не мог попасть в митохондрии [113]. Также в экспериментах *in vivo* укороченный с N-конца белок (N-47) оказывал заметный отрицательный эффект на развитие половых признаков у самцов мышей, хоть и не такой сильный, как в случае полного отсутствия белка [114]. Полностью лишенный N-концевого пептида белок способствовал передаче холестерола в другие мембраны, такие как ЭПР [62], т.е. фактически утрачивалась специфичность передачи холестерола в митохондрии. С другой стороны, замена митохондриального пептида STARD1 на пептид от белка P450scc ускоряла его перемещение в митохондрии и снижала активность мутантного белка минимум в два раза [2, 115]. В работе [116] было предположено, что STARD1 должен достаточно медленно транслоцироваться в митохондрии для оптимального уровня стероидогенеза, а импорт в митохондрии связан с его инактивацией.

В 2011 году была определена первая и на данный момент единственная кристаллическая структура белка STARD1 без митохондриального пептида (N-66) с разрешением 3.4Å (PDB *3P0L*) [110]. В растворе такой рекомбинантный белок образует преимущественно мономеры, но его препараты проявляют низкую стабильность и склонны к агрегации [117]. Структура STARD-доменов STARD1 и других представителей семейства сходны (см. рис. 3Б). Несмотря на высокий уровень гомологии, репертуар лигандов сильно различается (холестерол, желчные кислоты, жирные кислоты, церамиды, лютеин, фосфатидилхолин, см. табл.), однако факторы, определяющие лигандную специфичность START-белков, остаются мало понятными.

К 2018 году определены структуры только двух типов липидных комплексов разных белков, содержащих STARD-домен: STARD2/ дилинолеоилфосфатидилхолин и комплексы STARD11 с несколькими синтетическими аналогами церамидов (табл.). Попытки определить кристаллическую структуру комплекса STARD1/холестерол не увенчались успехом [110], поэтому до сих пор нет четкого понимания того, в какой ориентации холестерол связывается в полости белка, и какие именно аминокислотные остатки в этом участвуют. Из-за отсутствия прямых экспериментальных данных сформулированные к настоящему времени гипотезы основываются главным образом на результатах молекулярного моделирования и потому остаются спекулятивными.

С момента начала изучения этого вопроса были получены две противоположные, но почти равновероятные с точки зрения расчет-

ной термодинамики модели ориентации холестерола в полости белка [118]. В первой холестерол находится в полости в положении «IN», в котором 3-OH группа ориентирована в центр полости и направлена к остатку Arg188 [67, 119, 120]. Альтернативный вариант предполагает положение «OUT», в котором ацильный хвост молекулы холестерола находится в полости STARD1, а 3-OH группа – напротив остатка Arg182 [118, 121]. В работе 2018 года [119] моделирование комплексов STARD1, STARD3, STARD4, STARD5, STARD6 с холестеролом показало, что даже в пределах одного семейства возможны оба варианта положения лиганда в кармане. В случае STARD1 и STARD3 3-OH группа была обращена к Ω_1 петле, в то время как для STARD4 была предсказана противоположная ориентация. Для двух других белков – STARD5 и STARD6 – связывание холестерола было менее специфичным, предположительно, за счет особенностей структуры внутренней полости.

В отсутствие кристаллической структуры холоформы STARD1 взаимодействие с лигандами исследовалось *in vitro*. Поскольку холестерол имеет крайне низкую растворимость в воде (константа мицеллообразования 25–40 нМ) [122] и не является оптически активным, для изучения взаимодействий широко применялся C¹⁴-меченный холестерол и аналоги холестерола с флуоресцентной группой, например, NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) [65, 67, 123–126]. Было установлено, что коммерчески доступный NBD-холестерол связывается с белком в стехиометрии 1:1 с кажущейся константой диссоциации около 30 нМ, аналогично природному лиганду – холестеролу [121, 124]. В работе 2018 года [121] было показано, что размер флуоресцентного лиганда и положение NBD группы критически влияют на взаимодействие со STARD1 – слишком большие по размеру лиганды или лиганды с флуоресцентной группой на месте 3-OH группы холестерола связываются неэффективно.

В отличие от START-белков, кристаллические структуры комплексов стеролов с доменами представителей семейств LAM и ORP недавно были успешно определены. Согласно этим данным, стеролы связываются в полости в ориентации "IN", и в случае Lam4 и Osh4 гидроксильные группы у С₃-атома углерода эргостерола или 25-гидроксистерола направлены в центр полости [105, 108]. Однако структуры Osh4 и STARD-белков сильно различаются [108], и полученные для Osh4 результаты едва ли можно проецировать на STARD1. LAM-домены структурно более сходны со STARD-доменом (Са r.m.s.d. ~5–6 Å) [105], однако положение лигандов в белке Lam менее утоплено в полость (см. ниже), поэтому эти результаты также могут быть перенесены на STARD1 с существенными оговорками.

Таким образом, часть данных свидетельствует в пользу одной, а часть – в пользу противоположной ориентации молекулы холестерола в полости STARD1. Вероятно, нельзя полностью исключить, что связывание холестерола в полости STARD1 и его ближайших гомологов происходит в обеих ориентациях практически равнозначно и не столь важно для выполняемой белком функции. Выясняется, что структурная информация, полученная при исследовании взаимодействия одних LTPs с лигандами, имеет ограниченное применение для других LTPs из-за различий в устройстве липид-связывающих полостей [82, 110]. Лигандная специфичность STARD1 и его способность связывать другие природные липиды остаются плохо изученными.

IV. МЕХАНИЗМ СВЯЗЫВАНИЯ ХОЛЕСТЕРОЛА И ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ STARD1

Механизмы связывания холестерола и функционирования STARD1 остаются предметом дискуссий. Компактная структура его липидсвязывающего домена с практически со всех сторон плотно закрытой полостью (рис. 3A) предполагает структурные перестройки, которые способны обеспечить доступ холестерола в лиганд-связывающий карман. Учитывая структурное сходство разных START-белков и их гомологов, логично предполагать некоторую консервативность конформационных изменений, необходимых для связывания и высвобождения лигандов, вне зависимости от того, что разные STARD-домены функционируют в различной микросреде.

Большинство исследований указывает на особую конформационную подвижность Ω_1 петли и С-концевой α_4 -спирали STARD-доменов (рис. 3А). Модель «clam-shell» на примере белка STARD2, основанная на сравнении кристаллических структур апоформы STARD3 (PDB *IEM2*) и STARD2 в комплексе с ФХ (PDB *ILN1*), предполагает движение обоих указанных структурных элементов относительно остальной части белка, аналогично открыванию и закрыванию раковины у двустворчатого моллюска [127].

Согласно двухстадийной модели, предложенной А. Рустай с соавт. [124], подвижная С-концевая α_4 -спираль может изменять свое положение и обратимо расплетаться, не влияя на остальную часть функционального домена, причем было высказано предположение о равновесном сосуществовании обеих форм белка, спонтанно переходящих друг в друга. Предполагалось, что в промежуточном состоянии полость для связывания холестерола становится доступной для его входа и выхода, а при связывании С-концевая α_4 -спираль стабилизируется [124, 128]. Искусственно введенные двойные мутации

Ser100Суs/Ser261Суs или Asp106Суs/Ala268Суs, фиксируя α_4 -спираль при окислении, блокировали связывание холестерола и снижали стероидогенную активность STARD1 [123]. По данным авторов, добавление восстановителей полностью возвращало функциональную активность мутантного белка [123]. Было предложено, что мутации, приводящие к нарушению водородных связей внутри кармана между Arg188 и Glu169, увеличивают подвижность α₄-спирали и приводят к открытию холестерол-связывающей полости [128]. Остатки Arg188 и Glu169 – единственные заряженные остатки внутри липид-связывающей полости, и считается, что солевой мост между ними играет важную структурную роль [65]. Вероятно, С-концевая α,-спираль также важна для поддержания структуры липид-связывающей полости. Любопытно отметить, что нонсенсмутация Q258X (возникновение стоп-кодона) или искусственное удаление 28 С-концевых аминокислотных остатков (из 285) полностью лишает STARD1 способности связывать холестерол [113]. Тем не менее, остается не совсем понятным, что является движущей силой для спонтанного расплетания α₄-спирали, плотно упакованной в структуре глобулярного STARD-домена.

Возможно, и меньшие структурные перестройки могут объяснить процесс захвата и высвобождения холестерола. При исследовании STARD6 методом ЯМР была подтверждена повышенная мобильность не только С-концевой α,-спирали, но и Ω, петли [83]. В рамках альтернативной гипотезы именно Ω, петля выполняет роль «молекулярной крышки», открывающей вход в полость STARD-домена (рис. 4А) [83, 117, 118, 129, 130]. Отсутствие четкой электронной плотности в области этой петли в кристаллической структуре STARD1 (PDB 3P0L), а также несколько различное ее положение в разных структурах STARD1 и его гомологов свидетельствует о высокой конформационной подвижности Ω_1 петли и косвенно подтверждает данную модель [74, 129]. Эта петля является одной из самых протяженных в структуре STARD1, и ее гипотетическое отгибание делало бы липид-связывающую полость открытой для обмена молекулами холестерола. По некоторым данным, Ω, петля может участвовать во взаимодействии с мембранами и связывании/переносе стеролов у разных гомологов STARD1 [130]. Учитывая это, можно предполагать некоторую универсальность механизма захвата лигандов у START-белков.

По данным малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (SAXS), конформация STARD1 в растворе близка к кристаллической и вряд ли спонтанно претерпевает существенные перестройки, косвенно подтверждая гипотезу о роли Ω₁ петли в связывании холестерола





Рис. 4. Связывание стеролов в полости STARD1 и его гомологов при участии Ω_1 петли.

А. При отгибании Ω1 петли вход в полость становится доступным для молекулы холестерола. Ввиду противоречивости информации, показаны два варианта ориентации холестерола: «IN» и «OUT» (см. объяснения в тексте). Структура белка с достройкой Ω1 петли получена в i-Tasser [111] на основе структуры STARD1 (PDB 3P0L).

Б. Сравнение структур апо- (PDB 6BYD) и холоформы (PDB 6BYM) гомологичного белка Lam4S2 [105] с различным положением Ω_1 петли (отмечена стрелкой). Холоформа Lam4S2 содержит 25-гидроксихолестерол в ориентации 3-ОН группы стерола «IN».

В. Сравнение положения 25-гидроксихолестерола (фиолетовый цвет, PDB *6BYM*) и эргостерола (циановый и зеленый, PDB *5YS0*) в структуре белков Lam (серый цвет). Петля Ω₁ отмечена желтым. Видна значительная вариабильность положения стеролов при сохранении ориентации "IN".

Г. Сравнение моделей структур белков STARD1 (PDB *3P0L*) и Lam2 (PDB *5YS0*) в комплексе с лигандами. Отличие эргостерола от холестерола показано на структурной формуле красным цветом.

[117] и выводы недавней работы по исследованию структуры STARD6 [83]. Другие приведенные выше модели, в которых белок более значительно изменяет свою конформацию, не подтверждаются данными SAXS [117].

Любопытно, что роль именно Ω_1 петли в регуляции доступа полости для лигандов обсуждается и для представителей LAM-семейства [105]. При сравнении структур апо- и холоформ Lam четко видно, что Ω_1 петля изменяет свое положение при связывании, при практически неизменной конформации остальных элементов структуры белка (рис. 4Б). Положение лигандов в полости Lam не строго детерминировано, и наблюдается некоторая вариабильность, особенно в районе алкильного хвоста лигандов (рис. 4В). Положения эргостерола в цепях A и B заметно различаются (в третьей цепи лиганд вообще отсутствует – PDB 5*YS0*); положение 25-гидроксихолестерола в обеих белковых цепях в структуре *6BYM* практически неизменно, но отличается от положения молекул эргостерола в структуре *5YS0* (рис. 4В).

Как отмечалось выше, Lam2 сильно отличается от STARD1 по внутренней выстилке полости и по длине/составу Ω_1 петли. В отличие от STARD1, в полости Lam2 боковая цепь остатка Gln1149 формирует водородную связь с гидроксильной группой стерола и препятствует его дальнейшему проникновению внутрь, что приводит к более поверхностному расположению лиганда (PDB *5YS0*). Петля Ω_1 , играющая роль «молекулярной крышки», способна прикрыть менее глубоко залегающий лиганд белка Lam2 за счет удлиненных β-складок, между которыми она находится (рис. 4Г).

Таким образом, необходимы дальнейшие структурные исследования, которые помогли бы однозначно ответить на вопрос о том, как холестерол связывается с белком STARD1. К сожалению, точный механизм переноса холестерола в митохондрии остается еще более загадочным. Почти 20 лет назад был выявлен следующий парадокс, который в полной мере не разрешен до сих пор: несмотря на то, что в гидрофобной полости белка помещается только одна молекула холестерола [67, 118, 120, 124], и считается, что функционально активный STARD1 локализуется в OMM [2], одна молекула белка способствует переносу в IMM до 400 молекул холестерола в минуту [131].

Первая и самая простая модель постулировала, что митохондриальный пептид в составе STARD1 способствует образованию контактов между мембранами митохондрий и запускает перенос холестерола от ОММ к IMM по градиенту концентрации [36]. Заякоривание белка в ОММ должно препятствовать его взаимодействию с другими

органеллами [2] и увеличивать время жизни в ОММ, повышая перенос холестерола и эффективность стероидогенеза [2, 115]. Однако удаление митохондриального пептида не приводило к значительному уменьшению уровня стероидогенеза [113]. В 2001 году И. Артеменко с соавт. продемонстрировали корреляцию между синтезом прегненолона в первичной культуре клеток, выделенных из надпочечников крыс, и процессингом белка STARD1 в митохондрии [131]. Это позволило предположить, что для эффективности стероидогенеза необходимо не только присутствие белка STARD1 в цитоплазме, способствующего доставке холестерола к IMM, но также и последующая стадия процессинга белка в матриксе митохондрий [131]. Косвенно это подтверждается увеличением синтеза митохондриальных протеаз в результате транскрипции STARD1 [132], однако по сути находится в неком противоречии с представлением о том, что для функционирования STARD1 должен удерживаться в ОММ, а попадание в матрикс митохондрии и процессинг выключает его из работы.

Другая гипотеза предполагала, что в тот момент, пока белок находится в межмембранном пространстве, он переносит холестерол от ОММ к IMM как челнок, поскольку может связывать одновременно только одну молекулу холестерола [67]. Такая модель также противоречила наблюдениям, в которых STARD1 функционирует только на ОММ [115].

В ряде экспериментов in vitro было показано, что для связывания лиганда белку необходимо перейти в состояние «расплавленной глобулы» [116, 123]. Такая модель предполагала, что активная форма белка – это частично развернутая молекула, которая образуется вблизи митохондриальной мембраны или в межмембранном пространстве в условиях локального закисления pH [116, 123]: в таком случае N-конец молекулы способствует привлечению STARD1 к ОММ, а С-конец белка непосредственно контактирует с мембраной [116]. При попадании в Н⁺-обогащенную среду межмитохондриального пространства белок, как полагали авторы, принимает конформацию расплавленной глобулы и способен связывать холестерол из ОММ и переносить его в IMM [116, 123]. К сожалению, прямые доказательства присутствия STARD1 в межмембранном пространстве не были опубликованы. Более того, механизм, связанный с образованием расплавленной глобулы, не отвечает на вопрос о том, что регулирует связывание и высвобождение холестерола в межмитохондриальном пространстве. По данным работы [133], структурное разворачивание STARD1 происходит в присутствии больших концентраций холестерола, в то время

как низкие его концентрации способствуют сворачиванию STARD1. Однако эти данные находятся в кажущемся противоречии с известными представлениями о том, что концентрация холестерола высока в ОММ и низка в IMM [40, 45], что существенно затруднило бы связывание холестерола в ОММ и его высвобождение в IMM. Нельзя исключить, что существуют некоторые интермедиаты сворачивания STARD1, различающиеся по своей конформации, стабильности и способности переносить холестерол к IMM. В данном контексте стоит упомянуть про недавно показанную шапероно-подобную роль белка GRP78 (Glucose Regulatory Protein 78) в поддержании специфической конформации STARD1, компетентной к переносу холестерола [134].

К сожалению, предложенные гипотезы лишь частично объясняют механизм функционирования STARD1 и до сих пор вопросы о том, какие факторы удерживают STARD1 в межмембранном пространстве, как низкие концентрации белка способствуют переносу большого количества холестерола [62], а также за счет чего происходит захват и высвобождение холестерола из липид-связывающей полости остаются открытыми.

V. ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ STARD1

Синтез стероидных гормонов запускается под действием лютеинизирующего гормона (LH) в семенниках, LH и фолликулостимулирующего гормона (FH) в яичниках, адренокортикотропного гормона (ACTH) или ангиотензина II (AII) и ионов калия (K⁺) в надпочечниках (рис. 5, дан на развороте) [135]. В плаценте стероидогенез стимулируется под действием хорионического гонадотропина (hCG), при этом считается, что на фоне отсутствующего в данном органе STARD1, в стероидогенезе участвует его гомолог STARD3 [71].

Во время быстрого ответа за несколько минут в клетке увеличивается концентрация активной формы белка STARD1, которая способствует немедленной мобилизации и доставке большого количества холестерола в митохондрии, где он превращается в прегненолон [36]. Также в это время запускается синтез и трансляция дополнительных молекул мРНК ферментов, осуществляющих превращения прегненолона в стероидные гормоны во время второй, *медленной*, фазы стероидогенеза. Оба этапа строго контролируются, однако далее мы коснемся только регуляции STARD1 как ключевого белка быстрой фазы.

Синтез STARD1 происходит *de novo* по мере необходимости, и активен только вновь синтезированный белок [131], активность кото-

рого регулируются во время стероидогенеза. Для поддержания необходимого количества активного белка в клетке контролируются все стадии биосинтеза: транскрипция, трансляция и внесение посттрансляционных модификаций (рис. 5).

Транскрипция STARD1 регулируется многими транскрипционными факторами (ТФ). Активация индуцирующих или репрессирующих факторов происходит преимущественно через сАМР [139]. Фосфорилирование ТФ сАМР-зависимой протеинкиназой (РКА) переводит их в активное состояние, после чего они связываются с промоторной частью гена *star* и стимулируют синтез мРНК [140]. На рис. 5 изображены основные ТФ. Чаще всего различные группы ТФ узнают свойственные только им участки в промоторной области, однако области узнавания некоторых ТФ могут перекрываться, что, в свою очередь, влияет на силу активации [139]. Например, ТФ Nurr77 препятствует связыванию другого ТФ – SF-1 [135].

Под действием тропных гормонов происходит активация не только факторов инициации транскрипции, но также и ее репрессоров. Подавление транскрипции мРНК STARD1 осуществляют факторы DAX-1 и YY1 [135]. ТФ DAX-1 не имеет консенсусной последовательности в ДНК и распознает характерную «шпильку» в промоторной области (рис. 5) [139]. Помимо прямого взаимодействия с нуклеотидной последовательностью, некоторые ТФ могут оказывать влияние на другие активирующие ТФ через белок-белковые взаимодействия. Например, ТФ DAX-1 способен подавляет активность индуцирующего фактора SF-1 [139].

Часть синтезированных мРНК может деградировать за счет взаимодействия с нкРНК let7, т.к. 3'-нетранслируемый регион содержит как минимум один участок узнавания для let-7. Авторы постулируют, что суперэкспрессированные нкРНК H19 связываются с let-7 и способствуют накоплению мРНК для эффективной трансляции белка [141].

Далее, синтезированные мРНК направляются из ядра в цитоплазму, где происходит синтез полноразмерного белка. После синтеза белок подвергается целому ряду посттрансляционных модификаций, происходящих как в цитоплазме, так и в митохондриях. Стероидогенная активность белка регулируется многими способами. Во-первых, методом *in silico* были обнаружены сайты фосфорилирования для PKA, PKC, PKG, CKI/II и Cdk5 [142]. У человека для PKA идентифицировано два участка фосфорилирования: Ser57 и Ser195 [137], а для STARD1 хомяка помимо Ser56 и Ser194 показано фосфорилирование еще и соседнего Ser55 [143]. Фосфорилирование по Ser195 коррелирует с повышением активности белка, хотя и не является необходимым условием для стероидогенеза. Внесение фосфоимитирующей замены



К.В.Тугаева, Н.Н.Случанко

Пояснения к рис. 5.

1. Транскрипция и посттранскрипционная регуляция в ядре. Под действием тропных гормонов LH, FHS, АСТН или АП и ионов К⁺в клетках стероидогенных тканей происходит сАМР-зависимая или Са⁺/Са⁺-кальмодулин-зависимая [135] активация ряда ТФ. Промоторная часть гена star содержит участки узнавания для многих ТФ, регулирующих транскрипцию STARD1 и других белков стероидогенеза [135]. На рисунке отмечено положение семейств активирующих ТФ: семейство орфановых ядерных рецепторов стероидогенного фактора-1 (Steroidogenic Factor 1, SF-1) и LRH-1 (Liver Receptor Homologue 1); семейство NR4A, состоящее из белка Nur77 (NGFI-B = NR4A1), nur-подобного белка-1 (nur related protein-1, Nurr1 = NR4A2) и neuron-derived orphan receptor 1 (Nor1 = = NR4A3); GATA 4 и GATA 6 – представители семейства ТФ GATA; CCAAT/ Enhancer Binding Protein β (C/EBPβ); семейство CREB белков – cAMP response elements (CRE) binding protein (CREB), CRE modulator (CREM); Sterol Regulatory Element Binding Protein (SREBP); и представителей группы репрессирующих ТФ: dosage-sensitive sex reversal (DAX-1) и Yin Yang 1 (YY1). Сплошными линиями показана активация, пунктирными – ингибирование ТФ. Некоторые факторы имеют тканевую специфичность, что отображено в цветовой кодировке линий: голубой цвет – клетки Лейдига у мужчин, розовый – клетки тканей яичников у женщин, оранжевый - клетки надпочечников. Синтезированная мРНК может подвергаться деградации после связывания с нкРНК (let-7).

2. Синтез белка и посттрансляционные модификации. STARD1 синтезируется в виде белка-предшественника, состоящего из глобулярного функционального домена (золотистый цвет) и N-концевого пептида (розовый цвет). Экспериментально показано фосфорилирование двумя протеинкиназами: PKA по сайтам Ser57 и Ser195 [136, 137] и ERK1/2 по сайту Ser233 [138], локализация которых показана желтыми сферами на модели структуры STARD1 (приведена нумерация STARD1 человека).

3. Белок-белковые взаимодействия в цитоплазме. По последним данным, STARD1 функционирует в составе трансдуцеосомы, в состав которой также входят белки VDAC-1, TSPO, PKA (регуляторная субъединица RI альфа), PAP7, ATAD3, 14-3-3.

4. Импорт в митохондрии и деградация. При стероидогенезе часть STARD1 импортируется в митохондрии, где происходит его последовательный процессинг до зрелой формы, а затем деградация (подробности см. в тексте). Протеасомная деградация STARD1 в рамках данного обзора не обсуждается.

S195D увеличивало синтез прегненолона на 20%, а внесение точечной замены S195A снижало его примерно в два раза по сравнению с фосфорилируемым диким типом [137]. Фосфорилирование Ser57, по-видимому, регулирует импорт белка в митохондрию, но не его стероидогенную активность, поскольку замена S57A не влияла на синтез прегненолона [137]. Роль других протеинкиназ пока еще изучена не до конца.

Выше отмечалось, что пребывание белка в ОММ увеличивает продуктивность синтеза прегненолона [2, 115]. Фосфорилирование мышиного белка STARD1 по остатку Ser232 митохондриальной протеинкиназой ERK способствует взаимодействию с OMM, а также защищает молекулу STARD1 от преждевременной деградации в матриксе [138]. В работе было показано, что уровень мутантной формы STARD1 с блокирующей фосфорилирование заменой S232A в области митохондрий снижается по сравнению с STARD1 дикого типа [138].

Резкое увеличение содержания холестерола в митохондриях в процессе стероидогенеза может приводить к нарушению целостности митохондрий, влияя на текучесть митохондриальной мембраны [144]. Чтобы избежать этого, активный белок необходимо удалять. Поэтому часть активного белка STARD1 в результате потенциал-зависимого процесса направляется в матрикс митохондрии для последующей, предположительно, трехстадийной деградации. Время полужизни активной формы белка в цитоплазме оценивается как 3–5 мин [131, 145], далее STARD1 попадает в митохондрии и там проводит последние часы своей «жизни». Зрелая форма белка имеет среднее время полужизни 2–4 ч [146].

Анализ аминокислотной последовательности крысиного STARD1 выявил наличие двух консервативных участков узнавания для митохондриальных металлопротеаз (Metalloprotease cleavage enzymes (MMPs) [147]. В случае крысиного STARD1 показано, что полноразмерный белок (p37) попадает в межмитохондриальное пространство, где происходит его процессинг до промежуточной формы p32. Затем белок p32 попадает в матрикс митохондрии, где сперва образуется зрелая форма p30, а затем происходит ее деградация [148] под действием целого «коктейля» из протеаз: матриксной LONпротеазы, мембранно-ассоциированной AFG3L2 и, наконец, еще не идентифицированной третьей протеазы (рис. 5) [149]. LON-протеаза вовлечена в деградацию примерно 40% импортированного белка [149]. Показано, что протеолиз белка в митохондриях мышиных клеток Y-1 является необходимым условием для синтеза прегненолона [131]. Хотя у человека механизм митохондриальной деградации STARD1

до сих пор изучен не до конца, имеющиеся данные свидетельствуют, что у млекопитающих она является важным аспектом регуляции активности белка.

VI. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ STARD1 С ДРУГИМИ БЕЛКАМИ

На сегодняшний день принято считать, что максимальная активность STARD1 наблюдается, когда он связан с OMM [2], где он взаимодействует с другими белками в составе сложного 800 кДа белкового комплекса, *трансдуцеосомы* [150]. Несмотря на то, что роль каждого белка трансдуцеосомы в отдельности более-менее известна, механизм работы всего комплекса не установлен.

В состав трансдуцеосомы помимо белка STARD1 входят мембранный TSPO, белки VDAC, PAP7, регуляторная субъединица PKA (RI альфа) и белки семейства 14-3-3 (рис. 5) [150], однако данные о роли тех или иных белков в стероидогенезе противоречивы. С одной стороны, показано, что нарушения гена *star* у мышей [151], удаление продуктов гена *tspo* в клеточной линии крысиных опухолевых клеток Лейдига R2C [152] и замена полноразмерного белка Pap7 на его фрагмент [153] критически влияют на стероидогенез. В то же время, по данным другой работы, у мышей с нокаутом по TSPO не наблюдалось изменений в гаметогенезе, репродукции и стероидогенезе в клетках Лейдига [154].

TSPO (ранее идентифицированный как бензодиазепиновый рецептор) – небольшой 18 кДа белок, который экспрессируется в больших количествах в стероидогенных клетках и локализуется на OMM [155]. Несмотря на ранние работы, показывающие взаимодействие TSPO и STARD1 [156], работы последних лет пересматривают участие белка TSPO в стероидогенезе [27]. Два следующих элемента трансдуцеосомы – регуляторная субъединица РКА (RI альфа) и привлекающий ее к мембране белок РАР7 – вероятно, необходимы для модуляции активности элементов белкового комплекса. Показано, что после обработки клеток линий MA-10 и COS-F2-130 гормоном hCG происходит формирование комплекса STARD1-PKARI альфа-РАР7-TSPO, в котором соотношение STARD1 к другим белкам со временем увеличивается и максимальное значение наблюдается после 30 мин воздействия [157].

Сшивание химическими агентами STARD1 с мембранными митохондриальными белками позволило идентифицировать в этом сшитом комплексе еще один компонент трансдуцеосомы – белок VDAC1 [158]. VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel 1) – β-склад-

чатый белок, вовлеченный в регуляцию транспорта ионов и малых молекул через OMM [46]. Взаимодействие белков VDAC1 и STARD1 считается необходимым для переноса холестерола к OMM [158]. В местах контактов митохондриальной мембраны с мембраной ЭПР обнаружен гомологичный белок VDAC2, взаимодействие STARD1 с которым также оказывает положительный эффект на синтез прегненолона [159].

В состав трансдуцеосомы входят также белки семейства 14-3-3, которые выполняют различные функции в клетке, взаимодействуя с белками-партнерами, имеющими фосфорилированные мотивы вида (R/K)XX[pS/pT]X(P/G) [160, 161]. В репертуар белков-партнеров 14-3-3 входят протеинкиназы, рецепторные и сигнальные белки, белки, регулирующие транскрипцию, клеточный цикл и апоптоз, ферменты и др. [162].

В 2012 году в лаборатории В. Пападопоулоса была обнаружена обратная связь между стероидогенезом и экспрессией белков 14-3-3 [163]. В организме человека обнаружено семь изоформ 14-3-3, пять из которых присутствуют в стероидогенных клетках и соочищаются с митохондриальной фракцией [163]. Под действием hCG в клетках MA-10 увеличивается экспрессия изоформ 14-3-3 γ и 14-3-3 ϵ в 4 и 1.5 раза, соответственно [163]. За исключением 14-3-3 σ , остальные изоформы способны к образованию гетеродимеров [161, 164]. Любопытно отметить, что стабильный гетеродимер 14-3-3, построенный из γ и ϵ изоформ, экспрессия которых увеличивается при гормональной стимуляции стероидогенеза [163], был ранее охарактеризован как фактор, стимулирующий митохондриальный импорт (Mitochondrial import Stimulating Factor, MSF) [165]. Эти данные позволяют предполагать важную роль 14-3-3 в регуляции стероидогенеза.

Несмотря на то, что *in silico* анализ последовательностей входящих в трансдуцеосому белков показал наличие мотивов узнавания во многих белках комплекса, только взаимодействие 14-3-3 γ /STARD1 зависело от времени воздействия сАМР [163]. В белке STARD1 выявляются два участка, RRS**pS**⁵⁷LL и RRG**pS**¹⁹⁵TC (нумерация и последовательность для STARD1 человека), похожих на мотивы, связываемые белками 14-3-3. По данным литературы, основная роль в связывании с 14-3-3 отводится участку вокруг Ser195, а роль Ser57 во взаимодействии не установлена [163, 166].

Согласно некоторым гипотезам [163, 166], гормональное воздействие увеличивает уровень 14-3-3ү и вызывает посттрансляционные модификации, приводящие к разрушению димера 14-3-3ү, причем его мономеры взаимодействуют с *нефосфорилированным* остатком

Ser195 в STARD1 и физически блокируют его доступность для PKA. Взаимодействие 14-3-3 и STARD1, по-видимому, транзиентное, и комплекс быстро распадается, а мономеры 14-3-3 собираются в димеры. По мнению авторов гипотезы, связывание STARD1 с 14-3-3γ привлекает 14-3-3ε, из-за возникающей конкуренции между партнерами 14-3-3 взаимодействие 14-3-3ε с VDAC1 ослабевает. Далее, по мере высвобождения STARD1 свободный 14-3-3ε может опять связываться с VDAC1 [167, 168].

Предложенный механизм содержит ряд противоречий и неточностей относительно общепринятых принципов димеризации 14-3-3 и их взаимодействия с белками-партнерами [161, 169]. Так, например, вызывает вопросы как наличие гиперфосфорилированной формы димера 14-3-3 р начальном состоянии, так и уменьшение степени фосфорилирования и увеличение степени ацетилирования 14-3-3 при накоплении сАМР. Помимо этого, неожиданным кажется предположение о взаимодействии STARD1 с 14-3-3 в *нефосфорилирование рованном* состоянии, тогда как фосфорилирование РКА разрушает комплекс, хотя для фосфорилируемых партнеров 14-3-3 обычно известно ровно противоположное.

Не вносит ясность в понимание взаимодействия между 14-3-3 и STARD1 недавно охарактеризованное взаимодействие между ближайшим гомологом, STARD3, и изоформами 14-3-3η и 14-3-3τ. Хотя аминокислотная последовательность STARD3 не содержит мотивов, узнаваемых 14-3-3, в составе STARD-домена был обнаружен участок 392-KSASNP-397, по данным авторов, отвечающий за связывание с 14-3-3 вне зависимости от фосфорилирования [170]. Таким образом, взаимодействие 14-3-3 с STARD1 и его гомологами является крайне интересным в контексте регуляции стероидогенеза, однако данные литературы на этот счет чрезвычайно противоречивы, а высказанные гипотезы нуждаются в тщательной проверке.

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на многолетнее и всестороннее изучение стероидогенного регуляторного белка с применением постоянно совершенствующихся методов биохимии, молекулярной биологии, биофизики и биоинформатики, многие вопросы так и остаются либо без ответов, либо имеют альтернативные объяснения. В некоторых областях изучения STARD1 все же смогли закрепиться лидирующие модели (например, участие Ω_1 петли в связывании холестерола или функционирование белка в составе трансдуцеосомы), однако такие важные аспекты, как

ориентация холестерола, механизм взаимодействия с белками 14-3-3 или собственно импорт STARD1 в матрикс митохондрии остаются далекими от понимания и требуют дальнейших смелых гипотез и грамотных экспериментов.

Изучение особенностей STARD1 имеет не только фундаментальную научную ценность. Не менее любопытным и перспективным, и в то же время пока мало развитым направлением является использование STARD1 в качестве агента, доставляющего химические соединения в митохондрии. В одной из работ 2018 года [119] *in silico* были проанализированы эффекты ряда токсических веществ, и показано, что ингибиторы и потенциально токсические соединения имеют хорошую аффинность к START-белкам. Безусловно, идея STARD1-опосредованной доставки в митохондрии, например, опухолевой клетки, некоторых синтетических соединений, разрушающих ее, кажется очень многообещающей, но требует сосредоточенных усилий для успешной реализации.

Авторы выражают благодарность О.Д. Лопиной, Л.А. Новиковой и Я.В. Фалетрову за внимательное прочтение обзора и замечания.

ЛИТЕРАТУРА

- Ткачук, В.А., Воротников, А.В., Тюрин-Кузьмин, П.А. (2017) Основы молекулярной эндокринологии. Рецепция и внутриклеточная сигнализация./ под ред. акад. Ткачука В.А. Москва, 2017, 256 с.
- Bose, H.S., Lingappa, V.R., Miller, W.L. (2002) Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import, *Nature*, 417, 87–91.
- Miller, W.L. (2018) Mechanisms in endocrinology: rare defects in adrenal steroidogenesis, *Eur J Endocrinol*, 179, R125–R141.
- Auchus, R.J. (2015) The classic and nonclassic concenital adrenal hyperplasias, *Endocr. Pract.*, 21, 383–389.
- King, S.R., Bhangoo, A., Stocco, D.M. (2010) Functional and physiological consequences of StAR deficiency: Role in lipoid congenital adrenal hyperplasia, *Pediatr. Adrenal Dis.*, 20, 47–53.
- Nakae, J., Tajima, T., Sugawara, T., Arakane, F., Hanaki, K., Hotsubo, T., Igarashi, N., Igarashi, Y., Ishii, T., Koda, N., Kondo, T., Kohno, H., Nakagawa,

Y., Tachibana, K., Takeshima, Y., Tsubouchi, K., Strauss, J.F., Fujieda, K. (1997) Analysis of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene in Japanese patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia, *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 571–576.

- Bose, H.S., Sugawara, T., Strauss, J.F., Miller, W.L. (1996) The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia, *N. Engl. J. Med.*, 335, 1870–1878.
- Bose, H.S., Sato, S., Aisenberg, J., Shalev, S.A., Matsuo, N., Miller, W.L. (2000) Mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in six patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85, 3636–3639.
- Kim, J.M., Choi, J.H., Lee, J.H., Kim, G.H., Lee, B.H., Kim, H.S., Shin, J.H., Shin, C.H., Kim, C.J., Yu, J., Lee, D.Y., Cho, W.K., Suh, B.K., Lee, J.E., Chung, H.R., Yoo, H.W. (2011) High allele frequency of the p.Q258X mutation and identification of a novel mis-splicing

mutation in the STAR gene in Korean patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia, *Eur. J. Endocrinol.*, **165**, 771–778.

- Achermann, J.C., Meeks, J.J., Jeffs, B., Das, U., Clayton, P.E., Brook, C.G., Jameson, J.L. (2001) Molecular and structural analysis of two novel StAR mutations in patients with lipoid congenital adrenal hyperplasia, *Mol. Genet. Metab.*, **73**, 354–357.
- Baquedano, M.S., Guercio, G., Marino, R., Berensztein, E., Costanzo, M., Ramírez, P., Bailez, M., Vaiani, E., Maceiras, M., Rivarola, M.A., Belgorosky, A. (2013) Novel heterozygous mutation in the steroidogenic acute regulatory protein gene in a 46,XY patient with congenital lipoid adrenal hyperplasia, *Med.*, **73**, 297–302.
- 12. Lekarev, O., Mallet, D., Yuen, T., Morel, Y., New, M.I. (2012) Congenital lipoid adrenal hyperplasia (a rare form of adrenal insufficiency and ambiguous genitalia) caused by a novel mutation of the steroidogenic acute regulatory protein gene, *Eur. J. Pediatr.*, 171, 787–793.
- Khoury, K., Barbar, E., Ainmelk, Y., Ouellet, A., Lavigne, P., LeHoux, J.-G. (2016) Thirty-eight-year follow-up of two sibling lipoid congenital adrenal hyperplasia patients due to homozygous steroidogenic acute regulatory (STARD1) protein mutation. Molecular structure and modeling of the STARD1 L275P mutation, *Front. Neurosci.*, 10, 527–543.
- 14. Radiuk, V.G., Shkumatov, V.M., Chashchin, V.L., Akhrema, A.A. (1982) Interaction between cytochrome P-450scc and adrenodoxin in solution under effects of low spin effectors, *Biokhimiia*, **47**, 1700–1709.
- 15. Новикова, Л.А., Фалетров, Я.В., Ковалева, И.Е., Мауерсбергер, Ш., Лузиков, В.Н., Шкуматов, В.М. (2009) От структуры и функции ферментов биосинтеза стероидов к новым генно-инженерным технологиям, *Vcnexu биологической химии*, **49**, 159–210.
- 16. Kraan, G.P.B., Dullaart, R.P.F., Pratt, J.J., Wolthers, B.G., Drayer, N.M., De Bruin, R. (1998) The daily cortisol production reinvestigated in healthy

men. The serum and urinary cortisol production rates are not significantly different, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1247–1252.

- Miller, W.L. (2017) Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 165, 18–37.
- Alberta, J.A., Epstein, L.F., Pon, L.A., Orme-Johnson, N.R. (1989) Mitochondrial localization of a phosphoprotein that rapidly accumulates in adrenal cortex cells exposed to adrenocorticotropic hormone or to cAMP, *J. Biol. Chem.*, 264, 2368–2372.
- Epstein, L.F., Roberts, N. (1991) Regulation of steroid hormone biosynthesis. Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells, *J Biol Chem*, **266**, 19739–19745.
- 20. Epstein, L.F., Orme-Johnson, N.R. (1991) Acute action of luteinizing hormone on mouse Leydig cells: Accumulation of mitochondrial phosphoproteins and stimulation of testosterone synthesis, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **81**, 113–126.
- Stocco, D.M., Zhao, A.H., Tu, L.N., Morohaku, K., Selvaraj, V. (2017) A brief history of the search for the protein(s) involved in the acute regulation of steroidogenesis, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 441, 7–16.
- Conneely, O.M., Headon, D.R., Olsont, C.D., Ungart, F., Dempseytt, M.E. (1984) Intramitochondrial movement of adrenal sterol carrier protein with cholesterol in response to corticotropin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81, 2970–2974.
- Scallen, T.J., Pastuszyn, A., Noland, B.J., Chanderbhan, R., Kharroubi, A., Vahouny, G.V. (1985) Sterol carrier and lipid transfer proteins, *Chem. Phys. Lipids*, 38, 239–261.
- 24. Chanderbhan, R.F., Kharroubi, A.T., Noland, B.J., Scallen, T.J., Vahouny, G.V. (1986) Sterol carrier protein2: Further evidence for its role in adrenal steroidogenesis, *Endocr. Res.*, 12, 351–370.
- 25. Pedersen, R.C., Brownie, A.C. (1987) Steroidogenesis-activator polypeptde

isolated from a rat Leydig cell tumor, *Science*, **236**, 188–190.

- 26. Papadopoulos, V. (1993) Peripheraltype benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: Biological role in steroidogenic cell function, *Endocr. Rev.*, 14, 222–240.
- 27. Selvaraj, V., Stocco, D.M., Tu, L.N. (2015) Minireview: Translocator Protein (TSPO) and Steroidogenesis: A Reappraisal, *Mol. Endocrinol.*, 29, 490–501.
- Tu, L.N., Morohaku, K., Manna, P.R., Pelton, S.H., Butler, W.R., Stocco, D.M., Selvaraj, V. (2014) Peripheral benzodiazepine receptor/translocator protein global knock-out mice are viable with no effects on steroid hormone biosynthesis, J. Biol. Chem., 289, 27444–27454.
- Clark, B.J., Wells, J., King, S.R., Stocco, D.M. (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), *J. Biol. Chem.*, 269, 28314–28322.
- 30. Clark, B.J., Stocco, D.M. (1995) Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells, *Endocr. Res.*, **21**, 243–257.
- 31. Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J.F., Clark, B.J., Stocco, D.M., Saenger, P., Rogol, A., Miller, W.L. (1995) Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis, *Science*, 267, 1828–1831.
- 32. Sugawara, T., Holt, J.A., Driscoll, D., Strauss, J.F., Lin, D., Miller, W.L., Patterson, D., Clancy, kevin P., Hart, I.M., Clark, B.J., Stocco, D.M. (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **92**, 4778–4782.
- Anuka, E., Gal, M., Stocco, D.M., Orly, J. (2013) Expression and roles of steroidogenic acute regulatory (StAR)

protein in «non-classical», extra-adrenal and extra-gonadal cells and tissues, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **371**, 47–61.

- 34. King, S.R., Stocco, D.M. (2011) Steroidogenic acute regulatory protein expression in the central nervous system, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, 2, 72.
- Miller, W.L. (2017) Steroidogenesis: Unanswered Questions, *Trends Endo*crinol. Metab., 28, 771–793.
- Stocco, D.M., Clark, B.J. (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells, *Endocr. Rev.*, 17, 221–244.
- Sanderson, J. T. (2009) Placental and fetal steroidogenesis, in *Methods Mol. Biol.*, 2009, 127–136.
- Reddy, D.S. (2010) Neurosteroids. Endogenous role in the human brain and therapeutic potentials, in *Progress* in Brain Research, 186, 2010, 113–137.
- Tsutsui, K. (2008) Minireview: Progesterone biosynthesis and action in the developing neuron, *Endocrinology*, 149. 2757–2761, 2008.
- 40. Stocco, D.M. (1999) An update on the mechanism of action of the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 107, 229–235.
- 41. Farkash, Y., Timberg, R., Orlyf, J. (1986) Preparation of antiserum to rat cytochrome P-450 cholesterol side chain cleavage, and its use for ultrastructural localization of the immunoreactive enzyme by protein A-gold technique, *Endocrinology*, **118**, 1353–1365.
- Bollag, W.B. (2014) Regulation of aldosterone synthesis and secretion, *Compr. Physiol.*, 4, 1017–1055.
- 43. Krause, M.R., Regen, S.L. (2014) The structural role of cholesterol in cell membranes: from condensed bilayers to lipid rafts, *Acc. Chem. Res.*, **47**, 3512–3521.
- 44. Maxfield, F.R., Wüstner, D. (2002) Intracellular cholesterol transport, in J. Clin. Invest., 110, 2002, 891–898.
- Horvath, S.E., Daum, G. (2013) Lipids of mitochondria, *Prog. Lipid Res.*, 52, 590–614.
- 46. Papadopoulos, V., Miller, W.L. (2012) Role of mitochondria in steroidogene-

sis, Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., 26, 771–790.

- 47. Shen, W.J., Azhar, S., Kraemer, F.B. (2016) Lipid droplets and steroidogenic cells, *Experimental Cell Research*, 340. Elsevier, 209–214, 2016.
- Miller, W.L. (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis, *Endocr Rev*, 9, 295–318.
- 49. Lev, S. (2010) Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11, 739–750.
- 50. Iaea, D.B., Mao, S., Lund, F.W., Maxfield, F.R. (2017) Role of STARD4 in sterol transport between the endocytic recycling compartment and the plasma membrane, *Mol. Biol. Cell*, **28**, 1111–1122.
- Elustondo, P., Martin, L.A., Karten, B. (2017) Mitochondrial cholesterol import, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1862, 90–101.
- 52. Lahiri, S., Toulmay, A., Prinz, W.A. (2015) Membrane contact sites, gateways for lipid homeostasis, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **33**, 82–87.
- Chiapparino, A., Maeda, K., Turei, D., Saez-Rodriguez, J., Gavin, A.C. (2016) The orchestra of lipid-transfer proteins at the crossroads between metabolism and signaling, *Prog. Lipid Res.*, 61, 30–39.
- 54. Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: Where they are and how they behave, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9. 112–124, 2008.
- 55. Wong, L.H., Čopič, A., Levine, T.P. (2017) Advances on the Transfer of Lipids by Lipid Transfer Proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 516–530.
- Mesmin, B., Maxfield, F.R. (2009) Intracellular sterol dynamics, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, 1791, 636–645.
- Salminen, T.A., Blomqvist, K., Edqvist, J. (2016) Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function, *Planta*, 244, 971–997.
- 58. Li, N.C., Fan, J., Papadopoulos, V. (2016) Sterol carrier protein-2, a nonspecific lipid-transfer protein, in intracellular cholesterol trafficking in

testicular leydig cells, PLoS One, 11, e0149728.

- 59. Schrick, K., Nguyen, D., Karlowski, W.M., Mayer, K.F.X. (2004) START lipid/sterol-binding domains are amplified in plants and are predominantly associated with homeodomain transcription factors, *Genome Biol.*, 5, R41.
- 60. Soccio, R.E., Breslow, J.L. (2003) StAR-related lipid transfer (START) proteins: Mediators of intracellular lipid metabolism, J. Biol. Chem., 278, 22183–22186.
- Alpy, F., Tomasetto, C. (2005) Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals, *J. Cell Sci.*, **118**, 2791–2801.
- 62. Kallen, C.B., Billheimer, J.T., Summerst, S.A., Stayrook, S.E., Lewis, M., Strauss, J.F. (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein, *J Biol Chem*, **273**, 26285–26288.
- Petrescu, A.D., Gallegos, A.M., Okamura, Y., Strauss, J.F., Schroeder, F. (2001) Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics, *J. Biol. Chem.*, 276, 36970–36982.
- 64. Korytowski, W., Wawak, K., Pabisz, P., Schmitt, J.C., Chadwick, A.C., Sahoo, D., Girotti, A.W. (2015) Impairment of macrophage cholesterol efflux by cholesterol hydroperoxide trafficking implications for atherogenesis under oxidative stress, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 35, 2104–2113.
- 65. Baker, B.Y., Epand, R.F., Epand, R.M., Miller, W.L. (2007) Cholesterol binding does not predict activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, *J. Biol. Chem.*, **282**, 10223–10232.
- 66. Clark, B.J., Stocco, D.M. (1996) StAR – A tissue specific acute mediator of steroidogenesis, *Trends Endocrinol. Metab.*, 7, 227–233.
- Tsujishita, Y., Hurley, J.H. (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain, *Nat. Struct. Biol.*, 7, 408–414.
- 68. Horvath, M.P., George, E.W., Tran, Q.T., Baumgardner, K., Zharov, G.,

Lee, S., Sharifzadeh, H., Shihab, S., Mattinson, T., Li, B., Bernstein, P.S. (2016) Structure of the lutein-binding domain of human StARD3 at 1.74 Å resolution and model of a complex with lutein, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.*, **72**, 609–618.

- 69. Li, B., Vachali, P., Frederick, J.M., Bernstein, P.S. (2011) Identification of StARD3 as a lutein-binding protein in the macula of the primate retina, *Biochemistry*, **50**, 2541–2549.
- Vachali, P., Li, B., Nelson, K., Bernstein, P.S. (2012) Surface plasmon resonance (SPR) studies on the interactions of carotenoids and their binding proteins, *Arch. Biochem. Biophys.*, **519**, 32–37.
- Tuckey, R.C., Bose, H.S., Czerwionka, I., Miller, W.L. (2004) Molten globule structure and steroidogenic activity of N-218 MLN64 in human placental mitochondria, *Endocrinology*, 145, 1700–1707.
- 72. Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Wong, E., Marques, D., Redford, K., Gil, G., Hylemon, P., Pandak, W.M. (2008) Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation, J. Lipid Res., 49, 1409–1419.
- 73. Korytowski, W., Rodríguez-Agudo, D., Pilat, A., Girotti, A.W. (2010) StarD4-mediated translocation of 7-hydroperoxycholesterol to isolated mitochondria: deleterious effects and implications for steroidogenesis under oxidative stress conditions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **392**, 58–62.
- 74. Romanowski, M.J., Soccio, R.E., Breslow, J.L., Burley, S.K. (2002) Crystal structure of the Mus musculus cholesterol- regulated START protein 4 (StarD4) containing a StAR-related lipid transfer domain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 6949–6954.
- Rodriguez-Agudo, D., Calderon-Dominguez, M., Ren, S., Marques, D., Redford, K., Medina-Torres, M.A., Hylemon, P., Gil, G., Pandak, W.M. (2011) Subcellular localization and regulation of StarD4 protein in macrophages and fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 1811, 597–606.

- Mesmin, B., Pipalia, N.H., Lund, F.W., Ramlall, T.F., Sokolov, A., Eliezer, D., Maxfield, F.R. (2011) STARD4 abundance regulates sterol transport and sensing, *Mol. Biol. Cell*, 22, 4004–4015.
- 77. Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Hylemon, P.B., Redford, K., Natarajan, R., Del Castillo, A., Gil, G., Pandak, W.M. (2005) Human StarD5, a cytosolic StAR-related lipid binding protein, *J. Lipid Res.*, 46, 1615–1623.
- Létourneau, D., Lorin, A., Lefebvre, A., Frappier, V., Gaudreault, F., Najmanovich, R., Lavigne, P., LeHoux, J.-G. (2012) StAR-related lipid transfer domain protein 5 binds primary bile acids, *J. Lipid Res.*, 53, 2677–2689.
- 79. Soccio, R.E., Adams, R.M., Romanowski, M.J., Sehayek, E., Burley, S.K., Breslow, J.L. (2002) The cholesterolregulated StarD4 gene encodes a StARrelated lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 6943–6948.
- Létourneau, D., Lorin, A., Lefebvre, A., Cabana, J., Lavigne, P., Lehoux, J.G. (2013) Thermodynamic and solution state NMR characterization of the binding of secondary and conjugated bile acids to STARD5, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids*, 1831, 1589–1599.
- Létourneau, D., Lefebvre, A., Lavigne, P., LeHoux, J.G. (2013) STARD5 specific ligand binding: Comparison with STARD1 and STARD4 subfamilies, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 371, 20–25.
- Létourneau, D., Lefebvre, A., Lavigne, P., LeHoux, J.G. (2015) The binding site specificity of STARD4 subfamily: Breaking the cholesterol paradigm, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 408, 53–61.
- Létourneau, D., Bédard, M., Cabana, J., Lefebvre, A., LeHoux, J.-G., Lavigne, P. (2016) STARD6 on steroids: solution structure, multiple timescale backbone dynamics and ligand binding mechanism, *Sci. Rep.*, 6, 28486.
- 84. Bose, H.S., Whittal, R.M., Ran, Y., Bose, M., Baker, B.Y., Miller, W.L. (2008) StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male

germ-line protein, *Biochemistry*, **47**, 2277–2288.

- 85. Chang, I.Y., Jeon, Y.J., Jung, S.M., Jang, Y.H., Ahn, J.B., Park, K.S., Yoon, S.P. (2010) Does the StarD6 mark the same as the StAR in the nervous system?, *J. Chem. Neuroanat.*, **40**, 239–242.
- Calderon-Dominguez, M., Gil, G., Medina, M.A., Pandak, W.M., Rodríguez-Agudo, D. (2014) The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatoryrelated lipid transfer (START) domain proteins: New players in cholesterol metabolism, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 49, 64–68.
- 87. Kang, H.W., Wei, J., Cohen, D.E. (2010) PC-TP/StARD2: Of membranes and metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.*, 21, 449–456.
- Horibata, Y., Sugimoto, H. (2010) StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria, *J. Biol. Chem.*, 285, 7358–7365.
- 89. Cohen, D.E., Green, R.M., Wu, M.K., Beier, D.R. (1999) Cloning, tissuespecific expression, gene structure and chromosomal localization of human phosphatidylcholine transfer protein, *Biochim. Biophys. Acta*, 1447, 265–270.
- 90. De Brouwer, A.P.M., Westerman, J., Kleinnijenhuis, A., Bevers, L.E., Roelofsen, B., Wirtz, K.W.A. (2002) Clofibrate-induced relocation of phosphatidylcholine transfer protein to mitochondria in endothelial cells, *Exp. Cell Res.*, **274**, 100–111.
- 91. Kanno, K., Wu, M.K., Scapa, E.F., Roderick, S.L., Cohen, D.E. (2007) Structure and function of phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP)/ StarD2, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids, 1771, 654–662.
- 92. Flores-Martin, J., Rena, V., Angeletti, S., Panzetta-Dutari, G.M., Genti-Raimondi, S. (2013) The lipid transfer protein StarD7: structure, function, and regulation, *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 6170–6186.
- 93. Olayioye, M.A., Vehring, S., Müller, P., Herrmann, A., Schiller, J., Thiele, C., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., Pomorski, T. (2005) StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid

transfer protein, J. Biol. Chem., 280, 27436–27442.

- 94. Alpy, F., Tomasetto, C. (2014) START ships lipids across interorganelle space, *Biochimie*, 96, 85–95.
- 95. Zhang, S., Chang, X., Ma, J., Chen, J., Zhi, Y., Li, Z., Dai, D. (2018) Downregulation of STARD8 in gastric cancer and its involvement in gastric cancer progression, *Onco. Targets. Ther.*, 11, 2955–2961.
- 96. Naumann, H., Rathjen, T., Poy, M.N., Spagnoli, F.M. (2018) The RhoGAP Stard13 controls insulin secretion through F-actin remodeling, *Mol. Metab.*, 8, 96–105.
- 97. Basak, P., Leslie, H., Dillon, R.L., Muller, W.J., Raouf, A., Mowat, M.R.A. (2018) In vivo evidence supporting a metastasis suppressor role for Stard13 (Dlc2) in ErbB2 (Neu) oncogene induced mouse mammary tumors, *Genes Chromosom. Cancer*, 57, 182–191.
- 98. Adams, S.H., Chui, C., Schilbach, S.L., Yu, X.X., Goddard, A.D., Grimaldi, J.C., Lee, J., Dowd, P., Colman, S., Lewin, D.A. (2001) BFIT, a unique acyl-CoA thioesterase induced in thermogenic brown adipose tissue: cloning, organization of the human gene and assessment of a potential link to obesity, *Biochem. J.*, **360**, 135–142.
- 99. Han, S., Cohen, D.E. (2012) Functional characterization of thioesterase superfamily member 1/Acyl-CoA thioesterase 11: implications for metabolic regulation, *J. Lipid Res.*, 53, 2620–2631.
- 100. Torres, J.Z., Summers, M.K., Peterson, D., Brauer, M.J., Lee, J., Senese, S., Gholkar, A.A., Lo, Y.-C., Lei, X., Jung, K., Anderson, D.C., Davis, D.P., Belmont, L., Jackson, P.K. (2011) The STARD9/Kif16a kinesin associates with mitotic microtubules and regulates spindle pole assembly, *Cell*, 147, 1309–1323.
- 101. Gatta, A.T., Wong, L.H., Sere, Y.Y., Calderón-Noreña, D.M., Cockcroft, S., Menon, A.K., Levine, T.P. (2015) A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role

in ER-PM sterol transport, *Elife*, **4**, e07253.

- 102. Elbaz-Alon, Y., Eisenberg-Bord, M., Shinder, V., Stiller, S.B., Shimoni, E., Wiedemann, N., Geiger, T., Schuldiner, M. (2015) Lam6 regulates the extent of contacts between organelles, *Cell Rep.*, **12**, 7–14.
- 103. Murley, A., Sarsam, R.D., Toulmay, A., Yamada, J., Prinz, W.A., Nunnari, J. (2015) Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER-mitochondria and ER-vacuole contacts, *J Cell Biol*, **209**, 539–548.
- 104. Murley, A., Yamada, J., Niles, B.J., Toulmay, A., Prinz, W.A., Powers, T., Nunnari, J. (2017) Sterol transporters at membrane contact sites regulate TORC1 and TORC2 signaling, *J. Cell Biol.*, **216**, 2679–2689.
- 105. Jentsch, J.A., Kiburu, I., Pandey, K., Timme, M., Ramlall, T., Levkau, B., Wu, J., Eliezer, D., Boudker, O., Menon, A.K. (2018) Structural basis of sterol binding and transport by a yeast StARkin domain, *J. Biol. Chem.*, 293, 5522–5531.
- 106. Tong, J., Manik, M.K., Im, Y.J. (2018) Structural basis of sterol recognition and nonvesicular transport by lipid transfer proteins anchored at membrane contact sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **115**, E856–E865.
- 107. Wong, L.H., Levine, T.P. (2016) Lipid transfer proteins do their thing anchored at membrane contact sites... but what is their thing?, *Biochem. Soc. Trans.*, 44, 517–527.
- 108. Im, Y.J., Raychaudhuri, S., Prinz, W.A., Hurley, J.H. (2005) Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins, *Nature*, 437, 154–158.
- 109. Schulz, T.A., Prinz, W.A. (2007) Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771. 769–780, 2007.
- 110. Thorsell, A.-G., Lee, W.H., Persson, C., Siponen, M.I., Nilsson, M., Busam, R.D., Kotenyova, T., Schüler, H., Lehtiö, L. (2011) Comparative structural analysis of lipid binding START domains, *PLoS One*, 6, e19521.

- 111. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015) The I-TASSER suite: protein structure and function prediction, *Nat. Methods*, **12**, 7–8.
- 112. Iyer, L.M., Koonin, E. V., Aravind, L. (2001) Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily, *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 43, 134–144.
- 113. Arakane, F., Sugawara, T., Nishino, H., Liu, Z., Holt, J.A., Pain, D., Stocco, D.M., Miller, W.L., Strauss, J.F. (1996) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., **93**, 13731–13736.
- 114. Sasaki, G., Ishii, T., Jeyasuria, P., Jo, Y., Bahat, A., Orly, J., Hasegawa, T., Parker, K.L. (2008) Complex role of the mitochondrial targeting signal in the function of steroidogenic acute regulatory protein revealed by bacterial artificial chromosome transgenesis in vivo., *Mol. Endocrinol.*, **22**, 951–64.
- 115. Bose, H.S., Lingappa, V.R., Miller, W.L. (2002) The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane, *Endocr. Res.*, 28, 295–308.
- 116. Bose, H.S., Whittal, R.M., Baldwin, M. a., Miller, W.L. (1999) The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 96, 7250–7255.
- 117. Sluchanko, N.N., Tugaeva, K. V., Maksimov, E.G. (2017) Solution structure of human steroidogenic acute regulatory protein STARD1 studied by small-angle X-ray scattering, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 489, 445–450.
- 118. Murcia, M., Faráldo-Gómez, J.D., Maxfield, F.R., Roux, B. (2006) Modeling the structure of the StART domains of MLN64 and StAR proteins in complex with cholesterol, *J. Lipid Res.*, 47, 2614–2630.
- 119. Kumar, K.K., Devi, B.U., Neeraja, P. (2018) Molecular activities and

ligand-binding specificities of StARrelated lipid transfer domains: exploring integrated in silico methods and ensemble-docking approaches, *SAR QSAR Environ. Res.*, **29**, 483–501.

- 120. Mathieu, A.P., Fleury, A., Ducharme, L., Lavigne, P., LeHoux, J.G. (2002) Insights into steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-dependent cholesterol transfer in mitochondria: Evidence from molecular modeling and structure-based thermodynamics supporting the existence of partially unfolded states of StAR, J. Mol. Endocrinol., 29, 327–345.
- 121. Tugaeva, K. V., Faletrov, Y. V., Allakhverdiev, E.S., Shkumatov, V.M., Maksimov, E.G., Sluchanko, N.N. (2018) Effect of the NBD-group position on interaction of fluorescentlylabeled cholesterol analogues with human steroidogenic acute regulatory protein STARD1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **497**, 58–64.
- 122. Haberland, M.E., Reynolds, J.A. (1973) Self-association of cholesterol in aqueous solution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**, 2313–2316.
- 123. 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, *J. Biol. Chem.*, 280, 41753–41760.
- 124. Roostaee, A., Barbar, E., Lehoux, J.-G., Lavigne, P. (2008) Cholesterol binding is a prerequisite for the activity of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), *Biochem. J.*, 412, 553–562.
- 125. Faletrov, Y. V., Bialevich, K.I., Edimecheva, I.P., Kostsin, D.G., Rudaya, E. V., Slobozhanina, E.I., Shkumatov, V.M. (2013) 22-NBDcholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 134, 59–66.
- 126. Robalo, J.R., Ramalho, J.P.P., Loura, L.M.S. (2013) NBD-labeled cholesterol analogues in phospholipid bilayers: Insights from molecular dynamics, J. Phys. Chem. B, 117, 13731–13742.

- 127. Roderick, S.L., Chan, W.W., Agate, D.S., Olsen, L.R., Vetting, M.W., Rajashankar, K.R., Cohen, D.E. (2002) Structure of human phosphatidylcholine transfer protein in complex with its ligand, *Nat. Struct. Biol.*, 9, 507–511.
- 128. Roostaee, A., Barbar, E., Lavigne, P., LeHoux, J.-G. (2009) The mechanism of specific binding of free cholesterol by the steroidogenic acute regulatory protein: evidence for a role of the C-terminal alpha-helix in the gating of the binding site, *Biosci. Rep.*, 29, 89–101.
- 129. Kudo, N., Kumagai, K., Matsubara, R., Kobayashi, S., Hanada, K., Wakatsuki, S., Kato, R. (2010) Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer, J. Mol. Biol., **396**, 245–251.
- 130. Iaea, D.B., Dikiy, I., Kiburu, I., Eliezer, D., Maxfield, F.R. (2015) STARD4 membrane interactions and sterol binding, *Biochemistry*, 54, 4623–4636.
- 131. Artemenko, I.P., Zhao, D., Hales, D.B., Hales, K.H., Jefcoate, C.R. (2001) Mitochondrial processing of newly synthesized steroidogenic acute regulatory protein (StAR), but not total StAR, mediates cholesterol transfer to cytochrome P450 side chain cleavage enzyme in adrenal cells, J. Biol. Chem., 276, 46583–46596.
- 132. Bahat, A., Perlberg, S., Melamed-Book, N., Lauria, I., Langer, T., Orly, J. (2014) StAR enhances transcription of genes encoding the mitochondrial proteases involved in its own degradation, *Mol. Endocrinol.*, 28, 208–224.
- 133. Rajapaksha, M., Kaur, J., Bose, M., Whittal, R.M., Bose, H.S. (2013) Cholesterol-mediated conformational changes in the steroidogenic acute regulatory protein are essential for steroidogenesis, *Biochemistry*, **52**, 7242–7253.
- 134. Prasad, M., Pawlak, K.J., Burak, W.E., Perry, E.E., Marshall, B., Whittal, R.M., Bose, H.S. (2017) Mitochondrial metabolic regulation by GRP78, *Sci. Adv.*, **3**, e1602038.

- 135. LaVoie, H.A., King, S.R. (2009) Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B, *Exp. Biol. Med.*, **234**, 880–907.
- 136. Sasaki, G., Zubair, M., Ishii, T., Mitsui, T., Hasegawa, T., Auchus, R.J. (2014) The contribution of serine 194 phosphorylation to steroidogenic acute regulatory protein function, *Mol. Endocrinol.*, 28, 1088–1096.
- 137. Arakane, F., King, S.R., Du, Y., Kallen, C.B., Walsh, L.P., Watari, H., Stocco, D.M., Strauss, J.F. (1997) Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity, J. Biol. Chem., 272, 32656–32662.
- 138. Duarte, A., Castillo, A.F., Podestá, E.J., Poderoso, C. (2014) Mitochondrial fusion and ERK activity regulate steroidogenic acute regulatory protein localization in mitochondria, *PLoS One*, 9, e100387.
- Christenson, L.K., Strauss, J.F. (2001) Steroidogenic acute regulatory protein: An update on its regulation and mechanism of action, *Arch. Med. Res.*, 32, 576–586.
- 140. Clark, B.J., Stocco, D.M. (2014) The steroidogenic acute regulatory protein (StAR), in Cholesterol transporters of the START domain protein family in health and disease: START Proteins – Structure and Function, B. J. Clark and D. M. Stocco, Eds. Springer Science+Business Media New York 2014, 2014, 15–48.
- 141. Men, Y., Fan, Y., Shen, Y., Lu, L., Kallen, A.N. (2017) The steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is regulated by the H19/let-7 axis, *Endocrinology*, **158**, 402–409.
- 142. Paz, C., Cornejo Maciel, F., Gorostizaga, A., Castillo, A.F., Mori Sequeiros García, M.M., Maloberti, P.M., Orlando, U.D., Mele, P.G., Poderoso, C., Podesta, E.J. (2016) Role of protein phosphorylation and tyrosine phosphatases in the adrenal regulation of steroid synthesis and mitochondrial function, *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, 7, 60.
- 143. Fleury, A., Mathieu, A.P., Ducharme, L., Hales, D.B., Lehoux, J.G. (2004)

Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **91**, 259–271.

- 144. Colell, A., García-Ruiz, C., Lluis, J.M., Coll, O., Mari, M., Fernández-Checa, J.C. (2003) Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity, J. Biol. Chem., 278, 33928–33935.
- 145. Clark, B.J., Hudson, E.A. (2015) StAR protein stability in Y1 and Kin-8 mouse adrenocortical cells, *Biology* (*Basel*)., **4**, 200–215.
- 146. Granot, Z., Geiss-Friedlander, R., Melamed-Book, N., Eimerl, S., Timberg, R., Weiss, A. M., Hales, K. H., Hales, D. B., Stocco, D. M., Orly, J. (2003) Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins, *Mol. Endocrinol.*, **17**, 2461–2476.
- 147. Bahat, A., Perlberg, S., Melamed-Book, N., Isaac, S., Eden, A., Lauria, I., Langer, T., Orly, J. (2015) Transcriptional activation of LON Gene by a new form of mitochondrial stress: A role for the nuclear respiratory factor 2 in StAR overload response (SOR), *Molecular and Cellular Endocrinology*, **408**. 62–72, 2015.
- 148. Lee, J., Tong, T., Duan, H., Foong, Y.H., Musaitif, I., Yamazaki, T., Jefcoate, C. (2016) Regulation of StAR by the N-terminal domain and coinduction of SIK1 and TIS11b/Znf3611 in single cells, *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, 7, 107.
- 149. Granot, Z., Kobiler, O., Melamedbook, N., Eimerl, S., Bahat, A., Lu, B., Braun, S., Maurizi, M.R., Suzuki, C.K., Oppenheim, A.B., Orly, J., Star, L. (2007) Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors, *Mol. Endocrinol.*, **21**, 2164–2177.
- 150. Rone, M.B., Midzak, A.S., Issop, L., Rammouz, G., Jagannathan, S., Fan, J., Ye, X., Blonder, J., Veenstra, T., Papadopoulos, V. (2012) Identification

of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones, *Mol. Endocrinol.*, **26**, 1868–82.

- 151. Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., Parker, K.L. (1997) Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipoid adrenal hyperplasia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 94, 11540–11545.
- 152. Papadopoulos, V., Amri, H., Li, H., Boujrad, N., Vidic, B., Garnier, M. (1997) Targeted Disruption of the Peripheral-type Benzodiazepine Receptor Gene Inhibits Steroidogenesis in the R2C Leydig Tumor Cell Line*, 272, 32129–32135.
- 153. Li, H., Degenhardt, B., Tobin, D., Yao, Z.-X., Tasken, K., Papadopoulos, V. (2001) Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: A peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIα)-associated protein, *Mol. Endocrinol.*, **15**, 2211–2228.
- 154. Morohaku, K., Pelton, S.H., Daugherty, D.J., Butler, W.R., Deng, W., Selvaraj, V. (2014) Translocator protein/peripheral benzodiazepine receptor is not required for steroid hormone biosynthesis, *Endocrinology*, **155**, 89–97.
- 155. Papadopoulos, V., Aghazadeh, Y., Fan, J., Campioli, E., Zirkin, B., Midzak, A. (2015) Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **408**, 90–98.
- 156. Rone, M.B., Fan, J., Papadopoulos, V. (2009) Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of proteinprotein interactions and implications in disease states, *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 646–658.
- 157. Liu, J., Rone, M., Papadopoulos, V. (2006) Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis, J *Biol Chem*, 281, 38879–38893.

- 158. Bose, M., Whittal, R.M., Miller, W.L., Bose, H.S. (2008) Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein, *J. Biol. Chem.*, 283, 8837–8845.
- 159. Prasad, M., Kaur, J., Pawlak, K.J., Bose, M., Whittal, R.M., Bose, H.S. (2015) Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) regulates steroidogenic activity via steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) interaction, J. Biol. Chem., 290, 2604–2616.
- Obsil, T., Obsilova, V. (2011) Structural basis of 14-3-3 protein functions, *Semin Cell Dev Biol*, 22, 663–672.
- 161. Sluchanko, N.N., Gusev, N.B. (2012) Oligomeric structure of 14-3-3 protein: What do we know about monomers?, *FEBS Lett.*, 586, 4249–4256.
- 162. van Hemert, M.J., Steensma, H.Y., van Heusden, G.P. (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis, *BioEssays*, 23, 936–946.
- 163. Aghazadeh, Y., Rone, M.B., Blonder, J., Ye, X., Veenstra, T.D., Hales, D.B., Culty, M., Papadopoulos, V. (2012) Hormone-induced 14-3-3γ adaptor protein regulates steroidogenic acute regulatory protein activity and steroid biosynthesis in MA-10 leydig cells, J. Biol. Chem., 287, 15380–15394.
- 164. Wilker, E.W., Grant, R.A., Artim, S.C., Yaffe, M.B. (2005) A structural basis for 14-3-3σ functional specificity, *J. Biol. Chem.*, **280**, 18891–18898.
- 165. Hachiya, N., Komiya, T., Alam, R., Iwahashi, J., Sakaguchi, M., Omura, T., Mihara, K. (1994) MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria, *EMBO J.*, **13**, 5146–5154.
- 166. Aghazadeh, Y., Ye, X., Blonder, J., Papadopoulos, V. (2014) Protein modifications regulate the role of 14-3-3γ adaptor protein in cAMP-induced steroidogenesis in MA-10 leydig cells, *J. Biol. Chem.*, **289**, 26542–26553.
- 167. Aghazadeh, Y., Papadopoulos, V. (2016) The role of the 14-3-3 protein

family in health, disease, and drug development, *Drug Discov. Today*, **21**, 278–287.

- 168. Aghazadeh, Y., Martinez-Arguelles, D.B., Fan, J., Culty, M., Papadopoulos, V. (2014) Induction of androgen formation in the male by a TAT-VDAC1 fusion peptide blocking 14-3-3ε protein adaptor and mitochondrial VDAC1 interactions, *Mollecular Ther.*, 22, 1779–1791.
- Sluchanko, N.N. (2018) Association of multiple phosphorylated proteins with the 14–3-3 regulatory hubs: Problems and perspectives, *J. Mol. Biol.*, 430, 20–26.
- Los 26.
 Liapis, A., Chen, F.W., Davies, J.P., Wang, R., Ioannou, Y.A. (2012) MLN64 transport to the late endosome is regulated by binding to 14-3-3 via a non-canonical binding site, *PLoS One*, 7, e34424.