

На правах рукописи

ТУГАЕВА Кристина Владимировна

**СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА СТЕРОИДОГЕННОГО
РЕГУЛЯТОРНОГО БЕЛКА (STARD1) ЧЕЛОВЕКА**

1.5.4. Биохимия

Автореферат диссертации

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва, 2023 г.

Работа выполнена в группе «Белок-белковые взаимодействия» Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель:

ведущий научный сотрудник
доктор биологических наук
Случанко Николай Николаевич

Официальные оппоненты:

Ширинский Владимир Павлович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточной подвижности научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России.

Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной медицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Защита состоится « 25 » мая 2023 г. в 13 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <http://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Орловский А. Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Стероидные гормоны - важная группа биологически активных соединений, которые играют роль во многих процессах жизнедеятельности организма. Стероидные гормоны регулируют водно-солевой баланс и метаболизм, обеспечивают развитие воспалительного ответа, а также контролируют развитие половых признаков. Поскольку стероидные гормоны обладают мощным физиологическим действием, организм не запасает их, а синтезирует по мере необходимости. Стероидогенез - многоступенчатый процесс, который начинается с переноса молекул холестерина в митохондрии и их превращения в прегненолон - общего предшественника всех стероидных гормонов. Всего в стероидогенезе задействовано более 25 ферментов [1]. Нарушения в синтезе стероидных гормонов приводят к заболеваниям, объединенным в группу с общим названием «врожденная гиперплазия надпочечников» (Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH). Наиболее тяжелое протекание этого заболевания вызывают мутации в стероидогенном регуляторном белке STARD1 (более раннее название - StAR), который участвует в лимитирующей стадии всего процесса стероидогенеза, осуществляя доставку холестерина к внутренней мембране митохондрий для дальнейшего превращения в прегненолон и стероидные гормоны [2].

STARD1 синтезируется *de novo* по мере необходимости в виде предшественника, состоящего из холестерол-связывающего домена (START-домена) и сигнального пептида с митохондриальной локализацией [3]. Несмотря на повышенное внимание к белку STARD1 и его активное изучение на протяжении нескольких десятков лет, остается ряд открытых вопросов, касающихся принципов его функционирования, регуляции активности и механизма транслокации в митохондрии.

Сокращения: КД - круговой дихроизм, МУРР - малоугловое рентгеновское рассеяние, ПКА - протеинкиназа А, CAH - congenital adrenal hyperplasia, IMM - inner membrane of mitochondria, MBP - maltose-binding protein, NBD - 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl, OMM - outer membrane of mitochondria, STARD1 - steroidogenic acute regulatory protein

Рекомбинантный STARD1 обладает повышенной склонностью к агрегации и экспрессируется в бактериях, главным образом, в виде телец включения. Существенные недостатки традиционной методики выделения STARD1 путем денатурации-ренатурации [4] значительно ограничивали его структурно-функциональные исследования в прошлом. Из-за трудностей получения STARD1 в больших количествах, данных о его олигомерном состоянии и конформации в растворе почти не было опубликовано. Объяснение механизма захвата холестерина белком STARD1 основывалось на косвенных данных, полученных с помощью методов кругового дихроизма и ограниченного протеолиза, а также на результатах молекулярного моделирования. В отсутствие кристаллической структуры комплекса STARD1 с холестерином представление о том, как природный лиганд ориентирован в полости белка, было лишь умозрительным.

Принято считать, что STARD1 функционирует в составе многокомпонентного белкового комплекса - трансдуцесомы [5]. Помимо STARD1 в трансдуцесому входят белки семейства 14-3-3 - известные фосфопептид-связывающие белки-регуляторы [5–7]. По данным литературы, белок STARD1 содержит два участка фосфорилирования - остатки Ser57 и Ser195 [8]. Это позволило предположить, что фосфорилирование STARD1 может влиять на его взаимодействие с 14-3-3 [9–11]. Однако противоречивость предложенного в литературе механизма регуляции STARD1 под действием фосфорилирования и взаимодействия с белками 14-3-3 [9–11] требовала дальнейших исследований.

Цель работы и основные задачи исследования

Цель работы - исследование структуры и некоторых функциональных особенностей белка STARD1 человека.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Получить препарат рекомбинантного STARD1 из бактерий *E. coli*.
2. Проанализировать свойства STARD1 с помощью различных биохимических и спектральных методов.

3. Охарактеризовать конформацию STARD1 в растворе и сравнить ее с известной кристаллической структурой апоформы белка.
4. Исследовать взаимодействие STARD1 с аналогами холестерина, содержащими флуоресцентную NBD-группу у разных атомов углерода.
5. Объяснить молекулярный механизм взаимодействия STARD1 с белками семейства 14-3-3.

Объекты и методы исследования

Рекомбинантные белки нарабатывали в клетках *Escherichia coli* (*E. coli*) штаммов BL21(DE3), Rosetta(DE3) и ArcticExpress(DE3). С использованием вычитающей металл-аффинной хроматографии с последующей гель-фильтрацией были очищены укороченные версии белка STARD1 и START-домен STARD3 человека. Несмотря на все попытки оптимизации условий экспрессии и выделения из телец включения, полноразмерный STARD1₁₋₂₈₅ получить в растворимом виде нам не удалось. Белки 14-3-3 были получены по разработанной ранее методике [12], включающей фракционирование клеточного лизата путем высаливания сульфатом аммония с последующими стадиями ионообменной хроматографии и гель-фильтрации.

Фосфорилированные формы укороченных конструкций белка STARD1 получали в бактериальной системе ко-экспрессии с протеинкиназой А (ПКА) по методике, разработанной автором за рамками настоящей диссертационной работы [13]. Фосфорилирование белков качественно оценивали с помощью электрофоретических методов, а идентификацию фосфорилированных остатков проводили с помощью масс-спектрометрии (ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН).

Вторичную структуру оценивали с использованием метода кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете. Изменения в третичной структуре косвенно оценивали по изменению триптофановой флуоресценции. Олигомерное состояние STARD1 в растворе исследовали методом аналитической гель-фильтрации при разных концентрациях белка, а также с использованием метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР).

Влияние флуоресцентных аналогов холестерина на термостабильность STARD1 оценивали по изменению температуры полуперехода ($T_{0,5}$) белка, которую определяли в результате обработки кривых температурной зависимости интенсивности флуоресценции триптофанилов белка по методу Бушуевой с соавторами [14].

В качестве функциональных свойств белка STARD1 были исследованы особенности его взаимодействия с NBD-мечеными лигандами и белками 14-3-3.

Кажущуюся константу диссоциации комплексов STARD1 с NBD-лигандами оценивали с помощью флуоресцентного титрования, основываясь на чувствительности NBD-группы к молекулярному окружению.

Моделирование ориентации холестерина и NBD-лигандов в полости STARD1 проводили с помощью докинга с использованием программ *FlexAID* и *Autodock 4.2* на основе единственной имеющейся кристаллической структуры апоформы белка STARD1 (PDB 3P0L).

За взаимодействием белков 14-3-3 с разными вариантами STARD1 следили с помощью метода аналитической гель-фильтрации. Изучение параметров взаимодействия STARD1 с 14-3-3 проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (совместно с к.х.н. Д.В. Сотниковым, ФИЦ Биотехнологии РАН).

Способность STARD1 связывать лиганд в присутствии 14-3-3 исследовали по изменению скорости релаксации анизотропии флуоресценции NBD-лиганда с использованием измерительного комплекса на основе системы счета единичных фотонов (совместно с д.б.н. Максимовым Е.Г., кафедра биофизики МГУ).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспрессия рекомбинантного белка STARD1 в виде фьюжн-конструкции с мальтозо-связывающим белком увеличивает растворимость STARD1, что исключает необходимость подвергать его денатурации-ренатурации при выделении. Разработанная методика позволяет получить миллиграммовые

количества высокоочищенного препарата STARD1, пригодного для структурно-функциональных исследований.

2. Получаемый белок является мономером в широком диапазоне концентраций и имеет структуру в растворе, близкую к кристаллической.

3. По данным малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), STARD1 имеет глобулярную форму и не претерпевает спонтанные конформационные перестройки, а для захвата холестерина достаточно отгибания Ω_1 -петли.

4. Положение NBD-группы флуоресцентных аналогов холестерина влияет на их связывание с STARD1. Из проанализированных флуоресцентных лигандов - 20NBD, 22NBD, 25NBD и 3NBD - наибольшим флуоресцентным откликом обладает самый компактный лиганд 20NBD. По данным титрования и молекулярного докинга, связывание 20NBD с белком STARD1 происходит с кажущейся константой диссоциации 26 нМ в ориентации, эквивалентной таковой для холестерина, и повышает термостабильность STARD1.

5. Холестерол-связывающий домен белка STARD1 не взаимодействует с белками 14-3-3 вне зависимости от фосфорилирования остатка Ser195, расположенного в этом домене. Для образования комплекса требуется фосфорилирование остатка Ser57 за пределами домена STARD1, что позволяет димеру 14-3-3 связывать до двух мономеров STARD1. Такое связывание не требует нарушения укладки START-домена, который в комплексе с 14-3-3 сохраняет способность связывать лиганды. Связывание pSer195 возможно только при частичном разворачивании STARD1, которое может происходить, например, при транслокации белка в митохондрии.

Новизна и практическая значимость

Предложена новая методика получения стероидогенного регуляторного белка STARD1 человека в бактериальной системе, основанная на фьюжн-конструкции STARD1 с отщепляемым мальтозо-связывающим белком, несущим гексагистиридиновый таг. Впервые исследована конформация STARD1 в растворе (метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР)). Результаты

МУРР позволили выделить из предложенных ранее механизмов функционирования STARD1 наиболее вероятный. Проведено сравнение широко используемого флуоресцентного аналога холестерина 22NBD с другими NBD-аналогами, и выявлен NBD-лиганд наиболее оптимальный для изучения лиганд-связывающих свойств STARD1 с помощью флуоресцентных методов. Впервые исследован механизм взаимодействия STARD1 с универсальными регуляторными белками семейства 14-3-3. Получены новые данные о роли фосфорилирования остатков Ser57 и Ser195 в регуляции STARD1 за счет взаимодействия с белками 14-3-3, и выявлены предпосылки для взаимодействия этих белков в процессе стероидогенеза.

Личный вклад соискателя

Большинство экспериментов, вошедших в диссертацию, было выполнено либо непосредственно автором работы, либо с его участием.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность результатов, полученных в ходе данной работы, подтверждается воспроизводимостью произведенных измерений и согласованностью результатов, полученных с использованием комбинации различных методов, адекватных поставленным задачам.

Финансовая поддержка

Данное исследование было поддержано грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) №14-0400146А, №18-34-00428 мол_а и Российского Научного Фонда (РНФ) №17-74-10053, №19-74-10031.

Публикации и апробация работы

По теме диссертации было опубликовано 7 статей в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конгрессах (42-й FEBS в Иерусалиме (Израиль) в 2017 году, 43-й FEBS в Праге (Чехия) в 2018 году),

конференциях (Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2017" и "Ломоносов-2018" в Москве, Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" и VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" в Москве в 2017 году), **школе** (XXIX Зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" в Москве в 2017 году) и на V **съезде** Биохимиков России и V съезде физиологов стран СНГ в Дагомысе в 2016 году.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из глав "Обзор литературы", "Материалы и методы" и "Результаты и обсуждение", заключения, выводов, приложения и списка используемой литературы. Изложена на 140 страницах и содержит 39 рисунков, 10 таблиц и 226 источников литературы.

Результаты и их обсуждение

К началу данной работы существовала проблема с получением белка STARD1 в количествах, достаточных для запланированных исследований. Так как для решения поставленных задач нам были необходимы большие количества *растворимого* и *правильно свернутого* белка, а стандартный протокол выделения STARD1 с помощью денатурации 8 М мочевиной [4] обладал существенными недостатками, целесообразно было модифицировать методику получения STARD1. На первом этапе работы, посвященном разработке методики получения STARD1 и анализу его свойств, мы сфокусировались на так называемом START-домене (66-285 а.о.) белка STARD1, который необходим для связывания холестерина - своего природного лиганда.

Получение и характеристика рекомбинантного белка STARD1

Для получения препаративных количеств STARD1 мы использовали бактериальную систему. Принимая во внимание склонность белка к формированию телец включения, мы нарабатывали его в виде фьюжна с

мальтозо-связывающим белком (MBP), который увеличивает растворимость связанных с ним рекомбинантных белков. Для удобства очистки на N-конец был введен гексагистидиновый таг, а в линкер между MBP и STARD1 - сайт узнавания для высокоспецифичной цистеиновой 3С-протеазы риновируса человека (Рис. 1А). Благодаря данному методу, который включает две стадии металл-аффинной хроматографии с промежуточной стадией 3С-протеолиза и гель-фильтрацию, удалось получить около 20-25 мг растворимого, электрофоретически гомогенного препарата STARD1 с одного литра бактериальной культуры (Рис. 1Б).

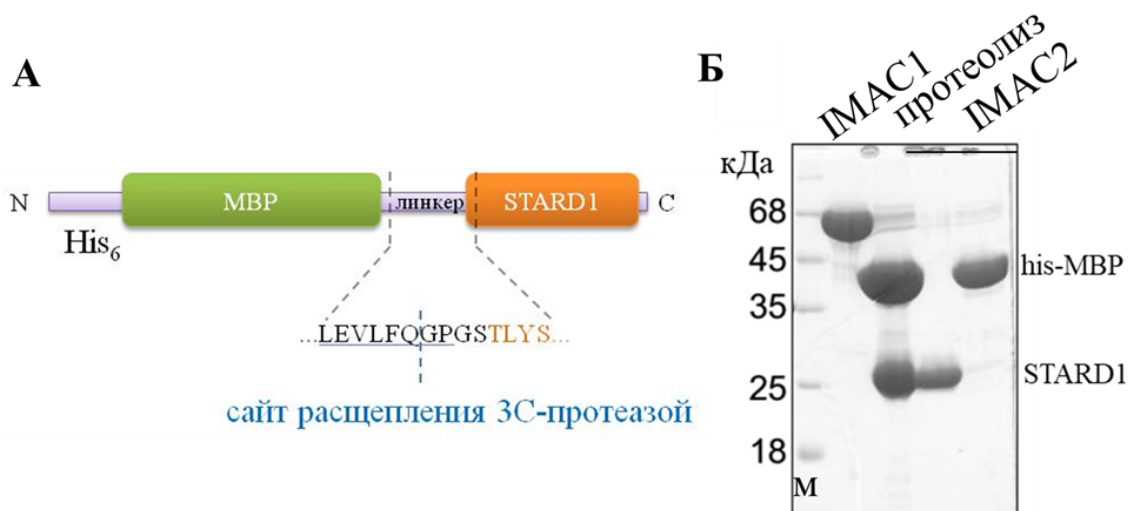


Рис. 1. Получение рекомбинантного STARD1 в бактериях. А. Схематическое изображение фьюжн-конструкции STARD1, несущей на N-конце his-MBP, отщепляемый 3С-протеазой. Б. ДСН-электрофореграмма очистки STARD1 с помощью вычитающей металл-аффинной хроматографии.

Определение вторичной структуры белка проводили с помощью метода спектроскопии кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолете (180-260 нм). Белок STARD1 имеет выраженный спектр КД в дальней УФ-области (Рис. 2), форма которого характерна для белка со смешанным, « α/β » типом вторичной структуры. Рассчитанный состав вторичных структур (α -спирали $\approx 22\%$ и β -складки $\approx 26\%$) для белка, полученного по нашей методике, оказался сходным с таковым из имеющейся кристаллической структуры (PDB 3POL) для STARD1 (Рис. 2, в скобках).

Третичную структуру рекомбинантного белка анализировали при регистрации спектров собственной флуоресценции аминокислотных остатков

триптофана, так как известно, что она чувствительна к молекулярному окружению. Белок STARD1₆₆₋₂₈₅ содержит четыре остатка триптофана на молекулу (Trp96, Trp147, Trp241, Trp250) (Рис. 3А), поэтому любые значимые изменения в укладке белка могли отразиться на спектрах триптофановой флуоресценции.

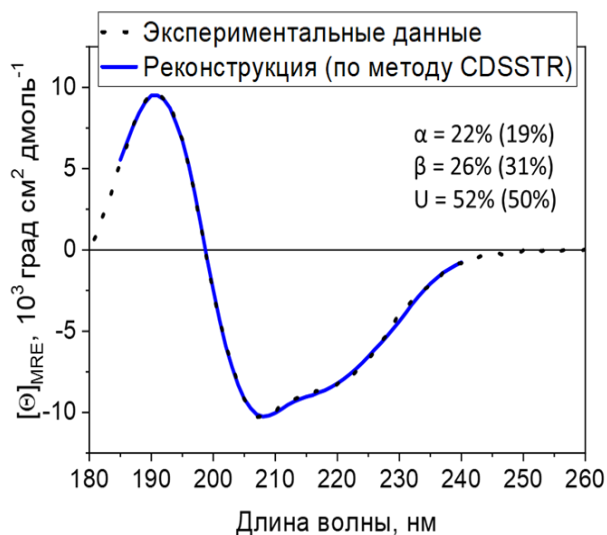


Рис. 2. Содержание вторичных структур в STARD1₆₆₋₂₈₅, определенное методом КД в дальнем УФ. Пунктиром показаны экспериментальные данные, а результат фитирования - сплошной синей линией. В правом углу указаны доли α -спиралей, β -структур и неупорядоченных участков (U), определенные по данным КД-спектра и на основе кристаллической структуры (PDB 3POL, в скобках).

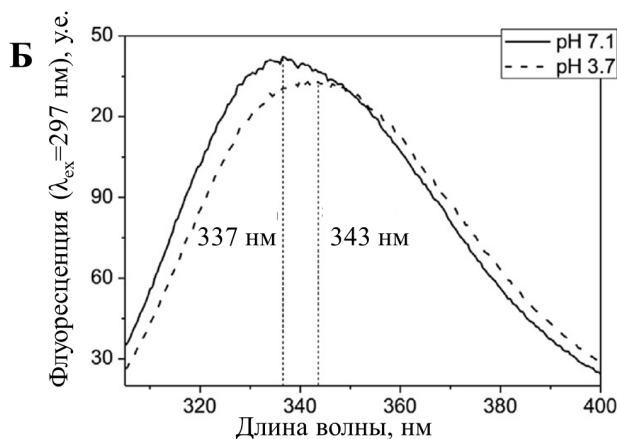
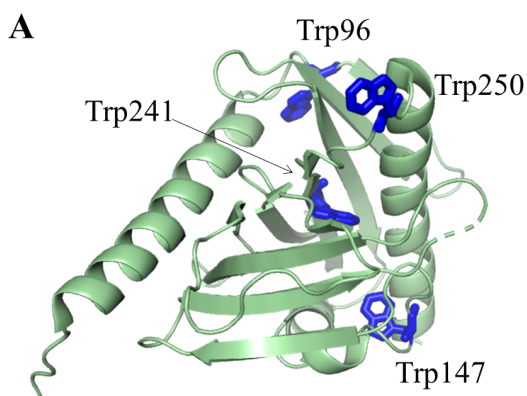


Рис. 3. Триптофановая флуоресценция STARD1. **А.** Кристаллическая структура белка STARD1 (PDB 3POL) с указанием триптофанилов. **Б.** Спектры флуоресценции STARD1 при pH 7,1 (сплошная линия) и при pH 3,7 (штриховая линия). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 297 нм. Положение максимумов эмиссии флуоресценции при разных условиях указаны пунктиром.

Максимум спектра флуоресценции триптофанилов STARD1 при нейтральных значениях pH находился при 337 нм (Рис. 3Б, сплошная линия). Такой коротковолновый максимум, по данным литературы [15], соответствует свернутому глобулярному белку с экранированными остатками триптофана. При кислых значениях pH максимум флуоресценции сдвигался на 6 нм в длинноволновую область (Рис. 3Б, штриховая линия), что указывало на смену

молекулярного окружения остатков триптофана с неполярного на более полярное [15], предположительно, в результате разворачивания полипептидной цепи в кислой среде.

Любопытно, что спектры STARD1 из ранее опубликованных работ [16–18], снятые при нейтральных значениях pH, сильно отличались, и их максимумы лежали в диапазоне 340-370 нм. Такие различия подчеркивают разницу в используемых протоколах выделения STARD1 и позволяют предположить, что препараты с длинноволновым максимумом содержали значительное количество несвернутого белка.

Олигомерное состояние STARD1 оценивали с использованием метода аналитической гель-фильтрации. В диапазоне исследуемых концентраций белка (0,3-2,8 мг/мл) STARD1 был стабилен и хорошо растворим, элюировался в виде мажорного симметричного пика с кажущейся молекулярной массой частиц 21,1 кДа и гидродинамическим радиусом $R_H \sim 20 \text{ \AA}$, что соответствовало мономеру STARD1 (Рис. 4А).

По данным МУРР (Рис. 4Б), радиус гирации $R_g=18,1 \text{ \AA}$ полностью соответствовал значению данного параметра, определенному для кристаллической структуры STARD1₆₆₋₂₈₅ (PDB 3POL) ($R_g = 18,2 \text{ \AA}$), что указывало на существование STARD1 в более компактной укладке в растворе, чем было предсказано при моделировании динамики STARD1 *in silico* [19]. Фитирование экспериментальных данных в координатах Кратки для белка STARD1₆₆₋₂₈₅ (Рис. 4В) при небольших значениях $S \cdot R_g$ указывало на наличие одного свернутого центра (домена), а наблюдаемый рост при значениях $S \cdot R_g > 3,5$ хорошо коррелировал с наличием в белке гибких петель. Примечательно, что отгибание Ω_1 -петли (Рис. 4Г), которого должно быть достаточно для открывания доступа в лиганд-связывающую полость STARD1, совместимо с полученными данными МУРР, поскольку модели с разным положением этой петли одинаково хорошо описывали полученные данные, не требуя более серьезных структурных перестроек, которые в разное время были предложены в литературе.

Таким образом, с помощью биохимических, спектральных и структурных методов мы продемонстрировали, что полученный по нашей методике STARD1 является мономером и обладает компактной структурой, близкой к сферической, а отгибания Ω_1 -петли достаточно для захвата лиганда. Далее мы перешли к исследованию функциональных свойств STARD1.

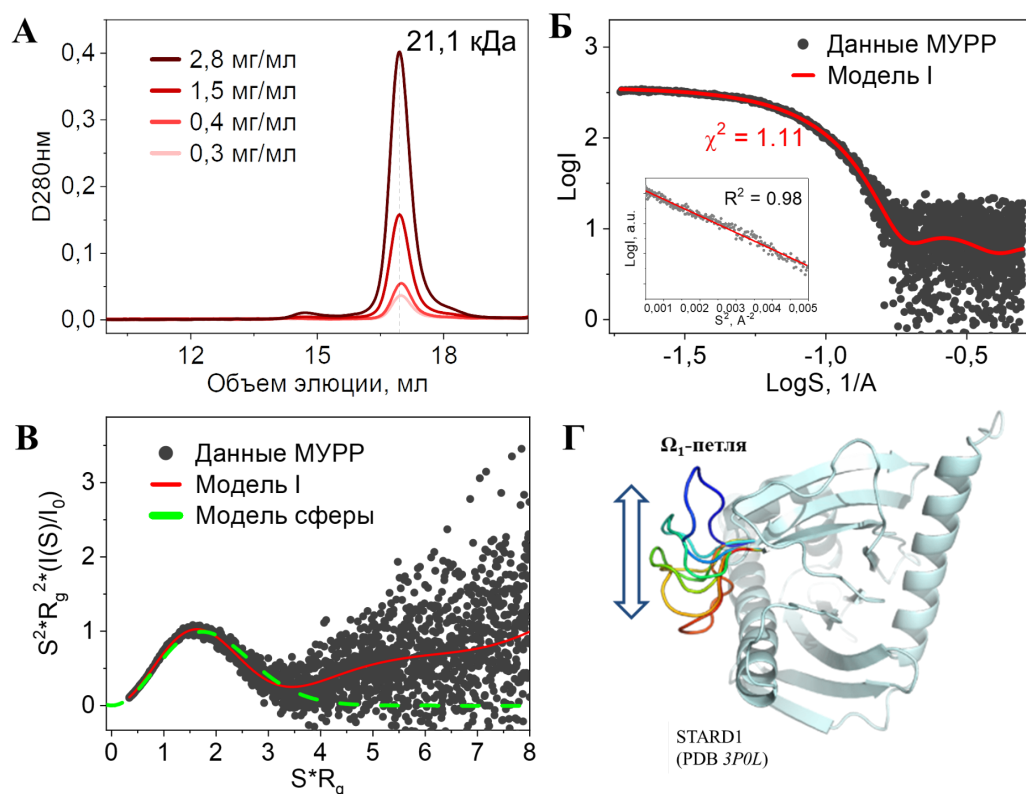


Рис. 4. Анализ олигомерного состояния и структуры STARD1₆₆₋₂₈₅ в растворе. **А.** Профили элюции белка STARD1 в результате аналитической гель-фильтрации в диапазоне концентрации 0,3–2,8 мг/мл; колонка Superdex 200 Increase 10/300, скорость элюции 1,5 мл/мин. **Б.** Профиль МУРР. Красной линией показана теоретическая кривая для модели, в основе которой лежит кристаллическая структура STARD1 (PDB 3POL) (Модель I). Вставка демонстрирует линейность в области Гинье для полученной кривой МУРР. **В.** Анализ гибкости/жесткости STARD1 в координатах Кратки. Преобразование теоретической кривой для модели I в координатах Кратки изображены красным цветом. Для сравнения показан график для идеальной жесткой сферы (зеленый пунктир). **Г.** Модель структуры STARD1 с разным положением Ω_1 -петли (показано градиентом цвета).

Исследование функциональных свойств STARD1

Взаимодействие STARD1 с флуоресцентными аналогами холестерина

Следующий этап работы был посвящен изучению функциональных свойств STARD1. Считается, что STARD1 связывает в полости одну молекулу холестерина. В работах, посвященных исследованиям функциональных свойств белка STARD1,

активно применяют флуоресцентный аналог холестерина - коммерчески доступное соединение 22NBD, у которого флуоресцентная NBD-группа находится при 22 атоме углерода (Рис. 5А и Б). NBD-группа обладает сольватохромизмом - т.е. способностью менять интенсивность флуоресценции в зависимости от молекулярного окружения. Однако ранее никто не изучал влияние положения NBD-группы на параметры связывания лиганда с белком и не анализировал, является ли флуоресцентный аналог 22NBD оптимальным. Для ответа на эти вопросы мы сравнили параметры связывания широко используемого соединения 22NBD и флуоресцентных аналогов холестерина, у которых NBD-группа была у 20-го (20NBD), 25-го (25NBD) атома углерода или вместо 3-ОН-группы (3NBD) (Рис. 5А и Б). Соединения были любезно предоставлены к.х.н. Я.В. Фалетровым (Минск, Беларусь).

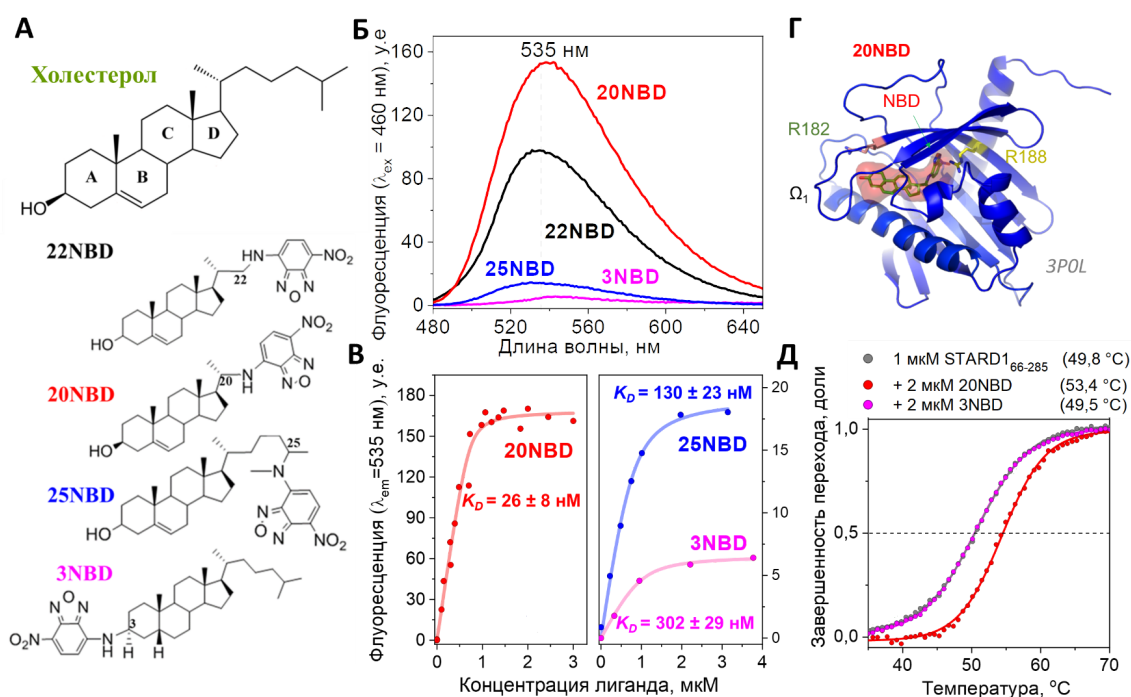


Рис. 5. Взаимодействие STARD1 с холестерином и его флуоресцентными аналогами. **А.** Структурные формулы холестерина и исследуемых NBD-меченных аналогов. **Б.** Спектры флуоресценции лигандов (1,5 мкМ), добавленных к STARD1 (1 мкМ). **В.** Кривые титрования 1 мкМ STARD1 лигандами 20NBD (слева) и 25NBD и 3NBD (справа). **Г.** Моделирование ориентации холестерина 20NBD в полости STARD1 с использованием программы *FlexAID*. Молекула лиганда 20NBD ориентирована в полости в положении "OUT": 3-ОН-группа лигандов расположена напротив остатка Arg182. **Д.** Термостабильность STARD1 в присутствии лигандов в виде зависимости завершенности перехода STARD1 до (серая кривая) и после добавления 3NBD (розовая) или 20NBD (красная). В скобках указаны значения температуры полуперехода ($T_{0,5}$).

Как оказалось, флуоресцентный отклик при добавлении одинакового количества лигандов к STARD1₆₆₋₂₈₅ увеличивался в ряду 3NBD < 25NBD < 22NBD < 20NBD (Рис. 5Б), причем сигнал от связывания лиганда 20NBD был в 1,6 раз выше, чем при связывании широко используемого 22NBD. Максимумы флуоресценции лигандов 20NBD, 22NBD и 25NBD в комплексе с STARD1 находятся около 535 нм (Рис. 5Б), что согласуется с полученными ранее данными для 22NBD [20]. Для лиганда 3NBD максимум флуоресценции находится в более длинноволновой области и почти не сдвигается (Рис. 5Б).

Аппроксимация кривых титрования (Рис. 5В) показала, что стехиометрия комплекса для каждого из лигандов была близка к 1:1, что хорошо согласуется с данными литературы [21,22] и подтверждается сопоставлением объемов молекулы холестерина (432 Å) и холестерол-связывающей полости STARD1 (471 Å) [23]. Кажущаяся константа диссоциации (K_D) для 20NBD была около 26 нМ, что сопоставимо с рассчитанными ранее константами диссоциации для холестерина (\approx 30 нМ) [21] и 22NBD (\approx 32 нМ) [20]. K_D для 3NBD была как минимум в 10 раз выше.

Результаты стационарной (steady-state) флуориметрии указывают на то, наибольшим флуоресцентным откликом обладает лиганд 20NBD, имеющий самую компактную структуру. Малозначительные изменения, практически не отличающиеся от фона, при добавлении лиганда 3NBD к белку могут быть вызваны отсутствием/низкой эффективностью связывания лиганда в полости и, следовательно, указывать на важность гидроксильной группы для образования комплекса.

Согласно проведенному компьютерному моделированию, лиганд 20NBD ориентирован в полости STARD1 подобно тому, как ориентирована молекула холестерина, при этом флуорофор NBD полностью погружен в полость и со всех сторон защищен белком, а 3-ОН группа расположена напротив остатка Arg182 у основания Ω_1 -петли (Рис. 5Г). Такое положение в случае холестерина в литературе обозначалось как "OUT" и неоднократно рассматривалось как теоретически

возможное [24,25]. В случае 25NBD и 3NBD в ходе докинга отбирались те модели, в которых лиганды находились вне полости в произвольной ориентации или в которых NBD-группа частично экспонирована из полости в растворитель. Тем не менее, согласно результатам моделирования, ориентация лиганда 3NBD в полости соответствует положению "OUT" для холестерина, в отличие от ориентации 25NBD, для которого, по-видимому, из-за его больших размеров происходит переориентация в положение "IN".

Как правило, при образовании комплекса с лигандами стабильность белка увеличивается [21]. При добавлении 20NBD температура полуперехода ($T_{0,5}$) STARD1 увеличивалась почти на 4 °C (Рис. 5Д). В присутствии 3NBD стабилизирующего эффекта обнаружено не было (Рис. 5Д). Данные стационарной флуориметрии были также подтверждены результатами время-разрешенной флуориметрии при нагревании смеси белка с 20NBD или 3NBD (эти данные в автореферате не приведены).

Другими словами, результаты молекулярного докинга согласуются с результатами титрования STARD1 лигандами 20NBD, 25NBD и 3NBD и могут объяснить различия во флуоресцентном отклике при их добавлении к белку. Вероятно, лиганд 3NBD связывается с белком с низким сродством и экспонированным в раствор флуорофором, и такое связывание не способно стабилизировать белок от разворачивания, вызванного нагреванием.

Взаимодействие STARD1 с белками 14-3-3

Среди функциональных особенностей STARD1 можно выделить его фосфорилирование под действием протеинкиназы А (ПКА), которое коррелирует с повышением эффективности стероидогенеза [8]. При этом максимальная активность STARD1 достигается в том случае, когда он связан с внешней мембраной митохондрии (ОММ), где взаимодействует с другими белками трансдуцесомы [5]. Особая роль в процессе стероидогенеза отводится комплексу STARD1 с универсальными регуляторными белками 14-3-3 [9,26]. Согласно модели, предложенной Я. Агхзадех с соавторами [9,26], *мономер* 14-3-3

связывает *нефосфорилированную* форму STARD1, при этом дальнейшая диссоциация комплекса STARD1/14-3-3 сопровождается фосфорилированием STARD1 по остатку Ser195. Однако такой механизм противоречит данным литературы и не учитывает склонность димеров 14-3-3 к связыванию фосфорилированных мотивов, расположенных в протяженных разупорядоченных участках [27,28].

Как видно из структуры STARD1 (PDB *3P0L*) (Рис. 6А), остаток Ser195 находится в петле β_6 - β_7 , которая, предположительно, слишком коротка и недостаточно гибка для эффективного связывания в амфипатической бороздке 14-3-3 без дополнительных конформационных перестроек соседних структур. Данные гель-фильтрации смеси белков STARD1₆₆₋₂₈₅ и 14-3-3 (эти данные в автореферате не приведены) в совокупности с полученной в нашей лаборатории кристаллической структурой 14-3-3 с пептидом RRGpS¹⁹⁵TCVLA (PDB *6T5F*) ставят под сомнение предположение о том, что белки 14-3-3 взаимодействует с нативным START-доменом, и что при этом задействован остаток Ser195. В то же время, остаток Ser57, второй потенциальный сайт связывания 14-3-3, находится в разупорядоченном N-концевом пептиде (Рис. 6А), который более благоприятен для связывания. Для проверки данной гипотезы мы получили конструктор STARD1, содержащий оба потенциальных сайта взаимодействия с 14-3-3 (далее STARD1₄₆₋₂₈₅). За взаимодействием дважды фосфорилированного STARD1₄₆₋₂₈₅ (ppSTARD1) с 14-3-3 следили с помощью метода аналитической гель-фильтрации.

Полученный профиль элюции для смеси белков отличался от суммы профилей изолированных 14-3-3 и ppSTARD1 (Рис. 6Б). По калибровочной кривой для белков-стандартов мы определили, что время элюции комплекса соответствует частицам с $MM_{каж}$ равной 93 кДа, что соответствует стехиометрии комплекса 2:2 (один димер 14-3-3 на два мономера STARD1₄₆₋₂₈₅). Слабое разделение пиков с $MM_{каж}$ 53 и 93 кДа может быть результатом перекрытия трех пиков с кажущимися молекулярными массами 93, 72 и 53 кДа. Извлеченный при

декомпозиции пик с $MM_{каж} = 72$ кДа, хорошо соответствовал промежуточному комплексу со стехиометрией 2:1 (димер 14-3-3 на мономер STARD1₄₆₋₂₈₅).

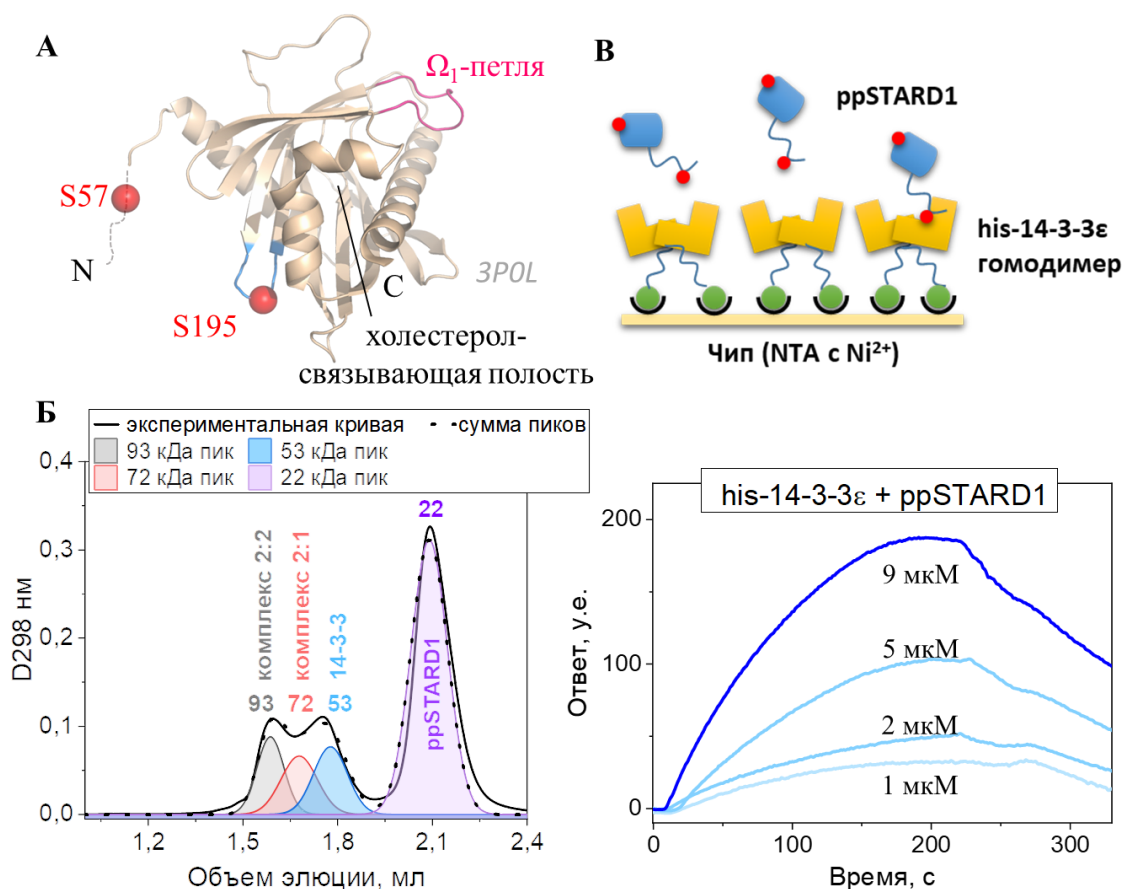


Рис. 6. Взаимодействие дважды фосфорилированного STARD1 (ppSTARD1) с белками 14-3-3. **А.** Модель полноразмерного STARD1 на основе кристаллической структуры (PDB 3POL) с указанием сайтов фосфорилирования Ser57 и Ser195 (красные кружки), холестерол-связывающей полости и Ω_1 -петли, участвующей в связывании лигандов. Петля β_6 - β_7 , в которой находится остаток Ser195, отмечена синим цветом. Остаток Ser57 расположен в N-концевом пептиде, который отсутствует в структуре (PDB 3POL). **Б.** Профиль элюции (черная кривая) смеси белков 215 мкМ ppSTARD1 и 90 мкМ 14-3-3 $\epsilon\Delta$ C и его декомпозиция (пики с выделенной цветами площадью), позволяющая детектировать два пика комплексов с разной стехиометрией. Алгебраическая сумма пиков после декомпозиции изображена пунктирной линией. Поглощение регистрировали при 298 нм во избежание зашкаливания показаний детектора. **В.** Определение параметров связывания ppSTARD1 с гомодимером his-14-3-3 ϵ методом поверхностного плазмонного резонанса. Схематическое изображение взаимодействия ppSTARD1 с иммобилизованным на чипе Ni-NTA гомодимером his-14-3-3 ϵ (сверху) и сенсограммы, полученные для указанных концентраций ppSTARD1 (снизу). Автор выражает благодарность к.х.н. Сотникову Д.В. за помощь в проведении эксперимента и обработке полученных данных.

Таким образом, из данных гель-фильтрации смесей 14-3-3 с разными вариантами STARD1 белка следует, что для взаимодействия с белками 14-3-3 *необходим* остаток pSer57. Стехиометрия комплекса 2:2 указывает на то, что pSer195, наоборот, не вносит значительный вклад во взаимодействие. Наличие

большого количества несвязанного ppSTARD1₄₆₋₂₈₅ в ходе гель-фильтрации, даже при высоких концентрациях белка, косвенно указывает на его относительно низкую аффинность к 14-3-3, которую с помощью данного метода оценить корректно не представляется возможным. Количественную оценку взаимодействия между ppSTARD1₄₆₋₂₈₅ и 14-3-3 мы проводили с помощью метода ППР. На Рис. 6В представлены схема эксперимента и сенсограмма для комплекса 14-3-3 и ppSTARD1. На основе этих данных были определены кажущиеся равновесные константы диссоциации (K_D) 13-15 мкМ. Полученные значения K_D лежат в том же диапазоне, что и константа диссоциации для 14-3-3 с монофосфорилированным пептидом RRApS¹⁶AP от белка HspB6 (2-6 мкМ) [29]. Поскольку наличие двух фосфосайтов, как правило, значительно увеличивает сродство к 14-3-3, полученные результаты позволяют предположить, что в связывании с 14-3-3 участвует только один сайт.

Чтобы ответить на вопрос, способен ли ppSTARD1 в составе комплекса с 14-3-3 связывать лиганд, т.е. сохраняется ли конформация START-домена нативной, мы измерили скорость релаксации анизотропии флуоресценции лиганда 22NBD в трех разных состояниях: в свободном (Рис. 7А), в составе двойного комплекса с ppSTARD1 (Рис. 7Б) и тройного комплекса ppSTARD1/14-3-3 (Рис. 7В). Выбор метода был основан на том, что анизотропия флуоресценции малой молекулы увеличивается при связывании с относительно более крупной молекулой белка и поэтому может быть использована для отслеживания увеличения размера комплекса при связывании.

В отсутствие белков флуоресценция 22NBD сильно потушена молекулами растворителя. Время релаксации анизотропии составило 115 ± 23 пс (Рис. 7А), что соответствует быстровращающимся сольватохромным флуорофорам [30]. Добавление 10-кратного молярного избытка фосфорилированного ppSTARD1 привело к 116-кратному увеличению сигнала флуоресценции NBD-группы и увеличило время релаксации анизотропии (Рис. 7Б). Характер кривой анизотропии флуоресценции был двухфазный, с быстрой τ_1 (84 ± 6 пс) и медленной τ_2 ($9,2 \pm 0,2$

нс) компонентами, представленными почти в равных долях (48,0% и 52,0%, соответственно). Появление медленной компоненты τ_2 обусловлено формированием лиганд-белкового комплекса, а ее величина хорошо сходится со значением для идеальной сферической частицы с массой 27 кДа, оцененной по формуле Перрена (11 нс) [30]. Присутствие быстрой компоненты τ_1 указывает на то, что 22NBD сохраняет также способность вращаться внутри полости белка со скоростью, сопоставимой с вращением свободного лиганда. По-видимому, такое вращение флуоресцентной группы происходит вдоль одинарной связи.

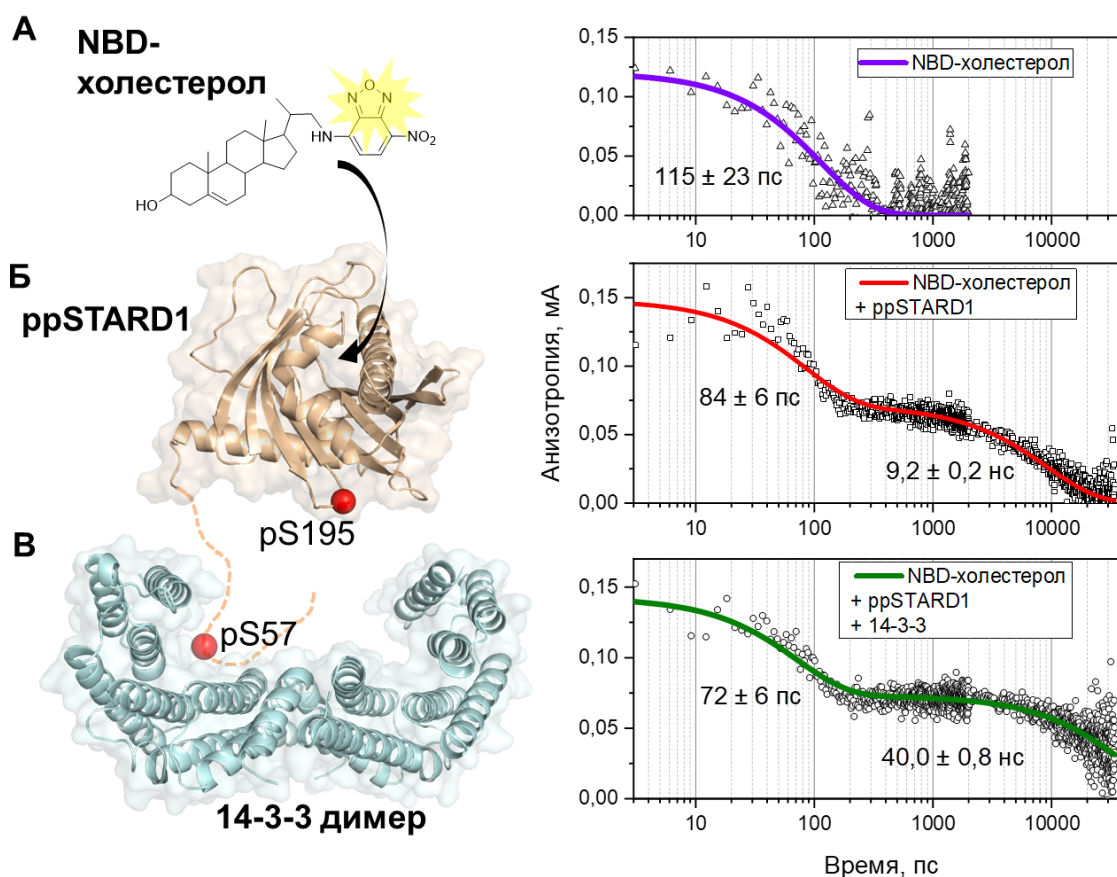


Рис. 7. Сравнение кинетик релаксации анизотропии флуоресценции свободного NBD-холестерола (А) и в составе двойного (Б) и тройного комплекса (В). Слева схематично изображено состояние NBD-лиганда, которое отражают соответствующие кривые кинетики релаксации анизотропии флуоресценции (справа), зарегистрированные с помощью системы счета единичных фотонов с пикосекундным разрешением. Автор выражает благодарность д.б.н. Максимову Е.Г. за помощь в проведении эксперимента и обработке данных.

В присутствии 10-кратного молярного избытка 14-3-3 над ppSTARD1 мы также наблюдали двухфазную кривую релаксации анизотропии флуоресценции 22NBD с примерно равными долями быстрой τ_1 (72 ± 6 пс, 51,4%) и медленной τ_2

($40,0 \pm 0,8$ нс, 48,6%) компонент (Рис. 7В). Очевидно, что увеличение значения медленной компоненты τ_2 с 9,2 до 40 нс является следствием формирования бóльшего белок-белкового комплекса, что приводит к уменьшению скорости вращения флуорофора. Мы предположили, что в условиях 10-кратного избытка ppSTARD1 и 100-кратного избытка 14-3-3 над лигандом 22NBD, скорее всего, формируется тройной комплекс 22NBD/ppSTARD1/14-3-3 со стехиометрией 1:1:2. Согласно формуле Перрена, время релаксации анизотропии флуоресценции для лиганда 22NBD в составе тройного комплекса (40 нс) почти равно теоретическому значению для 85 кДа комплекса идеальной сферической формы (35 нс). Здесь, как и в двойном комплексе, наличие быстрой компоненты 72 ± 6 пс свидетельствует о том, что связывание 14-3-3 не препятствует вращению флуорофора в холестерол-связывающей полости ppSTARD1. По-видимому, такое вращение флуоресцентной группы происходит вдоль одинарной связи.

Таким образом, полученные результаты подтверждают предположение о том, что в комплексе с 14-3-3 фосфорилированный STARD1 остается компетентным к связыванию лиганда, т.е. сохраняет лиганд-связывающую полость и конформацию. Этот вывод указывает на то, что остаток pSer195 не вносит вклад во взаимодействие с 14-3-3. Возможно, для связывания pSer195 требуются более значительные конформационные перестройки ppSTARD1, которые могут происходить, например, при транслокации этого белка в митохондрию.

На основании данных литературы и наших результатов мы предполагаем следующий механизм функционирования STARD1 (Рис. 8). Под действием тропных гормонов STARD1 синтезируется *de novo* вблизи митохондрий и направляется к трансдуцеосоме (1). Трансдуцеосома, содержащая ПКА, 14-3-3 и другие белки, обозначена вопросительным знаком. ПКА фосфорилирует STARD1 по остаткам Ser57 и Ser195, после чего 14-3-3 связывает pSTARD1 за остаток pSer57 (2). Локализация вблизи ОММ, возможно, способствует переходу pSTARD1 в состояние расплавленной глобулы. В таком состоянии pSTARD1 в кооперации с другими белками трансдуцеосомы способствует переносу холестерина в IMM к

ферменту P450_{scc} через стадии разворачивания/сворачивания (3), до тех пор, пока его не узнают белки TOM-TIM (4) для импорта в митохондрию (5). Бидентатное связывание развернутого ppSTARD1, фосфорилированного по сайтам Ser57 и Ser195, с димером 14-3-3 защищает его от дефосфорилирования, агрегации и деградации (6), препятствуя преждевременному импорту в митохондрию. Помимо связывания за остаток pSer57, условное (conditional) связывание за остаток pSer195 белками 14-3-3 может влиять на переход из свернутого (folded) состояния в развернутое (unfolded) состояние, который, как предполагается, необходим для транспорта холестерина.

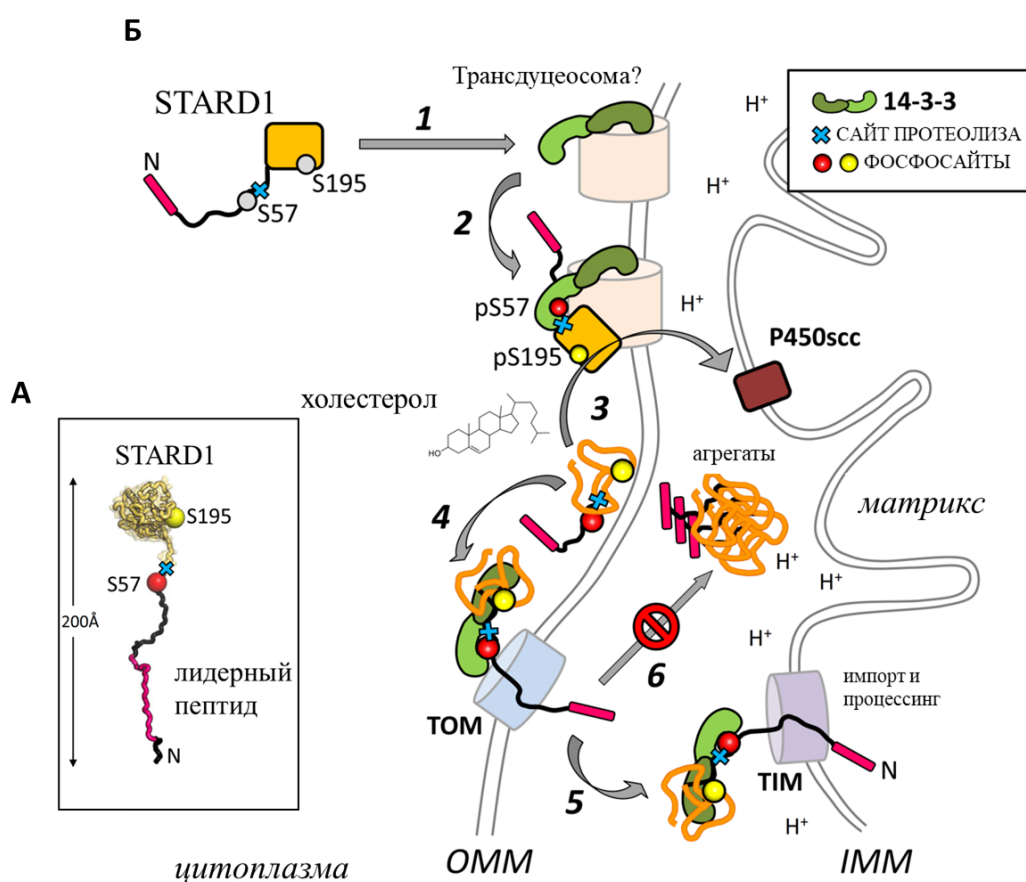


Рис. 8. Возможный механизм регуляции активности STARD1 белками семейства 14-3-3. **А.** Модель полноразмерного STARD1 (остатки 1-285), построенная с помощью *Bioserf*. Изображены реальные пропорции N-концевого лидерного пептида и функционального домена STARD1. Голубым крестиком отмечено предполагаемое место протеолиза. Остатки Ser57 и Ser195, которые подвергаются фосфорилированию ПКА в процессе стероидогенеза, отмечены кружками. **Б.** Схематичное изображение функционирования STARD1 в ходе стероидогенеза и роль белков 14-3-3 в этом процессе. Объяснения см. в тексте. Протоны (H⁺) в межмембранном пространстве обозначают низкий рН. TOM и TIM - компоненты транслоказы внешней и внутренней мембран митохондрий, соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Разработана эффективная методика получения рекомбинантного белка STARD1 в растворимой форме.
2. Получаемый белок является мономером и имеет структуру в растворе, близкую к кристаллической.
3. Анализ данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей указывает на то, что белок STARD1 является глобулярным и имеет ограниченную конформационную гибкость, а для захвата лиганда достаточно движения Ω_1 -петли.
4. Показано, что на связывание флуоресцентных аналогов холестерина в полости STARD1 влияет положение их NBD-группы. Наиболее оптимальным является вариант 20NBD, связывание которого по данным флуоресцентного титрования и молекулярного докинга практически эквивалентно связыванию холестерина и приводит к увеличению термостабильности STARD1.
5. Показано, что вне зависимости от фосфорилирования остатка Ser195, холестерол-связывающий домен белка STARD1 не взаимодействует с белками 14-3-3. Для взаимодействия необходимо фосфорилирование остатка Ser57, что делает возможным связывание димера 14-3-3 с двумя мономерами STARD1. Фосфорилированный остаток Ser195 участвует в связывании с 14-3-3, по-видимому, только при локальном разворачивании STARD1, которое может происходить, например, при его транслокации в митохондрии в ходе стероидогенеза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Sluchanko N.N., **Tugaeva K. V.**, Faletrov Y. V., Levitsky D.I. High-yield soluble expression, purification and characterization of human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) fused to a cleavable Maltose-Binding Protein (MBP) // *Protein Expr. Purif.* – 2016. – Vol. 119. – P. 27–35.
2. Sluchanko N.N., **Tugaeva K. V.**, Maksimov E.G. Solution structure of human steroidogenic acute regulatory protein STARD1 studied by small-angle X-ray scattering // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 489, № 4. – P. 445–450.
3. **Tugaeva K. V.**, Faletrov Y. V., Allakhverdiev E.S., Shkumatov V.M., Maksimov E.G., Sluchanko N.N. Effect of the NBD-group position on interaction of fluorescently-labeled cholesterol analogues with human steroidogenic acute regulatory protein STARD1 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2018. – Vol. 497, № 1. – P. 58–64.
4. **Tugaeva K. V.**, Sluchanko N.N. Steroidogenic Acute Regulatory Protein: Structure, Functioning, and Regulation // *Biochem. (Moscow)* – 2019. – Vol. 84, № Suppl.1. – P. S233–S253.
5. Faletrov Y. V., Efimova V.S., Horetski M.S., **Tugaeva K. V.**, Frolova N.S., Lin Q., Isaeva L. V., Rubtsov M.A., Sluchanko N.N., Novikova L.A., Shkumatov V.M. New 20-hydroxycholesterol-like compounds with fluorescent NBD or alkyne labels: Synthesis, in silico interactions with proteins and uptake by yeast cells // *Chem. Phys. Lipids.* – 2020. – Vol. 227. – P. 104850.
6. **Tugaeva K. V.**, Titterington J., Sotnikov D. V., Maksimov E.G., Antson A.A., Sluchanko N.N. Molecular basis for the recognition of steroidogenic acute regulatory protein by the 14-3-3 protein family // *FEBS J.* – 2020. – Vol. 287, № 18. – P. 3944–3966.
7. Gogl G.*, **Tugaeva K. V.***, Eberling P., Kostmann C., Trave G., Sluchanko N.N. Hierarchized phosphotarget binding by the seven human 14-3-3 isoforms // *Nat. Commun.* – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 1677. *Совместное первое авторство.

Тезисы докладов

1. Завадская О. А., **К. В. Тугаева**, Фалетров Я. В., Случанко Н.Н. Новые белок-лигандные взаимодействия холестерин-переносящего белка STARD1 с оксистеролами и стероидными гормонами in silico и in vitro // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016». - 2016. - С. 83-83.
2. **Tugaeva K.V.**, Faletrov Y. V., Maksimov E. G., Sluchanko N.N. Novel Method of production of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) able to bind fluorescent cholesterol analogues // 1st B3 International Conference for Young Scientists Lomonosov Moscow State University. - 2016. - С. 39-39.
3. **Тугаева К. В.**, Завадская О. А., Фалетров Я. В., Максимов Е. Г., Случанко Н.Н. Исследование взаимодействия холестерина с белком StAR с помощью флуоресцентных аналогов холестерина с различным положением NBD-группы // Acta Naturae (русскоязычная версия). - 2016. - 2(спецвыпуск). - С. 50-51.
4. Sluchanko N. N., **Tugaeva K. V.**, Faletrov Y. V., Maksimov E. G. Solution structure of human STARD1 protein and its interaction with fluorescently-labeled cholesterol analogues with different position of the NBD-group // The FEBS Journal Supplement. - 2017. - Suppl. 1, том 284. - С. 182-183.
5. **Тугаева К. В.** Исследование особенностей взаимодействия белка StAR с универсальными адаптерными белками семейства 14-3-3 // Материалы XXIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2017". - 2017. - С.
6. **Тугаева К. В.**, Фалетров Я. В., Максимов Е. Г., Случанко Н. Н. Поиск оптимального флуоресцентного аналога холестерина среди его производных с различным положением NBD-группы для исследований взаимодействия с белком StAR // XVII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Сборник тезисов. - 2017. - С. 91-91.

7. Тугаева К. В., Сотников Д. В., Случанко Н. Н. Изучение роли фосфорилируемых участков белка StAR в его взаимодействии с белками семейства 14-3-3 // ActaNaturae. - 2017. - серия СПЕЦВЫПУСК, С. 58-58.

8. Tugaeva K. V., Sotnikov D. V., Sluchanko N. N. Analysis of the interaction between 14-3-3 and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) // FEBS Open Bio. - 2018. - 8(S1). - P.18-009-Wed.

9. Tugaeva K. V., Titterington J., Antson A., Sluchanko N. N. Structural basis for the interaction of 14-3-3 proteins with phosphopeptides of STARD1 revealed by the chimeric app // FEBS Open Bio. - 2019. - 9(Suppl. 1). - С. 257-257.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller WL et al., *Endocrine Reviews* 2011; **32**: 81–151.
2. Stocco DM., *Biology of Reproduction* 1997; **56**: 328–36.
3. Artemenko IP et al., *Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**: 46583–96.
4. Bose HS et al., *Biochemistry* 1998; **37**: 9768–75.
5. Rone MB et al., *Molecular Endocrinology* 2012; **26**: 1868–82.
6. Obsil T et al., *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2011; **22**: 663–72.
7. Yaffe M., *FEBS Letters* 2002; **513**: 53–7.
8. Arakane F et al., *The Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**: 32656–62.
9. Aghazadeh Y et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: 15380–94.
10. Aghazadeh Y et al., *Molecular Therapy* 2014; **22**: 1779–91.
11. Aghazadeh Y et al., *Drug Discovery Today* 2016; **21**: 278–87.
12. Sluchanko NN et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; **477**: 305–12.
13. Tugaeva KV et al., *PLoS One* 2017; **12**: e0178933.
14. Bushueva TL et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1978; **534**: 141–152.
15. Пермяков ЕА., М.:Наука, 2003.
16. Baker BY et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2005; **280**: 41753–60.
17. Bose HS et al., *Biochemistry* 2009; **48**: 1198–209.
18. Rajapaksha M et al., *Biochemistry* 2013; **52**: 7242–53.
19. Barbar E et al., *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2009; **113**: 92–7.
20. Petrescu AD et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2001; **276**: 36970–82.
21. Roostae A et al., *Biochemical Journal* 2008; **412**: 553–62.
22. Tsujishita Y et al., *Nature Structural Biology* 2000; **7**: 408–14.
23. Létourneau D et al., *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015; **408**: 53–61.
24. Murcia M et al., *Journal of Lipid Research* 2006; **47**: 2614–30.
25. Kumar KK et al., *SAR and QSAR in Environmental Research* 2018; **29**: 483–501.
26. Aghazadeh Y et al., *Molecular Therapy* 2014; **22**: 1779–91.
27. Sluchanko NN et al., *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 2019; **166**: 19–61.
28. Bustos DM et al., *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2006; **63**: 35–42.
29. Sluchanko NN et al., *Structure* 2017; **25**: 305–16.
30. Lakowicz JR., Springer Science & Business Media, 2006.