

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ им. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Тугаева Кристина Владимировна

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

Специальность 1.5.4. Биохимия

диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Случанко Николай Николаевич

Москва
2023

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ	
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ	7
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Стероидные гормоны и стероидогенез	12
1.2. Открытие белка STARD1	16
1.3. Семейство STARD-белков	17
1.4. Структурная организация STARD-белков	21
1.5. Ориентация и конформация стероидов в полости STARD-белков и их гомологов	23
1.6. Возможные механизмы захвата холестерина белком STARD1	26
1.7. Возможные механизмы функционирования STARD1 в процессе стероидогенеза	29
1.8. Взаимодействие STARD1 с другими белками	33
1.9. Белки семейства 14-3-3	35
1.10. Участие белков 14-3-3 в регуляции активности STARD1	39
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	42
2.1. Материалы и реактивы	42
2.2. Получение рекомбинантных белков	43
2.2.1. <i>Получение кодирующих конструкций STARD1</i>	43
2.2.2. <i>Трансформация клеток E. coli плазмидной ДНК</i>	44
2.2.3. <i>Препаративная экспрессия и ко-экспрессия с протеинкиназой A белков STARD1</i>	44
2.2.4. <i>Выделение и очистка рекомбинантных белков STARD1</i>	45
2.2.5. <i>Получение препаратов 14-3-3</i>	47
2.3. Исследование вторичной структуры методом кругового дихроизма	48
2.4. Исследование триптофановой флуоресценции белков	50
2.5. Определение олигомерного состояния, гидродинамических параметров и конформационной подвижности белка STARD1 в растворе	50
2.5.1. <i>Метод аналитической гель-фильтрации</i>	50
2.5.2. <i>Метод малоуглового рентгеновского рассеяния</i>	51
2.6. Исследование функциональных свойств белка STARD1	54
2.6.1. <i>Взаимодействие STARD1 с флуоресцентными аналогами холестерина</i>	54
2.6.1.1. <i>Метод стационарной флуориметрии</i>	55
2.6.1.2. <i>Метод время-разрешенной флуориметрии</i>	57
2.6.1.3. <i>Моделирование ориентации холестерина и NBD-лигандов в полости STARD1</i>	58
2.6.2. <i>Взаимодействие STARD1 с белками семейства 14-3-3</i>	59
2.6.2.1. <i>Аналитическая гель-фильтрация</i>	59

2.6.2.2. Метод поверхностного плазмонного резонанса	60
2.6.2.3. Анизотропия флуоресценции NBD-группы	61
2.7. Электрофоретические методы	63
2.7.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Леммли	63
2.7.2. Электрофорез белков в нативных условиях по методу Перье-Пэрри	64
2.8. Спектрофотометрическое определение концентрации белков	65
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	66
3.1. Разработка метода получения белка STARD1 в бактериальной системе	66
3.2. Анализ свойств рекомбинантного белка STARD1	74
3.2.1. Определение содержания вторичных структур в STARD1 методом кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете	74
3.2.2. Исследование собственной флуоресценции STARD1	74
3.2.3. Олигомерное состояние и гидродинамические свойства STARD1	76
3.3. Анализ конформационной подвижности STARD1 в растворе методом МУРР	79
3.4. Исследование функциональных свойств STARD1	82
3.4.1. Взаимодействие флуоресцентных аналогов холестерина с белком STARD1	82
3.4.1.1. Определение параметров связывания с помощью стационарной флуориметрии	82
3.4.1.2. Моделирование связывания и поиск ориентации холестерина и его NBD-аналогов в полости STARD1	86
3.4.1.3. Влияние NBD-лигандов на термостабильность STARD1	89
3.4.2. Взаимодействие STARD1 с белками семейства 14-3-3	92
3.4.2.1. Получение и характеристика препаратов белков	93
3.4.2.2. Биоинформатический анализ последовательности STARD1 и поиск потенциальных участков связывания 14-3-3	97
3.4.2.3. Исследование взаимодействия STARD1 и 14-3-3 методом аналитической гель-фильтрации	99
3.4.2.4. Определение параметров взаимодействия белков STARD1 и 14-3-3 методом поверхностного плазмонного резонанса	106
3.4.2.5. Исследование взаимодействия 14-3-3 и STARD1 с помощью анизотропии флуоресценции NBD-холестерола	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	111
ВЫВОДЫ	114
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	115
ПРИЛОЖЕНИЕ	118

Приложение 1	118
Приложение 2	119
Приложение 3	120
Приложение 4	121
Приложение 5	122
Приложение 6	123
Приложение 7	124
Приложение 8	126
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	127

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА	Акриламид
АКТГ	Адренкортикотропный гормон
БСА	Бычий сывороточный альбумин
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ	Гель-фильтрация
ДЕАЕ-целлюлоза	Диэтиламиноэтил-целлюлоза
ДМАПН	Диметиламинопропионитрил
ДСН	Додецилсульфат натрия
ИПТГ	Изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
КД	Круговой дихроизм
кДНК	Кодирующая ДНК
ЛГ	Лютеинизирующий гормон
МБА	N,N'-метиленисакриламид
ММ _{каж}	Кажущаяся молекулярная масса
мРНК	Матричная РНК
МУРР	Малоугловое рентгеновское рассеяние
ПААГ	Полиакриламидный гель
ППР	Поверхностный плазмонный резонанс
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
ТЕМЕД	N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин
Трис	Трис(гидроксиметил)аминометан
УФ	Ультрафиолет
ФМСФ	Фенилметилсульфонилфторид
ФСГ	Фолликулостимулирующий гормон
ФХ	Фосфатидилхолин
Хепес	4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
цАМФ	Циклический аденозинмонофосфат
ЭПР	Эндоплазматический ретикулум
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
Abs	Absorbance
ANT	Adenine nucleotide translocator
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene
CAH	Congenital adrenal hyperplasia
DHE	Dehydroergosterol
EOM	Ensemble optimisation method
FRET	Förster resonance energy transfer
hCG	Human chorionic gonadotropin
IMAC	Immobilized metal affinity chromatography
IMM	Inner membrane of mitochondria
LB	Lysogeny broth
LCAH	Lipoid congenital adrenal hyperplasia
MBP	Maltose-binding protein
MSF	Mitochondrial import stimulation factor
NBD	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
NTA	Nitrilotriacetic acid
OMM	Outer membrane of mitochondria
P450 _{scc} (CYP11A1)	Цитохром P450 холестерингидроксилаза/20,22-лиаза
PAP7	PBR/PKA-R1alpha-associated protein
PKA	Protein kinase A

RALLS	Right angle laser light scattering
RI	Refractive index
StAR (=STARD1)	Steroidogenic acute regulatory protein
TIM	translocase of the inner membrane
TOM	The translocase of the outer membrane
TSPO	Translocator protein
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
WT	Wild Type
β -MЭ	2-меркаптоэтанол

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 [1]. 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 [2]. Нарушения в синтезе стероидных гормонов приводят к заболеваниям, объединенным в группу с общим названием «врожденная гиперплазия надпочечников» (Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH) [3,4]. 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 [5].

STARD1 синтезируется *de novo* по мере необходимости в виде предшественника, состоящего из холестерол-связывающего домена (START-домена) и сигнального пептида с митохондриальной локализацией [6]. 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.

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 [7] 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 [8,9] и ограниченного протеолиза [10–12], а также на результатах молекулярного моделирования [13–15]. В отсутствие кристаллической структуры комплекса STARD1 с холестеролом представление о том, как природный лиганд ориентирован в полости белка, было лишь умозрительным.

Принято считать, что STARD1 функционирует в составе многокомпонентного белкового комплекса - трансдуцеосомы [16]. Помимо STARD1 в трансдуцеосому входят белки семейства 14-3-3 - известные фосфопептид-связывающие белки-регуляторы [16–18]. По данным литературы, белок STARD1 содержит два участка фосфорилирования - остатки Ser57 и Ser195 [19]. Это позволило предположить, что фосфорилирование STARD1 может влиять на его взаимодействие с 14-3-3 [20–22]. Однако противоречивость предложенного в литературе механизма регуляции STARD1 под действием фосфорилирования и взаимодействия с белками 14-3-3 [20–22] требовала дальнейших исследований.

В связи с вышеизложенным, **целью** диссертационной работы стало 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.

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 гексагистидиновый 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.

Методология и методы диссертационного исследования. Работа проведена с использованием современных молекулярно-биологических, биохимических и биофизических методов.

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.

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.

Личный вклад соискателя

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

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.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из глав "Обзор литературы", "Материалы и методы исследования" и "Результаты и их обсуждение", Заключение, Выводов, Приложения и Списка цитированной литературы. Изложена на 140 страницах и содержит 39 рисунков, 10 таблиц и 226 источников литературы.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Стероидные гормоны и стероидогенез

Гормоны - обширный класс биологически активных соединений, который обнаружен у большинства многоклеточных живых организмов - растений, животных и человека. По химической структуре гормоны человека делят на несколько больших групп: аминокислоты и их производные (пептиды и белки), гликопротеины, производные арахидоновой кислоты (эйкозаноиды) и производные холестерина (стероидные гормоны).

Большинство стероидных гормонов - это небольшие молекулы (до 500 Да) с циклопентанпергидрофенантеновым ядром - системой из четырех сопряженных колец (некоторые стероидные гормоны человека изображены на [Рис. 1](#)). Многообразие стероидных гормонов и вызываемые ими эффекты обеспечиваются различными сочетаниями кето-, гидроксидных и ацильных функциональных групп [23].

Стероидные гормоны играют важную роль в обеспечении нормального функционирования организма. Так, они вовлечены в поддержание метаболизма, регуляцию солевого и водного баланса, формирование половых признаков, а также обеспечивают развитие физиологических процессов при стрессе, травмах и воспалении [1]. В классификации стероидных гормонов на основе их биологической роли выделяют эстрогены, прогестероны, андрогены, минералокортикоиды, глюкокортикоиды и отдельно витамин D [24]. В последнее время в самостоятельную группу выделяют нейростероиды - производные прегнана и андростана, которые синтезируются в гиппокампе и других структурах мозга [25]. В [Приложении 1](#) для основных стероидных гормонов человека указано место синтеза, физиологическая роль, а также тропные гормоны, вызывающие их секрецию.

Долгое время считалось, что синтез стероидных гормонов идет только в специализированных органах: минералокортикоиды и глюкокортикоиды синтезируются в надпочечниках, половые гормоны - в семенниках у мужчин и в фолликулах яичников и желтом теле у женщин [26]. Во временном органе - плаценте - синтезируются необходимые для нормального протекания беременности эстриол и прогестерон [27]. Однако в настоящее время известно, что мозг [28], жировая ткань [29] и кишечник [30] также способны продуцировать стероидные гормоны.

У человека в зависимости от тканей, пола и возраста количество синтезируемых стероидных гормонов за день сильно отличается. Подсчитано, что у мужчин надпочечники производят до 100 мкг/день тестостерона, тогда как семенники - в 70 раз больше [23]. В организме женщины примерно половина тестостерона образуется в результате превращения андростендиона в периферических тканях, 30% синтезируют надпочечники и около 20% - яичники [23]. Также примечательно, насколько сильно различается интенсивность синтеза разных стероидных гормонов в одних и тех же органах. Например, надпочечники человека в день синтезируют примерно 25 мг кортизола и лишь 100 мкг альдостерона [23]. Приведенные примеры наглядно демонстрируют, что в организме человека имеется слаженный механизм регуляции синтеза стероидных гормонов, которых в стероидогенных клетках в норме имеется лишь незначительный базовый запас.

Стероидогенез - это многостадийный процесс превращения холестерина в активные стероидные гормоны, в котором задействовано более 25 ферментов [2]. На [Рис. 1](#) схематично изображена абстрактная стероидогенная клетка. Первая стадия стероидогенеза происходит в матриксе митохондрий, в результате которой холестерол превращается в прегненолон. Затем последний транспортируется в гладкий ЭПР, где происходит большинство дальнейших этапов стероидогенеза, за исключением финальных стадий синтеза минералокортикоидов и глюкокортикоидов [31]. Несмотря на многоэтапность и сложность этого процесса, лимитирующей стадией является "подготовительная" - а именно доставка холестерина ко внутренней мембране митохондрий (Inner Membrane of Mitochondria, IMM), которая осуществляется благодаря **стероидогенному регуляторному белку StAR** (Steroidogenic Acute Regulatory protein) [5]. В связи с тем, что позже были открыты другие белки (о них более подробно описано в [Подразделе 1.3.](#)), которые сформировали семейство STARD-белков, белок StAR получил название STARD1.

Мутации в некоторых ферментах, участвующих в стероидогенезе (на [Рис. 1](#) номера, соответствующие таким ферментам, отмечены красным цветом, а катализируемые ими реакции - красными стрелками), являются причинами заболеваний, объединенных в группу врожденных гиперплазий надпочечников (Congenital Adrenal Hyperplasias, CAH) [3,4]. В подавляющем большинстве описанных случаев (около 95%) нарушения затрагивают стадии превращения прогестерона или 17 α -гидроксиprogестерона в 11-дезоксикортикостерон или

11-дезоксикортизол, соответственно, ферментом цитохром P450 21-гидроксилазой [4]. Генетические нарушения в белке STARD1 приводят к развитию наиболее тяжелой формы САН - липоидной врожденной гиперплазии надпочечников (Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia, LCAH).

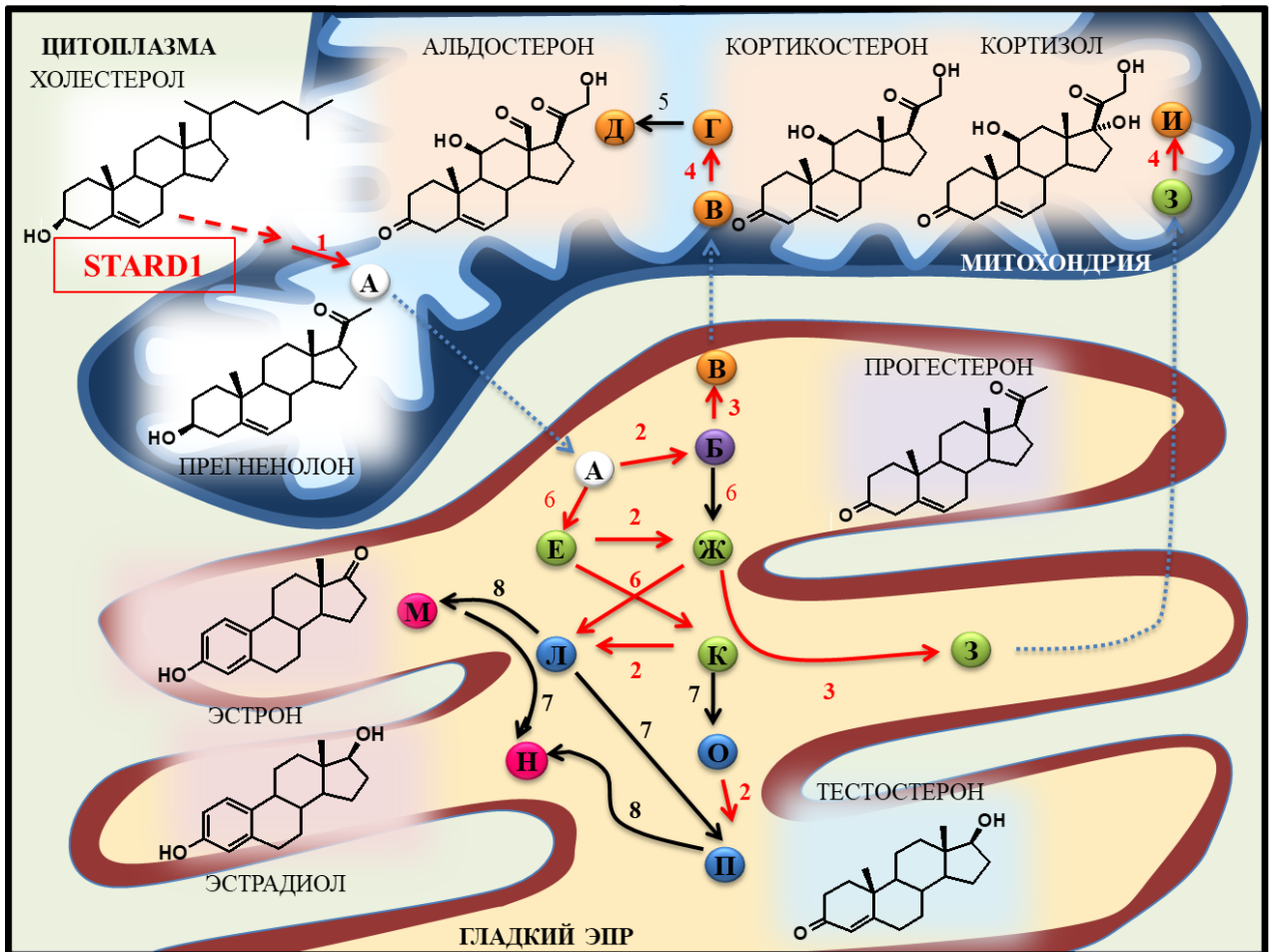


Рис. 1. Общая схема стероидогенеза в абстрактной стероидогенной клетке, синтезирующей половые гормоны и гормоны надпочечников. На схеме представлен фрагмент цитоплазмы клетки с митохондрией и гладким эндоплазматическим ретикулулом (ЭПР). Кружками отмечены интермедиаты (А – прегненолон; Б – прогестерон; В – 11-дезоксикортикостерон; Г – кортикостерон; Д – альдостерон; Е – 17 α -гидроксиpregненолон; Ж – 17 α -гидроксипрогестерон; З – 11-дезоксикортизол; И – кортизол; К – дегидроэпиандростерон; Л – андростендион; М – эстрон; Н – эстрадиол; О – андростендиол; П – тестостерон). Цифрами обозначены ферменты, катализирующие соответствующие реакции: 1 – цитохром P450 холестерингидроксилаза/20,22-лиаза, P450_{ssc} (CYP11A1); 2 – 3 β -гидростероиддегидрогеназа, 3 β -HSD; 3 – цитохром P450 21-гидроксилаза, P450_{c21} (CYP21); 4 – цитохром P450 11 β -гидроксилаза, P450_{c11} (CYP11B1); 5 – цитохром P450 альдостеронсинтаза, P450_{c18} (CYP11B2); 6 – цитохром P450 17 α -гидроксилаза/17,20-лиаза, P450_{c17} (CYP17); 7 – 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа, 17 β -HSD; 8 – цитохром P450 ароматаза, P450_{c19} (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.

Ген *star* расположен на хромосоме 8p11.2 и состоит из 7 экзонов [32]. Больше половины описанных мутаций находятся в 5-7 экзонах и приводят к аминокислотным заменам в белке или появлению стоп-кодона [33,34]. Другую часть составляют мутации в интронах, которые влияют на сплайсинг мРНК STARD1 [35–39].

Медицинское сообщество различает два типа LCAH в зависимости от степени тяжести протекания надпочечниковой недостаточности. *Классическая* LCAH сопровождается серьезными нарушениями в организме человека (например, [33,37,40–43]). Недостаток стероидных гормонов нарушает водно-солевой баланс организма, приводит к уменьшению веса, гиперпигментации кожи, а также влияет на половое развитие у мужчин. Наиболее распространенной мутацией, приводящей к *классической* LCAH, является нонсенс-мутация с обрыванием полипептидной цепи после 257 остатка (Q258X). Среди миссенс-мутаций наиболее часто встречаемыми являются замены остатка Arg182. Основные мутации, вызывающие *классическую* форму LCAH, отмечены на [Рис. 2А](#).

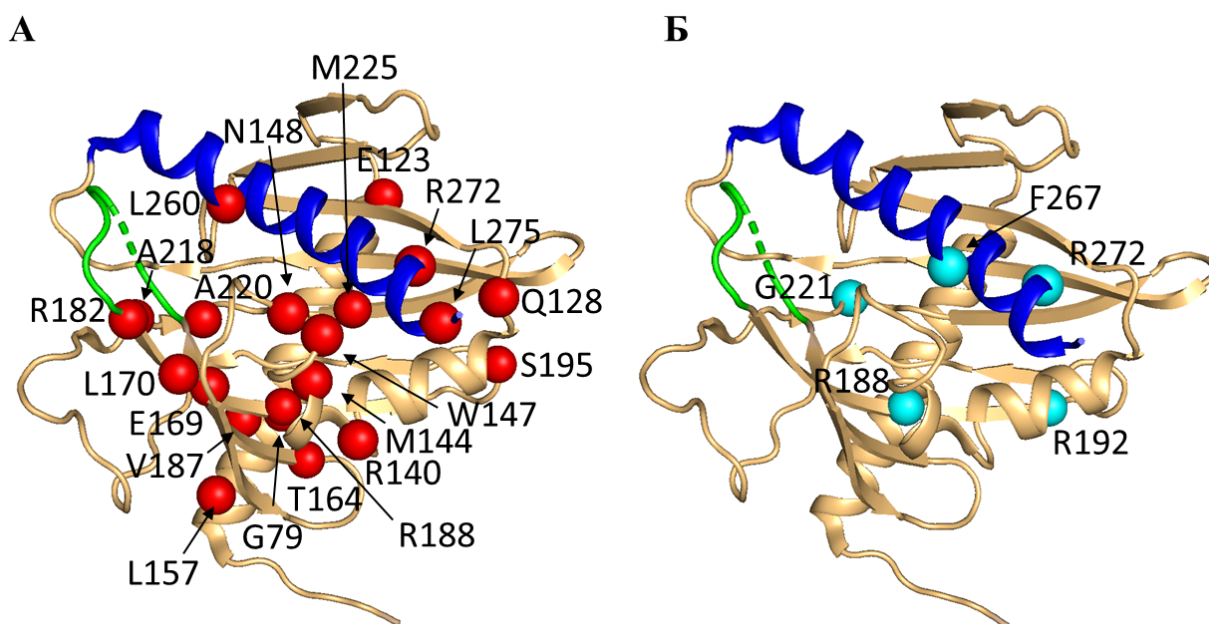


Рис. 2. Расположение некоторых аминокислотных остатков STARD1, замены которых являются причинами развития *классической* (А, красные сферы) и *неклассической* (Б, циановые сферы) форм LCAH. Для картирования аминокислотных остатков использовали единственную кристаллическую структуру STARD1 (PDB 3P0L). Важные структурные элементы STARD1 выделены зеленым (Ω_1 -петля) и синим (α_4 -спираль) цветом. Модели нарисованы в программе PyMOL 2.20.

Неклассическая форма LСАН (nonLСАН) имеет более мягкие симптомы. Часто появление nonLСАН вызвано наличием в белке таких мутаций, как R188С, R192С и R272С ([Рис. 2Б](#)). В экспериментах *in vitro* такие мутантные формы STARD1 показывали не полное, а частичное уменьшение стероидогенной активности [44–46], чем, по-видимому, и обусловлена более легкая форма заболевания. Стоит отметить, что анализ клинических картин больных позволил обнаружить несколько мутаций (например, R182С, V187М, M225Т, L260Р), которые описаны у пациентов как с *классической* [47], так и с *неклассической* [44] формами LСАН.

На данный момент замечена тенденция, что заболевание развивается преимущественно в определенных этнических группах. Больше всего LСАН подвержены корейцы, японцы и палестинские арабы. Тем не менее, есть зарегистрированные случаи и среди европейского населения ([Приложение 2](#)).

На клеточном уровне LСАН проявляется в нарушении переноса холестерина в митохондрии и, вследствие этого, накопления его в цитоплазме. Согласно двухстадийной модели развития LСАН [33], на начальных этапах часть холестерина 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 холестерина и способствует его накоплению в цитоплазме в липидных каплях с последующим увеличением клеток надпочечников в объеме.

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что именно STARD1 играет ключевую роль в доставке холестерина в митохондрии. Однако этому предшествовали долгие годы исследований начальных этапов стероидогенеза.

1.2. Открытие белка STARD1

В 1980-1990-х годах в клетках Лейдига семенников и надпочечников мышей и крыс были обнаружены неизвестные фосфобелки с кажущимися молекулярными массами около 30 (p30), 32 (p32) и 37 (p37) кДа [48,49]. Их экспрессия заметно усиливалась после воздействия на клетки лютеинизирующего гормона (ЛГ) или адренкортикотропного гормона (АКТГ), причем экспрессия коррелировала с уровнем синтеза тестостерона и кортикостерона, соответственно [48,49]. Обнаруженные фосфобелки были ассоциированы с митохондриальной фракцией [50] и, как позже выяснилось, являлись продуктами экспрессии одного гена, который был

идентифицирован и клонирован [49]. Прямое влияние этих белков на стероидогенез было доказано при трансформации клеток соответствующей кДНК. Экспрессия р30-37 в клетках линии MA-10 из опухоли мышечных клеток Лейдига приводила к увеличению уровня прогестерона в 1,5-3,5 раза по сравнению с клетками, трансфицированными пустым вектором [49,51,52]. Аналогично, в нестероидогенных клетках почек зеленой мартышки COS-1 совместная экспрессия кДНК STARD1 и фермента P450_{scc} увеличивала синтез прегненолона в несколько раз [26,53,54]. На основе своего вклада в гормон-индуцируемый процесс синтеза стероидных гормонов белок р30-37 был переименован в стероидогенный регуляторный белок StAR [49].

Позже STARD1 был обнаружен в клетках печени, мозга, глаз, сердца, легких, почек, кожи, эндотелия сосудов и кишечника, а также при развитии некоторых опухолей [55]. В неклассических стероидогенных тканях (например, в мозге [28], жировой ткани [29] или кишечнике [30]) уровень экспрессии STARD1 значительно ниже, а его функции в них остаются малоизученными. Стоит отметить, что в плаценте, которая является классическим стероидогенным органом [27], считается, что STARD1 вовсе отсутствует, и в стероидогенезе участвует его ближайший гомолог, STARD3 [56].

1.3. Семейство STARD-белков

STARD1 относится к семейству STARD-белков, которые объединяет наличие структурно сходного липид-связывающего домена. Этот домен был назван START-доменом и, помимо STARD1, он обнаружен еще в 14 белках человека, которые можно разделить на 6 подсемейств [57] в зависимости от тканевой и лигандной специфичности ([Рис. 3](#) и [Таблица 1](#)). Белки STARD-семейства выполняют различные функции в жизнедеятельности клетки и даже организма ([Таблица 1](#)). В стероидогенезе участвуют STARD1 и его ближайший гомолог STARD3, последовательности которых обладают 37% идентичностью и 50% сходством [58]. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей всех известных на данный момент STARD-белков человека приведено в [Приложении 3](#).

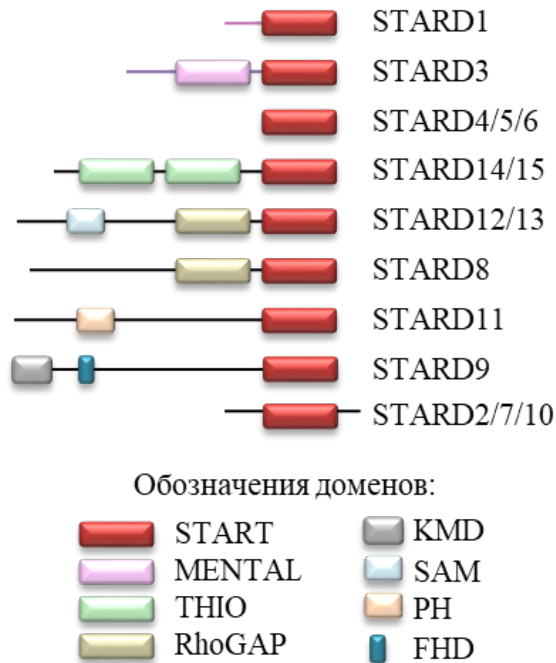
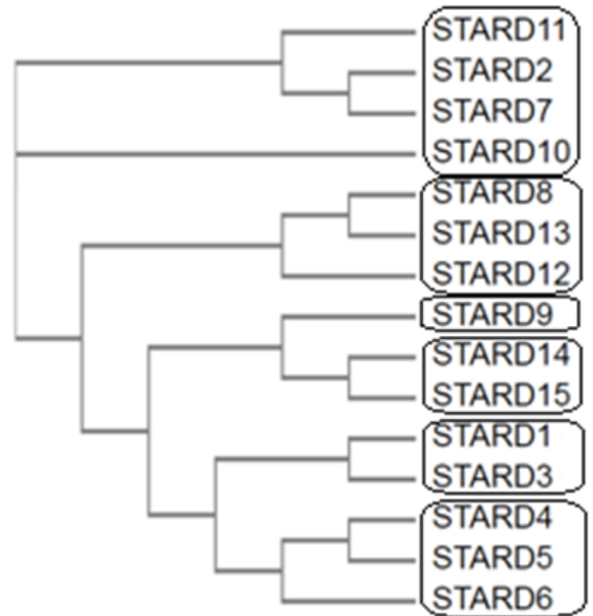
А**Б**

Рис. 3. Многообразие и доменная структура STARD-белков человека. **А.** Схематическое изображение доменной организации STARD-белков человека. Цветными блоками указаны домены STARD-белков согласно указанным обозначениям. Используемые сокращения: FHD – домен, связывающий фосфорилированные белки (Phosphoprotein Binding Domain); 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); SAM – sterile alpha motif; THIO – ацил-CoA тиоэстеразный домен (acyl-CoA thioesterase domain). **Б.** Филогенетическое дерево STARD-белков человека, построенное на основе выравнивания их START-доменов с использованием веб-сервиса *MUSCLE* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>).

Табл. 1. Характеристика STARD-белков человека.

Название	PDB идентификаторы	Лиганды	Тканевая локализация	Локализация в клетке	Функция
Подсемейство STARD 1/3					
STARD1 (StAR)	<i>3POL</i> (Ч*)	Холестерол, NBD-аналоги, β -ситостерол [59], DHE [60], 7 α -пероксихолестерол [61], BODIPY-холестерол [62]	Надпочечники, половые железы [63]	Цитоплазма, митохондрии	Доставка холестерина в IMM во время стероидогенеза
STARD3 (MLN64)	<i>5I9J</i> (Ч) <i>1EM2</i> (Ч)	Холестерол [64], лютеин [65–67]	Плацента, мозг, желтое пятно сетчатки [65–67]	Поздние эндосомы	Доставка холестерина в IMM в плаценте [56], предположительно, фотопротекция в сетчатке [65–67]
Подсемейство STARD 4/5/6					
STARD4	<i>1JSS</i> (М), <i>5BRL</i> (М), <i>6L1M</i> (Ч), <i>6L1D</i> (Ч)	Холестерол [68], 7 α -гидроксистерол, 7-гидропероксистерол [68,69]	Во многих тканях, наибольшее кол-во в печени и почках [70]	ЭПР [71], пузырьки эндоцитарного аппарата [72]	Транспорт стеролов между ПМ и пузырьками эндоцитарного аппарата [73]
STARD5	<i>2R55</i> (Ч)	Холестерол** [74], 25-гидрохолестерол, NBD-аналог [74], желчные к-ты [75]	Клетки Купфера, почки, сердце [76]	Цитоплазма, АГ, ЭПР [77]	Ответ на стресс [78]
STARD6	<i>2MOU</i> (Ч, ЯМР)	Холестерол [79], прегненолон [80], тестостерон [81]	Мужские половые железы [82], нервная ткань [83]	Цитоплазма, митохондрии [84]	Роль в сперматогенезе непонятна
Подсемейство STARD 2/7/10/11					
STARD2 (PCTP)	<i>1LN1</i> , <i>1LN2</i> , <i>1LN3</i> (Ч)	ФХ [85,86]	Печень, сердце, мышцы [87]	Цитоплазма, ядро [85], митохондрия [88]	Регулирует метаболизм ЖК, глюкозы, легочного сурфактанта [89]
STARD7 (GTT1)	-		Половые мужские железы, плацента, хориокарцинома, трофобласты [90]	Короткая форма – цитоплазматическая, длинная - митохондриальная [86]	Доставка ФХ в МХ [86], пролиферация, миграция, дифференциация клеток, синтез ФЛ [90]

STARD10	6SER (Ч)	ФХ, ФЭ [85]	Повсеместно, суперэкспрессия в опухоли груди		Регуляция клеточного деления и развития опухоли [91]
STARD11 (CERT)	2Z9Z; 2E3R; 3H3S; 2E3N и другие; [аналоги церамидов] (Ч)	Церамиды	Нетканеспецифичные, мышцы, сердце, мозг, почки, плацента [57]	Цитоплазма и АГ [57]	Транспорт церамидов из ЭПР в АГ [92]
Подсемейство STARD8/12/13					
STARD8 (DLC-3)	-	-	Плацента, периферическая НС [57], опухоли груди, простаты	Ядро и цитоплазма [93]	Опухолевый супрессор и активатор Rho-ГТФазы [93]
STARD12 (DLC-1)	-	-	Суперэкспрессия в опухолях	Ядро, цитоплазма, кавеолы [94]	Подавление клеточного роста
STARD13 (DLC-2)	2PSO (Ч)	-	Островки поджелудочной железы [95], суперэкспрессия в опухолях	Цитоплазма, митохондрии, ассоциирован с микротрубочками [94]	Контроль инсулиновой секреции [95], опухолевый супрессор [96]
Подсемейство STARD 14/15					
STARD14 (ACOT11)	3FO5 (Ч)	Жирные к-ты (?), коА производные жирных кислот, желчных кислот, простагландинов	В бурой жировой ткани при понижении температуры [97]	Микросомы, ядро [98]	Компоненты мультидоменной ацетил-КоА гидролазы
STARD15 (ACOT12)	-		Печень, селезенка, мышцы, яичники [57]	Цитоплазма [57]	
Подсемейство STARD9					
STARD9 (Kif16a)	-	-	Нервная ткань [78]	Ассоциирован с микротрубочками [99], центриолями	Регулирует сборку веретена деления [99]

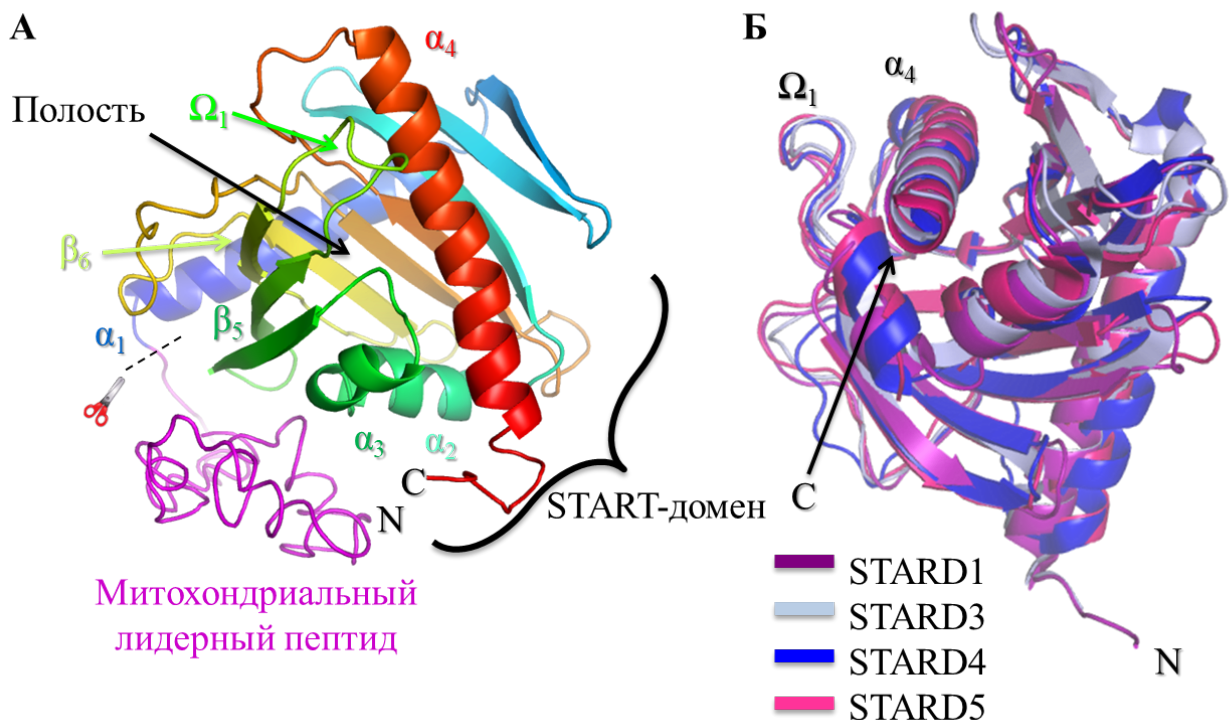
* приведены PDB идентификаторы структур STARD-белков человека (Ч) или мыши (М).

** в более поздних работах [75,79] связывание холестерина со STARD5 подтвердить не удалось.

Сокращения и обозначения: ACOT 11-12 – ацил-КоА тиоэстераза 11-12 (Acyl-CoA Thioesterase 11-12); CERT – белок, переносящий церамиды (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); Kif16a – кинезин 16a из семейства kinesin-3; PCTP – ФХ-переносящий белок (Phosphatidylcholine Transfer Protein); АГ – аппарат Гольджи; ЖК – жирная кислота; М – мышшь; НС – нервная система; ПМ – плазматическая мембрана; ФЛ – фосфолипид; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтаноламин; Ч – человек; ЭПР – эндоплазматический ретикулум. Отсутствие литературных данных отмечено прочерком (-).

1.4. Структурная организация STARD-белков

Последовательности белков STARD1 из разных организмов консервативны и содержат около 280-290 аминокислотных остатков (Приложение 4). STARD1 человека синтезируется в виде 285-аминокислотного белка-предшественника с расчетной молекулярной массой ≈ 32 кДа (из-за кажущейся массы 37 кДа такой полипептид был назван р37, что прочно закрепилось в ранней литературе). Полноразмерный белок имеет С-концевой функциональный глобулярный домен (START-домен) и длинный N-концевой пептид (Рис. 4А) [100].



Н-концевой пептид (1-62 аминокислотные остатки) содержит каноническую сигнальную последовательность, направляющую полноразмерный STARD1 в матрикс митохондрий, где происходит его процессинг в зрелую форму и затем деградация. Мутантные формы STARD1, у которых удален полностью N-концевой пептид (1-62 аминокислотные остатки, N-62) или его

часть (31-62 аминокислотные остатки), не попадают в митохондрии, однако сохраняют способность связывать холестерол в количествах, сопоставимых со STARD1 дикого типа [52,59,102,103]. В то же время, в экспериментах *in vivo* у мышей с укороченным с N-конца белком (N-47) наблюдаются нарушения в развитии половых признаков, хотя и менее значительные, чем в случае полного отсутствия STARD1 [104]. По данным работы Х. Босе и соавторов [52], эффективность стероидогенеза, скорее всего, определяется именно расположением STARD1, а не наличием митохондриального пептида.

Действительно, делеция N-концевого пептида негативно влияет на способность STARD1 связываться с внешней мембраной митохондрий (Outer Membrane of Mitochondria, OMM) [103], в результате чего укороченная форма STARD1 доставляет холестерол также в мембраны других органелл, и, соответственно, теряется специфичность передачи холестерола в митохондрии [105]. Однако наличие такого лидерного пептида (1-62 аминокислотные остатки) не обеспечивает транслокацию в митохондрии связанных с ним других белков. Искусственное добавление митохондриального пептида от STARD1 к белку пролактину (PRL) не способствует его транслокации в митохондрию [71]. Это свидетельствует о том, что присутствия лидерного пептида недостаточно для транспортировки белка внутрь митохондрии и, вероятно, в направлении белка в митохондрию вовлечены еще участки лиганд-связывающего START-домена [71].

Механизм и сайт протеолиза STARD1 митохондриальными протеазами до сих пор остаются предметом дискуссий. Имеются косвенные указания, что сайт протеолиза находится между 63-м и 64-м аминокислотными остатками [102], а деградация STARD1 проходит в несколько стадий. Считается, что полноразмерная форма STARD1 человека (37 кДа) попадает в матрикс митохондрий, где сперва образуется зрелая форма STARD1 (30 кДа), а затем происходит ее деградация под действием "коктейля" протеаз [106,107]. Для крысиного STARD1 обнаружена дополнительная промежуточная форма (32 кДа), которая образуется в межмембранном пространстве [6,48,50]. Хотя механизм митохондриальной деградации STARD1 изучен не до конца, очевидно, что она является важным аспектом регуляции активности белка. В случае нарушения импорта STARD1 в митохондрии белок, тем не менее, не накапливается в цитоплазме, а, вероятнее всего, подвергается протеасомной деградации [108]. Время жизни

активной формы белка в цитоплазме оценивается в 3-15 мин [6,108,109], а его зрелая форма в матриксе митохондрий имеет среднее время жизни 2-4 часа [108].

В 2011 году была получена первая и, на данный момент, единственная кристаллическая структура функционального START-домена белка STARD1 без митохондриального пептида, с разрешением 3,4 Å (PDB *3POL*). Холестерол-связывающий домен имеет характерную "α/β helix/grip" укладку, в которой 9 β-складок ограничены двумя концевыми α₁ и α₄ спиралями [110]. Гидрофобный карман белка STARD1, сформированный центральными β-складками, тремя α₂-α₄ спиралями и петлей Ω₁ между β₅ и β₆ складками, имеет полость объёмом ~ 470 Å³ и способен вмещать одну молекулу холестерина (~ 430 Å³) [8,15,80].

Сходную пространственную структуру имеют и другие представители STARD-семейства. Белки STARD3, STARD4, STARD5, STARD6, STARD7 имеют аналогичное содержание элементов вторичной структуры [82] и обладают заметным структурным сходством со STARD1: среднеквадратичное отклонение позиций Cα атомов (Cα RMSD) в STARD1 (PDB *3POL*), STARD3 (PDB *1EM2*), STARD4 (PDB *1JSS*), STARD5 (PDB *2R55*), STARD6 (PDB *2MOU*) составляет менее двух ангстрем ([Рис. 4Б](#)) [80]. У большинства STARD-белков размеры полости соответствуют объему лигандов [80], и считается, что, по крайней мере, STARD1 [8], STARD2 [111], STARD3, STARD4 [70] и STARD11 [112] связывают только одну молекулу лиганда.

1.5. Ориентация и конформация стероидов в полости STARD-белков и их гомологов

Несмотря на высокий уровень сходства START-доменов разных белков ([Рис. 4Б](#)), репертуар лигандов этого семейства крайне разнообразен ([Таблица 1](#)) и включает холестерол и его различные производные, церамиды, фосфатидилхолины, жирные и желчные кислоты, и даже каротиноид лютеин, которые заметно отличаются по своим размерам и химическим структурам ([Приложение 5](#)). Ввиду того, что укладка, форма и размеры лиганд-связывающих доменов разных STARD-белков очень сходны, предполагается, что лигандная специфичность определяется аминокислотными остатками, которые выстилают полость белка [70]. Боковые цепи этих остатков могут, с одной стороны, напрямую участвовать в белок-лигандных взаимодействиях, а с другой стороны, определять форму и размер полости (например, Trp171 и Trp404 в белках STARD4 и STARD2, соответственно) [70].

К 2021 году определены структуры в холоформах только для двух представителей семейства: STARD2 в комплексе с дилинолеилфосфатидилхолином (PDB *1LN1*, *1LN2*, *1LN3*) и

STARD1 в комплексе с аналогами церамидов (например, PDB 2Z9Z, 2E3R, 3H3S, 2E3N). Получение структуры комплекса STARD1 с холестерином оказалось трудной задачей и не увенчалось успехом до сих пор [100]. Из-за отсутствия этой структуры остается открытым вопрос, в какой ориентации располагается холестерин в полости STARD1, и какие аминокислотные остатки его координируют.

Существует две альтернативные, но почти равновероятные с точки зрения расчетной термодинамики модели положения холестерина в полости STARD1 [13]. К моменту начала нашего исследования не существовало прямых экспериментальных доказательств в пользу той или другой модели, и гипотезы основывались в основном на результатах молекулярного моделирования.

Молекула холестерина обладает асимметрией - боковой алифатический хвост и гидроксильная группа находятся по разные стороны от циклопентанпергидрофенантренового остова (Рис. 1). Положение, в котором 3-ОН группа холестерина ориентирована в центр полости STARD1 и направлена к аминокислотному остатку Arg188, можно обозначить как "IN" (на Рис. 5 данная ориентация холестерина показана зеленым цветом) [15,64,113]. Тогда противоположная ориентация холестерина, где 3-ОН группа находится напротив остатка Arg182, а в полости находится боковая цепь холестерина, может быть обозначена как "OUT" (Рис. 5, ориентация холестерина показана синим цветом) [13,113].

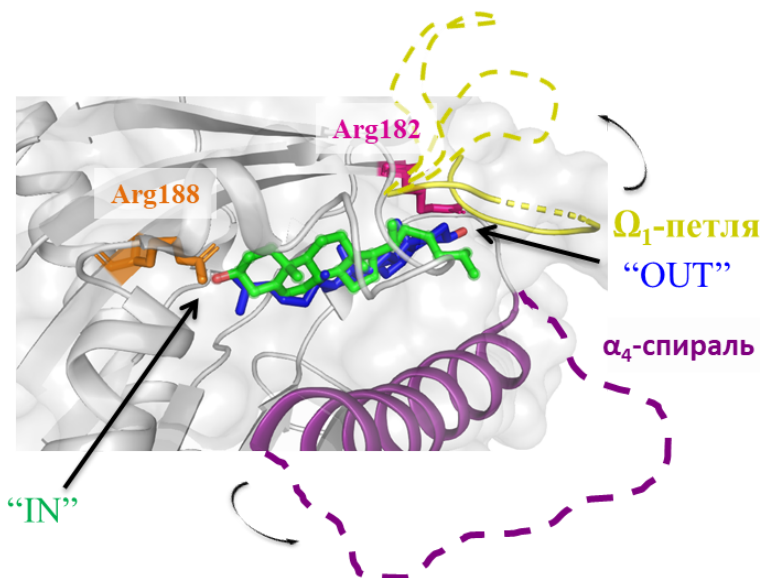


Рис. 5. Возможные ориентации холестерина в полости STARD1. Положение "IN", при котором 3-ОН группа холестерина ориентирована в центр полости и направлена к Arg188. Альтернативное положение - "OUT", при котором 3-ОН группа находится напротив остатка Arg182 и Ω_1 -петли. Пунктирными линиями обозначены возможные конформационные изменения Ω_1 -петли и α_4 -спирали, предшествующие связыванию/высвобождению холестерина. Модель структуры белка с достройкой Ω_1 -петли получена в *i-Tasser* [101] на основе структуры STARD1 (PDB 3POL).

В недавно опубликованной работе [113] было смоделировано положение холестерина в комплексе с белками STARD1, STARD3, STARD4, STARD5 и STARD6. Согласно этим данным, в пределах одного семейства возможны оба альтернативных варианта расположения (ориентации).

В отличие от STARD-белков, кристаллические структуры для лиганд-белковых комплексов некоторых других липид-переносящих белков были успешно определены. Согласно этим структурам, 25-гидроксистерол и эргостерол связываются в полостях белков Osh4 и Lam4 преимущественно в положении “IN”, т.е. фактически гидроксильные группы у C3-атома направлены в центр кармана [114,115] (Рис. 6А). К сожалению, эти данные вряд ли можно применить к STARD1 ввиду сильно различающихся структур STARD1 и Osh4 [114]. Lam4 имеет структуру, более сходную со STARD1 (RMSD 5-6 Å) [115], однако эргостерол в комплексе с Lam4 достаточно слабо погружен в полость (Рис. 6Б), поэтому эти результаты также могут быть перенесены на STARD1 лишь частично и с существенными оговорками.

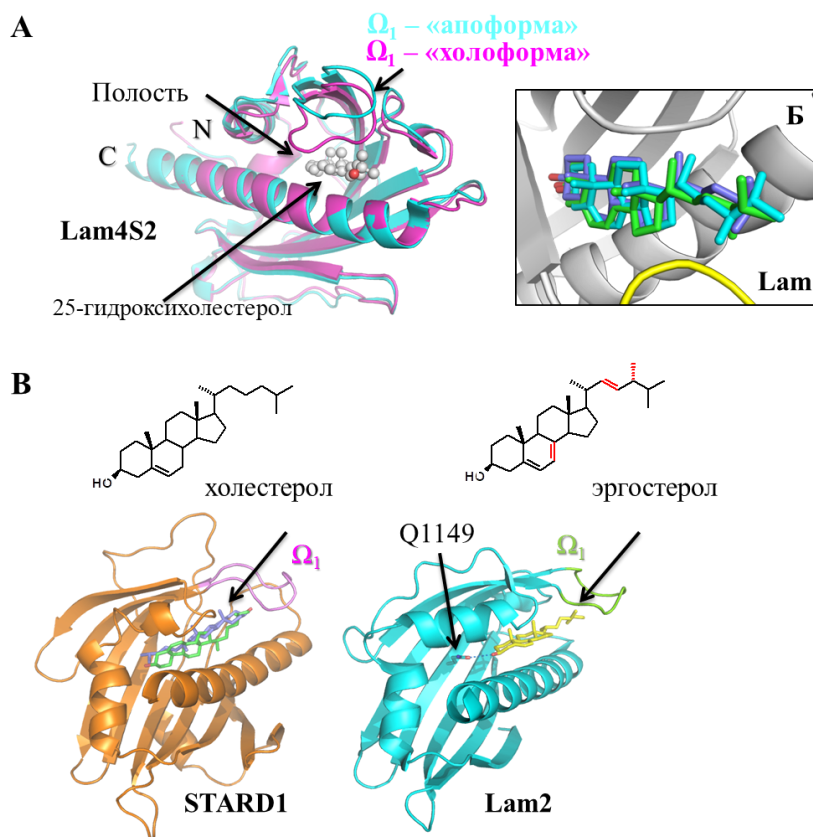


Рис. 6. Связывание стеролов в полости Lam-гомологов. **А.** Сравнение структур апо- (PDB 6BYD) и холоформы (PDB 6BYM) гомологичного белка Lam4S2 с различным положением Ω_1 -петли (отмечена стрелкой). Холоформа Lam4S2 содержит 25-гидроксихолестерол в ориентации 3-OH группы стерола “IN”. **Б.** Сравнение положения 25-гидроксихолестерола (фиолетовый цвет, PDB 6BYM) и эргостерола (циановый и зеленый, PDB 5YS0) в структуре белков Lam (серый цвет). Ω_1 -петля отмечена желтым. Видна значительная варибельность положения стеролов при сохранении ориентации “IN”. **В.** Сравнение моделей структур белков STARD1 (PDB 3POL) и Lam2 (PDB 5YS0) в комплексе с лигандами. Отличие эргостерола от холестерина показано на структурной формуле красным цветом. Модели нарисованы в программе PyMOL 2.20.

Таким образом, часть данных свидетельствует в пользу одной модели ориентации лиганда в полости STARD1, а часть - в пользу противоположной. Наконец, нельзя исключить, что холестерол в полости STARD1 и его гомологов может располагаться в обеих ориентациях, и что ориентация не столь важна для выполняемых белком функций.

1.6. Возможные механизмы захвата холестерола белком STARD1

Не менее интригующим вопросом остается механизм попадания холестерола в гидрофобный карман STARD1. Согласно данным кристаллической структуры STARD1 (PDB *3POL*), гидрофобная полость со всех сторон окружена полипептидной цепью ([Рис. 4А](#)). Очевидно, что для связывания/высвобождения гидрофобных лигандов такому белку необходимо претерпеть определенные конформационные изменения. Уже отмеченное ранее сходство START-доменов ([Рис. 4Б](#)) предполагает некоторую универсальность этого механизма и позволяет делать предположения, основанные на сравнении имеющихся структур START-доменов в апо- и холоформах.

Большинство исследователей отмечают особую конформационную подвижность С-концевой α_4 -спирали (250-285 остатки) и Ω_1 -петли (171-182 остатки) в структуре STARD1 и его гомологов ([Рис. 4](#) и [Рис. 5](#)).

Так, различия в положении Ω_1 -петли и α_4 -спирали в апоформе белка STARD3 (PDB *IEM2*) и в холоформе белка STARD2 (PDB *ILN1*) с фосфатидилхолином лежат в основе модели “clam-shell” [111]. В рамках этой модели для связывания/высвобождения холестерола предполагается движение обоих структурных элементов относительно остальной части белка, аналогично движению створок раковины двустворчатого моллюска ([Рис. 7А](#)). Сравнение конформаций фосфатидилинозитол-переносящего белка PITP α в холоформе (PDB *IFVZ*) и апоформе (PDB *IKCM*) также подкрепляет эту гипотезу ([Рис. 7Б](#)).

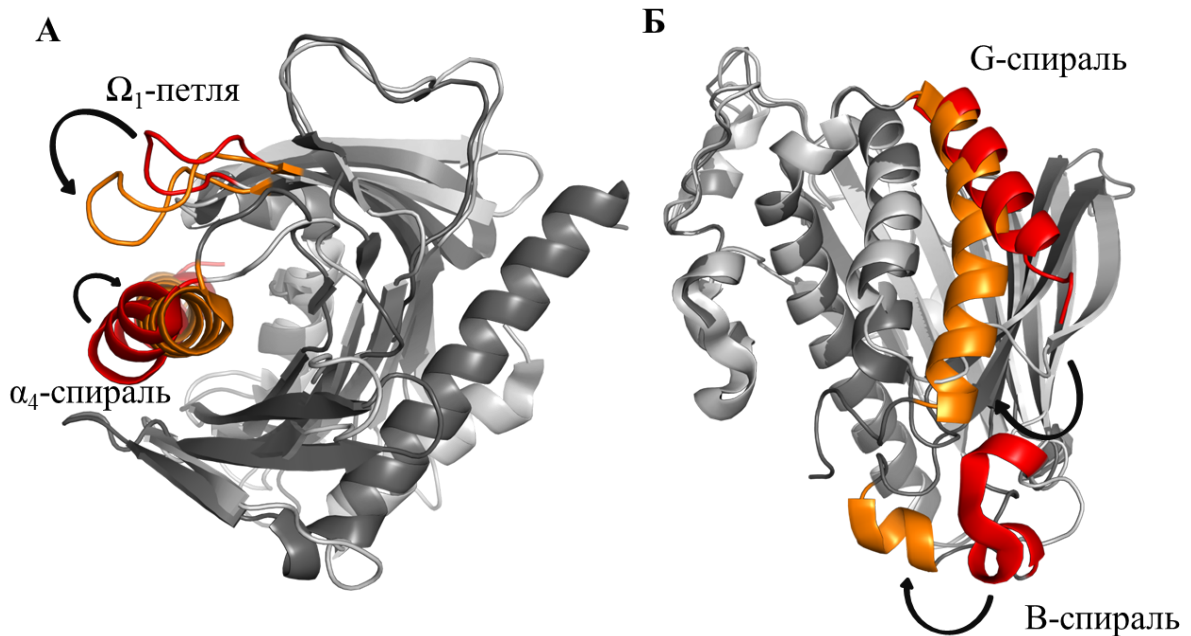


Рис. 7. Структурные изменения в лиганд-связывающих доменах белков, происходящие при связывании лигандов. **А.** Сравнение положений Ω_1 -петли и α_4 -спирали в апоформе белка STARD3 (PDB *1EM2*) и в холоформе белка STARD2 (PDB *1LN1*). **Б.** Сравнение положений В- и G-спиралей белка PITP α в структурах апоформы (PDB *1KCM*) и холоформы (PDB *1FVZ*). На обеих панелях желтым цветом выделены элементы, изменившие свое положение после связывания лигандов; красным цветом обозначены те же элементы в свободном белке; серым цветом - остальная часть лиганд-связывающего домена, конформация которой осталась практически без изменений. Стрелками изображено движение указанных структурных элементов при связывании лигандов. Модели нарисованы в программе PyMOL 2.20.

В основе *двухстадийной модели* [8] лежит допущение, что подвижная α_4 -спираль STARD1 может самопроизвольно и обратимо расплетаться, не оказывая влияния на остальную часть домена. Авторы постулируют, что две соответствующие формы белка, содержащие полностью свернутый глобулярный домен или частично разупорядоченный с С-конца домен, находятся в равновесии, которое смещено в сторону последнего состояния, и между ними возможен спонтанный переход ([Рис. 8А](#)) [8]. В качестве доказательства приводятся доли α -спиралей для STARD1, рассчитанные из спектра кругового дихроизма в дальнем УФ (32,5%) и на основе расчетной 3D-модели (PDB *1IMG*) (40%) [9]. По мнению авторов такой динамической модели, при спонтанном разворачивании α_4 -спирали полость внутри белка становится доступной для входа/выхода холестерина, который при связывании ее стабилизирует. Предполагаемый механизм связывания и высвобождения холестерина изображен на [Рис. 8Б](#).

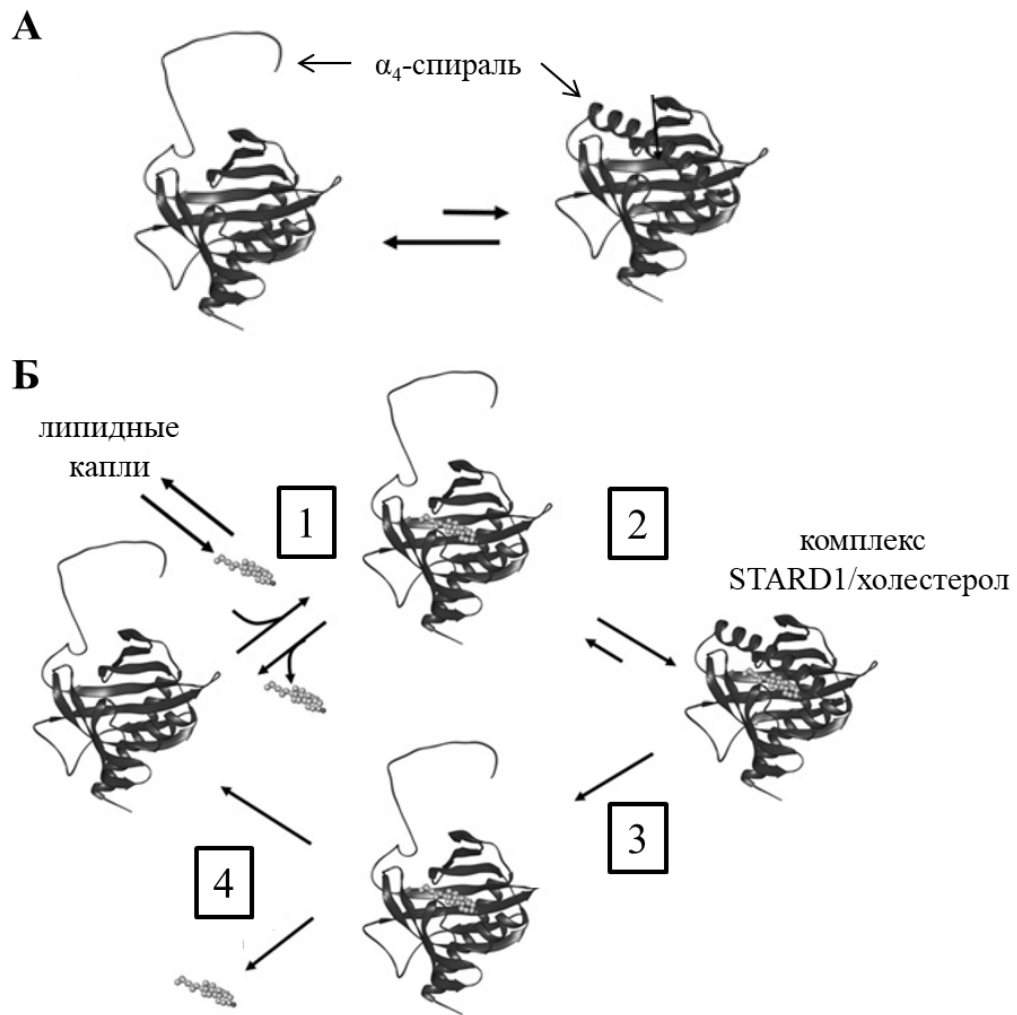


Рис. 8. Двухстадийная модель связывания холестерина (по [8,9]). **А.** В отсутствие холестерина α_4 -спираль белка находится в разупорядоченном (слева) и свернутом состояниях (справа) в равновесии. **Б.** Во время спонтанного разворачивания α_4 -спирали гидрофобная полость белка открывается, и холестерол может в неё попасть (1). Связывание холестерола в полости STARD1 инициирует сворачивание α_4 -спирали (2). Фосфорилирование STARD1 и/или взаимодействие с митохондриальными мембранными белками приводит к разворачиванию α_4 -спирали (3). Когда комплекс STARD1/холестерол диссоциирует, холестерол направляется в митохондрию, а STARD1 готов к связыванию следующей молекулы холестерола (4).

Фиксация α_4 -спирали за счет введения остатков цистеина с последующим окислением белка и образованием дисульфидных мостиков блокирует связывание холестерола и приводит к уменьшению стероидогенной активности STARD1 [116]. Удаление С-концевой спирали [102] и обнаруженная природная нонсенс-мутация (Q258X) [34,37,117,118], приводящая к LСАН, указывают на то, что интактный С-концевой участок важен для функционирования белка, однако не могут служить прямым доказательством его непосредственного участия в связывании

холестерола. Более того, в работе [102] постулируется роль С-конца белка именно во взаимодействии с мембраной. Параллельно с этими наблюдениями вероятная роль С-концевых аминокислотных остатков в связывании холестерина и/или с мембраной была обнаружена и для гомологичного белка STARD2 (PCTP), в случае которого удаление пяти С-концевых аминокислотных остатков уменьшало активность на 50%, а удаление десяти С-концевых аминокислотных остатков - полностью подавляло активность [111,119].

Однако существует альтернативная модель, объясняющая процесс захвата и высвобождения холестерина значительно меньшими конформационными перестройками. В основе модели лежат результаты молекулярного моделирования механизма захвата для белков STARD1 и STARD3 [13]. Согласно проведенным расчетам, движения Ω_1 -петли достаточно для открытия полости для лиганда [13]. В пользу данного предположения свидетельствует отсутствие упорядоченной электронной плотности для некоторых остатков в области Ω_1 -петли (аминокислотные остатки 171-182 [13]) в кристаллической структуре STARD1 (PDB 3P0L), указывающее на ее высокую мобильность. Кроме того, прямо показана динамичность Ω_1 -петли другого гомологичного белка - STARD6 - согласно данным ЯМР спектроскопии [81].

Роль Ω_1 -петли в регуляции доступности кармана для лигандов обсуждается и для Lam-белков [115]. При сравнении структур апо- и холоформ Lam видно, что при связывании лиганда Ω_1 -петля меняет свое положение относительно практически неизменной конформации остальных элементов структуры белка. Как видно из [Рис. 6В](#), Ω_1 -петля, играющая роль «молекулярной крышки», способна прикрыть выступающий лиганд Lam2 за счет удлиненных β -складок, между которыми она расположена.

Таким образом, на сегодняшний день нет консенсусного представления о том, каким образом холестерол попадает в полость STARD1. Еще более неясным остается механизм функционирования STARD1 и белок-опосредованной доставки холестерина в митохондрию.

1.7. Возможные механизмы функционирования STARD1 в процессе стероидогенеза

Около 20 лет назад был выявлен парадокс функционирования STARD1, который не разрешен до сих пор: несмотря на то, что в гидрофобном кармане белка помещается только одна молекула лиганда [8,13,15,64] и, считается, что функционально активный STARD1 локализуется в ОММ [120], одна молекула STARD1 способствует переносу в IMM до 400 молекул

холестерола в минуту [6]. Многочисленные экспериментальные данные легли в основу нескольких основных гипотез, однако все они имеют серьезные противоречия.

Согласно самой простой гипотезе, основанной на наличии митохондриального пептида и обнаружении STARD1 во фракции митохондрий, белок «заякоривается» в ОММ, что способствует образованию контактов между ОММ и IMM и запуску переноса холестерина *по градиенту концентрации* (Рис. 9А) [26,105]. В таком случае, пока STARD1 непосредственно взаимодействует с ОММ, холестерол в большом количестве "перетекает" из ОММ в IMM. Заканчивается этот процесс, когда STARD1 пересекает обе мембраны митохондрии и попадает в матрикс, где происходит его деградация. Возможно, "митохондриальный хвост" STARD1, благодаря которому он направляется в матрикс митохондрии, увеличивает время нахождения в ОММ и замедляет импорт белка в митохондрии [120]. Было обнаружено, что при замене природного лидерного пептида STARD1 на пептид от другого митохондриального белка увеличивается скорость транспортировки через митохондриальные мембраны и уменьшается эффективность стероидогенеза [120]. Максимальная стероидогенная активность STARD1 наблюдается только в том случае, если он локализован во внешней митохондриальной мембране, а не в межмембранном пространстве или во внутренней мембране [120]. Суммарно, эти наблюдения указывают на то, что для функционирования белку необходимо дольше находиться в ОММ, чем в среднем другим митохондриальным белкам, что, однако, в некоторой степени противоречит другим фактам.

Во-первых, как уже отмечалось выше, удаление митохондриального пептида не приводит к значительному снижению уровня стероидогенеза в культуре клеток COS-1 [69]. Во-вторых, эксперименты на первичной культуре клеток, полученных из надпочечников крыс, выявили корреляцию между синтезом прегненолона и процессингом STARD1 в митохондриях [76], а также было обнаружено повышение уровня синтеза митохондриальных протеаз в результате транскрипции STARD1 [98]. Такое наблюдение косвенно указывает на то, что для эффективного стероидогенеза важно как наличие в цитоплазме STARD1, так и последующее его созревание в митохондриях. Хотя обсуждаемая теория переноса холестерина и содержит стадию деградации STARD1 в митохондриях, все же, согласно ей, роль STARD1 в переносе холестерина заканчивается в тот момент, когда STARD1 попадает в матрикс митохондрии, т.к. больше не участвует в образовании контактов между ОММ и IMM.

Сторонники *челночного механизма* функционирования [15,64] предполагают попадание полноразмерного STARD1 в межмембранное пространство, в котором белок оказывается зажатым между внешней и внутренней мембранами митохондрии (Рис. 9Б). В межмембранном пространстве предположительно происходит частичное разворачивание α_4 -спирали STARD1 (Рис. 9Б, стадия 0), что приводит к связыванию в его полости холестерина. Далее, STARD1 переносит по одной молекуле лиганда из OMM в IMM подобно челноку (Рис. 9Б, стадии 1-4), до тех пор, пока не будет сам импортирован по неизвестному пока механизму в митохондрии. Однако данная модель также находится в противоречии с тем, что STARD1 максимально эффективно функционирует, только находясь на OMM [52].

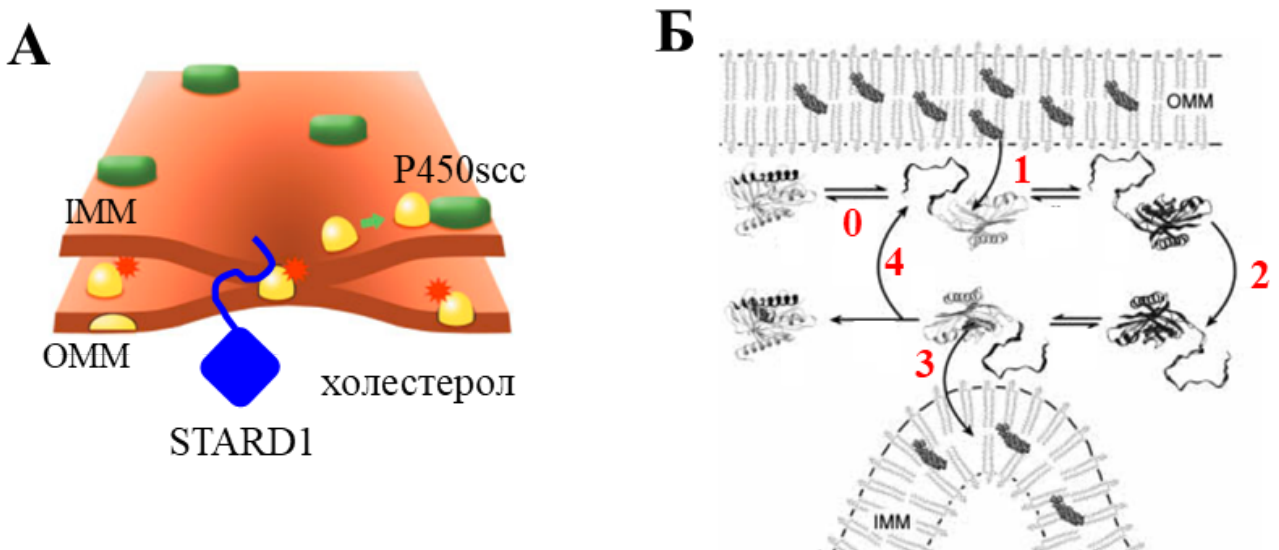


Рис. 9. Возможные механизмы функционирования STARD1. **А.** Заякоривание STARD1 способствует образованию контактов между мембранами митохондрий. В местах таких контактов перенос холестерина осуществляется по химическому градиенту концентраций (с изменениями по [121]). **Б.** Челночный механизм (с изменениями по [15]). STARD1 попадает в межмембранное пространство митохондрий, где связывает одну молекулу холестерина из внешней митохондриальной мембраны (ОММ) (обозначено цифрой "1") и переносит ("2") ее во внутреннюю митохондриальную мембрану (ИММ) ("3"). Свободный STARD1 возвращается к ОММ ("4") и процесс повторяется заново. Цифрой "0" обозначен процесс частичного разворачивания α_4 -спирали для связывания холестерина (согласно модели [8,9]).

Для импортируемых в мембраны и органеллы белков характерна способность принимать так называемую конформацию "расплавленной глобулы" [122,123] - частично развернутой молекулы белка с сохранением ее вторичных структур. Несмотря на общепринятое мнение о том, что потеря третичной структуры, вызванная значительными изменениями рН, приводит к частичной или полной потере активности белков, существуют исключения. Например, частично

развернутая форма дигидрофолатредуктазы (DHFR) связывает лиганд аналогично нативному белку, а хоризмат мутаза в конформации расплавленной глобулы (mCM) связывает и высвобождает свой субстрат намного быстрее нативной формы фермента [124]. В ряде экспериментов *in vitro* было продемонстрировано, что для функционирования STARD1 также необходимо перейти в конформацию *расплавленной глобулы* [116,125]. Было высказано предположение, что вблизи митохондриальной мембраны или внутри межмембранного пространства в условиях локального понижения pH STARD1 принимает конформацию расплавленной глобулы и в такой форме способен связывать холестерол из OMM и переносить его в IMM [116,125]. Авторы такой гипотезы продемонстрировали, что помимо N-концевого лидерного пептида, который направляет STARD1 в митохондрию, с митохондриальной мембраной взаимодействует еще С-концевой участок белка [11,125]. Согласно молекулярному моделированию, между STARD1 и OMM могут возникать гидрофобные взаимодействия за счет экспонированных в раствор боковых цепей остатков Phe267 и Ala283, а также между отрицательно заряженными боковыми цепями Asp266, Glu276 и Glu281 и положительно заряженными участками мембран митохондрий [11]. В случае другого представителя семейства – STARD6 – взаимодействие с митохондриальной мембраной было более прочным, чем с STARD1 или STARD3, предположительно, из-за бóльшей гидрофобности его С-концевого участка [82]. Несмотря на то, что авторы не смогли предположить, каким образом α_4 -спираль ориентирована при связывании с мембраной [11], им удалось объяснить сохранение стероидогенной активности у STARD1, лишённого митохондриального пептида.

Функционирование в виде расплавленной глобулы предполагается и для гомологичного белка – STARD3, но обнаруженные pH-зависимые изменения в его структуре были менее кардинальными, чем у STARD1 [52,56].

К сожалению, прямые свидетельства нахождения STARD1 в межмембранном пространстве не были опубликованы. Более того, предложенный механизм функционирования в виде расплавленной глобулы не отвечает на вопрос, *что* именно регулирует связывание/высвобождение холестерола. По данным работы М. Раджапакши и соавторов [126], при высоких концентрациях холестерола STARD1 претерпевает разворачивание, в то время как низкие концентрации холестерола способствуют его сворачиванию. Эти наблюдения противоречат представлениям о том, что концентрация холестерола в OMM высокая, а в IMM

низкая [127]. В таком случае связывание холестерина из ОММ и высвобождение его в IMM было бы затруднено.

Суммируя вышесказанное, стоит признать, что все предложенные гипотезы содержат внутренние противоречия и не могут полно и максимально логично объяснить существующий парадокс в функционировании STARD1.

1.8. Взаимодействие STARD1 с другими белками

Несколько лет назад профессор Пападопулос с коллегами заметил, что добавление только STARD1 не приводит к максимальному возможному уровню синтеза стероидов, а на эффективность стероидогенеза влияет не только уровень экспрессии STARD1, но и ряда других белков [20,21,128,129]. На основе этих наблюдений было предположено существование динамического белкового комплекса - *трансдуцеосомы* - который состоит из цитоплазматических и митохондриальных белков (Рис. 10) и "собирается" непосредственно при стероидогенезе [16]. Точный состав комплекса остается спорным, но, считается, что помимо STARD1 в состав трансдуцеосомы входят еще мембранные белки TSPO, VDAC1 и VDAC2, цитоплазматическая регуляторная субъединица PKA ($RI\alpha$) и привлекающий ее к мембране белок PAP7, а также универсальные регуляторные белки семейства 14-3-3 [16]. Несмотря на то, что роль каждого белка трансдуцеосомы в отдельности более-менее известна, механизм работы всего комплекса далек от полного понимания, а данные о роли тех или иных белков в стероидогенезе противоречивы.

Белок TSPO (историческое название - бензодиазепиновый рецептор, Peripheral-type Benzodiazepine receptor, PBR) - 18 кДа белок, обладающий большим сродством к холестеролу и бензодиазепину, экспрессируется в больших количествах в стероидогенных клетках и локализован в ОММ [128]. В течение долгого времени белок TSPO считался главным кандидатом на роль белка, участвующего в лимитирующей стадии стероидогенеза. Однако в настоящее время его роль в данном процессе пересмотрена.

PAP7 (60 кДа) - TSPO-ассоциированный цитоплазматический белок, который также способен привлекать к ОММ регуляторную субъединицу PKA ($RI\alpha$). Под действием тропных гормонов и синтетических аналогов цАМФ происходит перераспределение белка PAP7 в клетке, после чего он локализуется преимущественно около митохондрий. По всей видимости, PKA

(RI α) необходима для модуляции активности белков, входящих в комплекс, за счет фосфорилирования [19,131].

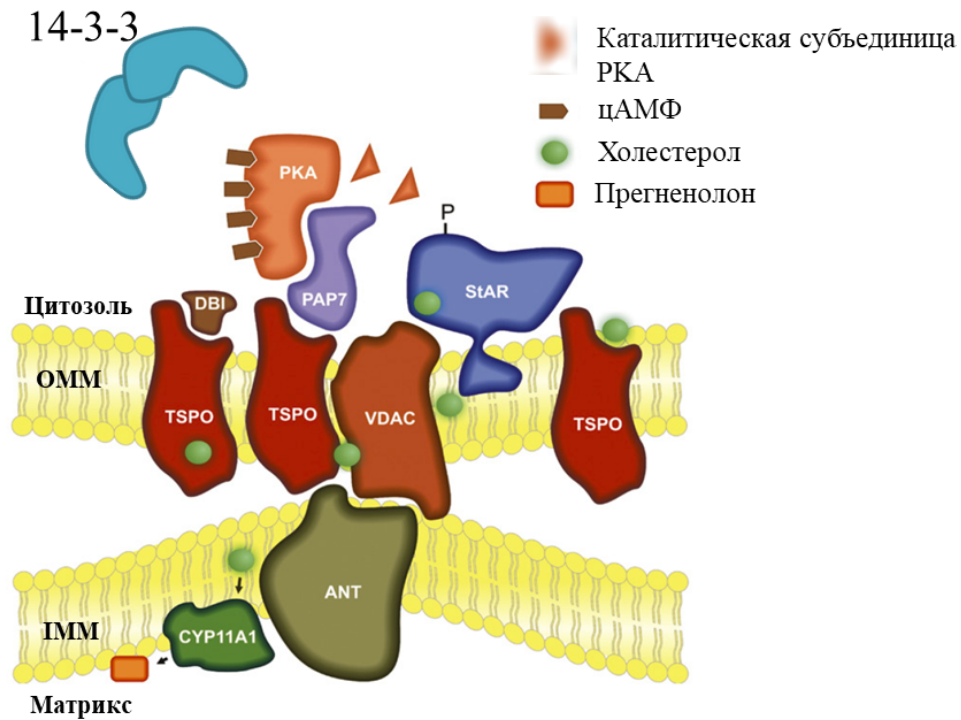


Рис. 10. Схематическое изображение трансдуцесомы (по [130] с дополнениями). В трансдуцесому входят цитоплазматические регуляторные белки семейства 14-3-3, PKA (RI α) и связывающий ее с ОММ белок PAP7, STARD1 (StAR), мембранные белки TSPO и VDAC. ОММ - внешняя митохондриальная мембрана, ИММ - внутренняя митохондриальная мембрана, также на схеме обозначены ингибитор TSPO (Diazepam Binding Inhibitor, DBI), переносчик адениновых нуклеотидов (Adenine Nucleotide Transporter, ANT) и цитохром P450_{scc} (CYP11A1).

Для STARD1 человека, который изначально описан как фосфобелок, показано фосфорилирование *in vivo* по остаткам Ser57 и Ser195 [19]. Считается, что фосфорилирование по Ser195 повышает активность STARD1 в полтора раза, хотя не является обязательным условием для стероидогенеза [19]. Фосфоимитирующая замена S195D способствует увеличению синтеза прегненолона на 20%, а внесение блокирующей фосфорилирование замены S195A, наоборот, снижает эффективность стероидогенеза примерно в два раза по сравнению с диким типом [19]. Точечная замена S57A не оказывает серьезный эффект на стероидогенез: по-видимому, фосфорилирование по Ser57 регулирует импорт белка в митохондрию [19]. Уместно отметить, что остаток Ser57 расположен вблизи от предполагаемого участка процессинга STARD1 (остатки 63-64).

Следующие обнаруженные в трансдуцесоме белки - VDAC1 [132] и гомологичный ему VDAC2 [103]. VDAC1 (Voltage-Dependent Anion Channel 1) – β -складчатый белок, вовлеченный в регуляцию транспорта ионов и малых молекул через ОММ [133]. Взаимодействие белков VDAC1 и STARD1 считается необходимым для переноса холестерина к ОММ [132], тогда как отсутствие VDAC2 нарушает импорт STARD1 в митохондрию [103].

В состав трансдуцесомы входят также белки семейства 14-3-3, которые вовлечены во многие важные процессы жизнедеятельности клетки [134]. Обнаружение регуляторных белков 14-3-3 в составе трансдуцесомы указывает на то, что этот многокомпонентный белковый комплекс не только способствует переносу холестерина, но также обладает способностью регулировать свою активность в соответствии с нуждами клетки. Согласно последним представлениям, белки 14-3-3 являются партнерами STARD1 и регуляторами стероидогенеза [20,135].

1.9. Белки семейства 14-3-3

Универсальные регуляторные белки семейства 14-3-3 обнаружены у большинства исследованных эукариот [17]. Благодаря своему богатому интерактому 14-3-3 вовлечены в регуляцию клеточного цикла и пролиферации, клеточной подвижности, апоптоза и других процессов жизнедеятельности клетки [134,136,137]. Свое необычное название они получили благодаря номерам фракций в процессе их выделения из экстракта мозга быка, очистке на ДЕАЕ-целлюлозе и последующей идентификации методом электрофореза в крахмальном геле [138].

У человека семейство белков 14-3-3 представлено семью изоформами (β , γ , ϵ , ζ , η , σ и τ), которые кодируются разными генами [139] (ввиду последнего, применительно к белкам 14-3-3 название “изоформа” не совсем корректно, однако этот термин чрезвычайно крепко укоренился и распространился, поэтому в данной работе мы также будем придерживаться этой номенклатуры). Изоформы 14-3-3 встречаются повсеместно и входят в двадцатку наиболее представленных белков человека [140]. В зависимости от типа ткани распределение долей изоформ 14-3-3 варьируется. Согласно базе данных PAXdb (<https://pax-db.org>) и [140], наиболее тканеспецифичной является изоформа 14-3-3 σ , а изоформы ϵ и ζ – напротив, представлены в большинстве тканей ([Рис. 11](#)).

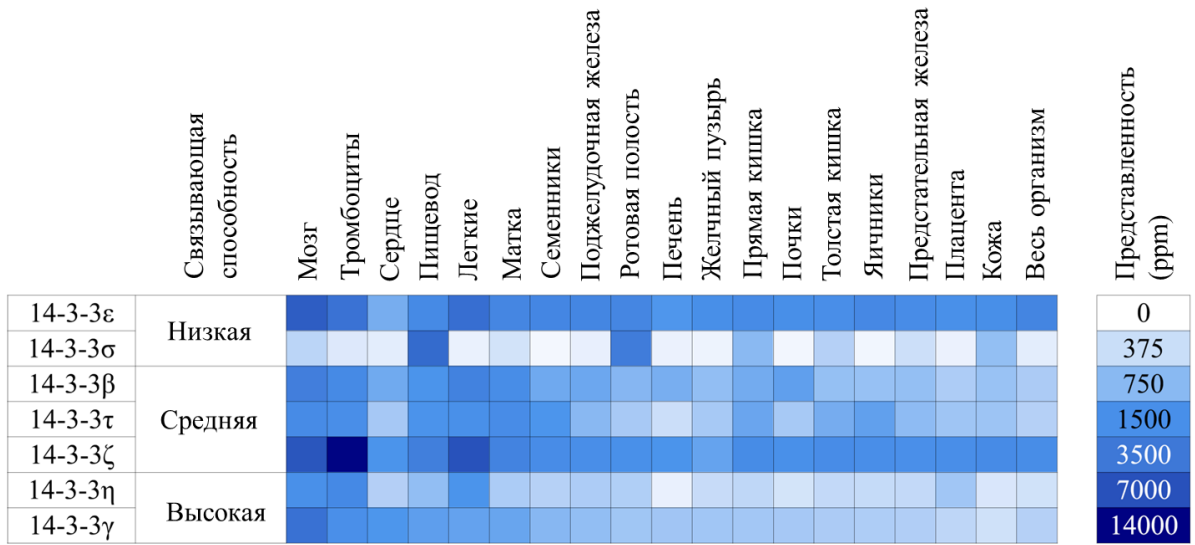


Рис. 11. Распределение 14-3-3 по тканям и во всем организме человека на основе базы данных *PAXdb* (<https://pax-db.org/>) (по [140] с изменениями). Для каждой изоформы цветом закодировано её содержание (ppm = количество молекул данной изоформы 14-3-3 на 10^6 молекул всех белков в данной ткани/органе), согласно шкале справа.

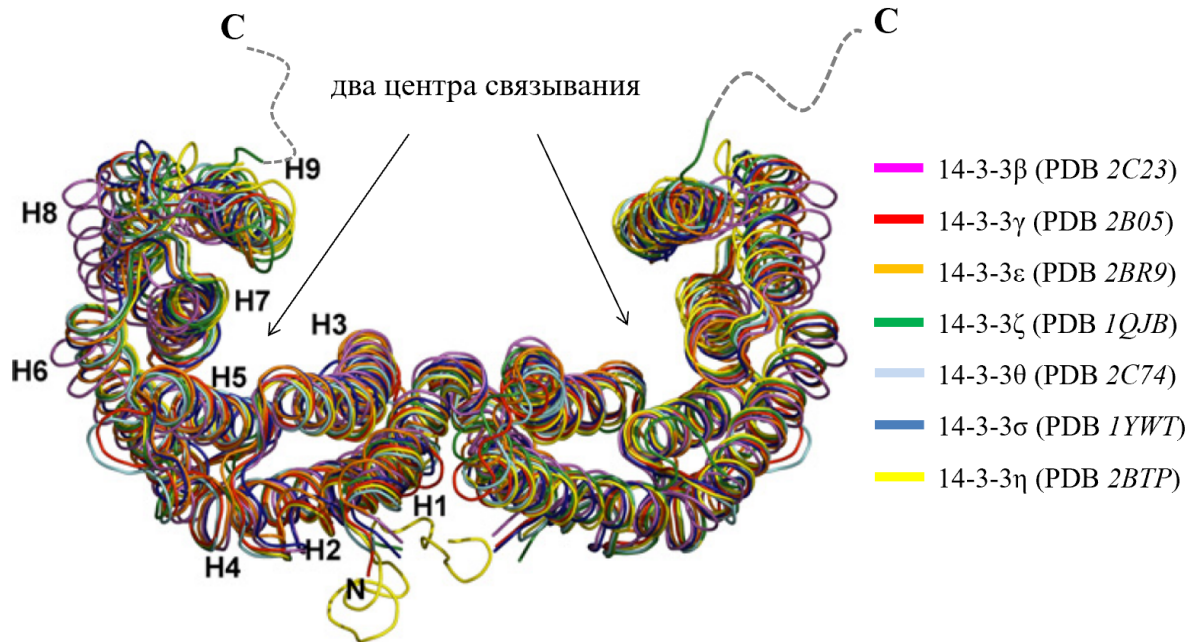


Рис. 12. Сравнение кристаллических структур семи изоформ 14-3-3 человека (по [17] с дополнениями). Белки 14-3-3 формируют димеры, мономеры которых содержат по одному центру связывания (амфипатической бороздке) белка-партнера. Спирали H1-H4 образуют “дно” мономера, H5-H9 - его боковые стенки. N-концы мономеров находятся в интерфейсе, С-концы имеют разупорядоченную структуру и обозначены пунктирной линией.

Благодаря рентгеноструктурному анализу было установлено, что все семь изоформ 14-3-3 человека (PDB 2C23 (β), 2B05 (γ), 2BR9 (ϵ), 1QJB (ζ), 2C74 (θ), 1YWT (σ), 2BTP (η)) обладают сходной структурой и формируют димеры W-образной формы [17]. Каждый мономер 14-3-3 (28-30 кДа) состоит из 9 антипараллельных α -спиралей (спирали Н1-Н9, [Рис. 12](#)) и имеет амфипатическую бороздку для связывания фосфорилированных фрагментов в составе белков-партнеров [141]. Было замечено, что изоформы обладают различной склонностью образовывать гомо- и гетеродимеры [142]. Так, изоформа 14-3-3 σ существует только в виде гомодимера [143], в то время как 14-3-3 ϵ - практически исключительно в виде гетеродимера с остальными изоформами (кроме 14-3-3 σ) [144].

Несмотря на то, что в клетке присутствуют в основном димеры 14-3-3, по данным нативной масс-спектрометрии, стабильность димеров разных изоформ 14-3-3 *in vitro* отличается. Например, изоформы ϵ и γ преимущественно находятся в виде димеров, в то время как для изоформ β и η соотношение димеров и мономеров примерно равно 70:30 [144]. Фосфорилирование консервативного остатка Ser58 (нумерация для изоформы 14-3-3 ζ человека), локализованного в интерфейсе, разрушает димер [145] и оказывает влияние на функциональность белка [142,146]. Согласно оценке, проведенной в недавней работе [147], константа диссоциации (K_D) димеров на мономеры *нефосфорилированной* формы 14-3-3 ζ почти в 800 000 раз ниже, чем *фосфорилированной* формы p14-3-3 ζ (примерно 5,5 нМ и 4,3 мМ, соответственно). В других недавних работах было продемонстрировано, что мономеры 14-3-3 связывают белки-партнеры вне зависимости от наличия в них фосфорилированного участка, препятствуют агрегации в условиях *in vivo* и *in vitro* [148] и проявляют шапероноподобные свойства [149].

На сегодняшний день описано несколько сотен белков-партнеров [150], а с помощью биоинформатических методов и анализа белковых баз данных число выявляемых потенциальных партнеров 14-3-3 увеличивается до нескольких тысяч [151]. Белки 14-3-3 в подавляющем большинстве случаев узнают небольшие участки в партнерах, в центральном положении которых находится остаток фосфосерина или фосфотреонина. Использование библиотек синтетических фосфопептидов позволило выявить три консенсусных мотива [152,153]:

Мотив I R[S/Φ; +]pS/pTXP
 Мотив II RX[S/Φ; +]pS/pTXP
 Мотив III pS/pTX₀₋₂COOH,

где Φ – ароматический остаток, + положительно заряженный остаток, pS/pT – фосфосерин или фосфотреонин, X – любой остаток, преимущественно Leu, Gly, Ala, Met.

Несмотря на то, что эти мотивы наиболее распространены среди партнеров 14-3-3, описаны случаи, в которых взаимодействие происходит с неканоническими последовательностями [154]. Наиболее известными примерами является экзоэнзим S (ExoS) (ADP-рибозилтрансфераза), который связывается с 14-3-3 за счет последовательности ⁴²⁴DALDL⁴²⁸ и синтетический пептид R18 (PHCVPRDLS**WLDLEANMCLP**) [155].

Принято считать, что взаимодействие димера 14-3-3 с белками-партнерами, имеющими два и более фосфосайтов, происходит последовательно и с увеличением силы связывания с 14-3-3 [153]. Для описания этой гипотезы была предложена модель "привратника", согласно которой один сайт узнавания работает в качестве привлечения для связывания, а второй сайт усиливает взаимодействие [18].

Принято считать, что 14-3-3 - цитоплазматические белки, но для выполнения некоторых своих функций 14-3-3 могут мигрировать в другие органеллы. Например, показано, что изоформы γ и ε в клетках селезенки человека ассоциированы с центросомами [156,157]. В гиппокампе крысы все изоформы 14-3-3 локализованы в цитоплазме, хотя изоформы γ и ζ были также обнаружены в митохондриальной и микросомальной фракциях [158]. В клетках-предшественниках глии изоформа ζ также обнаружена в цитоплазме, но транслоцируется в ядро после дифференцировки клеток [159]. С помощью непрямого иммунофлуоресцентного анализа внутриклеточного распределения 14-3-3 на клетках линии COS-7 было показано, что 14-3-3ε колокализована с аппаратом Гольджи, а 14-3-3γ и η преимущественно колокализованы с ядром и с митохондриями, соответственно [160]. Любопытно, что ранее для изоформ γ и ε была показана роль в транслокации белков в митохондрии в составе комплекса - так называемого фактора транслокации в митохондрии (Mitochondrial import Stimulation Factor, MSF) [161,162].

Согласно последним данным, в импорте белков в митохондрии участвует система комплексов, расположенных на ОММ и ИММ [163]. На внешней мембране митохондрий

локализован транслоказный комплекс TOM, который включает рецепторы (например, Tom20, Tom22, Tom70) и трансмембранные каналы (Tom40, Tom5, Tom6, Tom7). Для высших эукариот показано непосредственное участие белков 14-3-3 γ в регуляции транспорта белков-предшественников в митохондрию [164].

Во внутренней мембране митохондрий присутствуют транслоказные комплексы двух типов, TIM22 и TIM23, отличающиеся по своей специфичности [165]. Комплекс TIM23 (состоит из белков Tim17, Tim23, Tim44) обеспечивает импорт белков с положительно заряженным лидерным пептидом, тогда как комплекс TIM22 (представлен белками Tim9, Tim10, Tim12) обеспечивает импорт интегральных белков внутренней мембраны митохондрий, которые не несут классический сигнал митохондриальной локализации.

1.10. Участие белков 14-3-3 в регуляции активности STARD1

В основе гипотезы о роли белков 14-3-3 в регуляции стероидогенеза лежит увеличение уровня экспрессии изоформ 14-3-3 γ и 14-3-3 ϵ под действием хорионического гонадотропина hCG (или цАМФ) в клетках MA-10 [20]. Со-очищение 14-3-3 γ и 14-3-3 ϵ с митохондриальной фракцией указывает на прямое взаимодействие между 14-3-3 и белками, связанными с митохондриями [20]. Биоинформатический анализ последовательностей белков, входящих в состав трансдуцесомы, показал наличие потенциальных участков узнавания 14-3-3 в трех белках - TSPO, VDAC и STARD1 [20]. Однако только для взаимодействия между 14-3-3 γ и STARD1 была обнаружена зависимость от времени воздействия цАМФ [20]. В серии работ под руководством проф. Пападопулоса [20,135] в последовательности STARD1 было выявлено два потенциальных участка связывания с 14-3-3: RRSpS⁵⁷LL (здесь и далее нумерация для STARD1 человека) и RRGpS¹⁹⁵TC.

В результате экспериментов на клеточных культурах авторы предположили, что во взаимодействии с 14-3-3 основную роль играет именно участок RRGpS¹⁹⁵TC [20,135] и на основе сделанных наблюдений был предложен следующий механизм участия 14-3-3 в регуляции синтеза стероидных гормонов [20]. До стимуляции стероидогенеза 14-3-3 присутствуют в гиперфосфорилированной димерной форме в цитоплазме ([Рис. 13А](#)). Гормональная стимуляция и увеличение внутриклеточной концентрации цАМФ вызывают ацетилирование димеров 14-3-3, которые диссоциируют на мономеры ([Рис. 13Б](#)). Мономерная форма 14-3-3 связывает *нефосфорилированный* остаток Ser195 в STARD1, и тем самым

препятствует его фосфорилированию (Рис. 13Б). Авторы предположили, что в составе комплекса с 14-3-3 белок STARD1 обладает низкой стероидогенной активностью. В течение следующих 60 минут увеличивается количество синтезированных молекул STARD1 и 14-3-3 за счет трансляции пре-синтезированных мРНК, а также после диссоциации комплекса 14-3-3/STARD1 (Рис. 13В). Свободный STARD1 становится доступным для PKA. Эффективность стероидогенеза частично повышается. После 120 минут стимуляции цАМФ мономеры 14-3-3 снова формируют димеры (Рис. 13Г). Весь свободный STARD1 подвергается фосфорилированию PKA, и эффективность стероидогенеза становится максимальной (Рис. 13Г).

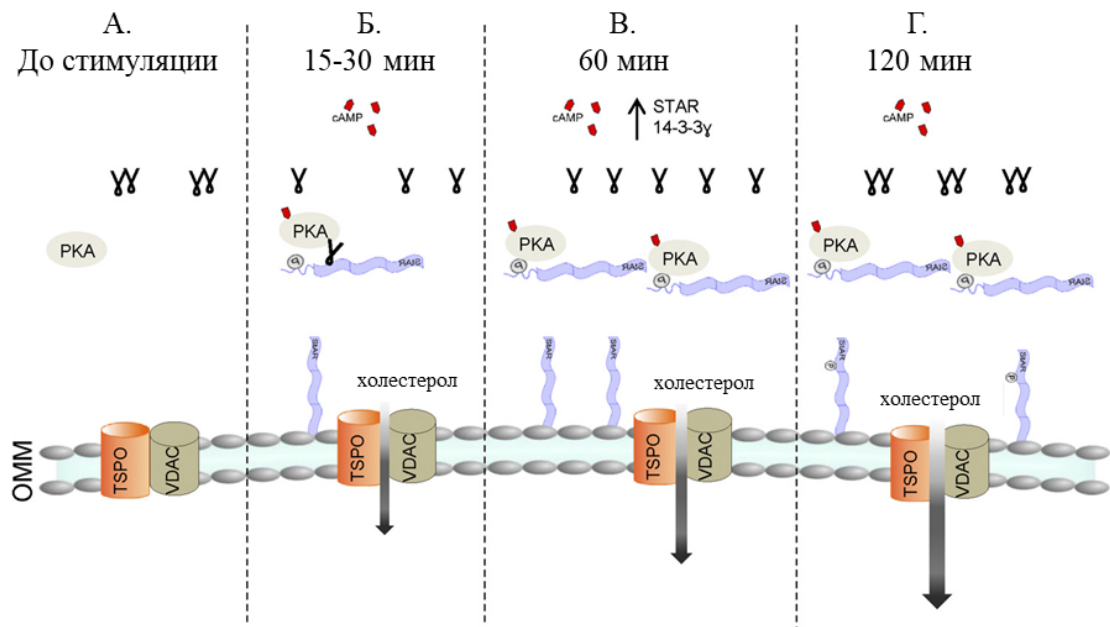


Рис. 13. Возможный механизм участия белков 14-3-3 в регуляции активности STARD1 (по [20]). Показаны четыре временных промежутка стероидогенеза (А-Г) с обозначением белков 14-3-3, STARD1 (STAR), PKA и некоторых мембранных белков трансдуцосомы (TSPO и VDAC). ОММ - внешняя митохондриальная мембрана. Длина серой стрелки обозначает условную эффективность стероидогенеза. Подробные объяснения см. в тексте.

В отличие от изоформы γ , которая, предположительно, образует комплекс со STARD1 [20], изоформа ϵ , вероятно, связывает VDAC1 и препятствует эффективному взаимодействию TSPO и VDAC1 [128]. По мнению авторов гипотезы, связывание STARD1 с 14-3-3 γ привлекает 14-3-3 ϵ , и из-за возникающей конкуренции между партнерами 14-3-3 взаимодействие 14-3-3 ϵ с VDAC1 ослабевает. Далее, по мере высвобождения STARD1 свободный 14-3-3 ϵ может опять связываться с VDAC1 [21,22].

К большому удивлению, предложенная Пападопулос с коллегами модель обладает очевидными логическими нарушениями и противоречит общепринятым закономерностям функционирования белков 14-3-3. Например, неясно, почему в начальном состоянии 14-3-3 находятся в гиперфосфорилированной форме в виде димеров, т.к., например, для изоформы 14-3-3 ζ в фосфорилированном состоянии (p14-3-3 ζ) при физиологической концентрации около 25 мкМ в условиях *in vitro* доля мономерной формы составляет 99,35% [166]. Также кажется нелогичным, что при увеличении внутриклеточной концентрации цАМФ происходит дефосфорилирование и ацетилирование 14-3-3, а не наоборот. Вызывает сомнения и утверждение, что 14-3-3 взаимодействует именно с *нефосфорилированной* формой STARD1, тогда как в большинстве описанных случаев белки 14-3-3 связывают фосфоформы белков-партнеров [153,167].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и реактивы

Холестерол и его флуоресцентные аналоги были любезно предоставлены к.х.н. Фалетровым Я.В. (лаборатория биохимии лекарственных препаратов НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь). Флуоресцентные лиганды 20NBD и 3NBD были синтезированы и очищены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), остальные лиганды были куплены в коммерческих фирмах: холестерол - Sigma-Aldrich (Сент-Луис, США), 22NBD - Molecular Probes (Юджин, США) и 25NBD - Avanti Polar Lipids (Бирмингем, США).

Холестерол и его флуоресцентные аналоги растворяли в 96% этиловом спирте до конечной концентрации лигандов 200-300 мкМ. Концентрацию лигандов определяли спектрофотометрически по поглощению при 470 нм, используя коэффициент экстинкции, равный $21\ 000\ \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Растворы лигандов хранили в темноте при $-20\ ^\circ\text{C}$.

Плазмиды *his-MBP-3C_site* (ампициллиновая устойчивость) и *his-MBP-protease_3C* (ампициллиновая устойчивость), кодирующая риновирусную 3С-протеазу, были любезно предоставлены профессором А.А. Антсоном (Лаборатория структурной биологии, Йорк, Великобритания). 3С-протеаза (аминокислотные остатки 1-182) была клонирована в вектор *his-MBP-3C_site*, в котором отсутствовал сайт узнавания для 3С-протеазы для возможности отделения His-MBP-3С-протеазы от целевого белка на второй стадии металл-аффинной хроматографии (Immobilized metal affinity chromatography, IMAC2).

Плаزمида *pQE30-STARDD1₆₂₋₂₈₅* (ампициллиновая устойчивость) была любезно предоставлена профессором Х. Босе (Медицинский факультет Университета Мерсера, Джорджия, США), плазмида *pNIC28-Bsa4-STARDD1₆₆₋₂₇₄* (ампициллиновая устойчивость) - Г. Шулером (Кафедра биохимии и биофизики Каролинского института, Стокгольм, Швеция).

Плазмида *pQE80L-STARDD3₂₁₆₋₄₄₄* (ампициллиновая устойчивость) была любезно предоставлена проф. Т. Фридрихом (Технический университет Берлина, Германия). Белок STARDD3 имел гистаг на N-конце MRGSHHHHHHGSACELG²¹⁶SDN.LGAR⁴⁴⁴.

Реактивы, используемые для приготовления буферных растворов и питательных сред, были наивысшей доступной степени чистоты. Все растворы готовили на дистиллированной воде, прошедшей дополнительную очистку на системе Barnstead (США) до 18,1-18,3 МΩ/см

(Milli-Q), и перед использованием очищали от механических примесей с помощью фильтров (MF-Millipore, 0,22 мкм MCE Membrane, Merck, Германия).

2.2. Получение рекомбинантных белков

2.2.1. Получение кодирующих конструкций *STARD1*

Для увеличения растворимости белка в бактериальной системе использовали мальтозо-связывающий белок (Maltose-Binding Protein, MBP). Ген, кодирующий фрагмент белка *STARD1* человека (соответствует аминокислотным остаткам 66-285), был амплифицирован полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с матрицы *pQE30-STARD1₆₂₋₂₈₅* с помощью праймеров *STARD1₆₆₋₂₈₅ for* (здесь и далее приводятся названия праймеров, нуклеотидный состав которых приведен в [Таблице 2](#)) и вектор-специфического праймера *pQE30 rev*, высокоточной ДНК-полимеразы *Pfu* и затем клонирован по сайтам рестрикции *BamHI* и *HindIII* в вектор *his-MBP-3C_site* по стандартному протоколу.

Точечную мутантную форму *His-MBP-3C-STARD1₆₆₋₂₈₅* с фосфоимитирующей заменой S195E (*His-MBP-3C-STARD1₆₆₋₂₈₅-S195E*) получали методом ПЦР на матрице *his-MBP-3C-STARD1₆₆₋₂₈₅* дикого типа с промежуточным этапом получения мутантного мегапраймера [168]. На первом этапе клонирования, с помощью мутагенного праймера и вектор-специфического праймера *his-MBP-3C rev* получали ПЦР-продукт (=мегапраймер S195E rev). Затем ПЦР-продукт очищали от исходной плазмиды с использованием препаративного гель-электрофореза, пропуская через 1% агарозный гель, и выделяли из агарозного геля набором для выделения (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Scientific, США) по стандартному протоколу. Второй раунд ПЦР проводили на исходной матрице с прямым вектор-специфическим праймером *his-MBP-3C for* и обратным мегапраймером S195E rev.

Генетические конструкции *his-MBP-3C-STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A* и *his-MBP-3C-STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P* были получены за одну стадию ПЦР на матрице *his-MBP-3C-STARD1₆₆₋₂₈₅* с использованием обратного *his-MBP-3C rev* и прямого *STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A for* или *STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P for* праймеров, соответственно. Полученные фрагменты были лигированы в плазмиду *his-MBP-3C-STARD1₆₆₋₂₈₅* с использованием сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции *HindIII* и *BamHI*.

Правильность полученных конструкций подтверждали секвенированием в компании Евrogen (<https://evrogen.ru>, Москва). Плазмиды нарабатывали в клетках *Escherichia coli* (*E. coli*)

штамма DH5 α , а выделяли с помощью коммерческого набора (Monarch Plasmid Miniprep Kit, New England BioLabs, США) по стандартному протоколу.

Табл. 2. Олигонуклеотиды, использованные в работе в качестве праймеров для клонирования.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
STARD1 ₆₆₋₂₈₅ for	ATATAGGATCCACTCTCTACAGTGACCAG
pQE30 rev	CATTACTGGATCTATCAACAGGAG
STARD1 ₆₆₋₂₈₅ -S195E for	CCGAGGCGAAACCTGTGTG
STARD1 ₄₆₋₂₈₅ -S56A for	ATATAGGATCCACTTGGATTAATCAAGTTAGGAGGAGGGCTT CCCTGCTGGGAAGC
STARD1 ₄₆₋₂₈₅ -S56A/L59P for	ATATAGGATCCACTTGGATTAATCAAGTTAGGAGGAGGGCTT CCCTGCCGGGAAGCAG
his-MBP-3C for	ACAACAACCTCGGGATCGAG
his-MBP-3C rev	CCCAGTCACGACGTTGTAACAACG

2.2.2. Трансформация клеток *E. coli* плазмидной ДНК

К размороженной на льду аликвоте компетентных клеток *E. coli* (50-100 мкл) добавляли 0,5 мкл плазмиды с концентрацией 150-200 нг/мкл и инкубировали 20 минут во льду. Трансформировали клетки по стандартному протоколу, включающему тепловой шок при 42 °C в течение 30 с на водяной бане и инкубацию 3 мин во льду. После этого к клеткам добавляли 900 мкл среды LB без антибиотиков и растили при 37 °C при постоянном перемешивании 1400 rpm в течение 1,5-2 часов. Затем суспензию клеток центрифугировали (5000 rpm, 5 мин), супернатант (~850 мкл) стерильно удаляли, а осадок ресуспендировали в оставшемся объеме (~50 мкл) и высевали на чашку агар/LB с необходимыми антибиотиками. Трансформанты росли в течение 16 часов при 37 °C.

2.2.3. Препаративная экспрессия и ко-экспрессия с протеинкиназой A белков STARD1

Одиночные колонии инокулировали в 20 мл среды LB и растили при 37 °C в течение ночи (около 16 часов) при максимальной аэрации. Ночные культуры пересевали в среду LB (не более 2% от конечного объема культуры) с необходимыми антибиотиками и растили при 37 °C до оптической плотности при 600 нм, равной 0,6-0,8, вне зависимости от используемого штамма. Затем добавляли индуктор экспрессии ИПТГ до конечной концентрации 0,1-1 mM.

Экспрессию his-STAR_{D1} (здесь и далее обозначение конструкций без уточнения длины фрагмента STAR_{D1} указывает на универсальность протокола для всех STAR_{D1} белков) проводили в течение 4-20 ч при 12-37 °С в штаммах M15(pREP4), BL21(DE3) и C41(DE3)-RIL или 24-72 ч при 6-10 °С в штамме ArcticExpress(DE3).

Экспрессию белков his-MBP-3C-STAR_{D1} проводили аналогичным образом при 10 °С в течение 20 ч в штамме ArcticExpress(DE3) или при 37 °С в течение 4 ч в штамме C41(DE3). Затем культуру клеток осаждали при скорости 3000 g в течение 1 часа, супернатант удаляли, осадок клеток ресуспендировали в 40 мл **буфера А** (состав этого и других используемых буферов указан в [Приложении 6](#)) и замораживали суспензию клеток при -80 °С.

Для получения фосфорилированных белков his-MBP-3C-STAR_{D1} (pSTAR_{D1}) использовали собственную отлаженную методику ко-экспрессии с каталитической субъединицей цАМФ-зависимой протеинкиназы (PKA) в клетках *E. coli* [169]. Компетентные клетки BL21(DE3)-PKA, содержащие низкокопийную плазмиду *pACYC-PKA* (хлорамфеникольная устойчивость), трансформировали по стандартному протоколу (см. Подраздел [2.2.2.](#)) плазмидой *his-MBP-3C-STAR_{D1}* и экспрессировали белки в течение 4 часов при температуре 37 °С и конечной концентрации индуктора ИПТГ 0,7-1 мМ. Осаждали клетки центрифугированием (3000 g, 1 ч) и ресуспендировали в **буфере А**. Хранили осадки при -80 °С.

2.2.4. Выделение и очистка рекомбинантных белков STAR_{D1}

Белки His-STAR_{D1} выделяли по следующему протоколу. Суспензию клеток в **буфере А** подвергали ультразвуковой обработке (ультразвуковой гомогенизатор VCX-130, Sonics & Materials (США)) и центрифугировали (при 4 °С, 1 ч, 12000 g) для отделения фрагментов клеток и нерастворимой фракции белков (фракция «осадок») от растворимых белков (фракция «супернатант»). При большой плотности клеток или низкой растворимости белка «осадок» снова ресуспендировали в **буфере А** и повторяли ультразвуковую обработку с последующим центрифугированием 2-3 раза. «Супернатант» наносили на 5 мл колонку HisTrap (GE Healthcare, США), заранее уравновешенную **буфером А**, и собирали фракцию «проскок». Затем промывали колонку 50 мл **буфера А** (10 объемов колонки) и собирали фракцию «промывки». Элюировали белок с колонки линейным градиентом имидазола (10-500 мМ), который получался в градиентаторе при постепенном смешивании **буфера А** и **буфера Б**.

Нерастворимую фракцию «осадок» тщательно ресуспендировали в 5 мл **буфера А**, дополнительно содержащего 8 М мочевины и 0,05% Triton X-100. После 6 ч интенсивного перемешивания при комнатной температуре и солубилизации нерастворимого осадка препарат центрифугировали 1 ч при 12000 g для удаления механических примесей. Прозрачный супернатант (~ 4,5 мл) со скоростью 1 капля/мин добавляли к 250 мл холодного буфера 5 мМ Трис-НСl (рН 7,5) и выдерживали 2 ч при 4 °С при постоянном перемешивании с последующим центрифугированием (20 мин при 12000 g, 4 °С). К прозрачному супернатанту добавляли β-МЭ и ФМСФ до конечных концентраций 1 мМ и 0,1 мМ, соответственно, и оставляли при 4 °С на 2 дня для возможной ренатурации белков. Перед нанесением на 5 мл колонку HisTrap, уравновешенную **буфером А**, ренатурированные белки отделяли от нерастворимых агрегатов центрифугированием (20 мин при 12000 g). Последующие этапы металл-аффинной хроматографии ренатурированного белка были аналогичны этапам очистки растворимого белка: собирали фракции «проскок» и «промывка» и элюировали линейным градиентом 20-510 мМ имидазола.

Фьюжн-белки His-MBP-3C-STAR1D1 (нефосфорилированные или ко-экспрессированные с РКА для фосфорилирования) выделяли с помощью двух последовательных стадий металл-аффинной хроматографии (Immobilized Metal Affinity Chromatography, IMAC), между которыми была стадия диализа в присутствии 3C-протеазы. Первая стадия (IMAC1) была аналогична описанной выше. По результатам ДСН-электрофореза фракции, содержавшие His-MBP-3C-STAR1D1, объединяли и диализовали против **буфера Г1** при 4 °С в течение ночи. Протеазу 3C добавляли непосредственно к белку в диализный мешок в соотношении субстрат:протеаза равном 500-1000:1. На следующий день диализат наносили на уравновешенную **буфером А** 5 мл HisTrap колонку для отделения His-MBP и His-3C-протеазы (в случае pSTAR1D1 еще и от His-РКА) от STAR1D1 и промывали 2-5 объемами колонки **буфером А**. В результате второй металл-аффинной хроматографии (IMAC2) целевой белок STAR1D1 не связывался с носителем и находился во фракции «проскок + промывка 2». Фрагмент His-MBP и His-3C-протеазу (в случае pSTAR1D1 еще и His-РКА) элюировали **буфером Б** (фракция «элюат»).

На финальной стадии очистки STAR1D1 подвергали гель-фильтрации на колонке HiLoad 26/600 Superdex 200 (GE Healthcare, США), уравновешенную **буфером Г1**, со скоростью элюции

2,6 мл/мин и собирали фракции по 1 мин. Фракции анализировали методом ДСН-электрофореза по Леммли [170]. Фракции из мономерного пика с максимальным содержанием STARD1 объединяли, концентрировали до 4-6 мг/мл, разделяли по аликвотам и хранили при -80 °С. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически с помощью Implen P330 Nanophotometer (Германия). Коэффициенты экстинкции белков приведены в [Таблице 5](#).

2.2.5. Получение препаратов 14-3-3

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* и экспрессию 14-3-3γ дикого типа проводили по стандартным методикам для рекомбинантных белков, описанным в Подразделах [2.2.2.](#) и [2.2.3.](#) Выделение и очистка 14-3-3γ были проведены по методике, разработанной ранее с участием И.С. Черника [171]. Лизат клеток с оверэкспрессированным 14-3-3γ центрифугировали 40 мин при 12000 g при 4 °С. Осадок фрагментов разрушенных клеток и нерастворимых белков отбрасывали, а к супернатанту добавляли маленькими порциями сухой сульфат аммония до степени насыщения 20% и оставляли на 30 мин при постоянном перемешивании при 4 °С. Белки, выпавшие в осадок, удаляли центрифугированием (30 мин, 12000 g). Осадок отбрасывали, к супернатанту добавляли небольшими порциями навеску сульфата аммония до конечной степени насыщения 65% и вновь инкубировали 30-40 мин при постоянном перемешивании при 4 °С. В этих условиях большая часть экспрессированного 14-3-3γ выпадала в осадок, который собирали центрифугированием (40 мин, 12000 g). Затем его ресуспендировали в минимальном объеме **буфера А** и диализовали против 10-кратного объема **буфера А** в две смены в течение ночи. На следующий день диализат центрифугировали (30 мин, 12000 g) для отделения от нерастворившегося осадка и наносили на 5 мл колонку HighTrap Q (GE Healthcare, США), уравновешенную **буфером К**. После нанесения препарата белка на колонку, ее промывали 10V **буфера К** и проводили элюцию градиентом NaCl (10-500 mM на основе **буфера К**) со скоростью 3 мл/мин. Фракции, содержащие по данным ДСН-электрофореза наибольшее количество 14-3-3γ, объединяли, концентрировали и подвергали дальнейшей очистке на гель-фильтрационной колонке Superdex 75 26/600 (GE Healthcare, США) согласно методике, описанной для STARD1 (см. Подраздел [2.2.4.](#)).

Ранее в нашей лаборатории был получен препарат мономерной формы 14-3-3 (14-3-3ζm58E) [171], а His-14-3-3ε был получен по стандартному протоколу для гистаг-содержащих белков.

Гетеродимер His-14-3-3ε/γ получали *in vitro* согласно протоколу, описанному в работе [172], основываясь на предпочтительной гетеродимеризации 14-3-3ε в присутствии других изоформ 14-3-3. Аликвоту His-14-3-3ε инкубировали с 1,5-кратным молярным избытком 14-3-3γ в течение ночи при 4 °С. Смесь белков наносили на 1 мл колонку HisTrap HP (GE Healthcare, США) и промывали **буфером А** для отделения от избытка 14-3-3γ. Элюцию гетеродимера проводили **буфером В**, содержащим 200 мМ имидазола. Финальной стадией очистки была гель-фильтрация на колонке Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, США), уравновешенной **буфером Х1**.

2.3. Исследование вторичной структуры методом кругового дихроизма

В первом приближении белковую молекулу можно рассматривать как линейную комбинацию участков, находящихся в конформациях α-спирали, β-слоя и беспорядочной структуры [173]. Из-за своей асимметричности α-спирали и β-структуры по-разному поглощают лево- (L-) и право- (R-) поляризованный свет, т.е. обладают оптической активностью. Именно это явление лежит в основе метода кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолете (УФ), который широко используется для определения содержания вторичных структур в исследуемой белке.

Каждый тип вторичных структур при длине волны λ имеет свою величину коэффициента молярного поглощения право- (ε_R) и лево- (ε_L) поляризованного света. На практике с помощью дихрографа регистрируется разность $\Delta\varepsilon_\lambda$:

$$\Delta\varepsilon_\lambda = \varepsilon_L - \varepsilon_R \text{ (моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}\text{)} \quad (1)$$

в дальнем УФ (диапазон длин волн 185-280 нм [174]), которая дальше пересчитывается в молярную эллиптичность $[\Theta_\lambda]$ по формуле:

$$[\Theta_\lambda] = 3298 \cdot \Delta\varepsilon_\lambda \text{ (град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1} \cdot \text{остаток)} \quad (2) \text{ [174].}$$

Для белков чаще используют параметр средней эллиптичности на остаток $[\Theta_\lambda]$, который равен:

$$[\Theta_\lambda] = ([\Theta_\lambda] \cdot M) / 10 \cdot C \cdot L \text{ (град} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{дмоль}^{-1}\text{)} \quad (3),$$

где $[\Theta_\lambda]$ – измеренная эллиптичность в градусах, M – средняя молекулярная масса аминокислотного остатка, C – концентрация белка в мг/мл, а L – длина оптического пути в см.

Зависимость $\Delta\varepsilon_\lambda$ или $[\Theta_\lambda]$ от длины волны λ называется спектром КД.

Вторичные структуры обладают своими характерными спектрами КД и вносят разный вклад в итоговый спектр исследуемого белка. Спектры белков, представляющие крайние возможные варианты, представлены на [Рис. 14](#). Для белков с высоким содержанием α -спиралей спектр КД имеет два минимума при 208 и 222 нм и один максимум в районе 192 нм ([Рис. 14](#), синяя кривая). Спектры β -складчатых белков обладают одним минимумом при 217 нм и одним максимумом при 195 нм ([Рис. 14](#), красная кривая). Спектр модельного 100% беспорядочного клубка имеет один минимум около 192 нм и один максимум в районе 215 нм ([Рис. 14](#), зеленая кривая) [175]. В зависимости от содержания вторичных структур и неупорядоченных участков итоговые спектры КД белков будут представлять комбинацию спектров вторичных структур. Дальнейший математический анализ полученных спектров КД с помощью различных подходов позволяет оценить доли вторичных элементов в исследуемом белке в данных условиях.

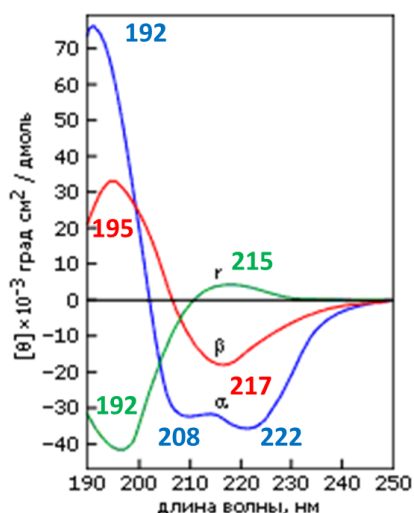


Рис. 14. Характерные спектры КД для модельных белков, состоящих из α -спиралей (α), β -складок (β) и неупорядоченного клубка (r) [175]. Максимумы пиков для каждой вторичной структуры отмечены цифрами с соответствующей цветовой кодировкой.

Для исследования вторичной структуры STARD1₆₆₋₂₈₅ и STARD3₂₁₆₋₄₄₄ методом КД препарат белка (0,3-0,6 мг/мл) диализовали в течение ночи против 15 мМ фосфатного буфера (рН 7,2), содержащего 15 мМ β -МЭ. Перед экспериментом диализат центрифугировали 10 мин при 4 °С и 12000 g, измеряли концентрацию в супернатанте по поглощению при 280 нм (коэффициенты экстинкции приведены в [Таблице 5](#)) на наноспектрофотометре P330 (Implen, Германия) и инкубировали при 20 °С в течение 5-7 мин. Спектры КД регистрировали на КД-спектрофотометре Chirascan (Applied Photophysics, Великобритания) при постоянной температуре 20 °С в диапазоне длин волн 185-280 нм с шагом 0,5-1 нм в кварцевой кювете с

длиной оптического пути 0,02 см. Для каждого белка итоговые кривые молярной эллиптичности были получены усреднением данных нескольких повторностей за вычетом спектра КД диализного буфера. После чего анализировали состав вторичных структур с помощью сервиса *DicroWeb* (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>).

2.4. Исследование триптофановой флуоресценции белков

Метод детекции собственной люминесценции белка активно применяется для исследования изменений в молекулярном окружении белковых хромофоров. Остатки тирозина, фенилаланина и, в значительно большей степени, триптофана определяют спектры поглощения и собственной флуоресценции белковых молекул. В зависимости от расположения аминокислотных остатков триптофана в белковой молекуле и его аминокислотного окружения, положение максимума спектра флуоресценции варьирует в пределах 307–353 нм [176]. Как правило, для остатков триптофана, экспонированных в водный раствор, характерно положение пика эмиссии флуоресценции в более длинноволновой области, а для экранированных остатков триптофана, наоборот, в более коротковолновой области [176].

Измерения флуоресценции остатков триптофана STARD1 проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc., Австралия) в **буфере Ф1** или **буфере Ф2** в конечном объеме 600 мкл. Пробу, содержащую 0,5-1 мкМ белка, облучали светом с длиной волны 297 нм, а излучение флуоресценции регистрировали в диапазоне 305-420 нм при напряжении 700 В и с постоянной шириной щелей монохроматоров 5 нм. Скорость регистрации флуоресценции составляла 40 нм/мин с временем усреднения 1 с.

2.5. Определение олигомерного состояния, гидродинамических параметров и конформационной подвижности белка STARD1 в растворе

2.5.1. Метод аналитической гель-фильтрации

Пробы белка STARD1 с концентрациями 0,3; 0,4; 1,5 и 2,8 мг/мл инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и затем наносили на колонку Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare), уравновешенную **буфером Г2**. Элюцию проводили со скоростью 1,5 мл/мин, регистрируя поглощение при 280 нм с помощью детектора Varian 335.

Гидродинамический радиус (радиус Стокса, R_H) и кажущуюся молекулярную массу ($MM_{каж}$) STARD1 определяли по калибровке колонки с помощью белков-стандартов с

известными $MM_{каж}$ и R_H . В качестве белков-стандартов использовали тример БСА (198 кДа), димер БСА (132 кДа), мономер БСА (66 кДа, 35 Å), овальбумин (43 кДа, 27 Å) и α -лактальбумин (15 кДа, 19 Å).

2.5.2. Метод малоуглового рентгеновского рассеяния

Метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) широко применяется для изучения гидродинамических параметров, конформационной подвижности и структуры белков в растворе. Особенность метода заключается в том, что для исследований не требуется получения кристаллов. С одной стороны, это значительно упрощает пробоподготовку и позволяет исследовать макромолекулы разных размеров, смеси олигомерных форм и т.д. С другой стороны, с помощью МУРР удается получить структуру молекулы с невысоким разрешением, поэтому данный метод не позволяет получить структурную информацию *de novo*. Однако, получаемого разрешения, которое обычно не превышает 10-20 Å, вполне достаточно для определения формы и размеров макромолекул [177]. При наличии дополнительной информации об объекте исследования, полученной с использованием других методов структурной биологии (рентгено-структурного анализа или ЯМР), на основании данных МУРР можно моделировать структурные изменения или перестройки в белках в растворе.

Физическая основа метода заключается в том, что при попадании сфокусированного пучка рентгеновских лучей с длиной волны 0,3-3,5 Å на препарат белка, частицы раствора рассеивают падающий луч. Зависимость интенсивности рассеянного света I от вектора рассеяния s , который отображает угол рассеяния θ

$$|s| = 4\pi \sin\theta / \lambda \quad (4),$$

где 2θ - угол между падающим и рассеянным лучом с длиной волны λ (нм или Å),

представляется в виде характеристической кривой в логарифмических координатах $\log(I)/\log(s)$ или $\log(I)/(s)$.

После первичной обработки экспериментальных данных с помощью программы *PRIMUS* [178] из пакета программ *ATSAS* (<http://www.embl-hamburg.de/biosaxs/software.html>), рассчитываются так называемые инварианты - молекулярная масса MM , максимальный размер D_{max} , исключенный объем частицы (или объем Порода) $P(r)$ и радиус гирации R_g . Величина D_{max} характеризует максимальное расстояние между двумя точками внутри частицы, а объем $P(r)$ - ее

максимальный объем. В отличие от гидродинамического радиуса R_H , который определяется как радиус сферической частицы, эквивалентной наблюдаемой молекуле, радиус гирации R_g рассчитывается как среднеквадратичное расстояние от центра масс до каждого массового элемента в молекуле и отражает форму и компактность молекулы.

Экспериментальную кривую МУРР для объекта обычно сравнивают с одной или несколькими теоретическими кривыми, пытаясь оценить адекватность предполагаемых моделей, описывающих структуру объекта, с помощью статистических критериев.

Для наиболее корректных интерпретаций, часто непосредственно перед детекцией рассеяния рентгеновских лучей исследуемый образец подвергают гель-фильтрации с целью отделить нежелательные примеси агрегатов или олигомеров от целевой фракции биомакромолекулы, структурные свойства которой исследуют.

Данные МУРР для STARD1 и STARD3 регистрировали на синхротронной станции EMBL P12 (PETRA III, DESY Гамбург, Германия). Образцы (75-100 мкл) исследуемых белков STARD1 или STARD3 с концентрациями 10 мг/мл и 8 мг/мл, соответственно, наносили на колонку Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, США) преуравновешенную **буфером Г2**. При скорости элюции 0,5 мл/мин мономеры белков успешно отделялись от их агрегатов и олигомеров. Интенсивность рассеяния рентгеновских лучей I от вектора рассеяния s регистрировали на протяжении всего профиля элюции, однако далее анализировали только данные для мономерной фракции белков. Так как исследуемые белки находятся в буферном растворе, частицы которого также дают рассеяние, для буфера без белков также были получены зависимости $I(s)$.

Первичную обработку экспериментальных данных и расчет гидродинамических параметров на линейном участке Гинье - интенсивность рассеяния $I(0)$, экстраполированная в нулевой угол, и радиус гирации R_g - производили в программе *PRIMUS* [178].

Из кривых рассеяния для каждого образца вычитали рассеяние буфера, нормализовали на концентрацию и усредняли, в результате чего получались по одной кривой МУРР вида $\log I_{exp}(s)$ для каждого белка. Путем экстраполяции в нулевой угол $s = 0$ получали значение интенсивности светорассеяния $I(0)$. Радиус гирации R_g рассчитывали с использованием приближения:

$$I_{exp}(s) \approx I(0) * \exp\left(-\frac{s^2 R_g^2}{3}\right) \quad (5),$$

где $I(0)$ - интенсивность рассеяния при нулевом угле в отн.ед., s - вектор рассеяния (\AA^{-1}).

Объем корреляции (Volume-of-correlation, V_C) - параметр, позволяющий оценить молекулярную массу (MM) не только для компактных молекул, но и для гибких систем [179] - определяли как отношение:

$$V_C = \frac{I(0)}{\int_0^{0,3} s * I(s)} \quad (6),$$

где $I(0)$ - интенсивность рассеянного света I при нулевом угле, а интеграл $\int_0^{0,3} s * I(s)$ - общая интенсивность рассеяния в диапазоне s от 0 до $0,3 \text{\AA}^{-1}$.

Полученные значения V_C использовали для расчета MM , используя эмпирическую формулу:

$$MM = \frac{V_c^2}{R_g * 0,1231} \quad (7).$$

Анализ компактности и гибкости системы проводили с помощью безразмерного графика Кратки в координатах $s^2 * R_g^2 * I(s) / I(0)$ от $s * R_g$, где значения R_g и $I(0)$ были определены с использованием приближения Гинье.

Для глобулярных частиц с однородной плотностью рассчитывают объем Порода (Pogod volume, $P(r)$) - исключенный объем гидратированной частицы (нм^3), который обратно пропорционален площади под графиком Кратки. Для глобулярных белков $P(r)$ (нм^3) примерно в 1,6 раз больше MM , выраженной в кДа.

Обратная задача, заключающаяся в получении трехмерной структуры из одномерных данных МУРР, получила свое развитие благодаря разработке подхода *ab initio*. Суть данного метода в том, что из сферы, заполненной конечным количеством шариков с заданным диаметром, поочередно удаляются шарики до тех пор, пока полученная модель не будет давать теоретическую кривую рассеяния, максимально напоминающую экспериментальную кривую. Такой подход применим, если верно допущение, что белковая молекула не претерпевает

конформационных изменений. Ввиду вырожденности такого решения, операцию повторяют много раз, пытаясь найти средние общие параметры формы получаемых структурных моделей.

Для белка STARD1 двадцать независимых *DAMMIF* моделей были созданы на основе кривой рассеяния ($s \leq 0,3 \text{ \AA}^{-1}$), а затем сглажены и усреднены в программе *DAMAVER* [180]. Расчет теоретических кривых МУПП и сопоставление их с экспериментальными кривыми были произведены в *CRY SOL* [181]. Для моделирования кристаллическая структура STARD1 (PDB *3POL*) была дополнена недостающими остатками Ω_1 -петли, С-концевыми остатками 277-284, GPGS-остатками, присутствующими на N-конце рекомбинантного белка, также была внесена замена S195E. Эти операции были произведены с использованием *Coot* [182] и *i-Tasser* [101]. Для имитации динамики Ω_1 -петли были также получены структурные модели с различным ее положением, и проведен анализ точности аппроксимации экспериментальной кривой МУПП для каждой из полученных моделей в программе *CRY SOL* [181].

Для количественного описания гибких систем использовали подход *Ensemble Optimization Method (EOM)* [183]. Процедура *EOM* заключается в том, что создается большая популяция всех возможных конформаций белка, которая затем с помощью генетического алгоритма сокращается до минимального набора тех конформаций, которые наиболее оптимально описывают экспериментальные данные в совокупности.

В случае STARD3 моделирование проводили в программе *CORAL* [184] на основе кристаллической структуры STARD3 (PDB *5I9J*), дополненной длинным N-концевым пептидом, который присутствовал в конструкции. С помощью программы *CRY SOL* [181] были рассчитаны теоретические кривые рассеяния на основе моделей с различными конформациями N-концевого пептида и произведено сопоставление их с экспериментальной кривой МУПП.

2.6. Исследование функциональных свойств белка STARD1

2.6.1. Взаимодействие STARD1 с флуоресцентными аналогами холестерина

Природный лиганд белка STARD1 - холестерол - спектрально неактивная молекула с низкой растворимостью в водных растворах. Значительно удобнее использовать радиоактивно меченный [^3H]-холестерол [8] или его синтетический аналог с флуоресцентной NBD-группой [62,185]. Флуоресцентный метод детекции стал по праву популярным, т.к. флуоресцентный аналог холестерина имеет ряд неоспоримых преимуществ. Во-первых, флуоресцентный метод

менее трудоемкий и энергозатратный, во-вторых, не подразумевает взаимодействия исследователя с радиацией. В-третьих, флуоресцентные аналоги коммерчески доступны, разнообразны и относительно легко синтезируются. В-четвертых, концентрация мицеллообразования NBD-холестерола ($6,56 \cdot 10^{-7}$ М) ощутимо выше, чем у холестерола ($3,14 \cdot 10^{-8}$ М) [186], что позволяет использовать более высокие концентрации в экспериментах. В-пятых, NBD-группа обладает сольватохромным эффектом, который позволяет использовать NBD-холестерол для отслеживания образования комплекса лиганда с белком. Другими словами, при попадании в гидрофобное окружение квантовый выход флуоресценции NBD-группы увеличивается, при этом наблюдается сдвиг максимума эмиссии флуоресценции в коротковолновую область.

2.6.1.1. Метод стационарной флуориметрии

Спектры флуоресценции NBD-лигандов. Флуоресценцию NBD-группы измеряли с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian Inc., Австралия) при температуре 37 °С. К пробе объемом 600 мкл, содержащей 1 мкМ STARD1 в **буфере Ф1**, добавляли небольшие количества NBD-лигандов (0,2-0,9 мкл, стоковая концентрация NBD-лигандов 200-300 мкМ) и инкубировали 5 мин при 37 °С. Флуоресценцию NBD-группы возбуждали светом с длиной волны 460 нм, а регистрировали в диапазоне 475-650 нм при напряжении 700 В и шириной щелей монохроматоров 5 нм. Запись спектров проводили при скорости 40 нм/мин, с временем накопления сигнала 1 с. Для каждого лиганда спектры прописывали не менее 5 раз и корректировали спектр флуоресценции NBD-лиганда в присутствии белка на спектр свободного лиганда.

Кривые титрования STARD1 и их математическая обработка. В кюветы, содержащие только буфер **Ф1** или 1 мкМ белка STARD1, вносили одинаковое количество (0,2-0,9 мкл, стоковая концентрация NBD-лигандов 200-300 мкМ) флуоресцентного лиганда и регистрировали флуоресцентный отклик после каждой добавки. В конце титрования конечная концентрация лиганда в пробах не превышала 4 мкМ, а конечная концентрация этанола составляла не более 1% от объема проб. Возбуждали флуоресценцию NBD-группы при $\lambda_{ex} = 460$ нм, а регистрировали излучение флуоресценции при $\lambda_{em} = 535$ нм при напряжении 700 В и ширине щелей монохроматоров 5 нм.

Для полученных кривых из значения флуоресценции NBD-группы в комплексе со STARD1 при концентрации лиганда x вычитали флуоресценцию свободного лиганда при той же концентрации и строили зависимость интенсивности флуоресценции NBD-группы от концентрации лиганда в пробе. Кривые зависимости обрабатывали уравнением:

$$F(x) = F_{max} * \left(\left(\frac{N+x+K_D}{2N} \right) - \sqrt{\left(\frac{N+x+K_D}{2N} \right)^2 - \frac{x}{N}} \right) \quad (8),$$

где F_{max} - максимальная флуоресценция при насыщении (у.е.), N – концентрация сайтов связывания (мкМ), K_D – кажущаяся константа диссоциации (мкМ), x - концентрация лиганда (мкМ), $F(x)$ - флуоресцентный отклик при концентрации лиганда, равной x (у.е.).

Все расчеты и построение кривых производили в программе *OriginPro 9.0*. В результате обработки кривых титрования получали значение кажущейся константы диссоциации (K_D , мкМ) и стехиометрию комплекса лиганд/белок, рассчитанную из отношения значения концентрации сайтов связывания N (мкМ) к фиксированной концентрации белка (мкМ).

Влияние NBD-лигандов на термостабильность STARD1. При повышении температуры происходит дестабилизация белка, нарушается его нативная структура, и, как следствие, могут измениться спектральные свойства белка, такие как параметры триптофановой флуоресценции. В то же время, взаимодействия белков со своими лигандами или белками-партнерами увеличивает количество связей, что, как правило, отражается в повышении устойчивости белка к нагреванию. Для определения термостабильности белка мы регистрировали изменение интенсивности флуоресценции остатков триптофана при равномерном нагревании белка в присутствии лигандов или без них.

Образцы белка STARD1 растворяли в **буфере Н** до конечной концентрации 1 мкМ, затем добавляли 2-х кратный молярный избыток лигандов (20NBD, 3NBD) или смесь 20NBD:3NBD (в их молярном соотношении 2:5) и инкубировали 10 мин при температуре 10 °С. Триптофановую флуоресценцию образцов возбуждали светом с длиной волны 297 нм и регистрировали при 346 нм (ширина щелей монохроматоров 5 нм) и напряжении 700 В. Образцы равномерно нагревали от 10 до 60 °С со скоростью 1 °С/мин. Одновременно регистрировали изменение флуоресценции NBD-группы ($\lambda_{ex} = 460$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм) и увеличение светорассеяния при нагревании ($\lambda_{ex} = 350$ нм, $\lambda_{em} = 355$ нм). Все эксперименты по изучению температурных

зависимостей параметров флуоресценции проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc., Австралия), снабженном контролируемой 4-х ячеечной термоприставкой Пельтье.

Полученные кривые температурных зависимостей интенсивности собственной флуоресценции STARD1 анализировали по методу, предложенному Т.Л. Бушуевой [187], с некоторыми допущениями. Линейные участки до и после теплового перехода аппроксимировали прямой линией и строили зависимость так называемого параметра завершенности перехода α (доли единицы) от температуры ($^{\circ}\text{C}$), рассчитанного по следующей формуле:

$$\alpha = \frac{I_{346} - I_{346 \text{ нативный}}}{I_{346 \text{ денатурированный}} - I_{346 \text{ нативный}}} \quad (9),$$

где I_{346} - экспериментальное значение интенсивности флуоресценции, зарегистрированное при длине волны равной 346 нм и температуре T , а $I_{346 \text{ нативный}}$ и $I_{346 \text{ денатурированный}}$ - значения, полученные после аппроксимаций прямыми линиями линейных участков зависимости интенсивности собственной флуоресценции STARD1 до и после теплового перехода при температуре T , соответственно.

Полученные кривые обрабатывали уравнением Больцмана в программе *OriginPro 9.0*. и определяли температуру полуперехода $T_{0,5}$, которая соответствует 50% завершенности теплового перехода и является мерой термостабильности белка.

2.6.1.2. Метод время-разрешенной флуориметрии

Измерение времен жизни флуоресценции NBD-группы. Временем жизни возбужденного состояния называется время, необходимое для уменьшения начального сигнала флуоресценции в e раз [176]. Величина времени жизни флуоресценции зависит от доступности флуорофора для молекул-тушителей. Если флуорофор экспонирован в водный раствор, то молекулы растворителя за счет соударений быстро тушат флуоресценцию. Если при связывании с белком флуоресцентная группа лиганда попадает в полость или карман и оказывается защищенной от молекул растворителя, время жизни ее флуоресценции увеличивается. Другими словами, измерение времен жизни флуоресценции позволяет отслеживать изменения в молекулярном окружении флуорофора.

Кинетику флуоресценции NBD-группы измеряли с помощью счетчика одиночных фотонов с корреляцией по времени и длине волны на основе модуля SPC-150 и детектора HMP-100-50 (Becker & Hickl GmbH, Германия) на кафедре биофизики биологического факультета МГУ. Постоянную температуру пробы (25 °С) или, при необходимости, ее равномерное (1 °С/мин) нагревание (25-70 °С) обеспечивали с помощью кюветного держателя Qrod 2e с функцией нагрева (Quantum Northwest, США).

Флуоресценцию лигандов 20NBD или 3NBD (по 1,4 мкМ) в **буфере Ф1** (100 мкл) до и после добавления 2 мкМ белка STARD1 возбуждали короткими (30 пс) лазерными вспышками с длиной волны 450 нм и регистрировали интенсивность флуоресценции во времени. Все эксперименты повторяли не менее пяти раз.

Кривые затухания флуоресценции аппроксимировали суммой экспоненциальных функций затухания. Для сравнения различных кривых затухания рассчитывали среднее время затухания τ_{av} по выражению:

$$\tau_{av} = \sum n_i \tau_i a_i \quad (10),$$

где τ_i и a_i - время жизни и амплитуда (нормированная на единицу: $n_i a_i = 1$) i -й компоненты затухания флуоресценции. Все расчеты проводились с использованием программы *OriginPro 9.0*.

Автор глубоко благодарна д.б.н. Е.Г. Максимова за помощь в проведении экспериментов с использованием время-разрешенной флуориметрии.

2.6.1.3. Моделирование ориентации холестерина и NBD-лигандов в полости STARD1

Молекулярный докинг - метод моделирования, позволяющий среди набора возможных конформаций лиганда в полости рецептора выделить те положения, которые обладают минимальной энергией при связывании. При этом для каждой конформации в процессе моделирования рассчитывается так называемая оценочная функция, которая зависит от множества параметров, описывающих систему. Поскольку существующие программы не учитывают все параметры и имеют свои ограничения, моделирование комплексов часто проводят с использованием нескольких программ с разными оценочными функциями, а результаты затем сравнивают.

Моделирование комплексов мы проводили с использованием программ *FlexAID* [188] и *Autodock 4.2* [189] на основе единственной имеющейся кристаллической структуры STARD1 (PDB *3POL*) [100]. Программы были выбраны таким образом, что в каждой из них учитывались различные параметры при моделировании положения лиганда.

Программа *FlexAID* [188] отбирает наиболее вероятные конформации лиганда в полости белка, допуская гибкость боковых остатков аминокислот и разрешенную химической структурой пластичность лигандов, но не учитывая электростатические взаимодействия. Определение потенциального сайта связывания было выполнено с использованием инструмента *GetCleft* из плагина *NRGsuite* для программы *PuMol* (минимальный заданный радиус - 1,6 Å, объем полости для размещения лиганда - 450 Å³) с добавлением атомов водорода и сохранением гибкости у участвующих в связывании холестерина остатков белка. В ходе моделирования использовались генетический алгоритм с генерацией 1000 "хромосом" и 1000 "поколений" и общая функция корреляции, остальные параметры задавались по умолчанию.

Программа *AutoDock* [189] учитывает электростатические взаимодействия, однако не учитывает подвижность боковых цепей аминокислотных остатков белка и атомов лиганда (за исключением вращения вокруг одинарных связей в составе лиганда, которое можно учитывать или не учитывать). Парциальные заряды атомов были рассчитаны по методу Гастайгера в программе *AutoDockTools*. Пространство для докинга определяли как куб с размерами 60×60×60 Å³, в окрестности геометрического центра белка. Лиганды были созданы и подготовлены для докинга с использованием программы *HyperChem 7.01 (Hypercube)*. Для расчетов жесткого докинга применялся генетический алгоритм Ламарка с параметрами по умолчанию. Значения энергии для комплексов рассчитывались автоматически программой *Autodock* [189].

2.6.2. Взаимодействие STARD1 с белками семейства 14-3-3

2.6.2.1. Аналитическая гель-фильтрация

За взаимодействием белков 14-3-3 с разными вариантами STARD1 следили с помощью метода аналитической гель-фильтрации с использованием хроматографической системы *Varian ProStar 335/ProStar 363* (Varian Inc., Австралия). Пробы, содержащие изолированные белки STARD1 и 14-3-3 или их смесь, готовили из концентрированных растворов соответствующих белков, инкубировали в течение 5-10 мин при комнатной температуре и наносили на колонку

Superdex 200 Increase 5/150 или Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, США) - в зависимости от объема образца и необходимости сбора фракций в ходе элюции. Размер колонки и скорость элюции указаны в каждом конкретном случае. Элюцию проводили со скоростью 0,1 мл/мин или 1,5 мл/мин. Профили элюции регистрировали при длине волны 280 (или 298 нм во избежание заскала). Гель-фильтрационные колонки были уравновешены **буфером X2**. Калибровку проводили по белкам-стандартам, кажущиеся молекулярные массы которых указаны в скобках: БСА тример (198 кДа), БСА димер (132 кДа), БСА мономер (66 кДа), овальбумин (43 кДа) и α -лактальбумин (15 кДа).

2.6.2.2. Метод поверхностного плазмонного резонанса

Изучение кинетики взаимодействия pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P с гомодимером His-14-3-3 ϵ или гетеродимером с His-14-3-3 ϵ/γ и оценку констант взаимодействия проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием проточной сенсорной системы «Biacore X» (Pharmacia Biosensor AB, Швеция) (Лаборатория иммунобиохимии, институт биохимии имени А.Н. Баха). В системе имеется две ячейки, одну из которых использовали в качестве аналитической ячейки, а вторую - в качестве ячейки сравнения. На поверхность сенсорного чипа был нанесен NTA - карбоксиметилированный декстрановый матрикс, предварительно иммобилизованный с нитрилоуксусной кислотой для захвата молекул, несущих полигистидиновую метку. В качестве "рецептора" использовали 14-3-3, иммобилизованный за гистаг на поверхности сенсорного чипа, модифицированного NTA. Для этого 80 мкл белков His-14-3-3 ϵ или His-14-3-3 ϵ/γ с концентрацией 1 мг/мл в **буфере С** пропускали через аналитическую ячейку со скоростью 10 мкл/мин, ячейка сравнения оставалась закрытой. В качестве лиганда использовали STARD1₄₆₋₂₈₅, не содержащий гистаг, который пропускали через обе ячейки и регистрировали кинетику взаимодействия при разных концентрациях $C_1, C_2 \dots C_i$, считая, что концентрация иммобилизованного 14-3-3 не изменялась.

Обработку и анализ данных проводили с использованием программ *BIAevaluation* (Biacore) и *OriginPro 9.0*.

Константу связывания (K_A) рассчитывали в приближении равновесных условий по формуле:

$$R_{eq} = \frac{K_A * C * R_{max}}{1 + K_A * C} \quad (11),$$

где K_A – равновесная константа связывания, C – концентрация добавляемого белка, R_{eq} – разность сигналов в аналитической ячейке и ячейке сравнения при данной концентрации белка, R_{max} – предельный уровень связывания.

В координатах Скетчарда ($1/R_{eq}$ от $1/C$) зависимость (11) приобретает линейный вид:

$$\frac{1}{R_{eq}} = \frac{1}{K_A * C * R_{max}} + \frac{1}{R_{max}} \quad (12).$$

Точка пересечения прямой с осью ординат дает величину $1/R_{max}$, а тангенс наклона линеаризованной зависимости – $1/(K_A * R_{max})$, откуда получается значение K_A .

Константу скорости диссоциации (k_d) рассчитывали в приближении необратимой реакции, т.к. продукты диссоциации вымываются из реакционной среды потоком жидкости, и реакция фактически приобретает необратимый характер. Модель диссоциации комплексов была рассчитана в программе *BIAevaluation (Biacore)* по формуле:

$$R = R_0 * \exp(-k_d(t-t_0)) + Offset \quad (13),$$

где R – это значение сигнала в момент времени t , k_d – кинетическая константа диссоциации, $Offset$ – это уровень сигнала в начальный момент времени t_0 .

Из значений R и R_0 , полученных из анализа участка диссоциации на сенсограммах, находили значение k_d . Учитывая соотношения $K_A = 1/K_D = k_a/k_d$, находили значения кинетической константы ассоциации (k_a) и равновесной константы диссоциации (K_D).

Автор глубоко благодарна к.х.н. Д. В. Сотникову за помощь в проведении исследований с помощью метода ППР.

2.6.2.3. Анизотропия флуоресценции NBD-группы

Анизотропия флуоресценции — физическое явление, заключающееся в различной интенсивности света, испускаемого флуорофором, вдоль разных осей поляризации. Суть явления в том, что флуорофоры поглощают фотоны, электронные вектора которых ориентированы параллельно моментам перехода флуорофора. Свободные низкомолекулярные флуорофоры ориентированы в растворе случайным образом и имеют высокую скорость изменения ориентации в пространстве (т.е. быстро вращаются). Поэтому после поглощения плоскополяризованного кванта света молекула успеет быстрее изменить свою ориентацию, чем

испустит свет. В результате этого, параллельно поляризованная составляющая интенсивности излучения убывает (в том же направлении, что был поляризован падающий луч), а перпендикулярно поляризованная составляющая возрастает. При максимальной деполяризации флуоресценции значения анизотропии r минимальные. Интенсивность изменения анизотропии r не может быть измерена непосредственно и определяется отношением разности параллельно ($I_{||}$) и перпендикулярно (I_{\perp}) поляризованных компонентов к общей интенсивности флуоресценции испущенного света, возбужденной плоско-поляризованным светом по формуле:

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad (14).$$

При связывании низкомолекулярного флуорофора с макромолекулой скорость вращения уменьшается, т.к. время корреляции θ (для вращения сферического белка), определяющее вращательную диффузию молекулы, зависит от массы по уравнению Перрена:

$$\theta = \frac{\eta^* MM}{R^* T} (\nu + h) \quad (15),$$

где η - вязкость растворителя, MM - молекулярная масса белка, R - 8,314 Н*м/(моль*К), T - температура (К) ν и h - удельный объем белка и степень его гидратации (оба в мл/г), соответственно.

Для расчетов вязкость воды η была принята равной 0,9 сП (при 298 К), удельный объем белка и степень гидратации h - 0,73 и 0,4 мл/г, соответственно.

С помощью время-разрешенной флуориметрии можно рассчитать скорость затухания анизотропии $r(t)$ флуоресценции NBD-группы. Затухание анизотропии флуоресценции является результатом сферического вращения макромолекулы с течением времени t , и чем быстрее вращается молекула, тем быстрее значение анизотропии уменьшается. Другими словами, при вращении флуорофора параллельно поляризованная составляющая ($I(t)_{||}$) интенсивности излучения уменьшается, а перпендикулярно поляризованная составляющая ($I(t)_{\perp}$), наоборот, возрастает.

Кривые затухания флуоресценции NBD-лиганда в свободном состоянии или в комплексе с pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P и pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P/14-3-3 γ получали с помощью измерительного комплекса на основе системы счета одиночных фотонов с модулем SPC-130EM (Becker & Hickl GmbH, Германия). Флуоресценцию регистрировали с использованием

охлаждаемого сверхбыстрого счетчика-детектора фотонов (HPM-100-07C; Becker & Hickl GmbH, Германия) с низкой скоростью счета в темноте (~ 10 отсчетов/с), соединенного с монохроматором (ML-44; Solar Laser Systems, Беларусь). Возбуждение флуоресценции производили светодиодным лазером с длиной волны 455 нм (InTop, Санкт-Петербург, Россия) с частотой импульсов до 50 МГц. Для блокировки возбуждающего света использовали longpass-фильтр на 500 нм (Thorlabs, США).

Кинетику анизотропии флуоресценции регистрировали с помощью системы на основе фильтров с набором из двух сверхширокополосных проволочно-сеточных поляризаторов WP25M-UB (Thorlabs, США), установленных в моторизованные поворотные опоры K10CR1/M (Thorlabs, США). Кинетику затухания флуоресценции $I(t)$ измеряли при параллельной и перпендикулярной ориентации поляризатора возбуждающего света, после чего рассчитывали анизотропию $r(t)$ по формуле:

$$r(t) = \frac{I(t)_{\parallel} - I(t)_{\perp}}{I(t)_{\parallel} + 2I(t)_{\perp}} \quad (16).$$

Сначала регистрировали анизотропию флуоресценции для 1 мкМ свободного лиганда 22NBD в **буфере М**, затем - после добавления 10-кратного молярного избытка (10 мкМ) STARD1 (двойной комплекс) и, далее, после добавления 100-кратного молярного избытка (100 мкМ) 14-3-3 (тройной комплекс).

Температуру образца стабилизировали при 25 °С с помощью контролируемого Пельтье кюветодержателя Qpod 2e (Quantum Northwest, США). Анализ флуоресценции и кривые затухания анизотропии были получены с помощью *SPCIMAGE* (Becker & Hickl GmbH, Германия) и программы *OriginPro 9.0*. с использованием формулы (10). Эксперименты были выполнены не менее трех раз, представлены наиболее типичные результаты.

2.7. Электрофоретические методы

2.7.1. Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Леммли

Состав проб анализировали в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии ДСН по методу Леммли [170]. Разделение белков проводили в 15% полиакриламидном геле при постоянном напряжении 200 В в течение 50 мин. Составы растворов для полимеризации гелей

приведены в [Таблице 3](#). Перед внесением в гель пробы смешивали с 4-х кратным буфером для образцов, содержащим 250 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 40% глицерол, 0,05% бромфеноловый синий, 8% ДСН, и инкубировали при 90 °С в течение 5-10 мин. На дорожку наносили 1-3 мкг белка. Анодный буфер содержал 192 мМ глицин-Трис, рН 8,6, катодный буфер получали путем добавления к анодному буферу ДСН до конечной концентрации 0,1%.

После окончания электрофореза гель окрашивали раствором Кумасси G-250 (0,3% Кумасси G-250 на 40% изопропанол и 10% уксусной кислоте). Избыток красителя отмывали в кипящей дистиллированной воде в присутствии уксусной кислоты.

Табл. 3. Состав растворов для полимеризации 1 пластины ПААГ.

Компоненты геля	Разделяющий гель (15% полиакриламида)	Концентрирующий гель (5% полиакриламида)
Раствор акриламида (30% акриламид, 0,8% МБА), мл	2,50	0,33
Буфер разделяющего геля (1,5 М Трис-НСl, рН 8,8, 0,4% ДСН), мл	2,40	-
Буфер концентрирующего геля (0,5 М Трис-НСl, рН 6,8, 0,4% ДСН), мл	-	0,20
Вода, мл	1,20	1,43
Персульфат аммония, мг	4,5	3,0
ТЕМЕД, мкл	4,0	3,0
Конечный объем, мл	6,0	1,96

2.7.2. Электрофорез белков в нативных условиях по методу Перье-Пэрри

Зависимость подвижности белков не только от их молекулярной массы, но и от их заряда исследовали методом электрофореза в нативных условиях в присутствии мочевины, разработанным Перье и Пэрри [190]. Добавление мочевины приводит к нивелированию эффекта от формы белков, и разделение происходит только в зависимости от молекулярной массы и заряда молекул. К пробам, содержащим исследуемый белок, добавляли 2х-кратный буфер для образцов (2 мМ Трис-глицин, рН 8,6, 8 М мочевины, 5% β -МЭ, 0,05% бромфеноловый синий) в соотношении 1:1, соответственно, и инкубировали 7 мин при комнатной температуре. В дорожку вносили до 10 мкл, чтобы избежать размытости полос. Состав раствора для геля приведен в [Таблице 4](#). Электрофорез проводили в течение 90 минут при постоянной силе тока 8 мА. После завершения электрофореза гель окрашивали, как и при ДСН-электрофорезе.

Табл. 4. Состав раствора для полимеризации 1 пластины ПААГ.

Компоненты геля (10% АА)	Объем/навеска
Раствор акриламида (30% акриламид, 1,6% МБА), мл	1,7
12-кратный электродный буфер (240 мМ Трис-глицин, рН 8,6), мл	0,41
Мочевина, г	2,4
Персульфат аммония, мкг	3
ДМАПН, мкл	25
Вода	до 5 мл
Конечный объем, мл	5

2.8. Спектрофотометрическое определение концентрации белков

Поглощение полученных белков измеряли на спектрофотометре NanoPhotometer N80 (Implen, Германия) при 280 нм. Концентрации рассчитывали из уравнения Бугера-Ламберта-Бера:

$$A_{280} = \varepsilon * C * l \quad (17),$$

где A_{280} – поглощение; ε – коэффициент экстинкции, мл/(см*мг); l – длина оптического пути, см; C – концентрация, мг/мл.

Коэффициенты экстинкции белков (Таблица 5) и значение pI рассчитывали по аминокислотной последовательности в *ExpASy ProtParam tool* (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Табл. 5. Некоторые характеристики белков, используемых в работе.

Название белка	Uniprot ID	ММ, кДа	ε , М ⁻¹ *см ⁻¹	ε , мл/(мг*см)	pI
STARD1 ₆₆₋₂₈₅	P49675	24,6	26470	1,08	6,51
STARD1 ₆₆₋₂₈₅ -S195E	-"-	24,6	26470	1,08	6,22
STARD1 ₄₆₋₂₈₅ -S56A	-"-	26,9	31970	1,19	7,67
STARD1 ₄₆₋₂₈₅ -S56A/ L59P	-"-	26,9	31970	1,19	7,67
STARD3 ₂₁₆₋₄₄₄	Q14849	26,0	28420	1,10	8,41
14-3-3ε ΔC ₁₋₂₃₁	P62258	26,5	28880	1,09	4,92
14-3-3γ wt	P61981	28,3	31860	1,13	4,80

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка метода получения белка STARD1 в бактериальной системе

К началу данной работы существовала проблема с получением и выделением белка STARD1 в бактериальной системе. Рекомбинантный STARD1 обладает повышенной склонностью к агрегации и формирует в бактериях тельца включения. Эффективность выделения растворимого белка из цитоплазмы крайне низка, и для увеличения выхода очищенного белка ранее традиционно использовали методику его выделения с помощью денатурации 8 М мочевиной [7]. Так как такой протокол включает циклы денатурации/ренатурации белка, возникает проблема неправильного сворачивания части белковых молекул во время рефолдинга. Помимо того, что после стадии рефолдинга трудно отделить *правильно* ренатурированный белок от продуктов *неправильного* фолдинга, к очевидным недостаткам этой методики можно также отнести высокую трудоемкость и длительность стадий очистки.

Так как для решения поставленных задач нам были необходимы большие количества правильно свернутого белка, а стандартная методика выделения STARD1 обладала существенными недостатками, мы решили модифицировать методику получения STARD1 в бактериях.

Причина формирования телец включения при экспрессии рекомбинантных белков остается понятной не до конца, однако замечено, что уменьшение скорости роста бактерий и скорости синтеза белков приводит к повышению доли растворимого цитоплазматического белка. Обычно при подборе условий для улучшения экспрессии белков, экспрессируемых под индуцируемым промотором, варьируют время и температуру экспрессии, концентрацию индуктора и экспрессионные штаммы [191].

Мы начали с того, что, изменяя разные параметры и их сочетание, оценили экспрессию STARD1 с генетических конструкций, любезно предоставленных нам Г. Шулером и профессором Х. Босе. Клетки *E. coli* штаммов BL21(DE3) или C41(DE3)-RIL трансформировали плазмидой *pNIC28-Bsa4-STARD1*₆₆₋₂₇₄, а клетки штамма M15(pREP4) - плазмидой *pQE30-STARD1*₆₂₋₂₈₅. Оказалось, что вне зависимости от используемой плазмиды или выбранного штамма, белок с кажущейся молекулярной массой около 25 кДа находился в нерастворимой фракции (Рис. 15, "осадок"). Изменение концентраций ИПТГ (0,1–1 мМ),

длительности (4-20 ч) и температуры (12-37 °С) экспрессии не привели к повышению растворимости белка в штаммах BL21(DE3) и C41(DE3)-RIL ([Рис. 15А](#)).

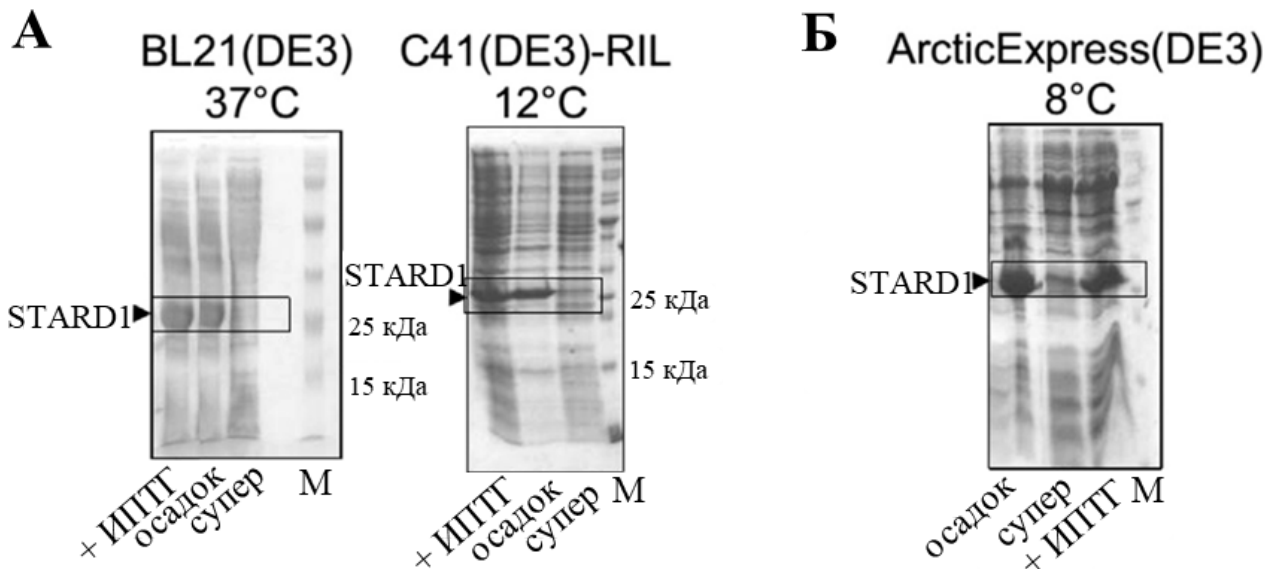


Рис. 15. Анализ экспрессии STARD1 в клетках *E. coli* штаммов BL21(DE3) и C41(DE3)-RIL при 37 и 12 °С (А) и штамма ArcticExpress(DE3) при 8 °С (Б). М - маркеры молекулярных масс, "+ИПТГ" - лизат клеток после индукции ИПТГ, "осадок" и "супер" - нерастворимая и растворимая фракции белков после ультразвуковой обработки клеток, соответственно.

Существенным недостатком экспрессии при пониженной температуре в штаммах BL21(DE3) или C41(DE3)-RIL является то, что в таких условиях (12-15 °С) активность эндогенного шаперонного комплекса GroEL/ES *E. coli* значительно падает, а вероятность нарушений в нативной укладке рекомбинантного белка, соответственно, возрастает [192]. Для наработки белка при пониженных температурах лучше использовать специальный холодадаптированный штамм *E. coli*, например, ArcticExpress(DE3), конститутивно экспрессирующий шаперонины Срп60 и Срп10 бактерии *Oleispira antarctica*, которые активны при низких температурах (максимальная активность Срп60/Срп10 достигается при 0-12 °С) [192]. Предполагается, что ко-экспрессия целевого белка с активными белками-шаперонинами Срп60/Срп10 может способствовать правильному сворачиванию полипептидной цепи и тем самым увеличивать долю растворимого белка.

Действительно, при экспрессии белка в штамме ArcticExpress(DE3) мы наблюдали некоторое улучшение растворимости STARD1, тем не менее, большая часть белка все же находилась в нерастворимой форме ([Рис. 15Б](#), "осадок"). Очистка того небольшого количества

STARD1 из растворимой фракции (Рис. 15Б, "супер") была сопряжена с новыми трудностями, связанными с со-очищением шаперонина Crp60 с His-STARD1 при проведении никель-аффинной хроматографии (Рис. 16А). Параллельное выделение из телец включения и очистка белка с использованием 8 М мочевины для денатурации и нанесение на никель-аффинную хроматографию ренатурированного белка были более успешными, однако значительная часть белка оказалась в не связавшейся с носителем фракции (Рис. 16Б, "проскок").

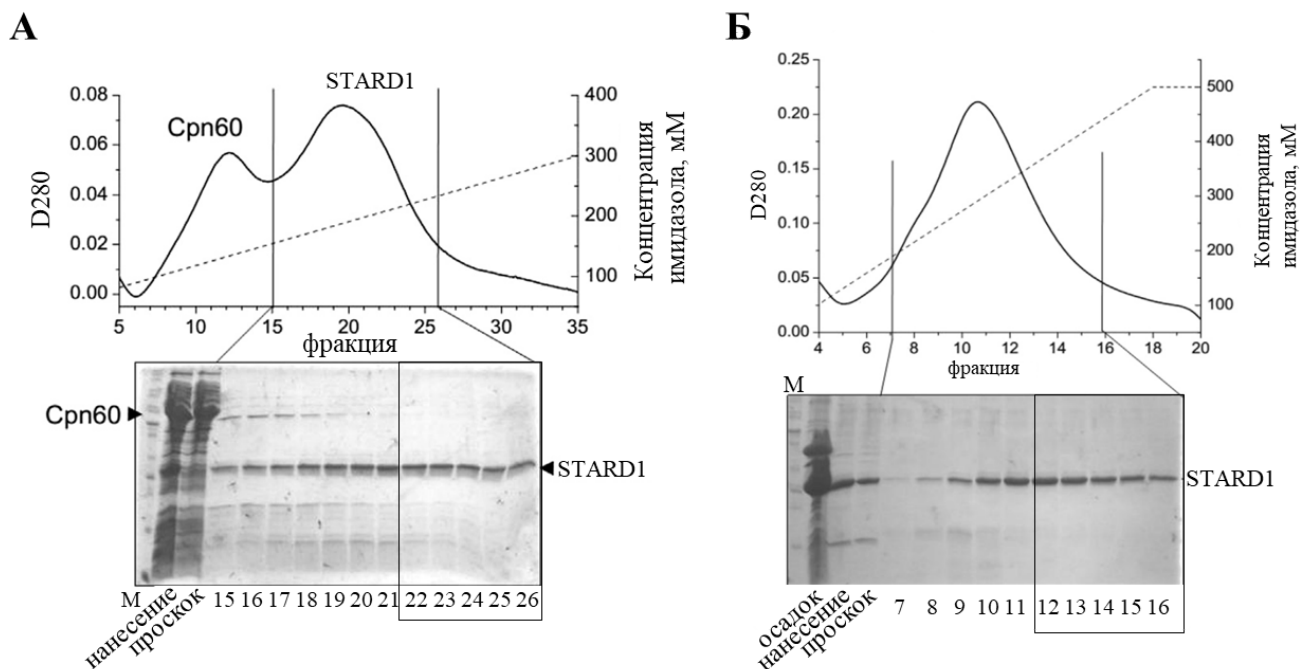


Рис. 16. Очистка STARD1 методом никель-аффинной хроматографии из растворимой фракции (А) и после ренатурации из телец включения (Б). А. На верхней панели профиль элюции градиентом (0-300 мМ) имидазола STARD1 из растворимой фракции, на нижней панели анализ фракций, полученных в результате очистки на колонке HisTrap, методом ДСН-электрофореза. Б. На верхней панели профиль элюции градиентом (0-500 мМ) имидазола STARD1 из нерастворимой фракции после ренатурации, на нижней панели анализ фракций, полученных в результате очистки на колонке HisTrap, методом ДСН-электрофореза. В прямоугольные рамки выделены фракции, которые объединили. М – маркеры молекулярной массы, "проскок" - фракция не связавшихся с колонкой белков; "осадок" - нерастворимая фракция белков, которую подвергли денатурации 8М мочевиной и ренатурации.

Убедившись в том, что экспрессия STARD1 с предоставленных нам плазмид (*pNIC28-Bsa4-STARD1₆₆₋₂₇₄* и *pQE30-STARD1₆₂₋₂₈₅*) при опробованных сочетаниях параметров и условий экспрессии не позволяет получить белок в растворимом виде в достаточных количествах (Рис. 15 и Рис. 16), мы приступили к разработке альтернативной методики получения рекомбинантного STARD1.

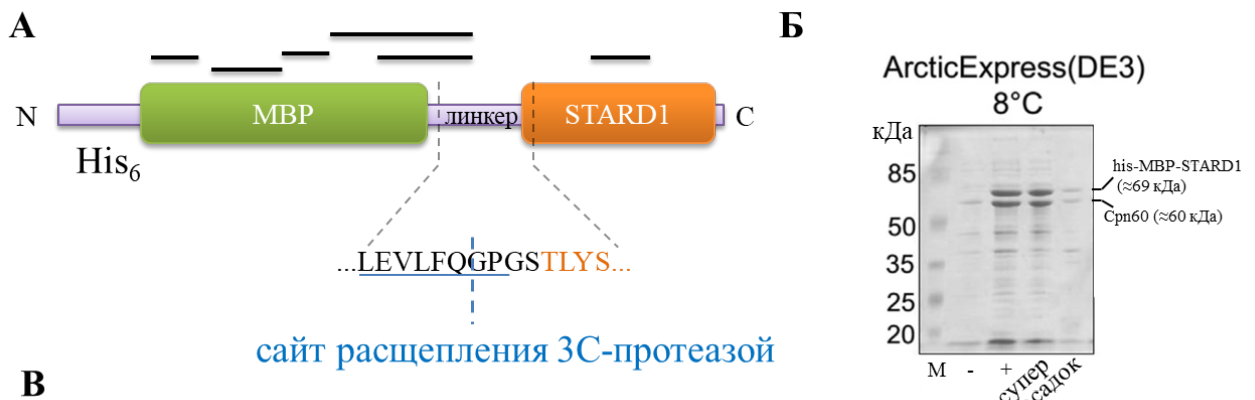
Было решено начать с оптимизации длины конструктора. Как сообщалось ранее, полноразмерная форма STARD1 подвергается процессингу, предположительно, между аминокислотными остатками 63 и 64 [102]. В то же время, считается, что остатки 66-285 формируют пространственную структуру, которая связывает холестерол в своей полости и способствует цАМФ-зависимому синтезу стероидов [48,49,102,120]. Принимая во внимание то, что единственная полученная кристаллическая структура START-домена белка STARD1 (PDB *3POL*) соответствует фрагменту с 66 по 274 остаток, а также, что первые 62 остатка не являются необходимыми для стероидогенной активности [105], а последние 28 С-концевых остатков, наоборот, крайне важны для транспорта холестерола в митохондрию [193], для структурных и функциональных исследований целесообразно иметь конструктор с 65-66 по 285 остаток.

Одним из главных требований к разрабатываемому нами методу было создание такого конструктора, который смог бы значительно увеличить растворимость STARD1. Популярным решением из-за своей относительной легкости и высокой эффективности является добавление в одну рамку считывания с целевым белком хорошо растворимого белка-тага. Для экспрессии в клетках *E. coli* в качестве тагов используют, например, бактериальные белки: мальтозо-связывающий белок (MBP), NusA, тиоредоксин Trx, ингибитор трипсина *E.coli* Ecotin, стресс-чувствительную арсенат-редуктазу ArsC, стресс-чувствительные белки RpoA, SlyD, Tsf и другие [191]. Существует несколько предполагаемых механизмов увеличения растворимости целевого белка после соединения его с таговым белком. Согласно работе С. Раран-Курузи с соавторами [194], предполагается, что MBP способствует повышению растворимости фьюжн-белка минимум двумя способами. С одной стороны, авторы предполагают, что некоторые белки, такие как TEV-протеаза, могут спонтанно правильно сворачиваться, если их склонность к образованию нерастворимых агрегатов блокируется путем слияния с хорошо растворимым MBP. С другой стороны, по их мнению, для правильной укладки некоторых белков (например, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа и дигидрофолатредуктаза) после MBP-опосредованной солюбилизации могут привлекаться эндогенные шаперонины. В обоих случаях MBP, видимо, выполняет роль “холдазы” для поддержания целевых белков в форме, устойчивой к агрегации.

Важно учитывать, что простое слияние MBP с молекулярной массой 45 кДа с целевым белком через линкер без возможности специфического протеолитического разделения белков

заметно сужает применимость данного подхода для получения и исследования белков, особенно небольших размеров. Например, неотщепляемый довесок в виде MBP может влиять на олигомерное состояние целевого белка, неспецифически взаимодействовать с исследуемыми лигандами и/или белками-партнерами, и даже стерически препятствовать взаимодействию целевого белка с ними. В работе Х. Босе с соавторами [7] генетическая конструкция STARD1 содержала сайт протеолиза для энтеропептидазы для отщепления гис-тага, однако для повышения специфичности протеолиза мы решили использовать цистеиновую 3С-протеазу риновируса человека.

Учитывая все вышесказанное, с помощью методов молекулярной биологии мы получили плазмиду *his-MBP-3C-STARD1*₆₆₋₂₈₅ (детали клонирования см. в Подразделе 2.2.1.), которая кодировала His-MBP связанный с STARD1₆₆₋₂₈₅ через длинный линкер с сайтом узнавания для 3С-протеазы (Рис. 17А).



В

Последовательность, идентифицированная масс-спектрометрически	Масса, Да	Фрагмент в фьюжн-белке
...AAEAAGNLVGPR...	1125,6	STARD1 (остатки 171-182)
...PQVAATGDGPDIIIFWAHDR...	2470,3	MBP
...AQTNSSNNNNNNNNNNLGIAGR...	2459,6/2599,3	MBP+линкер
...QTVDEALKDAQTNSSNNNNNNNNNNLGIAGR...	3459,6	MBP+линкер
...VTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDIIIFWAHDR...	3617,9	MBP
...DKPLGAVALK...	1011,6	MBP
...YENGKYDIK...	1130,5	MBP

Рис. 17. Дизайн фьюжн-конструкции MBP-STARD1 и анализ её растворимости при наработке в клетках *E. coli* штамма ArcticExpress(DE3). **А.** Схематическое изображение фьюжн-конструкции STARD1, несущей на N-конце his-MBP, отщепляемый 3С-протеазой. Черными линиями указаны участки, идентифицированные с помощью масс-спектрометрии. **Б.** Анализ экспрессии химерного белка методом ДСН-электрофореза. М – маркеры, фракции до (-) и после (+) добавления индуктора экспрессии ИПТГ, "супер" - растворимая фракция, "осадок" - нерастворимая фракция. **В.** Масс-спектрометрическая идентификация участков с указанием молекулярных масс и соответствием элементам фьюжн-белка.

В результате экспрессии белка в клетках *E. coli* штамма ArcticExpress(DE3), после индукции нарабатывается два белка с $MM_{каж}$ около 60 и 69 кДа, причем в большом количестве и преимущественно в растворимой форме ([Рис. 17Б](#), фракции "супер" и "осадок"). Мы предположили, что полоска с $MM_{каж}$ около 60 кДа соответствует шаперону Crp60, а полоска с $MM_{каж}$ 69 кДа - химерному белку His-MBP-3C-STAR1₆₆₋₂₈₅. Фрагмент геля, содержащий только верхнюю мажорную полосу, был подвергнут трипсинолизу с последующей идентификацией фрагментов методом тандемной масс-спектрометрии (ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН). В полоске были обнаружены семь характерных пептидов, принадлежащих разным участкам химерного белка ([Рис. 17А](#) и В).

Таким образом, с помощью масс-спектрометрического анализа мы подтвердили, что растворимая фракция действительно содержит STAR1. После этого мы перешли к его выделению и очистке.

На первом этапе очистки (IMAC1) химерный белок эффективно отделялся от большинства клеточных белков за счет N-концевого гистага ([Рис. 18А](#)). Наличие большого количества шаперона Crp60 в лизате не являлось проблемой, так как он не связывался с носителем и попадал в несвязавшуюся фракцию вместе с другими клеточными белками ([Рис. 18А](#), "проскок"). Фракции 6-14, содержавшие наибольшее количество His-MBP-STAR1, объединяли ([Рис. 18А](#) и Б, "6-14 фр.") и инкубировали с 3С-протеазой в течение ночи. После инкубации элюата с 3С-протеазой получали смесь из белков his-MBP, his-3С и STAR1 (без гистидинового тага), которую успешно разделяли с помощью второго раунда никель-аффинной хроматографии (IMAC2) на связавшуюся с носителем фракцию ([Рис. 18Б](#), "элюат"), содержащую his-MBP и his-3С, и не связавшуюся с носителем фракцию ([Рис. 18Б](#), "проскок"), обогащенную STAR1. После 3С-специфического расщепления химеры на N-конце белка STAR1 остается короткий пептид GPGS из незаряженных аминокислот.

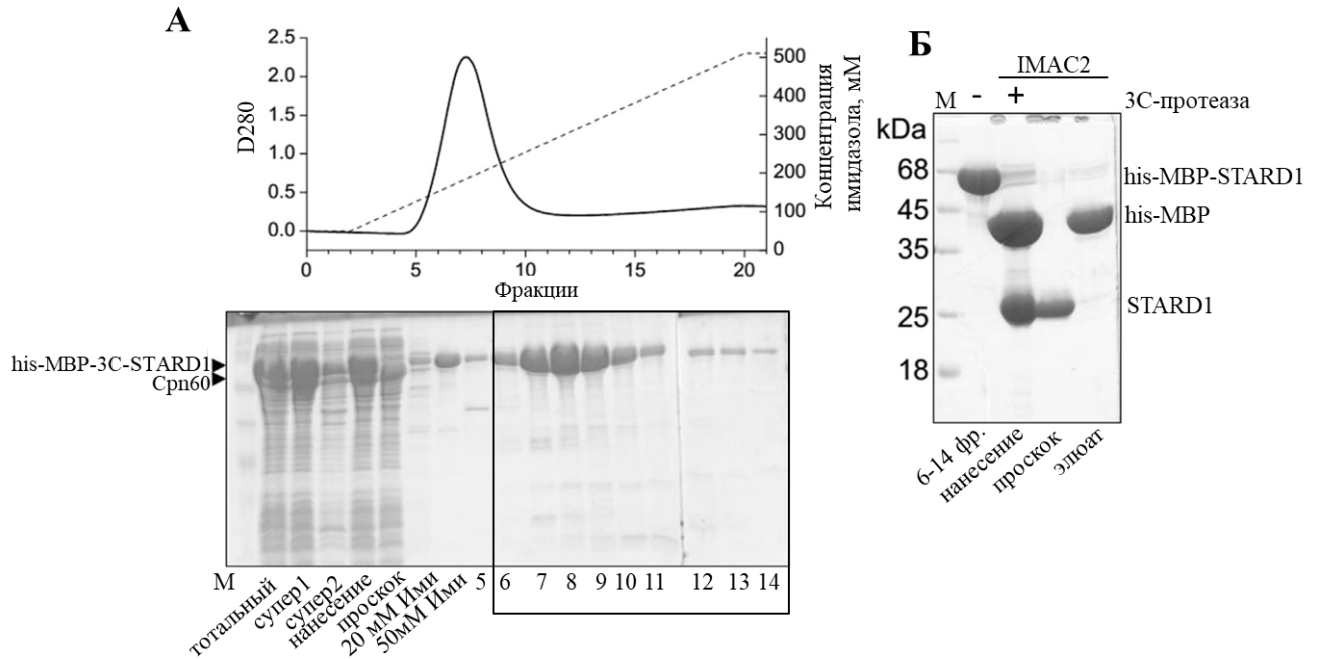


Рис. 18. Получение белка STARD1. **А.** Очистка химерного белка из клеток *E. coli* штамма ArcticExpress(DE3) на никель-аффинной хроматографии с использованием линейного градиента имидазола. Профиль элюции и электрофореграмма фракций. М – маркеры; "тотальный" - препарат после лизиса клеток; растворимые фракции (супернатанты) после первой ("супер1") и после второй ("супер2") экстракции, "нанесение" - объединенные фракции "супер1" и "супер2"; "проскок" - фракция несвязавшегося белка в процессе нанесения на колонку, 20 мМ Ими и 50 мМ Ими – фракции, элюированные буфером А, содержащим 20 и 50 мМ имидазола, соответственно; объединенные фракции выделены прямоугольником. **Б.** Электрофореграмма фракций, полученных в результате второй стадии никель-аффинной хроматографии (IMAC2). Объяснения см. в тексте.

Финальную стадию очистки проводили методом гель-фильтрации. На профиле элюции имеется три пика: первый соответствует большим агрегатам, выходящим в исключенном объеме колонки, второй - олигомерным формам STARD1, третий - мажорный симметричный пик - мономерной форме STARD1 (Рис. 19, пики 1-3). Другими словами, наличие нескольких пиков на профиле электрофоретически гомогенного препарата STARD1 подтверждает необходимость проведения третьей стадии очистки - гель-фильтрации - для отделения мономерной формы от образовавшихся в процессе выделения олигомеров и растворимых агрегатов белка. Фракции (85-97), содержащие наибольшее количество STARD1, объединяли, концентрировали до 4-6 мг/мл, разделяли на алиquotы по 50-100 мкл и хранили при -80°C .

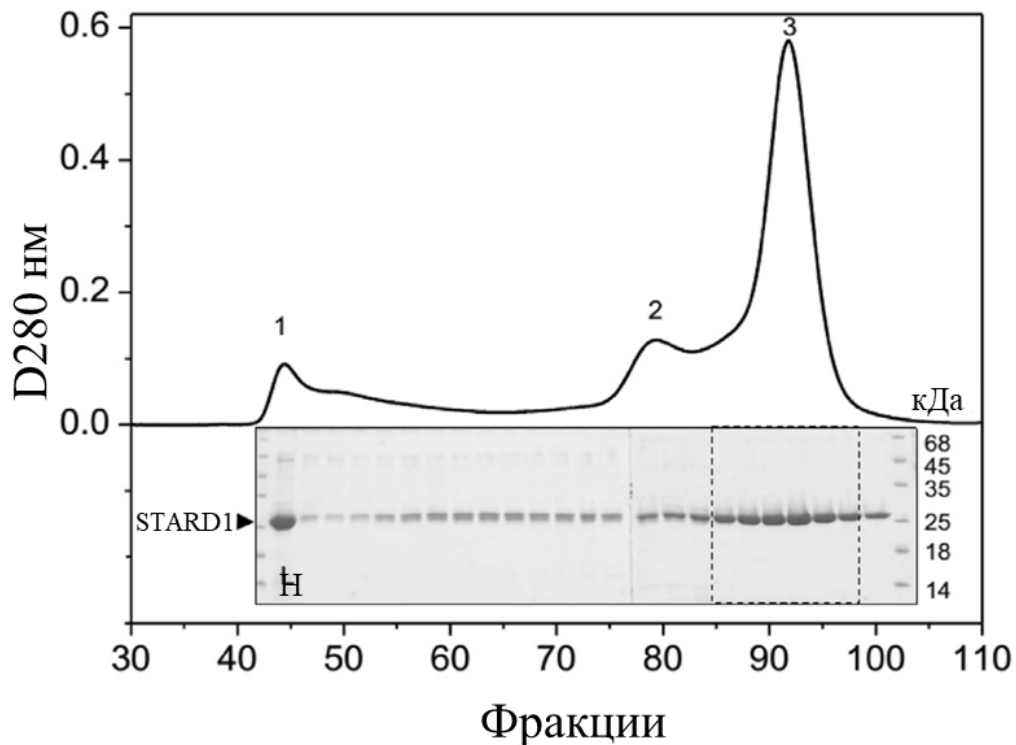


Рис. 19. Финальная стадия очистки STARD1 с помощью метода гель-фильтрации на колонке HiLoad 26/600 Superdex 200 со скоростью элюции 2,6 мл/мин. Профиль элюции STARD1 (сверху) с электрофоретическим анализом фракций (снизу). Маркеры молекулярных масс указаны справа, пунктирными линиями выделены объединенные фракции, содержащие наибольшее количество гомогенного препарата мономерной формы STARD1. Цифрами обозначены пики элюции, соответствующие агрегатам (1), олигомерам (2) и мономерам (3) STARD1.

Несмотря на вполне успешную экспрессию белка в клетках штамма ArcticExpress(DE3), в результате длительной экспрессии (более 20 ч), некоторая часть белка подвергалась неспецифическому протеолизу эндогенными протеазами. Разделение по фракциям Cpn60 и химерного белка на стадии IMAC1 (Рис. 18А) косвенно указывает на то, что эти белки не образуют прочный комплекс, и, по-видимому, присутствие шаперонинов играет второстепенную роль в повышении растворимости MBP-STARD1. Действительно, смена экспрессионного штамма на C41(DE3)-RIL не повлияла на эффективность экспрессии фьюжн-белка (данные не представлены). Используя описанный выше протокол очистки, нам удалось получить около 20-25 мг растворимого, электрофоретически гомогенного препарата STARD1 с одного литра бактериальной культуры, что создало предпосылку для дальнейших структурно-функциональных исследований.

3.2. Анализ свойств рекомбинантного белка STARD1

3.2.1. Определение содержания вторичных структур в STARD1 методом кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете

Корректность фолдинга полученного по новой методике STARD1 предполагалось проверить с помощью одного из наиболее широко используемых методов определения вторичной структуры белков - метода спектроскопии кругового дихроизма (КД) в дальнем ультрафиолете (180-260 нм). Количественный анализ содержания вторичных структур в белке STARD1 в растворе и в кристаллической структуре (PDB 3POL) осуществляли с помощью веб-сервиса *DichroWeb* [195].

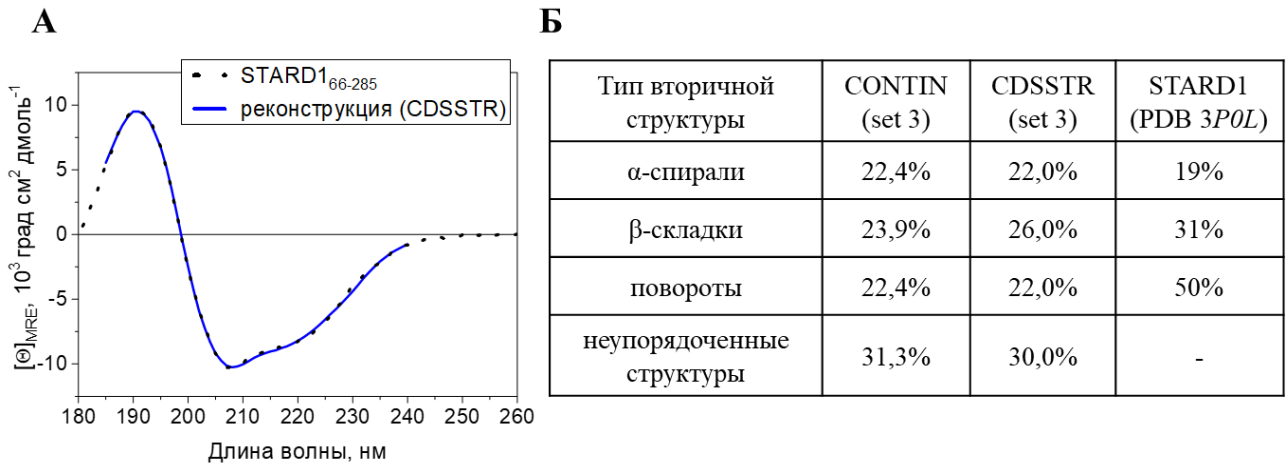


Рис. 20. Содержание вторичных структур в STARD1, определенное методом кругового дихроизма в дальнем УФ. **А.** КД-спектр STARD1 (пунктирная линия) и его реконструкция (синяя линия) с помощью метода CDSSTR. **Б.** Доли α-спиралей, β-структур и неупорядоченных участков, определенные по данным КД-спектра и на основе кристаллической структуры STARD1 (PDB 3POL).

Белок STARD1 имеет выраженный спектр КД в дальней УФ-области ([Рис. 20А](#)), форма которого характерна для белка со смешанным «α/β» типом вторичной структуры. Важно отметить, что состав вторичных структур (α-спирали ≈ 22% и β-складки 24-26%) для белка, выделенного по нашей методике, оказался сходным с таковым из имеющейся кристаллической структуры (PDB 3POL) для STARD1 ([Рис. 20Б](#)).

3.2.2. Исследование собственной флуоресценции STARD1

Известно, что флуоресценция остатков триптофана чувствительна к их молекулярному окружению. Белок STARD1₆₆₋₂₈₅ содержит четыре остатка триптофана на молекулу (Trp96,

Trp147, Trp241, Trp250) (Рис. 21А), которые могут быть хорошим репортером интактности пространственной структуры белка.

Максимум спектра флуоресценции остатков триптофана STARD1 при нейтральных значениях рН был около 337 нм (Рис. 21Б). По данным литературы [176], такой коротковолновый максимум указывал на расположение как минимум части триптофанилов в гидрофобном ядре глобулы и, соответственно, на то, что белок был свернут. При кислых значениях рН положение максимума флуоресценции сдвигалось на 6 нм в длинноволновую область (до 343 нм). Красный сдвиг спектра флуоресценции остатков триптофанов указывал на смену их молекулярного окружения с неполярного на более полярное [176]. Другими словами, при кислых значениях рН белок частично разворачивался, и некоторые остатки триптофана оказывались экспонированными в раствор.

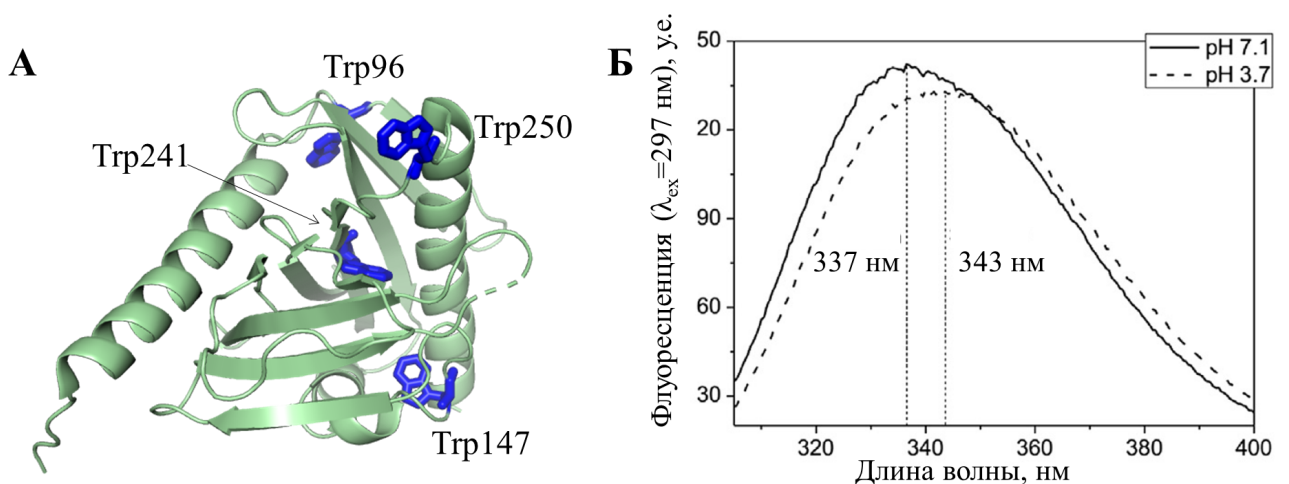


Рис. 21. Триптофановая флуоресценция STARD1. **А.** Кристаллическая структура белка STARD1 (PDB 3P0L) с указанием расположения четырех остатков триптофана. **Б.** Спектры флуоресценции STARD1 при рН 7,1 (сплошная линия) и при рН 3,7 (пунктирная линия). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 297 нм. Положение максимумов эмиссии флуоресценции при разных условиях указаны пунктиром.

Любопытно, что спектры STARD1 из опубликованных работ сильно отличались при нейтральных значениях рН (7,0 - 8,5). Например, в работе [116] спектр флуоресценции STARD1 и его мутантов имел максимум около 370 нм, что даже больше, чем для свободного триптофана, который теоретически должен иметь самый длинноволновый максимум флуоресценции (365 нм). В то же время в работах [10,125] аналогичный спектр флуоресценции ренатурированного STARD1 имел максимум при 340 нм, что было более близко к нашим результатам. Такие различия в очередной раз подчеркивают разницу в используемых протоколах и необходимость в

их стандартизации. Стоит отметить, что при соответствии положения максимумов в нашей работе и в работах [10,125] отсутствие этапа ренатурации STARD1 в подобранном нами протоколе является большим преимуществом, поскольку исключает наличие гетерогенности, вызванной процедурой денатурации-ренатурации.

3.2.3. Олигомерное состояние и гидродинамические свойства STARD1

Олигомерное состояние STARD1 при разных концентрациях белка оценивали с помощью метода аналитической гель-фильтрации. В диапазоне исследуемых концентраций (0,3 - 2,8 мг/мл) STARD1 был стабилен и хорошо растворим и элюировался в виде мажорного симметричного пика с кажущейся молекулярной массой ($MM_{\text{каж}}$) частиц 21,1 кДа и гидродинамическим радиусом $R_H \sim 20 \text{ \AA}$, что соответствует мономеру белка (Рис. 22А).

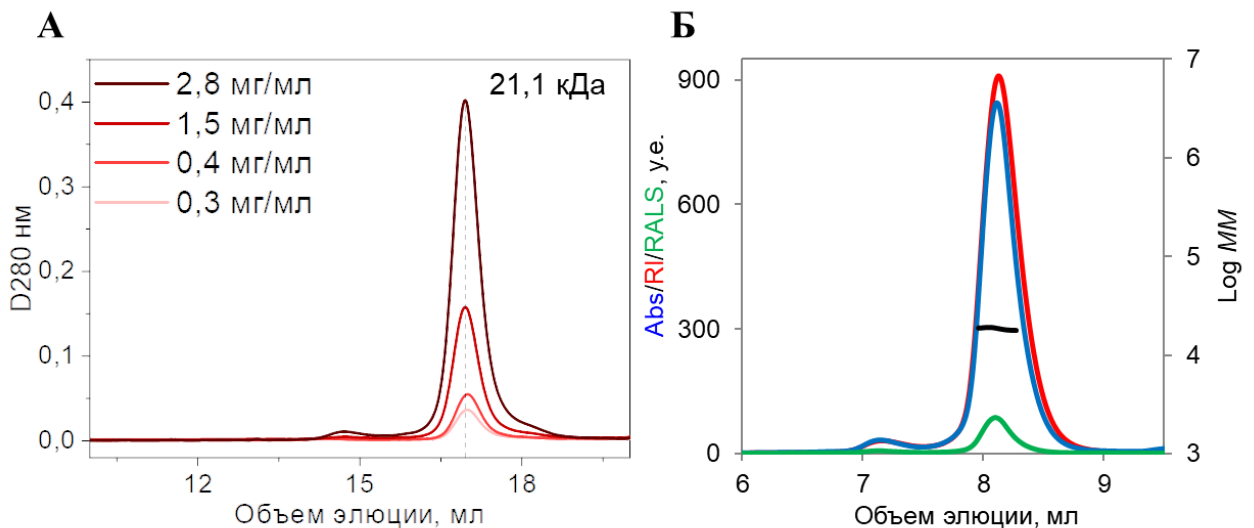


Рис. 22. Анализ олигомерного состояния STARD1. **А.** Профили аналитической гель-фильтрации при разных концентрациях белка в наносимом образце (0,3–2,8 мг/мл); колонка Superdex 200 Increase 10/300, скорость элюции 1,5 мл/мин. Значение $MM_{\text{каж}}$, рассчитанное по калибровке колонки, указано в кДа. **Б.** Профиль элюции STARD1 с параллельной тройной системой детектирования поглощения при 280 нм (Abs, синяя кривая), показателей преломления (RI, красная кривая) и светорассеяния под прямым углом (RALS, зеленая кривая). Логарифм молекулярной массы (Log MM), определенной по данным RI/RALS, показан черной линией.

Заниженное значение кажущейся молекулярной массы STARD1₆₆₋₂₈₅ (21,1 кДа), полученное по калибровочной кривой, по сравнению со значениями MM , рассчитанными по электрофоретической подвижности в ПААГ в денатурирующих условиях (~26 кДа) и по аминокислотной последовательности в *Swissprot* (24,9 кДа), по всей видимости, вызвано особенностями взаимодействия молекул белка с хроматографической смолой и другими

аномалиями. Стоит отметить, что такое поведение, по-видимому, является характерной особенностью разных START-доменов и обнаружено не только в случае STARD1, но и его гомологов - STARD3 человека [196], а также содержащего START-домен белка VmCBP из тутового шелкопряда [197].

Дополнительно гидродинамические свойства STARD1 мы проанализировали с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), совмещенного с ГФ. Данные модулей детекции RI/RALS (Refractive Index/Right Angle Light Scattering) также подтвердили отсутствие агрегатов и выявили основной пик монодисперсных частиц с ровным распределением $MM - 18,4$ кДа ([Рис. 22Б](#)), что позволило усреднить все кадры МУРР, полученные на протяжении пика элюции STARD1. Результирующая кривая рассеяния рентгеновских лучей, представленная на [Рис. 23А](#), была использована для дальнейшего анализа структурных свойств STARD1 в растворе.

По данным МУРР, радиус гирации R_g ($18,1 \text{ \AA}$) полностью соответствовал параметру, определенному для кристаллической структуры STARD1₆₆₋₂₈₅ (PDB *3POL*) с использованием программного обеспечения *HydroPro 1.0* [198] ($R_g = 18,2 \text{ \AA}$). Важно, что величина R_g , рассчитанная из экспериментальных данных, была несколько ниже, чем предсказанная ранее методом молекулярной динамики ($19,9 \pm 0,5 \text{ \AA}$) [199]. Это указывает на то, что в реальности белок STARD1₆₆₋₂₈₅ имеет несколько более компактную структуру в растворе, чем предсказывается биоинформатическими методами. Исключенный объем $P(r)$, равный $48,8 \text{ нм}^3$, соответствовал сферическим частицам с молекулярной массой $28,7 \text{ кДа}$ и параметрами $R_g = 18,4 \text{ \AA}$ и $D_{max} = 59 \text{ \AA}$. Молекулярная масса, оцененная с использованием параметра объем корреляции (V_C) при векторе рассеяния s в диапазоне $0-0,3 \text{ \AA}^{-1}$, составила $22,5 \text{ кДа}$. В [Таблице 6](#) приведены значения параметров, полученных различными методами.

График в координатах Кратки для белка STARD1 ([Рис. 23Б](#), черные точки и красная кривая) при небольших значениях $S \cdot R_g$ может быть описан графиком для модели идеальной сферы ([Рис. 23Б](#), зеленая пунктирная линия), что указывает на наличие одного свернутого центра, а наблюдающееся отличие при значениях $S \cdot R_g > 3,5$ хорошо коррелирует с наличием гибких петель в белке.

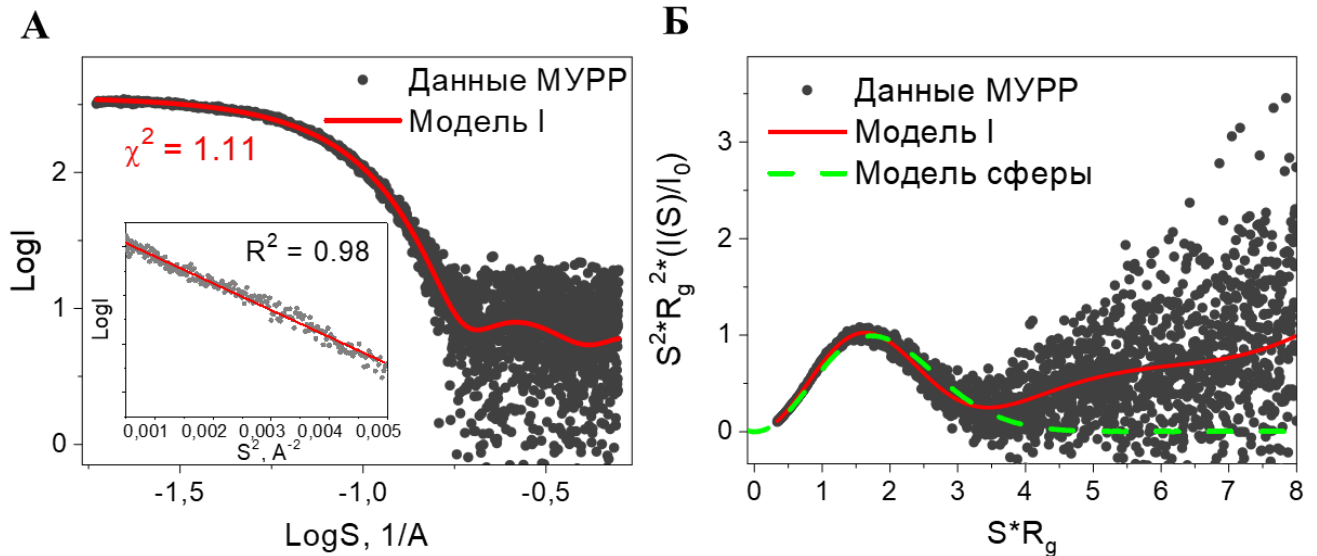


Рис. 23. Анализ структурных параметров STARD1 в растворе. **А.** Профиль МУПП (черные точки), полученный путем усреднения нескольких кривых из максимума хроматографического пика, представленного на Рис. 22Б. Вставка демонстрирует линейность в области Гинье для полученной усредненной кривой МУПП. **Б.** Анализ глобулярности и гибкости/жесткости STARD1 в координатах Кратки. Для сравнения показан график для идеальной жесткой сферы (зеленый цвет). Теоретическая кривая рассеяния для единственной кристаллической структуры STARD1 (PDB 3POL) и ее преобразование в координатах Кратки изображены красным цветом (Модель I).

Табл. 6. Структурные свойства и олигомерное состояние STARD1₆₆₋₂₈₅, определенные разными аналитическими методами.

Метод	R_g , Å	R_H , Å	D_{max} , Å	$MM_{каж}$, кДа	Олигомерное состояние
ДСН-электрофорез	-	-	-	26	-
Аналитическая гель-фильтрация	-	20	-	21,1	мономер
RI/RALS*	-	-	-	18,4	мономер
МУПП: Гинье/ $P(r)$ / V_C	18,1/18,4/-	-	-/59/-	-/28,7/22,5	мономер
Теоретический расчет по кристаллической структуре PDB 3POL**	18,2	21,9	63	24,5	мономер
Аналитическое ультрацентрифугирование	-	-	-	-	мономер [7,125]
Молекулярная динамика	19,9 [199]	-	-	-	-

* для калибровки детектора использовали БСА, значение $dn/dc=0,185$

** - значения R_g , R_H , D_{max} посчитаны в программе *HydroPro 1.0* [198], MM рассчитана по первичной последовательности STARD1 (аминокислотные остатки 66-284) с использованием сервиса *Expasy ProtParam tool* (<https://web.expasy.org/protparam/>).

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. Далее мы перешли к исследованию конформационной подвижности STARD1.

3.3. Анализ конформационной подвижности STARD1 в растворе методом МУРР

В литературе предлагается несколько возможных механизмов связывания холестерина, которые уже были подробно рассмотрены в Подразделе 1.6. Мы проанализировали конформационную подвижность STARD1 в растворе с помощью метода МУРР и сравнили теоретические кривые интенсивности рассеяния $I(s)_{теор}$ для каждой модели с экспериментальной кривой $I(s)_{эсп.}$. Для оценки адекватности предлагаемой модели и соответствия теоретической кривой экспериментальным данным использовали статистический критерий χ^2 .

Вначале мы проверили, различаются ли структуры START-домена белка STARD1 в растворе и в кристалле (Рис. 24А, модель I). Как видно из Рис. 24Б, теоретическая кривая МУРР, рассчитанная на основе кристаллической структуры STARD1 (PDB 3POL) (бирюзовая кривая) хорошо описывает экспериментальные данные МУРР ($\chi^2=1,11$). Соответствие структуры в кристалле и в водном растворе говорит о том, что в состоянии равновесия в растворе белок не претерпевает значительных спонтанных конформационных изменений, которые, например, предполагаются в модели расплавленной глобулы [116,125].

Модель “clam-shell” [111] предполагает движение α_4 -спирали и Ω_1 -петли относительно белка, аналогично открыванию и закрыванию раковины у двустворчатого моллюска. Модель II (Рис. 24, модель II), построенная на основе кристаллической структуры (PDB 1KCM) открытой конформации START-подобного домена белка РІТРа, также плохо описывает экспериментальные данные МУРР (зеленая кривая, $\chi^2=2,14$), что указывает на низкую вероятность спонтанных изменений конформаций, направленных в сторону увеличения размеров частицы.

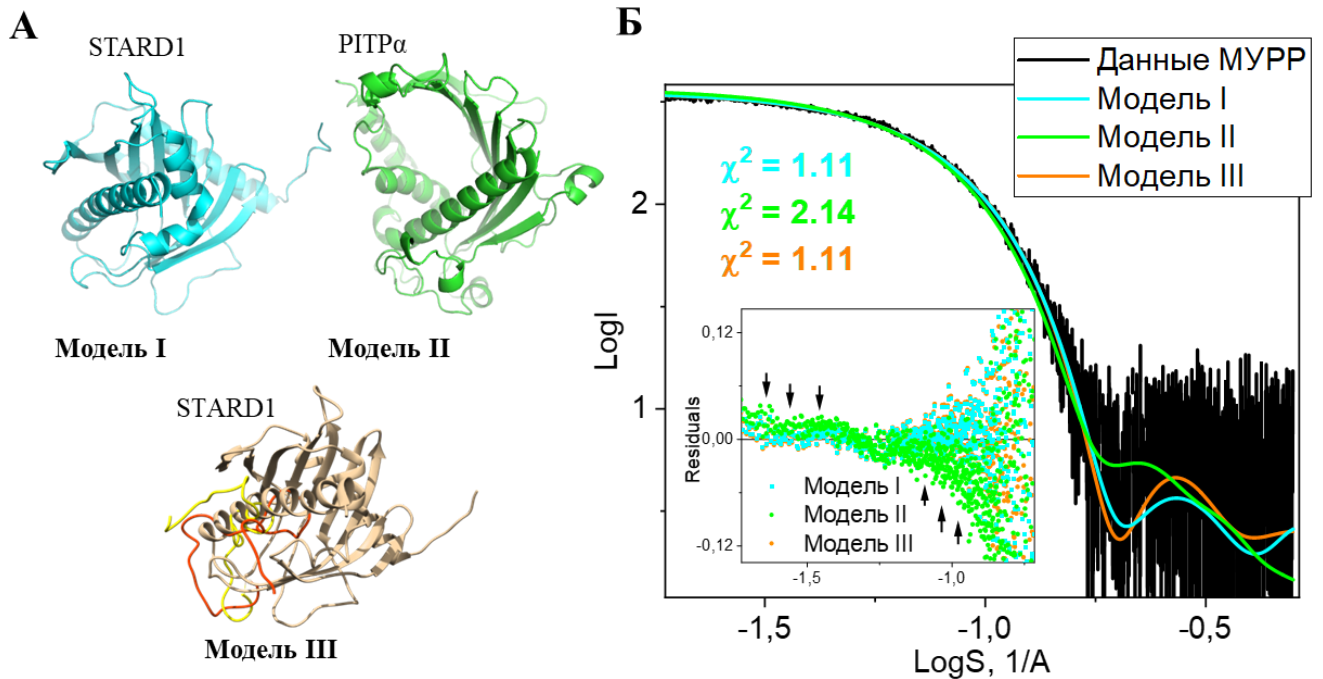


Рис. 24. Моделирование конформационной подвижности STARD1 в растворе на основе данных МУРР. **А.** Изображение структур, используемых для получения модельных кривых. Модель I соответствует кристаллической структуре STARD1 (PDB *3POL*), модель II - структуре PITPα в открытой конформации (PDB *1KCM*), модель III - наиболее вероятные гипотетические конформации разупорядоченной С-концевой α_4 -спирали (остатки 250-285). Начальное положение α_4 -спирали указано бежевым, а отобранные - красным и желтым цветом. **Б.** Сравнение экспериментальных данных МУРР (черная кривая) и результатов их описания для каждой из трех моделей, указанных на панели А. Значения остатков (Δ/σ) для каждой модели при подгонке указаны во вставке. Значения статистического критерия χ^2 для каждой модели также указаны.

На следующем этапе мы сравнили степень соответствия моделей, в которых только α_4 -спираль (Рис. 24, модель III) или Ω_1 -петля (Рис. 25, модель IV) обладают конформационной подвижностью.

С помощью программ *RANCH* (RANdom CHain) и *GAJOE* (Genetic Algorithm Judging Optimisation of Ensembles) были смоделированы наборы конформаций (около 10 000), в которых максимально полно описывается пространство возможных положений разупорядоченной α_4 -спирали (Рис. 24А, модель III) или Ω_1 -петли (Рис. 25А, модель IV). К нашему удивлению, было обнаружено, что только самые компактные, нерепрезентативные для такой конформационной свободы модели с развернутым С-концевым участком (Рис. 24, модель III, бежевая кривая) были отобраны методом *EOM* [183]. Другими словами, модель III с подвижной α_4 -спиралью оказалась тоже маловероятной, по крайней мере, для белка в растворе при нейтральном значении рН. Полученные нами данные находятся в некотором противоречии с

предложенными ранее теоретическими моделями, построенными с использованием молекулярной динамики [199], где такая конформационная свобода α_4 -спирали была постулирована.

Альтернативная модель IV с набором разных позиций Ω_1 -петли (Рис. 25А) хорошо описывала экспериментальные данные ($\chi^2=1,11-1,12$, Рис. 25Б). Эта модель согласуется с расчетами молекулярной динамики [13] и кристаллической структурой STARD1 (PDB 3P0L), в которой Ω_1 -петля имеет высокий В-фактор.

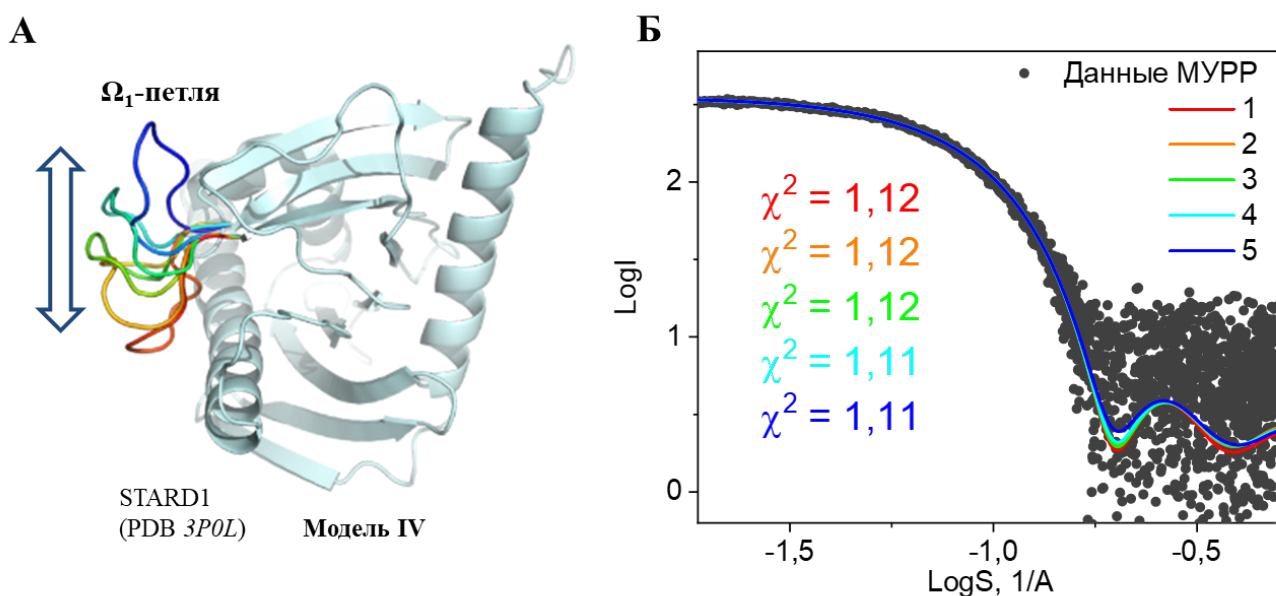


Рис. 25. Моделирование конформационной подвижности Ω_1 -петли (остатки 171-182) при сохранении конформации остальных элементов структуры STARD1 (Модель IV). **А.** Изображение структур, используемых для получения модельных кривых. Положение Ω_1 -петли показано градиентом цвета от красного (закрытая конформация) до синего (открытая конформация). **Б.** Сравнение экспериментальных данных МУПП (черные точки) и результатов их описания для каждого из пяти положений, указанных на панели А. Значения статистического критерия χ^2 указаны для каждого положения.

Кроме того, наши данные МУПП для START-домена белка STARD1 также подтверждают идею структурного сходства его с лиганд-связывающими доменами других представителей семейства STARD-белков. Недавно была получена ЯМР-структура STARD6, описывающая 20 его различных конформаций [81]. Теоретическая кривая, построенная на основе ЯМР-структуры (PDB 2MOU), отлично описывает наши данные МУПП для STARD1 ($\chi^2=1,13-1,16$, данные не представлены).

3.4. Исследование функциональных свойств STARD1

3.4.1. Взаимодействие флуоресцентных аналогов холестерина с белком STARD1

3.4.1.1. Определение параметров связывания с помощью стационарной флуориметрии

В работах, посвященных исследованиям функциональных свойств белка STARD1, активно применяют аналог холестерина - коммерчески доступное соединение 22NBD, у которого флуоресцентная NBD-группа находится при 22-м атоме углерода молекулы холестерина ([Рис. 26А](#) и [Б](#)) [60,62,185,200,201]. Несмотря на то, что NBD-группа увеличивает размеры молекул, в работе Б. Бейкер с соавторами [62] было показано, что связывание лиганда 22NBD со STARD1 эквивалентно связыванию радиоактивно меченого [³H]-холестерола, поэтому флуоресцентные NBD-аналоги по праву могут использоваться для изучения особенностей связывания с STARD1. Однако ранее никто не изучал влияние положения NBD-группы на параметры связывания лиганда с белком и не анализировал, является ли флуоресцентный аналог 22NBD наиболее оптимальным репортером взаимодействия STARD1 с лигандами.

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 и вместо 3-ОН-группы (3NBD) ([Рис. 26А](#) и [Б](#)). Данные соединения были выбраны для того, чтобы сравнить:

а) коммерчески доступные NBD-аналоги холестерина (22NBD и 25NBD) с новыми синтетическими соединениями (20NBD [202] и 3NBD);

б) флуоресцентные аналоги холестерина разных размеров. Лиганд 20NBD является самой компактной молекулой, т.к. боковая цепь сокращена до двух атомов углерода. Лиганды 25NBD и 3NBD, наоборот, являются наиболее объемными молекулами за счет наличия практически всей боковой цепи холестерина;

в) параметры связывания лиганда 3NBD, у которого вместо единственной гидроксильной группы холестерина находится NBD-группа, с остальными лигандами (20NBD, 22NBD, 25NBD), у которых 3-ОН-группа сохраняется.

Как оказалось, флуоресцентный отклик (амплитуда флуоресцентного сигнала) при добавлении одинакового количества лигандов к 1 мкМ STARD1₆₆₋₂₈₅ увеличивался в ряду 3NBD<25NBD<22NBD<20NBD ([Рис. 26В](#)), причем сигнал от связывания лиганда 20NBD был в 1,57 раз выше, чем при связывании широко используемого 22NBD и в 10 и 30 раз выше, чем у 25NBD и 3NBD, соответственно.

Важно заметить, что в пробах со STARD1 максимумы флуоресценции лигандов 20NBD, 22NBD и 25NBD находились при 535 нм ([Рис. 26В](#)), что согласовывалось с полученными ранее данными для 22NBD [60]. Сдвиг максимума эмиссии флуоресценции в синюю область возникал из-за попадания в гидрофобное окружение NBD-группы, обладающей сольватохромным эффектом. Для лиганда 3NBD максимум флуоресценции находился в более длинноволновой области и почти не сдвигался.

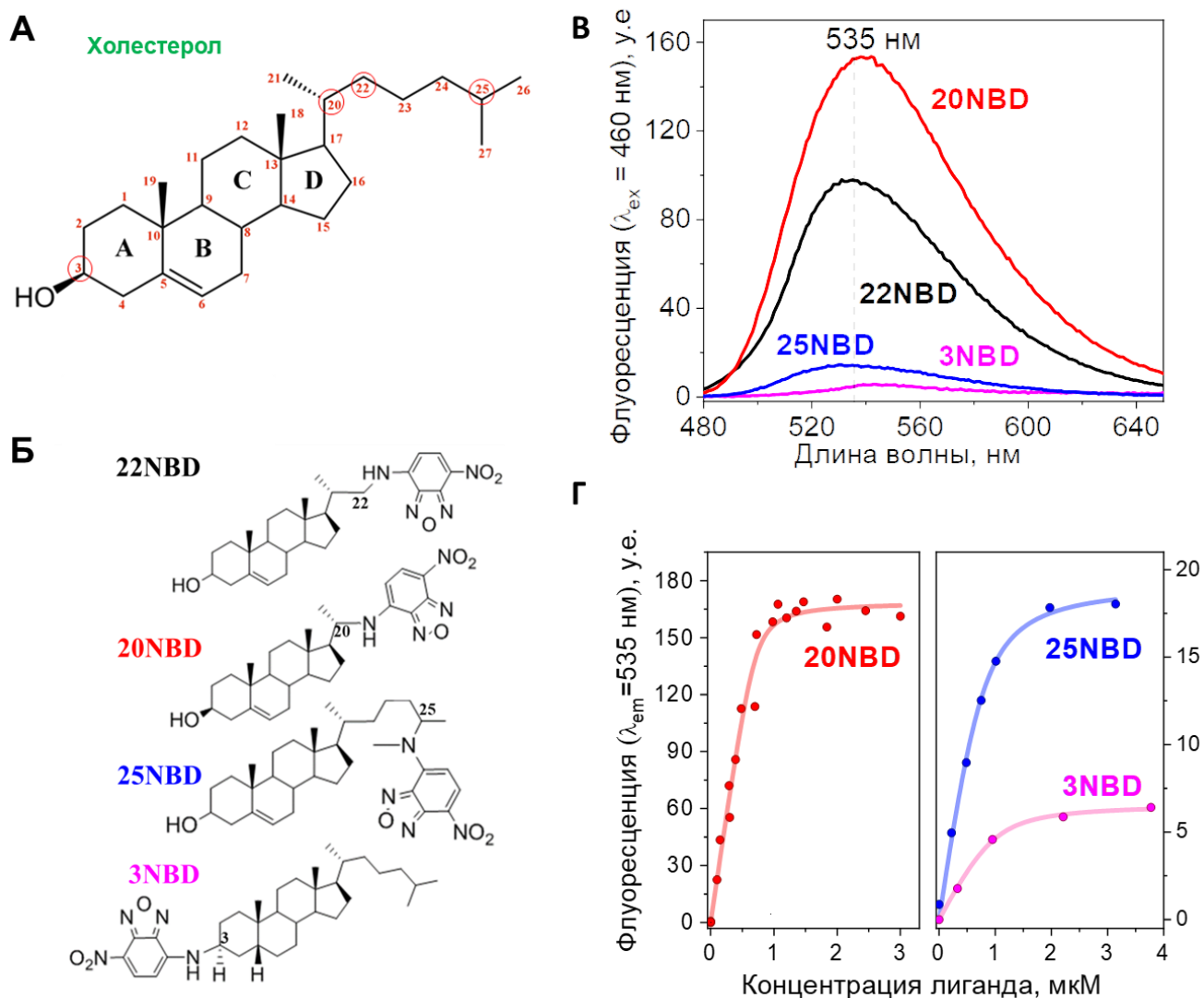


Рис. 26. Взаимодействие STARD1 с NBD-аналогами холестерина. Структурные формулы холестерина (**А**) и исследуемых NBD-аналогов (**Б**). **В.** Спектры флуоресценции лигандов (1,5 мкМ), добавленных к STARD1 (1 мкМ). **Г.** Кривые титрования 1 мкМ STARD1 лигандами 20NBD (слева) и 25NBD и 3NBD (справа).

Кажущуюся константу диссоциации (K_D) и стехиометрию комплекса определяли путем фитирования измеренных кривых титрования квадратичным уравнением (8) (Подраздел 2.6.1.1.) [203]. На Рис. 26Г представлены кривые титрования 1 мкМ STARD1₆₆₋₂₈₅ тремя новыми лигандами. Математический анализ кривых титрования показал, что стехиометрия комплекса для всех лигандов близка к 1:1, что хорошо согласуется с литературными данными [8,64] и подтверждается сопоставлением объемов молекулы холестерина (432 Å) и холестерол-связывающей полости STARD1 (471 Å) [80]. Рассчитанную по флуоресценции

NBD-группы стехиометрию комплекса лиганд/белок 2:1 в работе 2001 года [60], следует, скорее всего, признать ошибочной.

Кажущаяся константа диссоциации (K_D) для 20NBD была около 26 нМ, что сопоставимо с рассчитанными ранее K_D для холестерина (≈ 30 нМ) [8] и 22NBD (≈ 32 нМ) [60]. Кажущаяся константа диссоциации для 3NBD была как минимум в 10 раз выше. Параметры связывания для холестерина и NBD-лигандов суммированы в [Таблице 7](#).

Табл. 7. Параметры связывания холестерина и его аналогов со STARD1.

Лиганд	K_D , нМ	Кол-во центров связывания, N , шт	Метод, параметры измерения
[³ H]-холестерол	30 [8]	1	Круговой дихроизм, $\Delta[\theta]_{222}$
DHE	76 ± 10 [60]	нет данных	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 324$ нм
20NBD	$21 \pm 5^*$	1	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 297$ нм, $\lambda_{em} = 346$ нм
	$18 \pm 7^*$	1	FRET, $\lambda_{ex} = 297$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм
	$26 \pm 8^*$	1	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 460$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм
22NBD	32 ± 4 [60]	2	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 473$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм
	17 [60]	1	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 295$ нм, $\lambda_{em} = 350$ нм
	49 [60]	1	FRET, $\lambda_{ex} = 295$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм
	93 [60]	1	FRET, $\lambda_{ex} = 280$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм
	16 [60]	1	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 280$ нм, $\lambda_{em} = 340$ нм
25NBD	$130 \pm 23^*$	1	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 460$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм
3NBD	$302 \pm 29^*$	1	Флуоресценция, $\lambda_{ex} = 460$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм

* - данные получены в настоящей работе

Результаты стационарной (steady-state) флуориметрии указывают на то, что наибольшим флуоресцентным откликом обладает лиганд 20NBD ([Рис. 26В](#)), имеющий самую компактную структуру, где NBD-группа соединена с циклопентанпергидрофенантроновым ядром (А, В, С, D, [Рис. 26А](#)) короткой двухуглеродной цепочкой. Малозначительные изменения амплитуды флуоресценции, практически не отличающиеся от фона, при добавлении лиганда 3NBD к STARD1 ([Рис. 26В](#)), могут иметь несколько объяснений. С одной стороны они могут быть вызваны отсутствием связывания лиганда в полости и указывать на важность 3-ОН-группы для образования комплекса. С другой стороны, 3NBD все же может связываться с STARD1, но в

такой ориентации, что NBD-группа экспонирована в раствор, и в связи с этим отсутствует ее флуоресценция. Для проверки данных гипотез мы воспользовались компьютерным моделированием комплексов STARD1 с холестеролом и его флуоресцентными аналогами 20NBD, 25NBD и 3NBD.

3.4.1.2. Моделирование связывания и поиск ориентации холестерина и его NBD-аналогов в полости STARD1

Поиск и отбор наиболее энергетически выгодных положений холестерина и его флуоресцентных аналогов в полости STARD1 проводили в программах *Autodock* [189] и *FlexAID* [188].

Согласно проведенному компьютерному моделированию в обеих программах, холестерол ориентирован в гидрофобном кармане STARD1 таким образом, что боковая цепь молекулы (атомы углеродов C₂₀-C₂₇) находится в полости, а 3-ОН-группа напротив остатка Arg182 (Рис. 27А и Б). Такое положение холестерина в литературе обозначается как "OUT" и теоретически весьма вероятно [13,113].

Подобная ориентация в полости была отображена программами *Autodock* и *FlexAID* и для лиганда 20NBD (Рис. 27В и Г), а, следовательно, NBD-флуорофор был полностью погружен в полость и со всех сторон защищен белком. В случае 25NBD и 3NBD в программе *Autodock* отбирались те модели, в которых лиганды находились вне полости в произвольной ориентации (данные не показаны), а программа *FlexAID* предсказывала как наиболее вероятные конформации таковые, у которых NBD-группа частично экспонирована из полости (Рис. 27Д и Е). Тем не менее, согласно программе *FlexAID*, ориентация 3NBD в полости соответствовала положению "OUT" для холестерина, в отличие от ориентации 25NBD. По-видимому, слишком большой объем молекулы 25NBD являлся причиной ее переориентации в положение "IN".

Таким образом, результаты молекулярного докинга согласовались с результатами титрования STARD1 лигандами 20NBD, 25NBD и 3NBD и могли быть объяснением различий во флуоресцентном отклике при их добавлении к белку.

Важно отметить, что алгоритмы поиска основаны на разных расчетных функциях, но давали сходные результаты и определяли связывание 25NBD и 3NBD со STARD1 как менее вероятное, а для 20NBD - как более вероятное, причем именно в положении "OUT".

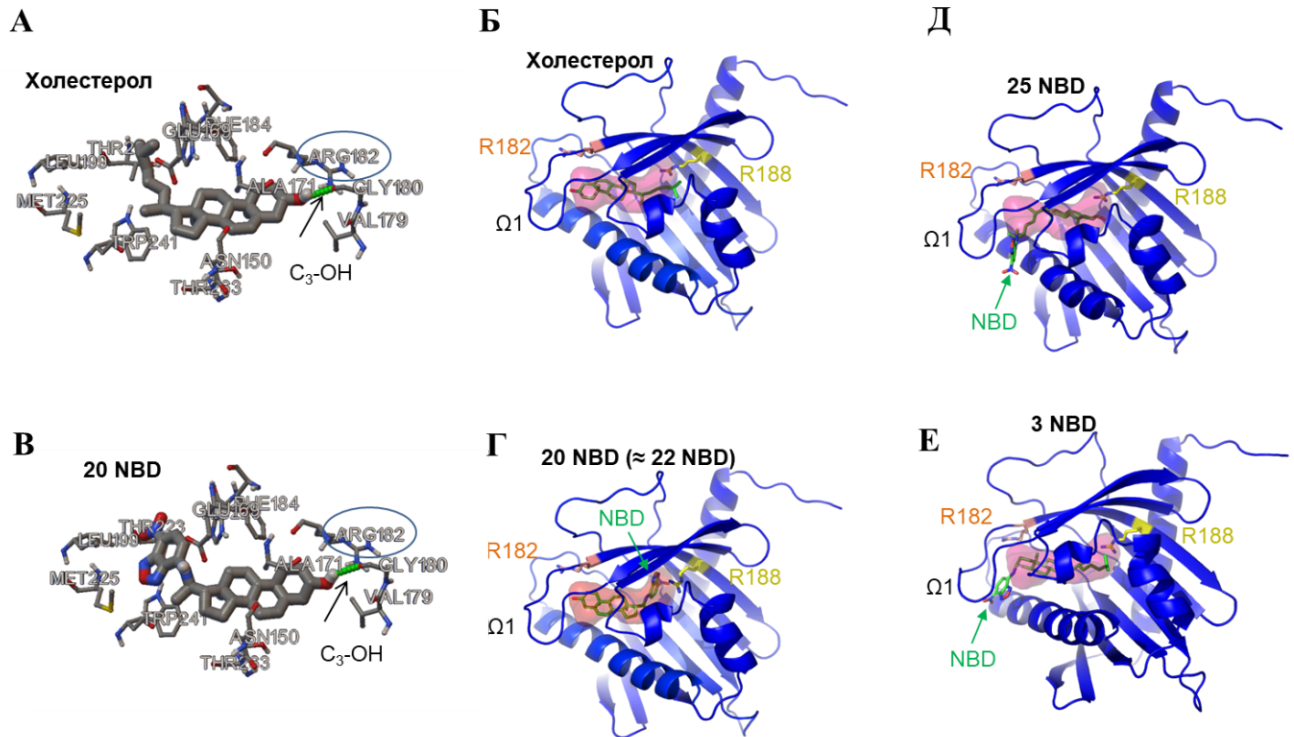


Рис. 27. Моделирование ориентации холестерина и NBD-лигандов в полости STARD1 с использованием программ *Autodock* (А, В) и *FlexAID* (Б, Г-Е). Молекулы холестерина (А и Б) и лиганда 20NBD (В и Г) ориентированы в полости в положении "OUT": 3-ОН-группа лигандов расположена напротив остатка Arg182. Лиганд 3NBD, у которого 3-ОН-группа заменена на NBD-группу, ориентирован аналогичным образом в положении "OUT", однако флуоресцентная группа частично выступает из гидрофобной полости (Е). Противоположную ориентацию "IN" имеет лиганд 25NBD (Д): его 3-ОН-группа находится внутри полости напротив остатка Arg188, а NBD-группа направлена к остатку Arg182 и также частично экспонирована в раствор.

Раньше было предположено, что остаток R188 формирует солевой мост с остатком E169 и играет ключевую роль в связывании 3-ОН-группы холестерина [9,15,62], в то время как R182 находится около Ω_1 -петли и может участвовать в регуляции ее подвижности [13]. Остатки R182 и R188 являются консервативными среди ортологов STARD1 (Рис. 28А), хотя R182 более консервативен среди представителей STARD-семейства человека (Рис. 28Б).

А		182	188			182	188									
		↓	↓			↓	↓									
P49675 STAR_HUMAN	GPRDFVSVRC	R	V	A	P49675 STARD1	R	V	R	C	A						
O46689 STAR_HORSE	GPRDFVSVRC	R	V	A	Q9UKL6 STARD2	N	Y	L	R	Q	R					
Q28918 STAR_BOVIN	GPRDFVSVRC	R	V	T	Q14849 STARD3	S	P	N	V	R	R	I				
P79245 STAR_SHEEP	GPRDFVSVRC	R	V	T	Q96DR4 STARD4	S	P	R	E	F	V	D	F	S	Y	T
Q28996 STAR_PIG	GPRDFVSVRC	R	V	T	Q9NSY2 STARD5	S	P	R	D	F	V	D	L	V	L	V
Q9DG08 STAR_XENLA	GARDFVSVRC	A	R	S	P59095 STARD6	S	P	R	D	F	I	D	L	V	Y	I
Q9DG09 STAR_CHICK	GPRDFVSVRC	R	V	S	Q9NQZ5 STARD7	Y	S	R	D	Y	V	V	R	R	R	Y
P51557 STAR_MOUSE	GPRDFVSVRC	R	V	T	Q92502 STARD8	P	C	R	D	F	V	V	L	R	M	W
P97826 STAR_RAT	GPRDFVSVRC	R	V	T	Q9P2P6 STARD9	Q	P	R	D	F	C	C	V	C	V	E
P70114 STAR_MESAU	GPRDFVSVRC	R	V	A	Q9Y365 STARD10	K	N	R	D	V	I	T	L	R	S	W
Q9DG10 STAR_DANRE	GPRDFVNVRC	R	V	H	Q9Y5P4 STARD11	S	Q	R	D	V	L	Y	L	S	V	I
Q9DE06 STAR_SALFO	GPRDFVSVRC	R	V	A	Q96QB1 STARD12	P	A	R	D	Y	V	V	L	R	T	W
Q9DEB4 STAR_ONCMY	GPRDFVSVRC	R	V	A	Q9Y3M8 STARD13	P	S	R	D	F	V	V	L	R	T	W
					Q8WXI4 STARD14	K	P	Q	D	F	V	I	L	A	S	R
					Q8WYK0 STARD15	K	P	K	D	L	V	V	L	V	S	R

Рис. 28. Выравнивание ортологов STARD1 из разных организмов (А) и представителей STARD-семейства человека (Б) в области остатков 180-190. Остатки Arg182 и Arg188 высококонсервативны в ортологах STARD1, аннотированных в *UniProt* (13 видов), однако остаток Arg182 *более консервативен* среди белков STARD-семейства человека. Аминокислотные остатки, идентичные в соответствующей позиции во всех последовательностях выравнивания, обозначены белым цветом на черном фоне; аминокислотные остатки, идентичные в соответствующей позиции в некоторых последовательностях выравнивания, обозначены жирным шрифтом и заключены в рамку. Выравнивание последовательностей было построено с использованием программы *Clustal Omega* (<http://www.clustal.org/omega>), а визуализировано с помощью веб-сервиса *ESPrpt 3.0* [204].

Согласно результатам молекулярного докинга, NBD-группа 20NBD находилась на расстоянии менее 12 Å от боковой цепи остатка Trp241 ([Рис. 29А](#)). Ввиду того, что спектры возбуждения флуоресценции NBD-группы и испускания флуоресценции остатков триптофана перекрываются ([Рис. 29Б](#)), при оптимальной ориентации флуорофоров удалось зарегистрировать перенос энергии FRET [60]. Изменения флуоресценции, отслеживаемые по уменьшению триптофановой флуоресценции и по параллельному с ним разгоранию флуоресценции NBD-группы, также носили насыщающийся характер и позволяли оценить кажущиеся K_D , значения которых были близки тому, которое удалось получить при простом флуоресцентном титровании с измерением флуоресценции NBD-группы ([Рис. 26Г](#)).

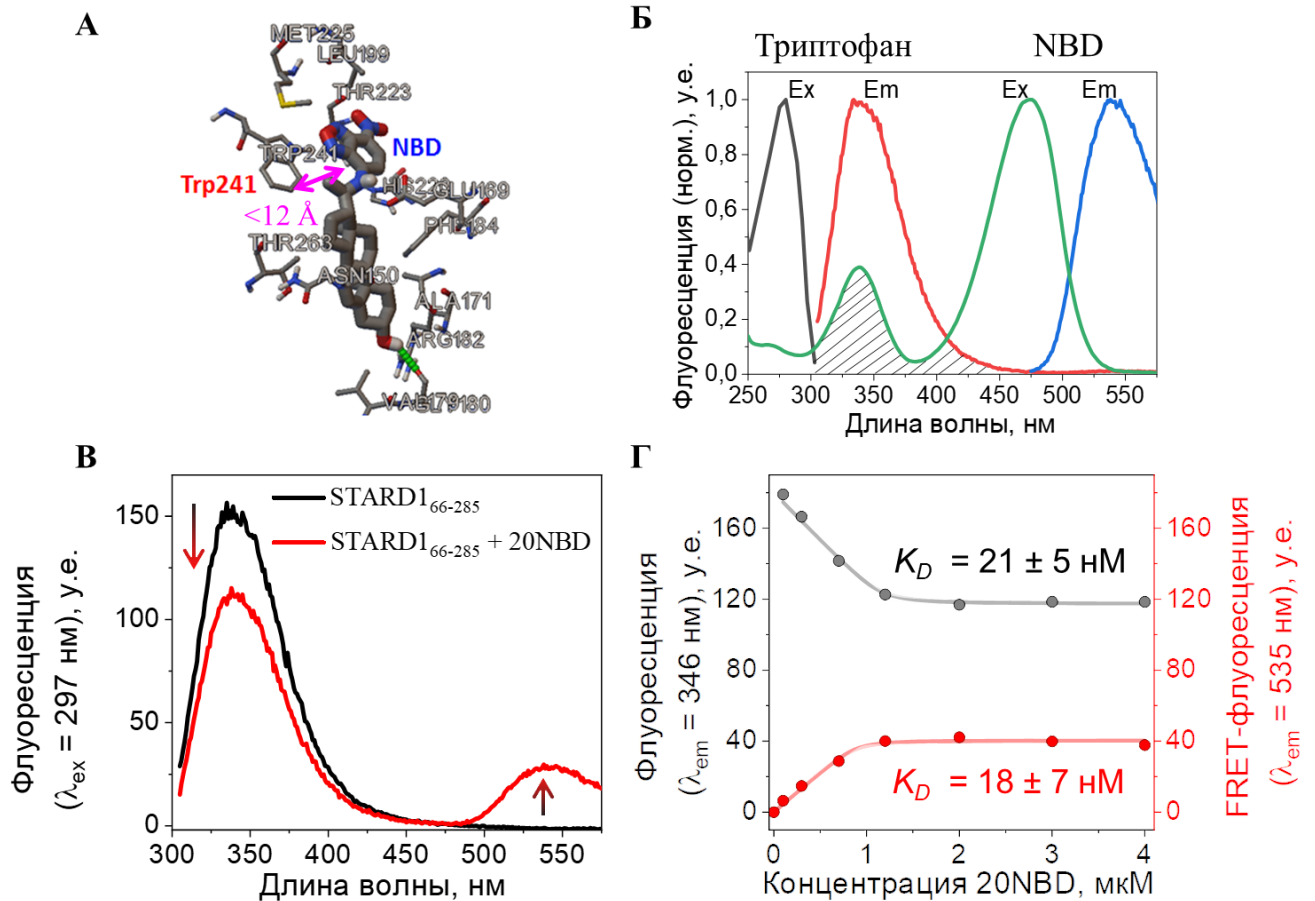


Рис. 29. Триптофановая флуоресценция STARD1 при связывании лиганда 20NBD. **А.** Расположение 20NBD в полости белка согласно моделированию в программе *Autodock* [189]. Близкое расположение остатка Trp241 и NBD-группы указывают на возможность переноса FRET. **Б.** Спектры возбуждения (Ex) и испускания (Em) флуоресценции остатков триптофана и NBD-группы. Область перекрытия заштрихована. **В.** Спектральные изменения (указаны стрелками) при добавлении избытка 20NBD к белку STARD1. **Г.** Кривые титрования 1 мкМ STARD1 лигандом 20NBD по тушению флуоресценции триптофана (черный), либо по увеличению интенсивности флуоресценции NBD-группы (красный).

3.4.1.3. Влияние NBD-лигандов на термостабильность STARD1

Как известно, при образовании комплекса с холестеролом стабильность STARD1 белка увеличивается [8]. Влияние новых лигандов на термостабильность белка оценивали по изменению температуры полуперехода ($T_{0,5}$) белка. Для этого мы регистрировали изменение интенсивности флуоресценции остатков триптофана при равномерном нагревании белка в присутствии лигандов или без них (Рис. 30А). Полученную зависимость обрабатывали уравнением (9) (Подраздел 2.6.1.1.) и строили зависимость степени завершенности перехода α

от температуры. Температура, соответствующая 50% завершенности, называется температурой полуперехода ($T_{0,5}$) и является мерой для оценки термостабильности белка.

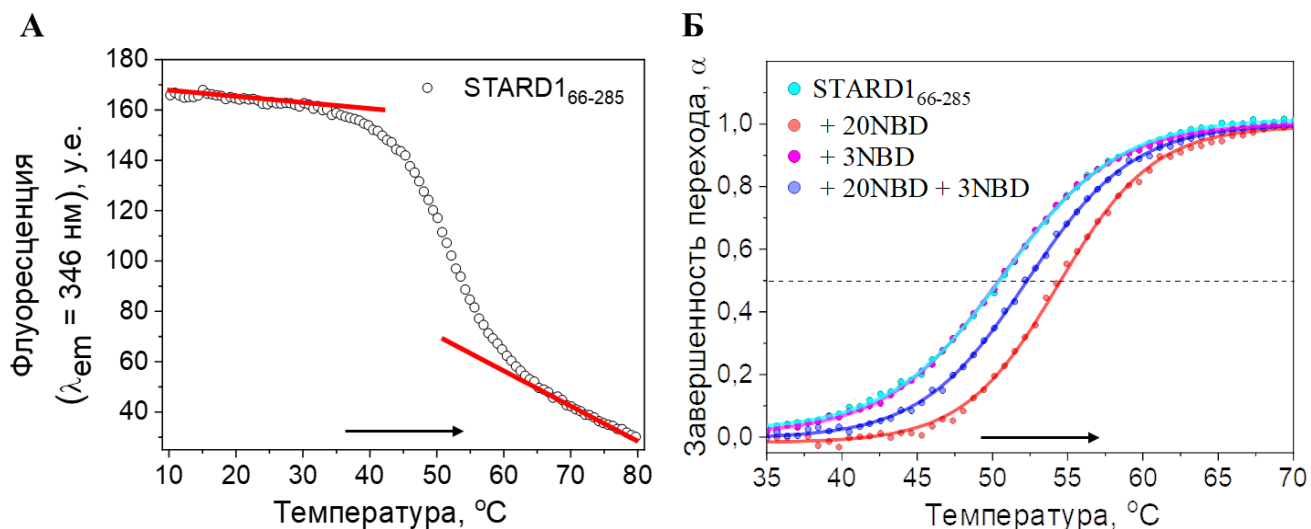


Рис. 30. Термостабильность STARD1 в присутствии лигандов. **А.** Изменение интенсивности триптофановой флуоресценции, вызванное тепловой денатурацией STARD1. Линиями обозначены линейные участки, соответствующие нативному и денатурированному состоянию белка, кружками - экспериментальные данные. **Б.** Зависимость завершенности перехода 1 мкМ STARD1 до (циановая кривая) и после добавления 2 мкМ 20NBD (красная), 2 мкМ 3NBD (розовая) и смеси 1 мкМ 20NBD и 5 мкМ 3NBD (синяя). Пунктирная линия обозначает полупереход ($\alpha=0,5$). Стрелками на обеих панелях показано направление изменения температуры.

В [Таблице 8](#) приведены значения, рассчитанные нами в данной работе и опубликованные ранее в литературе.

Табл. 8. Температуры полуперехода $T_{0,5}$ для STARD1 в присутствии различных лигандов.

Белок + лиганд	$T_{0,5}$, °C	Δ °C
STARD1 ₆₆₋₂₈₅	$49,8 \pm 0,1$	-
STARD1 ₆₆₋₂₈₅ + 20NBD	$53,4 \pm 0,1$	+3,6 °C
STARD1 ₆₆₋₂₈₅ + 3NBD	$49,5 \pm 0,1$	-0,3 °C
STARD1 ₆₆₋₂₈₅ + 20NBD + 3NBD	$51,3 \pm 0,1$	+1,5 °C
STARD1 ₆₆₋₂₈₅	$\sim 42,3$ [8]	-
STARD1 ₆₆₋₂₈₅ + холестерол	$\sim 45,9$ [8]	+3,6 °C

Добавление лигандов 20NBD и 3NBD оказывало различный эффект на термостабильность STARD1. Так, в присутствии 20NBD $T_{0,5}$ STARD1 повышалась почти на 4 °C, что согласовывалось с данными литературы для холоформы STARD1 с природным лигандом - холестеролом [8]. В случае 3NBD, наоборот, эффекта от добавления к STARD1 обнаружено не было. Добавление 3NBD к белку, преинкубированному с 20NBD лигандом, понижало

температуру полуперехода с 53,4 до 51,3 °С, но все равно $T_{0,5}$ была выше, чем при добавлении просто 3NBD.

Еще стоит заметить, что, по данным литературы, $T_{0,5}$ для апоформы STARD1 оказалась ниже, чем полученная в ходе нашего эксперимента. Это указывает на то, что в том эксперименте [8], STARD1 был менее стабилен, возможно, вследствие его выделения из телец включения с помощью денатурации мочевиной и неполноценной ренатурации.

Данные стационарной флуориметрии были подтверждены результатами время-разрешенной флуориметрии ([Рис. 31А](#) и [Таблица 9](#)).

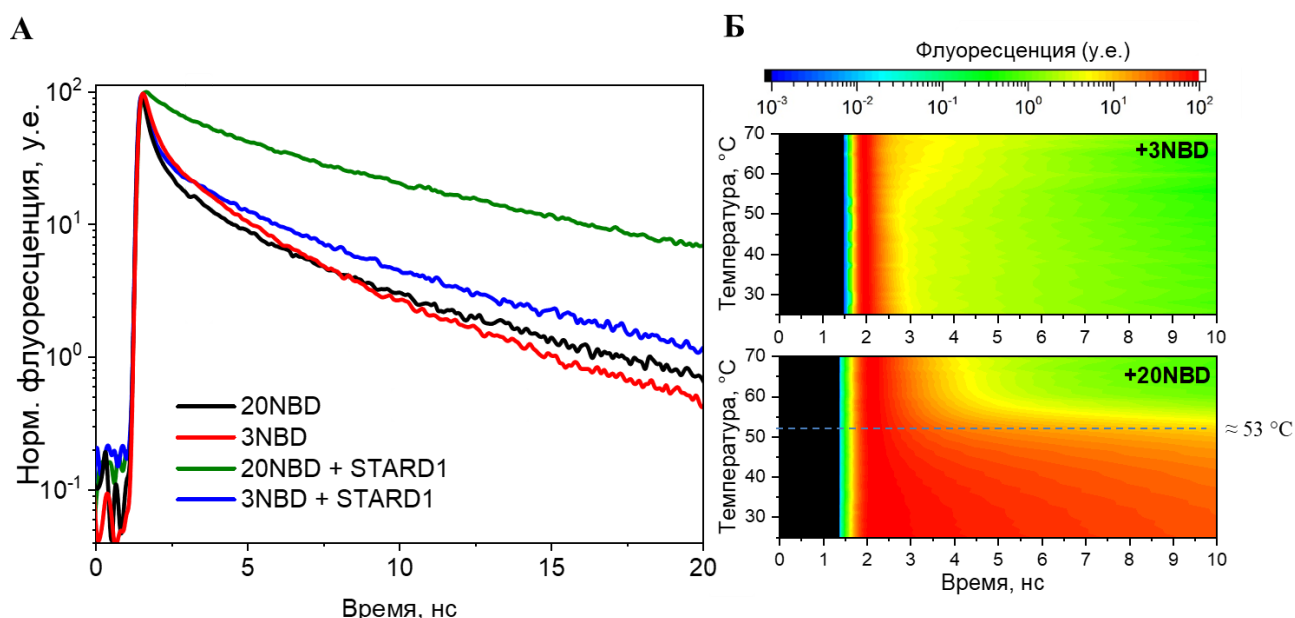


Рис. 31. Исследование взаимодействия STARD1 с лигандами 20NBD и 3NBD с помощью время-разрешенной флуориметрии. **А.** Кинетика затухания флуоресценции NBD-группы при 25 °С до (черная и красная кривые) и после (зеленая и синяя кривые) добавления избытка STARD1. **Б.** Тепловые карты, демонстрирующие термостабильность STARD1 в присутствии 3NBD (сверху) и 20NBD (снизу) в виде зависимости кинетики затухания флуоресценции NBD-группы (изменение флуоресценции NBD-группы с течением времени) при нагревании образцов до 70 °С с постоянной скоростью 1 °С/мин. Цветом закодирована интенсивность флуоресценции NBD-группы, согласно шкале, расположенной сверху.

В отсутствие STARD1 время жизни флуоресценции (быстрая компонента τ_1 и медленная компонента τ_2) NBD-группы свободного лиганда 20NBD и 3NBD были низкими ([Таблица 9](#)). Добавление избытка белка STARD1 не привело к заметному увеличению времени жизни флуоресценции 3NBD, в то время как для 20NBD оно выросло более чем в три раза ([Таблица 9](#)). Это указывало на то, что NBD-группа 20NBD становилась защищенной от молекул

растворителя при связывании с белком, а флуоресценция 3NBD оставалась затухающей в свободном состоянии молекулы, а также и после добавления белка, возможно, из-за неполного его размещения в полости STARD1.

Табл. 9. Эффект добавления STARD1 на времена жизни флуоресценции NBD-групп лигандов.

Лиганд + белок	Быстрая компонента, τ_1 , (пс)	Медленная компонента, τ_2 , (пс)
20NBD	225 (79,7%)	3435 (20,3%)
20NBD+STARD1 ₆₆₋₂₈₅	2185 (55,0%)	9860 (45,0%)
3NBD	295 (72,2%)	2980 (27,8%)
3NBD+STARD1 ₆₆₋₂₈₅	235 (76,1%)	4145 (23,9%)

Наши выводы были дополнительно подтверждены при регистрации температурных зависимостей кинетики флуоресценции NBD-группы при нагревании смеси белка с 20NBD или с 3NBD. На [Рис. 31Б](#) представлены полученные зависимости. В соответствии с [Рис. 31Б](#), при температурах ниже 50 °С время жизни было значительно больше в случае 20NBD и постепенно уменьшалось при нагревании. Резкая убыль времени жизни флуоресценции с 50 до 60 °С отражает денатурацию белка, вызванную нагреванием, и диссоциацию лиганда от белка. Температура полуперехода $T_{0,5} \sim 53$ °С, рассчитанная на основании этих данных, хорошо согласовывалась с результатами, полученными с помощью методов стационарной флуориметрии. Полученные данные являлись очередным свидетельством того, что 3NBD связывался с белком с низким сродством и экспонированным в раствор флуорофором, и такое связывание не могло полноценно стабилизировать белок от разворачивания, вызванного нагреванием.

3.4.2. Взаимодействие STARD1 с белками семейства 14-3-3

Среди функциональных особенностей STARD1 выделяется его фосфорилирование PKA, которое коррелирует с эффективностью стероидогенеза [19]. При этом максимальная активность STARD1 достигается в том случае, когда он связан с OMM [120], где STARD1 взаимодействует с другими белками трансдуцесомы [16]. Особая роль в процессе регуляции стероидогенеза отводится комплексу STARD1 с белками 14-3-3, экспрессия которых усиливается при запуске стероидогенеза [20,21]. В то же время, в литературе отсутствует ясная картина регуляции активности STARD1 под действием фосфорилирования и взаимодействия с

белками 14-3-3. Более того, предложенный механизм взаимодействия белков STARD1 и 14-3-3 (описан в [Подразделе 1.10](#)) [20,21] основан на результатах экспериментов на клетках и содержит серьезные неточности. В этой связи, в данной работе мы более детально исследовали особенности взаимодействия этих белков с помощью различных биохимических и физико-химических методов.

3.4.2.1. Получение и характеристика препаратов белков

Препараты белков STARD1. Фосфорилированные формы белков STARD1 (далее рSTARD1) получали в бактериальной системе ко-экспрессии с протеинкиназой А (РКА) по методике, разработанной автором за рамками настоящей работы [169]. Эта методика позволяет получать рекомбинантные фосфобелки внутри клеток, т.е. в условиях, близких к физиологическим. С помощью ко-экспрессии целевого белка с РКА для структурных и функциональных исследований нами уже были успешно получены фосфорилированные формы *tau*-белка [169], нуклеокапсидного белка коронавируса SARS-CoV-2 [205] и химерных конструкций белков 14-3-3 с пептидами от белков-партнеров BAD [206], STARD1 [196], 18E6 [140], HspB6 [207] и с полноразмерным HspB6 [208]. Этапы очистки фосфорилированных белков описаны в [Подразделе 2.2.4](#). Белки, экспрессированные в тех же условиях, но в отсутствие РКА, очищали и использовали в качестве нефосфорилированных контролей.

Для исследования параметров взаимодействия STARD1 с белками 14-3-3 были экспрессированы и очищены белки STARD1₆₆₋₂₈₅, рSTARD1₆₆₋₂₈₅, STARD1₆₆₋₂₈₅-S195E, STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A, рSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A, STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P, рSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P ([Рис. 32А](#) и [Б](#)). К сожалению, несмотря на все попытки оптимизации условий экспрессии и выделения из телец включения, полноразмерный STARD1₁₋₂₈₅ получить в растворимом виде нам не удалось.

Фосфорилирование белков качественно оценивали с помощью электрофоретических методов, а идентификацию фосфорилированных остатков проводили с помощью метода масс-спектрометрии в ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН. Как и ожидалось, белки, ко-экспрессированные с РКА, обладали бóльшей электрофоретической подвижностью в ПААГ в нативных условиях в присутствии мочевины, чем соответствующие контроли ([Рис. 32В](#)). Добавление фосфатазы к препаратам очищенных конструкторов рSTARD1 приводило к уменьшению подвижности в ПААГ, которое было вызвано удалением фосфатной группы и

уменьшением общего отрицательного заряда молекулы (Рис. 32В, дорожки 5 и 7). В то же время дополнительная инкубация фосфобелков с каталитически активной субъединицей PKA *in vitro* не приводила к появлению новых белковых полос с бóльшей подвижностью, что указывало на их полное фосфорилирование в бактериальной системе (данные не представлены).

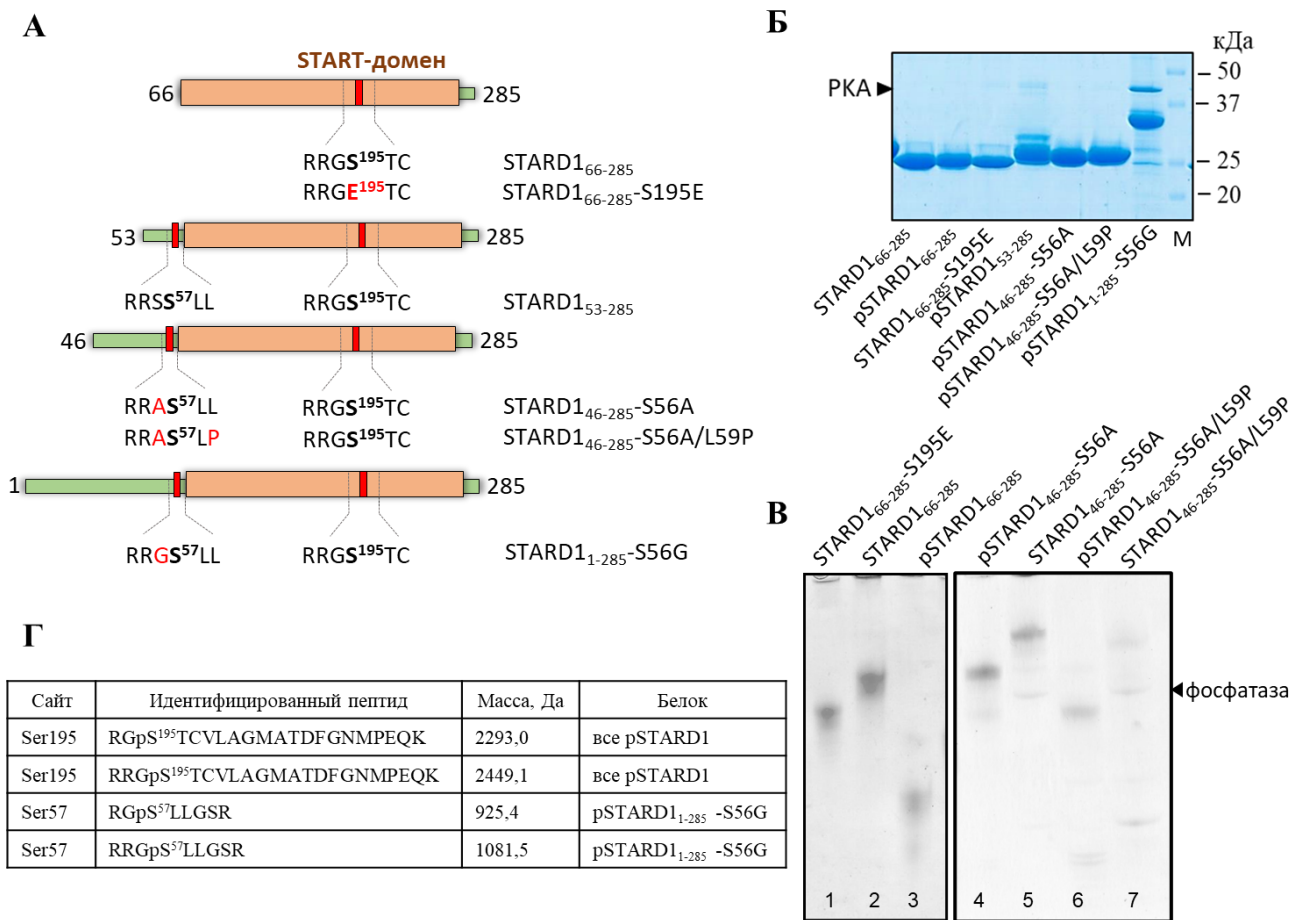


Рис. 32. Получение и характеристика различных форм STARD1. **А.** Схематическое изображение конструкторов STARD1 с указанием исследуемых участков. Остатки Ser57 и Ser195 выделены жирным шрифтом, а точечные мутации - красным цветом. **Б.** ДСН-электрофорез очищенных препаратов укороченных вариантов STARD1 и нерастворимого полноразмерного pSTARD1₁₋₂₈₅-S56G, коэкспрессированного с протеинкиназой А (PKA). М - маркеры молекулярных масс. **В.** Нативный гель-электрофорез в мочеvine полученных препаратов STARD1. Фосфорилированные белки STARD1₆₆₋₂₈₅ (3), STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A (4) и STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P (6) обладают большей подвижностью, чем соответствующие контроли (2), (5) и (7). Мутантная форма STARD1₆₆₋₂₈₅-S195E (1) обладает промежуточной подвижностью между фосфорилированной (3) и нефосфорилированной (2) формами STARD1₆₆₋₂₈₅. **Г.** Идентификация фосфорилированных участков STARD1 с помощью масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрический анализ показал фосфорилирование STARD1 только по остаткам Ser195 и Ser57 ([Рис. 32Г](#)), и других сайтов фосфорилирования в белке обнаружено не было.

Препарат STARD3₂₁₆₋₄₄₄ По некоторым данным, не только STARD1, но и его ближайший паралог, STARD3 (сходство кристаллических структур STARD1 и STARD3 показано на [Рис. 33А](#)), способен взаимодействовать с белками 14-3-3, однако за счет другого (но расположенного также в пределах START-домена) мотива - ³⁹²KSASNP³⁹⁷ [209] (выделен красным на [Рис. 33А](#)). Для проверки этой возможности мы также получили препарат белка STARD3₂₁₆₋₄₄₄, воспользовавшись разработанной нами методикой получения STARD1 (см. Подразделы [2.2.2-2.2.4](#)). Согласно данным ГФ, STARD3₂₁₆₋₄₄₄ являлся стабильным мономером с $M_{кэж}$ 17 кДа (данные не представлены). Содержание вторичных элементов, оцененное по КД-спектру в дальнем УФ ([Рис. 33Б](#)), было сопоставимо с таковым в кристаллической структуре STARD3 (PDB 5I9J). Наконец, экспериментальные данные МУРР для STARD3 ([Рис. 33В](#)) хорошо описывались модельной кривой, построенной на основе кристаллической структуры STARD3 (PDB 5I9J). Это указывало на то, что не только STARD1, но и STARD3 имеет конформацию в растворе, близкую к кристаллической структуре.

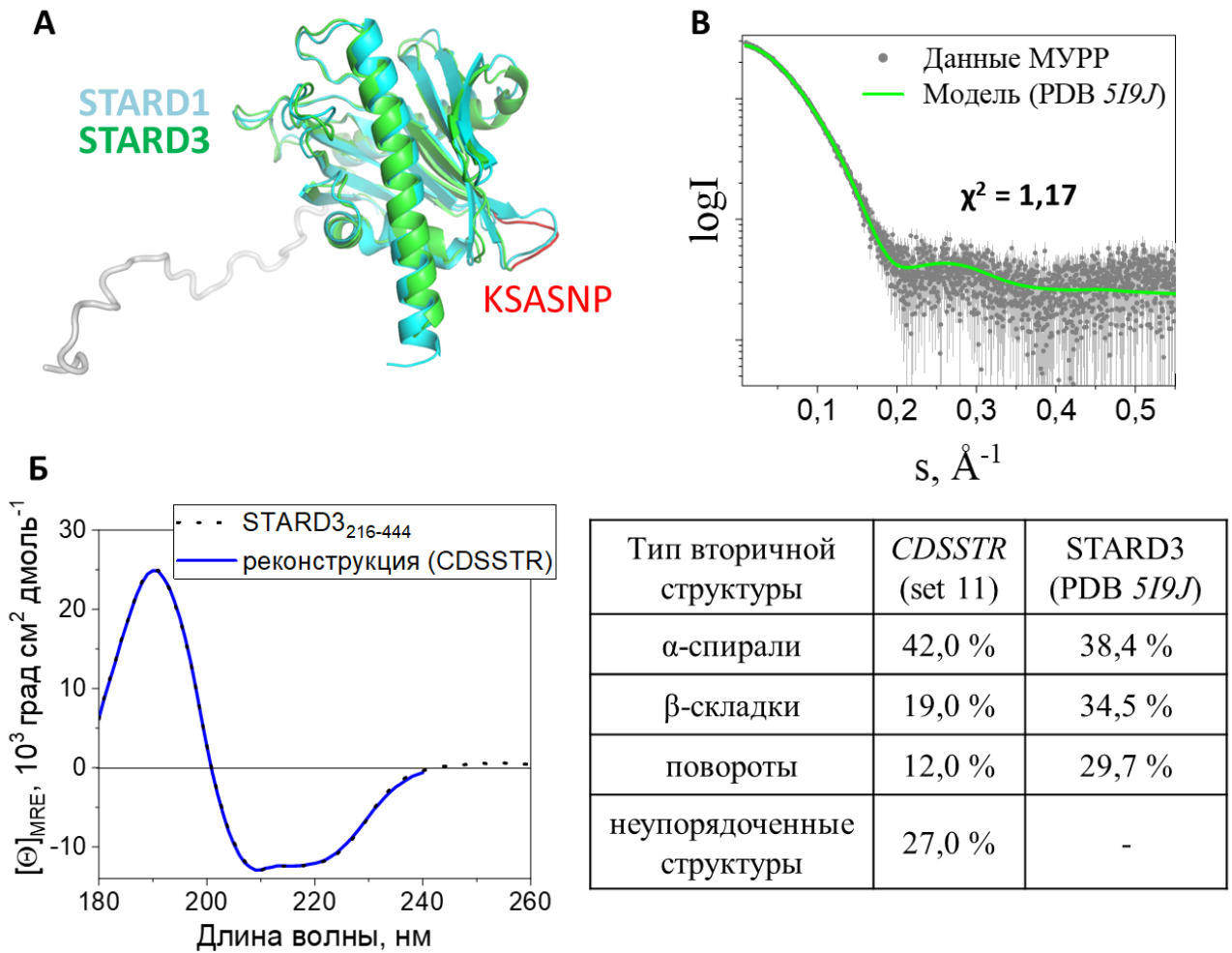


Рис. 33. Исследование структуры STARD3. **A.** Сравнение структур STARD1 (PDB 3P0L) и STARD3 (PDB 5I9J), с указанием расположения мотива ³⁹²KSASNP³⁹⁷. Серым цветом изображена N-концевая область STARD3, содержащая гистаг. **Б.** Экспериментальный КД-спектр STARD3₂₁₆₋₄₄₄ (черные точки) и его реконструкция, полученная с использованием веб-сервера *DichroWeb* (синяя кривая) [195]. В таблице приведены доли вторичных структур, определенные по данным КД-спектра и на основе кристаллической структуры STARD3 (PDB 5I9J). **В.** Кривая МУРР для STARD3, совмещенная с расчетной кривой рассеяния для модели (зеленая кривая), полученной с помощью программы *CORAL* [184] на основе кристаллической структуры STARD3 (PDB 5I9J).

Получение белков 14-3-3. Согласно данным литературы, именно изоформы 14-3-3γ и ε вовлечены в регуляцию стероидогенеза [20–22], поэтому в дальнейших экспериментах мы исследовали взаимодействие этих изоформ со STARD1 и STARD3. Также было проанализировано взаимодействие мономерной формы 14-3-3 (14-3-3ζm58E) с STARD1, т.к. в работе [20] было предположено, что именно *мономер* 14-3-3 взаимодействует с STARD1. Бестаговый белок 14-3-3ε и мономерная форма 14-3-3ζm58E были получены ранее в нашей

лаборатории, а изоформу γ выделяли по методике, описанной в работе [210]. В результате очистки был получен гомогенный препарат 14-3-3 γ с концентрацией 12 мг/мл.

3.4.2.2. Биоинформатический анализ последовательности STARD1 и поиск потенциальных участков связывания 14-3-3

Для поиска в последовательности STARD1 человека потенциальных сайтов узнавания белками 14-3-3 мы воспользовались программами *14-3-3-Pred* [151] и *SCANSITE 4.0* [211] и для каждого остатка серина и треонина в последовательности STARD1 рассчитали значения параметров, оценивающих сходство участка (6-11 аминокислотных остатков с центральным остатком pS/pT) с каноническим мотивом узнавания для 14-3-3 [153]. Участки, обладающие значением параметра выше порогового, определены как "потенциальные сайты" и представлены в [Приложении 7](#) и [Приложении 8](#). Всего было идентифицировано пять таких участков: расположенные в N-концевом пептиде участки вокруг Ser56 и Ser57 и участки вокруг Ser195, Thr196 и Ser277 в структурированном START-домене. Так как известно, что 14-3-3 связывают преимущественно фосфорилированные формы белков-партнеров [153], а белок STARD1 фосфорилируется *in vivo* в частности протеинкиназой A (PKA) [19], для идентифицированных сайтов мы также рассчитали вероятность их фосфорилирования PKA ([Приложение 8](#), PKA score) с помощью встроенного алгоритма в программу *SCANSITE 4.0* [211]. Для более полной картины, в [Таблице 10](#) также указаны сайты, предсказываемые этими программами для мышинового STARD1, идентичность последовательности которого с человеческим STARD1 составляет 87%; приведены значения для остатка Ser185, обсуждаемого в работе [20], а также для STARD3, который по данным работы [209] является партнером 14-3-3. В [Таблице 10](#) представлена тепловая карта для потенциальных сайтов узнавания 14-3-3 в STARD1 человека и мыши, полученная на основе представленных в [Приложении 7](#) и [Приложении 8](#) рассчитанных значений вероятности узнавания белками 14-3-3 и фосфорилирования PKA указанных сайтов.

Табл. 10. Поиск в последовательности белков STARD1 и STARD3 потенциальных сайтов узнавания белками 14-3-3. Вероятность узнавания белками 14-3-3 и фосфорилирования РКА указанных сайтов обозначена градиентом цвета от красного (низкая) до зеленого (высокая). Оценка отражает итоговую вероятность взаимодействия с 14-3-3 на основе программ *14-3-3-Pred* [151] и *SCANSITE 4.0* [211] от наиболее вероятного “++” до наименее вероятного “-”. Для сравнения приведены вероятности узнавания белками 14-3-3 и фосфорилирования РКА для участка вокруг Ser186 у человека (*) и гомологичного ему остатка Ser185 у мыши (**), который был описан в работе [20], а также для участка вокруг Ser395 STARD3 человека (***) - участка связывания STARD3 с белками 14-3-3 по данным работы [209].

№	Сайт	Последовательность	Расположение	14-3-3- Pred [151]	SCANSITE 4.0 [211]		Оценка
					14-3-3	РКА	
STARD1 человека (Uniprot ID P49675)							
1	S ²⁷⁷	HLRKRL p SHPASEAR	START-домен				-
2	S ⁵⁷	NQVRRRS p SLLGSRLE	N-концевой пептид				++
3	S ⁵⁶	INQVRRRS p SLLGSRL	N-концевой пептид				-/+
4	S ¹⁹⁵	RCAKRRG p STCVLAGM	START-домен				+
5	T ¹⁹⁶	CAKRRGS p T T CVLAGMA	START-домен				-
*	S ¹⁸⁶	VGPRDFV p SVRCAKRR	START-домен				-
STARD1 мыши (Uniprot ID P51557)							
1	S ⁵⁶	GQVRRRS p SLLGSQLE	N-концевой пептид				++
2	S ⁵⁵	MGQVRRRS p SLLGSQLE	N-концевой пептид				-/+
3	S ¹⁹⁴	RCTKRRG p STCVLAGM	START-домен				+
4	T ¹⁹⁵	CTKRRGS p T T CVLAGMA	START домен				-
**	S ¹⁸⁵	VGPRDFV p SVRCTKRR	START домен				-
***STARD3 человека (Uniprot ID Q14849)							
	S ³⁹⁵	FIVLKSA p SNPRVCTF	START домен				-

Несмотря на то, что обе программы выделяют остаток Ser²⁷⁷ STARD1 человека как потенциальный сайт узнавания 14-3-3, рассчитанная вероятность его фосфорилирования РКА крайне мала. Поскольку данный сайт располагается в С-концевой α-спирали, не является консервативным среди ортологов STARD1 и, например, у мышиноного STARD1 отсутствует (Приложение 4), мы исключили его из дальнейшего рассмотрения. Участие сайта Thr196 в связывании с 14-3-3 также представляется маловероятным, так как участок ¹⁹³RGSTCV¹⁹⁸ имеет самое слабое сходство с мотивом 14-3-3 и также не является оптимальным для

фосфорилирования PKA. Аналогичная ситуация наблюдается в случае сайта Ser186, который был идентифицирован ранее как сайт узнавания 14-3-3 [20], однако не предсказывается программами *14-3-3-Pred* и *SCANSITE 4.0*. как наиболее вероятный (тем не менее для наглядности он также был включен в [Таблицу 10](#) и [Приложение 8](#)). Наконец, участки вокруг остатков Ser56, Ser57 и Ser195 предсказываются как наиболее вероятные сайты узнавания белками 14-3-3 согласно обеим программам. Однако наибольшие оценки вероятности фосфорилирования PKA получили остатки Ser57 и Ser195, что находится в полном соответствии с экспериментальными данными [19,131]. Основываясь на вышеперечисленном, мы предположили, что из пяти обнаруженных *in silico* потенциальных сайтов только Ser57 и Ser195 могут быть вовлечены в образование комплекса с белками 14-3-3.

Как уже отмечалось в [Подразделе 1.10](#), Я. Агхзадех и соавторы предположили [20], что *мономер* 14-3-3 связывает *нефосфорилированную* форму STARD1, а дальнейшая диссоциации комплекса STARD1/14-3-3 сопровождается фосфорилированием STARD1 по остатку Ser195 (в обсуждаемой статье [20] указан остаток Ser194, т.к. там нумерация приведена для мышинового STARD1). Выше отмечалось, что, по данным работы [209], не только STARD1, но и его ближайший гомолог STARD3 способен взаимодействовать с белками 14-3-3. В этом случае было постулировано, что взаимодействие с 14-3-3 также не зависит от фосфорилирования START-домена STARD3, и обеспечивается за счет узнавания совершенно другого, неконсервативного мотива - $^{392}\text{KSASNP}^{397}$, присутствующего только в STARD3. Таким образом, в обеих работах было указание на узнавание белками 14-3-3 именно *нефосфорилированного* START-домена, что вызывало некоторые сомнения и требовало более детального изучения.

3.4.2.3. Исследование взаимодействия STARD1 и 14-3-3 методом аналитической гель-фильтрации

Для исследования взаимодействий START-домена белков STARD1 и STARD3 с 14-3-3 мы использовали метод аналитической гель-фильтрации. Для этого 14-3-3 (димер или мономер), STARD1₆₆₋₂₈₅ (или STARD3₂₁₆₋₄₄₄) или их смесь наносили на гель-фильтрационную колонку и следили за поглощением при 280 нм (или 298 нм, если высокая концентрация наносимого белка приводила к зашкалу на профиле элюции при 280 нм) ([Рис. 34](#)). В случае образования комплекса STARD1/14-3-3 ожидали появление нового пика, соответствующего белковому

комплексу - частицам с большей кажущейся молекулярной массой, а также уменьшение амплитуды пиков свободных белков.

Как видно на [Рис. 34А](#) и Б профили элюции для смеси 14-3-3/STARD1₆₆₋₂₈₅ и 14-3-3/STARD3₂₁₆₋₄₄₄ были равны алгебраической сумме профилей элюции отдельных белков, что свидетельствовало об отсутствии взаимодействия между белками. Другими словами, мы показали, что мономерная и димерная формы 14-3-3 не взаимодействуют с нефосфорилированным START-доменом белков STARD1 и STARD3.

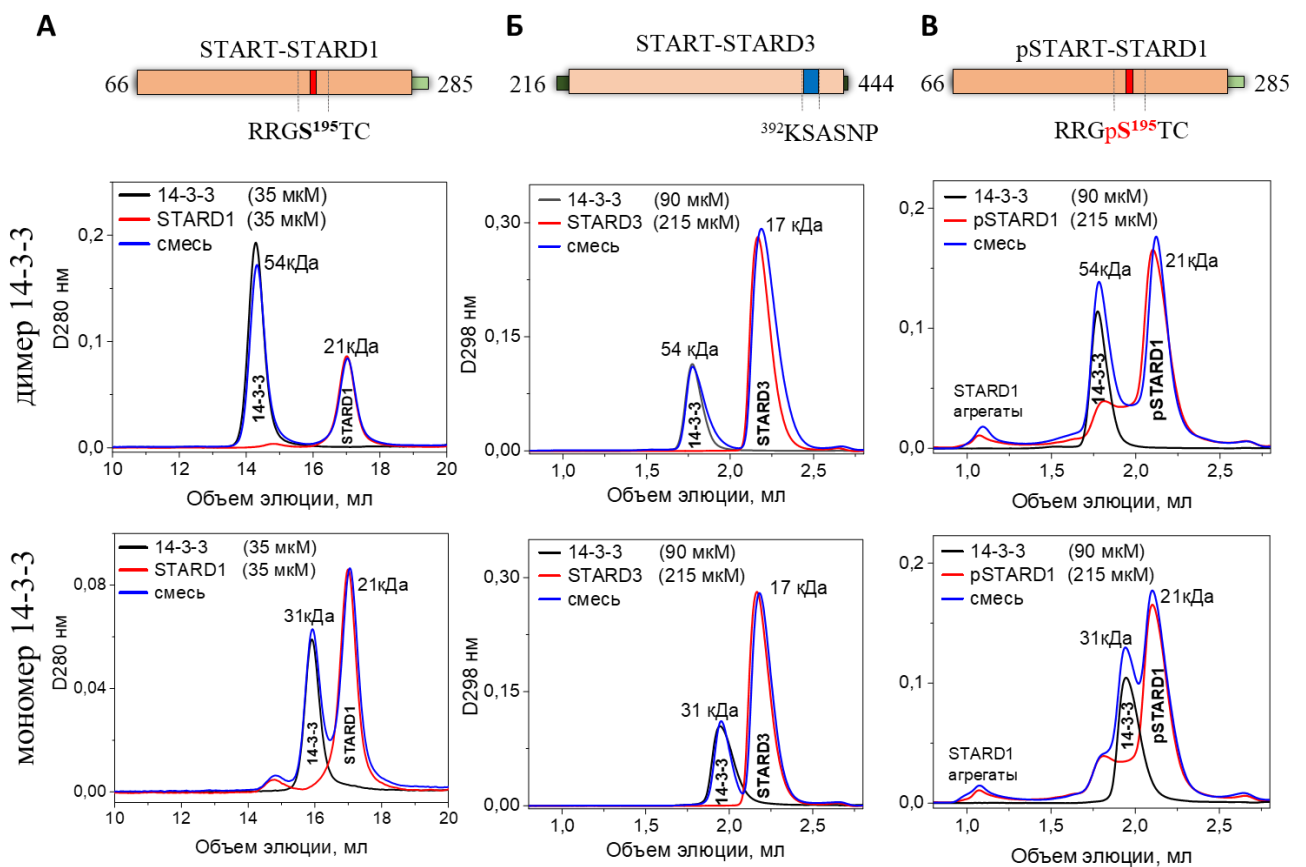


Рис. 34. Анализ возможности взаимодействия между белками 14-3-3 и START-доменом белков STARD1 (**А** и **В**) и STARD3 (**Б**). **А** и **Б**. Профили элюции 14-3-3, нефосфорилированного STARD1₆₆₋₂₈₅ (или STARD3₂₁₆₋₄₄₄) и их смеси. **В**. Профили элюции 14-3-3 и фосфорилированного STARD1₆₆₋₂₈₅ и их смеси. Во всех случаях профили элюции для димерной формы 14-3-3 указаны на верхней панели, для мономерной - на нижней. Конструкции STARD1 и STARD3, проанализированные в данных экспериментах, схематически изображены над соответствующими профилями элюции и демонстрируют расположение предполагаемых участков взаимодействия. Профили, изображенные на панели **А**, были получены на гель-фильтрационной колонке Superdex 200 Increase 10/300 при скорости 0,5 мл/мин, при $\lambda = 280$ нм, на панелях **Б** и **В** - на колонке Superdex 200 Increase 5/150 при скорости 0,1 мл/мин, при $\lambda = 298$ нм. Значения $MM_{\text{каж}}$, рассчитанные по калибровке колонок, указаны в кДа.

Так как 14-3-3 в подавляющем большинстве случаев связывают фосфорилированные формы белков-партнеров [205,212–214], мы подвергли гель-фильтрации также смесь 14-3-3 с фосфорилированным STARD1₆₆₋₂₈₅ (pSTARD1₆₆₋₂₈₅), который содержит основной фосфорилированный участок Ser195, фосфорилирование которого сопутствует началу стероидогенеза [19]. К нашему удивлению, фосфорилирования по Ser195 также было недостаточно для взаимодействия START-домена STARD1 с 14-3-3 ([Рис. 34В](#)). Аналогично, введение фосфоимитирующей замены S195E в STARD1 (STARD1₆₆₋₂₈₅-S195E) не привело к взаимодействию с 14-3-3 (эти данные не приведены в работе).

Важной особенностью универсальных регуляторных белков 14-3-3 является их склонность к связыванию мотивов, расположенных в протяженных разупорядоченных участках [215,216]. Как видно из структуры STARD1 (PDB *3P0L*) ([Рис. 35А](#)), остаток Ser195 находится в петле β_6 - β_7 , которая имеет ограниченный размер и гибкость, чего может быть недостаточно для эффективного связывания в амфипатической бороздке 14-3-3 (в месте связывания участков белков-партнеров) без дополнительных конформационных перестроек соседних β_6 - и β_7 -структур. Это предположение было подтверждено полученной в нашей лаборатории кристаллической структурой белка 14-3-3 с пептидным фрагментом STARD1 RRGpS¹⁹⁵TCVLA (PDB *6T5F*) ([Рис. 35Б](#), синий и желтый цвета), из которой следует, что данный пептид связывается в канонической развернутой конформации, характерной для комплексов 14-3-3 с фосфопептидами различных партнеров и, одновременно с тем, сильно отличающейся от той, которую этот пептид имеет в составе интактного START-домена белка STARD1 ([Рис. 35Б](#), бирюзовый цвет). Полученная кристаллическая структура (PDB *6T5F*) в совокупности с нашими данными гель-фильтрации ставят под сомнение предположение, согласно которому 14-3-3 взаимодействует с нативным START-доменом. Напротив, Ser57, второй потенциальный сайт связывания 14-3-3 и сайт фосфорилирования STARD1 *in vivo*, находится в длинном N-концевом пептиде ([Рис. 35А](#)) и более вероятно, что он играет роль 14-3-3-связывающего остатка. Подтверждением того, что участок вокруг Ser57 потенциально может быть связан в амфипатической бороздке 14-3-3, является полученная в нашей лаборатории за рамками данной работы кристаллическая структура комплекса 14-3-3 с соответствующим фосфопептидом ⁵⁴RRSpS⁵⁷LLGSR⁶² (PDB *6T5H*). В дополнение к этому, среди описанных белков-партнеров 14-3-3 есть белки с похожими участками узнавания 14-3-3: проапоптотический белок человека

Bcl-2-like protein 11 (UniProt ID *O43521*) RRS^{pS}⁸⁷LLSRS [217] и RAB11 family interacting protein 1 (UniProt ID *Q6WKZ4*) RRS^{pS}⁴³⁵LLSLM [218]. На основании вышесказанного, для дальнейшей работы и проверки роли остатка Ser57 во взаимодействии STAR¹D1 и 14-3-3 мы получили конструктор STAR¹D1₄₆₋₂₈₅-S56A, содержащий помимо остатка Ser195 второй потенциальный сайт взаимодействия с 14-3-3 - остаток Ser57.

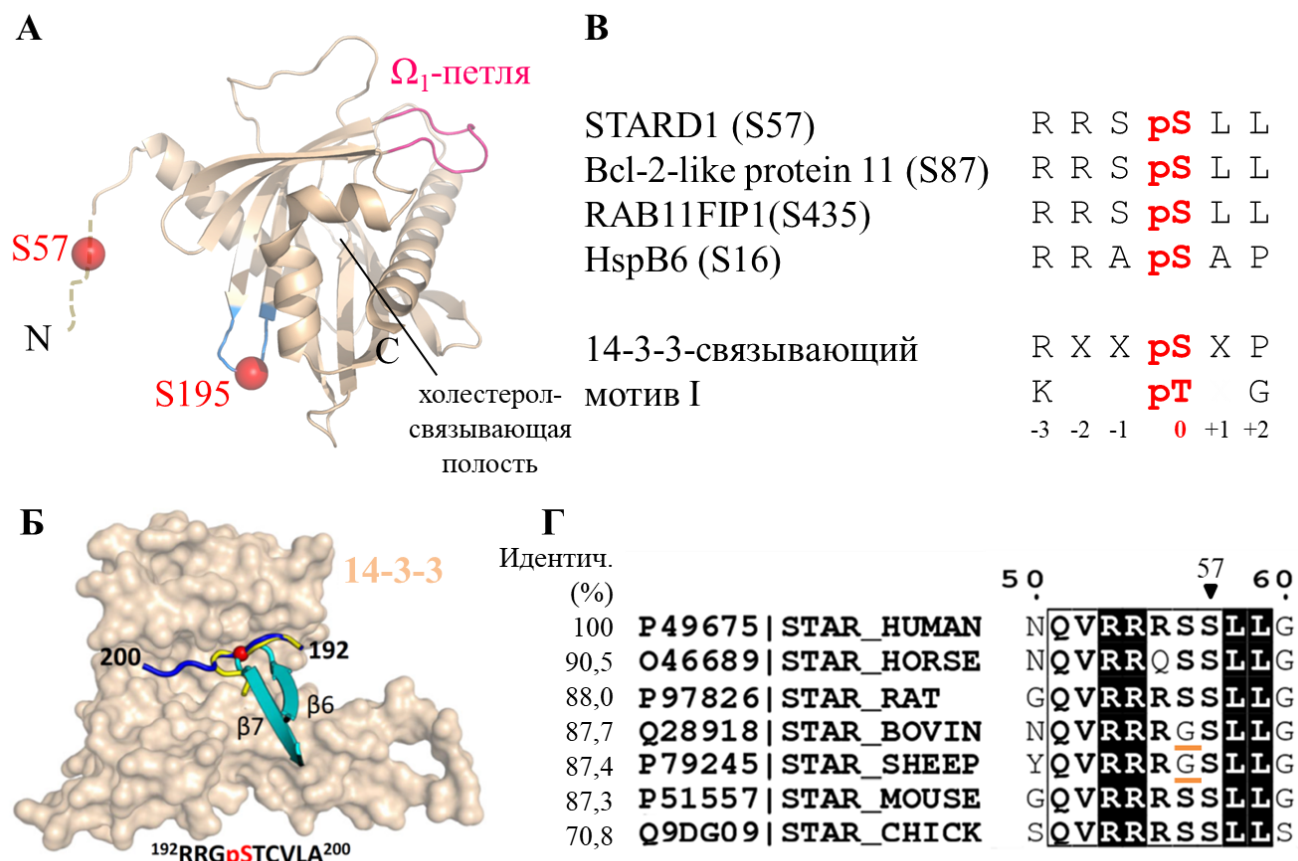


Рис. 35. Предполагаемые сайты связывания 14-3-3 в белке STAR¹D1. **А.** Модель полноразмерного STAR¹D1 на основе кристаллической структуры (PDB *3P0L*) с указанием расположения сайтов фосфорилирования Ser57 и Ser195 (красные кружки), холестерол-связывающей полости и Ω₁-петли, участвующей в связывании лигандов. Короткая петля β₆-β₇, в которой находится остаток Ser195, отмечена синим цветом. Остаток Ser57 расположен в N-концевом пептиде (изображен пунктиром), который отсутствует в кристаллической структуре STAR¹D1 (PDB *3P0L*). **Б.** Сравнение конформаций пептида RRGpS¹⁹⁵TCVLA в комплексе с 14-3-3 (синий и желтый цвета (PDB *6T5F*)) и в составе интактного STAR¹-домена STAR¹D1 (бирюзовый цвет, по данным кристаллической структуры STAR¹D1 (PDB *3P0L*)). Модели нарисованы в программе *Pymol* 2.20. **В.** Сравнение канонической последовательности 14-3-3-связывающего мотива I с пептидами белков STAR¹D1 (вокруг Ser57), Bcl-2-like protein 11 (Ser87), RAB11FIP1 (Ser435) и HspB6 (Ser16). **Г.** Фрагмент множественного выравнивания (50-60 аминокислотные остатки) полноразмерных белков-ортологов STAR¹D1 с указанием их степени идентичности (в процентах) относительно последовательности STAR¹D1 человека. Аминокислотные остатки, идентичные в соответствующей позиции во всех последовательностях выравнивания, обозначены белым цветом на черном фоне; аминокислотные остатки, идентичные в соответствующей позиции в некоторых последовательностях выравнивания, обозначены жирным шрифтом и заключены в рамку. Выравнивание последовательностей было

построено с использованием программы *Clustal Omega* (<http://www.clustal.org/omega/>), а визуализировано с помощью веб-сервиса *ESPrpt 3.0* [204]. Остаток Ser57 отмечен стрелкой. В белке STARD1 быка (BOVIN) и овцы (SHEEP) остаток Ser56 заменен на Gly (подчеркнуты оранжевыми линиями). Таким образом, в отличие от Ser57, соседний Ser56 является полуконсервативным и вряд ли может претендовать на роль основного регуляторного фосфосайта.

В результате биоинформатического анализа было замечено, что соседний остаток Ser56 является потенциальным сайтом фосфорилирования РКА ([Таблица 10](#)). Хотя нет экспериментальных подтверждений фосфорилирования Ser56 в человеческом STARD1 *in vivo*, были получены данные, свидетельствующие о фосфорилировании STARD1 крысы (*in vitro*) [219] и хомяка (*in vivo*) [220]. Тандемное фосфорилирование соседних остатков в белке-партнере, как известно из литературы [221], мешает взаимодействию с 14-3-3, а из множества кристаллических структур видно, что в бороздке стабильно координируется только один фосфоостаток. Сравнительный анализ первичной последовательности STARD1 белка из разных организмов показал, что Ser56 не является консервативным остатком и, как минимум у быка и овцы заменен на глицин ([Рис. 35Г](#)). Таким образом, в отличие от Ser57, соседний Ser56 является полуконсервативным и вряд ли может претендовать на роль основного регуляторного фосфосайта. В связи с этим мы ввели фосфоблокирующую замену S56A, чтобы избежать артефактного фосфорилирования по Ser56 (далее STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A) и минимизировать гетерогенность получаемых фосфорилированных препаратов белков.

Участок RRApS⁵⁷LL является субоптимальным для узнавания 14-3-3 и может иметь относительно невысокую аффинность для исследований взаимодействия с 14-3-3 *in vitro*. Поскольку он отличается от канонического участка RRApS¹⁶AP из уже хорошо охарактеризованного белка-партнера HspB6 [222] наличием остатка лейцина в положении +2 относительно центрального серина вместо канонического остатка пролина ([Рис. 35В](#)), дополнительно к мутантному варианту STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A, содержащему два потенциальных 14-3-3-связывающих участка (Ser57 и Ser195), было решено также получить мутантный вариант STARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P, в котором первый потенциальный 14-3-3-связывающий участок вокруг Ser57 был канонизирован за счет замены L59P. Фосфорилированные белки экспрессировали и очищали по стандартной схеме, описанной в Подразделах [2.2.3](#) и [2.2.4](#). Эффективность фосфорилирования проверяли методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях в присутствии мочевины и фосфорилирование по обоим участкам подтверждали методом

масс-спектрометрии (Рис. 32Б, В и Г). За взаимодействием между белками STARD1₄₆₋₂₈₅ и 14-3-3 следили с помощью метода гель-фильтрации.

Полученные профили элюции для смеси белков отличались от алгебраической суммы изолированных 14-3-3 и STARD1₄₆₋₂₈₅ и имели плечо в случае pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A (Рис. 36А), и более выраженный пик для pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P (Рис. 36Б). Белок pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A взаимодействовал с обеими изоформами γ и ϵ (Рис. 36А), но прочности комплексов было недостаточно для надежного разделения их пика и пика 14-3-3 методом гель-фильтрации.

Из данных ГФ следует, что оба мутантных варианта pSTARD1 были способны образовывать комплекс с 14-3-3, однако, как и ожидалось, для канонизированного мутантного варианта pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P взаимодействие было значительно сильнее, чем для pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A. Этот эффект однозначно указывал на роль участка вокруг pSer57 в узнавании белками 14-3-3, в пользу чего также указывала полученная в нашей лаборатории кристаллическая структура комплекса 14-3-3 с фосфопептидом RRS⁵⁷LLGSR (PDB 6T5F).

По калибровочной кривой для белков-стандартов мы определили, что время элюции комплекса соответствовало частицам с $MM_{\text{каж}}$, равной 93 кДа. Учитывая, что 14-3-3 представляет собой стабильный димер с $MM_{\text{каж}}$ 53 кДа, а мономер pSTARD1 имеет $MM_{\text{каж}}$ 22 кДа, стехиометрия комплекса близка к 2:2 (один димер 14-3-3 на два мономера pSTARD1). Слабое разделение пиков с $MM_{\text{каж}}$ 53 и 93 кДа, скорее всего, являлось результатом перекрытия трех пиков с кажущимися молекулярными массами 93, 72 и 53 кДа. Извлеченный при декомпозиции пик с $MM_{\text{каж}} = 72$ кДа, вероятно, соответствовал промежуточному комплексу со стехиометрией 2:1 (димер 14-3-3 на мономер pSTARD1). Немного уменьшенное значение $MM_{\text{каж}}$ 93 кДа и 72 кДа по сравнению с алгебраической суммой $53+22+22=97$ кДа или $53+22=75$ кДа могло быть связано с компактизацией pSTARD1 и/или уменьшением свободного вращения неструктурированного N-концевого пептида при связывании с 14-3-3.

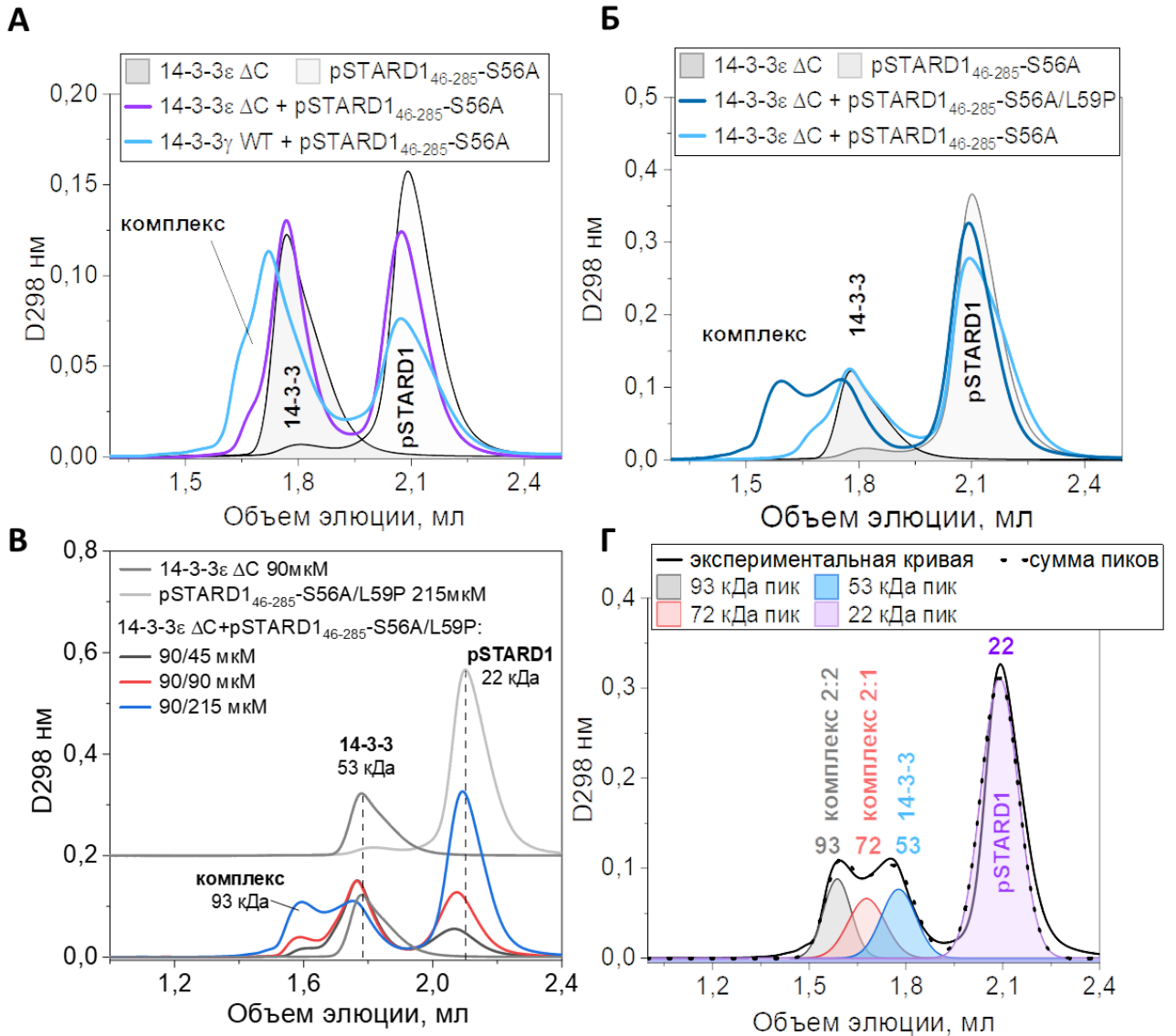


Рис. 36. Взаимодействие pSTARD1, фосфорилированного по Ser195 и Ser57, с 14-3-3. Взаимодействие было проанализировано методом ГФ с использованием pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A или pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P. Отдельные белки или их смеси в указанных молярных концентрациях предварительно инкубировали в течение 20 минут при комнатной температуре и наносили на колонку Superdex 200 Increase 5/150 при скорости потока 0,1 мл/мин. Значения $MM_{каж}$ рассчитанные по калибровке колонки, указаны в кДа. **А.** Взаимодействие 70 мкМ pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A с 77 мкМ 14-3-3ε ΔC или 74 мкМ 14-3-3γ WT (указаны молярные концентрации в расчете на мономер). **Б.** Сравнение связывания 14-3-3ε ΔC с pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A или pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P при заданном соотношении концентраций (90 мкМ 14-3-3 и 215 мкМ STARD1, каждый - в расчете на мономер). **В.** Титрование фиксированной концентрации 14-3-3ε ΔC (90 мкМ) разными концентрациями pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P (45, 90 или 215 мкМ). **Г.** Декомпозиция профиля элюции смеси 90 мкМ 14-3-3ε ΔC и 215 мкМ pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P, позволяющая детектировать два пика комплексов с разной стехиометрией.

Таким образом, из данных гель-фильтрации для смесей 14-3-3 с разными вариантами рSTARD1 белка, следовало, что для взаимодействия с белками 14-3-3 *необходим* остаток рSer57 STARD1, а установленная стехиометрия комплекса 2:2 указывала на то, что остаток рSer195 не вносил существенный вклад во взаимодействие. Наличие большого количества свободного STARD1, обнаруживаемого на профилях элюции смесей с 14-3-3, даже при высоких концентрациях белков, использованных в эксперименте, указывало на относительно низкую прочность комплекса с 14-3-3, что затрудняло провести дальнейшую количественную оценку аффинности комплекса 14-3-3 с рSTARD1 дикого типа. В связи с тем, что комплекс 14-3-3 с рSTARD1 дикого типа демонстрировал меньшую аффинность, чем комплекс 14-3-3 с мутантным вариантом рSTARD1, далее мы сфокусировались на паре рSTARD1₄₆₋₂₈₅S56A/L59P и 14-3-3, чтобы получить “оценку снизу” силы взаимодействия 14-3-3 и рSTARD1.

3.4.2.4. Определение параметров взаимодействия белков STARD1 и 14-3-3 методом поверхностного плазмонного резонанса

Количественную оценку взаимодействия между рSTARD1₄₆₋₂₈₅ и 14-3-3 мы проводили с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР). На сенсорную поверхность за гистидиновый таг были иммобилизованы гомодимер 14-3-3ε ([Рис. 37А](#)) или гетеродимер 14-3-3ε/γ (ввиду уникальной особенности изоформы ε образовывать гетеродимеры с другими изоформами 14-3-3 [144,223]) ([Рис. 37Б](#)). Выбор изоформ был обусловлен тем, что экспрессия именно γ и ε изоформ увеличивается при стероидогенезе [20].

На [Рис. 37](#)(В и Г) представлены сенсограммы, характеризующие кинетики связывания рSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P с иммобилизованным 14-3-3 и диссоциации образуемых этими белками комплексов.

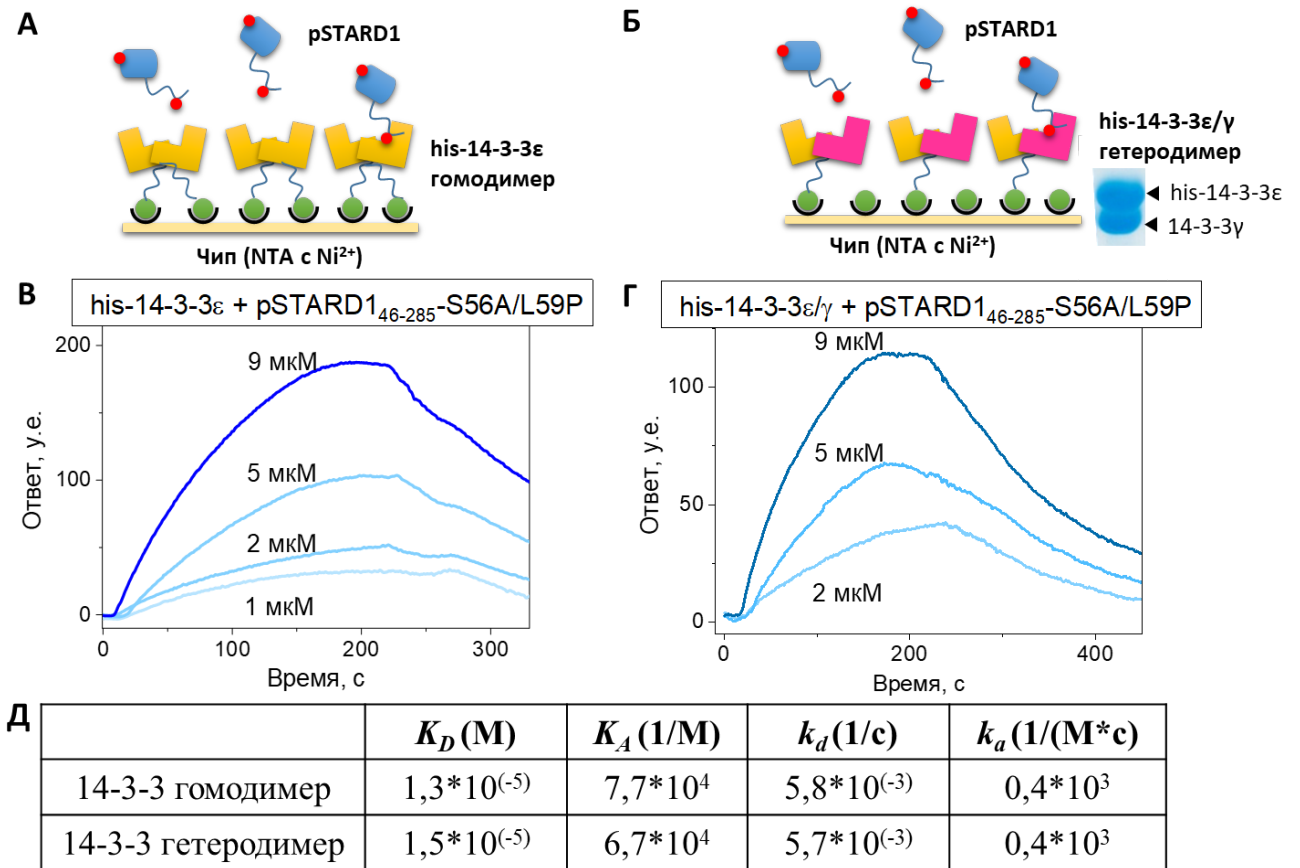


Рис. 37. Определение параметров связывания pSTARD1 с гомодимером 14-3-3ε и гетеродимером 14-3-3ε/γ методом поверхностного плазмонного резонанса. Схематическое изображение взаимодействия pSTARD1 с иммобилизованным на чипе Ni-NTA гомодимером 14-3-3ε (А) или гетеродимером 14-3-3ε/γ (Б). В и Г - сенсограммы, полученные для различных концентраций pSTARD1. Д. Кинетические и равновесные константы взаимодействия pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P с 14-3-3ε и ε/γ.

После ряда преобразований сенсограмм для pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/L59P с 14-3-3ε и ε/γ, математическая основа которых описана в [Подразделе 2.6.2.2.](#), были получены кажущиеся равновесные константы диссоциации K_D , равные 13 мкМ и 15 мкМ, соответственно ([Рис. 37Д](#)). Повышенная склонность к агрегации белка pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A не позволила получить сенсограммы, однако, учитывая данные гель-фильтрации (см. [Подраздел 3.4.2.3.](#)), можно предположить, что значение K_D для пары pSTARD1₄₆₋₂₈₅-S56A/14-3-3 будет выше. Полученные значения K_D лежат в том же диапазоне, что в недавно опубликованной работе [222] константа диссоциации для 14-3-3 с монофосфорилированным пептидом RRApS¹⁶AP от белка HspB6 (2-6 мкМ).

Так как известно, что наличие двух фосфосайтов значительно увеличивает сродство к 14-3-3, полученные результаты со столь высокими значениями K_D указывают на то, что только один сайт (pSer57) участвует в связывании с 14-3-3. Это согласуется с нашими данными гель-фильтрации (см. [Подраздел 3.4.2.3.](#)).

3.4.2.5. Исследование взаимодействия 14-3-3 и STARD1 с помощью анизотропии флуоресценции NBD-холестерола

Чтобы ответить на вопрос, способен ли pSTARD1 в составе комплекса с 14-3-3 связывать стероидный лиганд, т.е. сохраняется ли конформация START-домена нативной, мы измерили скорость релаксации анизотропии флуоресценции лиганда 22NBD в трех разных состояниях: в свободном ([Рис. 38А](#)), в составе двойного комплекса с дважды фосфорилированным STARD1 ([Рис. 38Б](#)) и в составе тройного комплекса pSTARD1/14-3-3 ([Рис. 38В](#)).

В отсутствие белков флуоресценция 22NBD была сильно затухана молекулами растворителя. Время релаксации анизотропии флуоресценции составило 115 ± 23 пс ([Рис. 38А](#)), что соответствует быстровращающимся молекулам флуорофора [224]. Добавление 10-кратного молярного избытка фосфорилированного STARD1 привело к 116-кратному увеличению сигнала флуоресценции NBD-группы и увеличило время релаксации ([Рис. 38Б](#)). Характер кривой затухания 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 коррелирует с формированием лиганд-белкового комплекса. Теоретическое значение времени корреляции для идеальной сферической частицы с массой 27 кДа по формуле Перрена [224] оценивается в 11 нс. Присутствие быстрой компоненты τ_1 указывает на то, что 22NBD сохраняет способность вращаться со скоростью, сопоставимой со скоростью вращения свободного лиганда. В данном эксперименте регистрация свободного вращения несвязанного лиганда представляется маловероятной по следующим соображениям. Во-первых, из данных литературы [60] и наших данных следует, что аффинность комплекса pSTARD1/22NBD находится в наномолярном диапазоне. Поэтому в условиях 10-кратного избытка pSTARD1 ожидается, что подавляющее большинство молекул 22NBD находится в комплексе с белком. Во-вторых, логично предположить, что незначительный сигнал флуоресценции от свободного NBD-лиганда крайне сложно детектировать в присутствии фракции молекул NBD-лиганда, связанных с белком. С

учетом вышесказанного, вероятнее всего, τ_1 отражает вращение флуорофора именно внутри полости белка, а не свободное вращение несвязанного лиганда. Это косвенно указывает на неоднозначность ориентации молекул лиганда в полости STARD1 или на свободное вращение NBD-группы вокруг N-C связи с боковой цепью холестерина.

В присутствии 10-кратного избытка 14-3-3 γ над pSTARD1 мы наблюдали также двухфазную кривую затухания 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. 38В](#)). 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. В условиях 10-кратного избытка pSTARD1 и 100-кратного избытка 14-3-3 над лигандом 22NBD, скорее всего, формируется тройной комплекс 22NBD/pSTARD1/14-3-3 со стехиометрией 1:1:2, а также присутствует большой избыток свободных молекул STARD1 и 14-3-3, с которыми не ассоциирован флуоресцентный сигнал. При этом время релаксации анизотропии флуоресценции для лиганда 22NBD в составе тройного комплекса (40 нс) почти равно теоретическому значению времени корреляции для 85 кДа частицы идеальной сферической формы (35 нс). Здесь, как и в двойном комплексе, наличие быстрой компоненты τ_1 (72 ± 6 пс), по-видимому, свидетельствует о том, что связывание 14-3-3 не препятствует вращению NBD-группы в холестерол-связывающей полости pSTARD1, и косвенно указывает на неоднозначность ориентации лиганда в полости STARD1 или на свободное вращение NBD-группы вокруг N-C связи с боковой цепью холестерол.

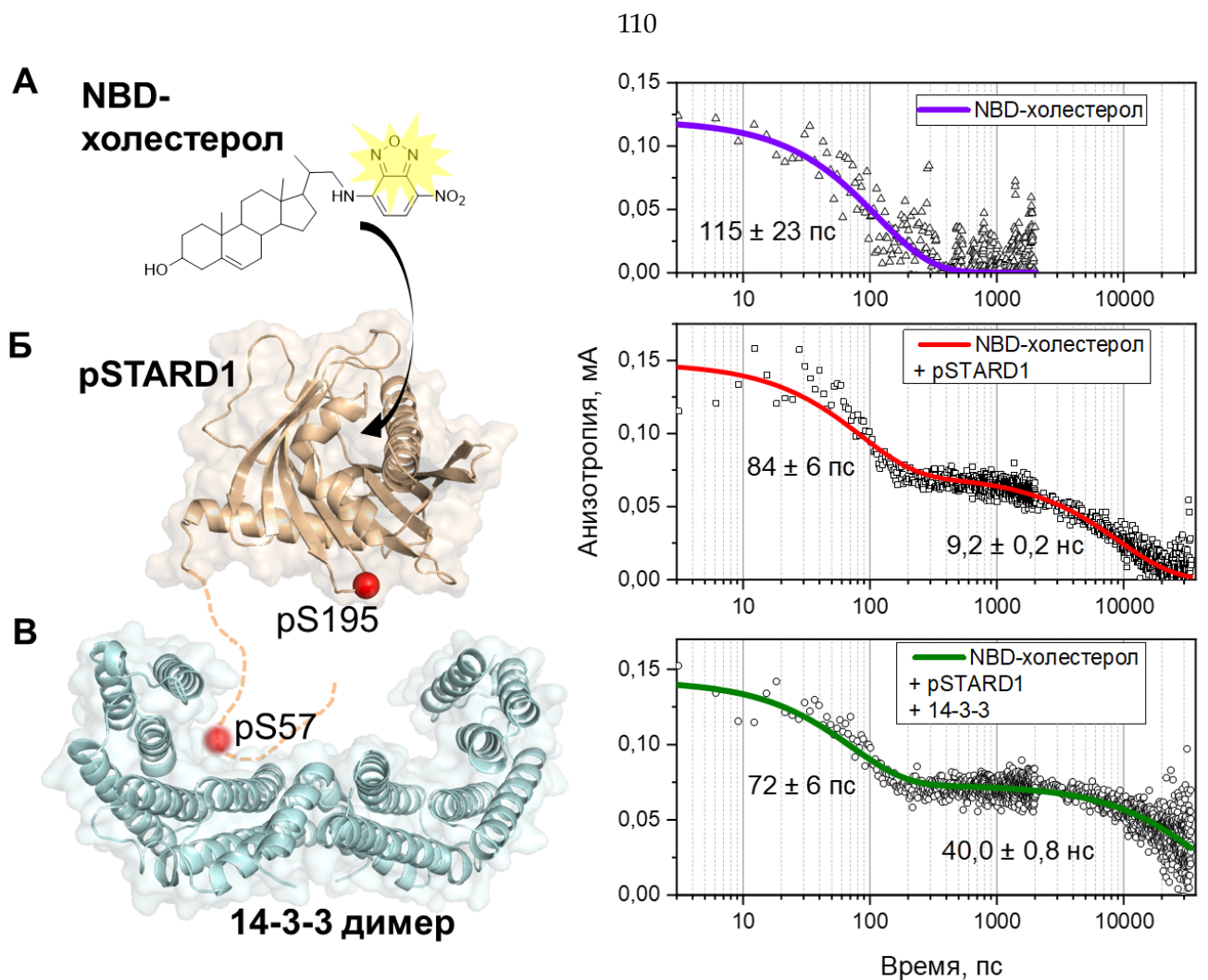


Рис. 38. Сравнение кинетики релаксации анизотропии флуоресценции свободного NBD-холестерола (**A**) и в составе двойного (**Б**) и тройного комплекса (**В**). Слева схематично изображено состояние NBD-лиганда, которое отражает соответствующие кривые кинетики релаксации анизотропии флуоресценции (справа), зарегистрированные с помощью системы счета единичных фотонов с пикосекундным разрешением.

Таким образом, данные результаты подтверждают предположение, 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, расположенный в короткой петле в лиганд-связывающем домене STARD1, не вносит существенный вклад во взаимодействие с 14-3-3. Возможно, для связывания pSer195 требуется более значительные конформационные перестройки STARD1, которые могут происходить, например, при транспортировке в митохондрию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стероидогенный регуляторный белок STARD1 играет ключевую роль в процессе синтеза стероидных гормонов и по праву является актуальным объектом для исследований уже на протяжении нескольких десятилетий. Несмотря на большой интерес научного сообщества к STARD1, достоверной информации о нем мало. Новые данные о принципах функционирования STARD1 могли бы быть полезны, например, в разработке подходов для лечения липоидной врожденной гиперплазии надпочечников (LCAH) или в создании противоопухолевых лекарств, направляемых в митохондрии.

В рамках данной работы с использованием классических и современных методов мы провели глубокий анализ свойств и функциональных особенностей STARD1. Так как одной из основных сложностей в исследованиях STARD1 долгое время являлась повышенная склонность STARD1 формированию телец включения и к агрегации, мы начали исследование с разработки методики получения рекомбинантного белка STARD1 в растворимой форме и в количестве, достаточном для исследований. Нами было показано, что экспрессия в виде химерного белка с мальтозо-связывающим белком (MBP) заметно увеличивает растворимость STARD1, что отменяет необходимость подвергать его денатурации-ренатурации мочевиной при выделении из клеток *E. coli*. В подобранных условиях нам удалось получить препарат STARD1, который, по данным кругового дихроизма, флуоресцентной спектроскопии, гель-фильтрации и МУРР, обладает характеристиками, соответствующими нативному белку.

С использованием метода МУРР нам также удалось проверить некоторые гипотезы, которые касаются механизма захвата холестерина - природного лиганда STARD1. Наши данные указывают на то, что, во-первых, белок обладает компактной структурой, которая не претерпевает спонтанные конформационные изменения, и, во-вторых, подтверждают результаты моделирования, согласно которым, для связывания холестерина достаточно отгибания небольшой Ω_1 -петли.

Следующим этапом работы было сравнение коммерчески доступного флуоресцентного аналога холестерина 22NBD с рядом других аналогов холестерина, которые отличались по наличию 3-ОН-группы и длины алифатического хвоста. В ходе экспериментов было обнаружено влияние положения NBD-группы на взаимодействие STARD1 с NBD-аналогом холестерина. Оказалось, что коммерчески доступный и широко используемый лиганд 22NBD не

является оптимальным по величине флуоресцентного отклика при связывании со STARD1. Обладая параметрами связывания, сопоставимыми с таковыми для холестерина, новый лиганд 20NBD, вероятно, является более перспективным репортером, например, для исследований взаимодействия STARD1 с другими оптически неактивными соединениями.

Наконец, в работе было проведено исследование взаимодействия STARD1 с универсальными регуляторными белками 14-3-3. Несмотря на то, что, по данным литературы, 14-3-3 вовлечены в регуляцию активности STARD1, напрямую это показано не было. С помощью серии мутантных форм STARD1 мы показали, что присутствия фосфорилированного остатка Ser195 недостаточно для его узнавания и связывания с белками 14-3-3, в то время как наличие фосфорилированного остатка Ser57, наоборот, играет критическую роль в формировании комплекса pSTARD1/14-3-3. Дальнейшее исследование параметров связывания pSTARD1 с белками 14-3-3 позволило предположить, что, по-видимому, взаимодействие 14-3-3 и pSTARD1 - транзистентное, с кажущейся константой диссоциации комплекса, находящейся в микромолярном диапазоне.

Согласно нашим результатам и данным литературы, мы предполагаем следующий механизм функционирования STARD1 ([Рис. 39](#)): под действием тропных гормонов STARD1 синтезируется *de novo* вблизи митохондрий и направляется к трансдуцесоме (1) (трансдуцесома, содержащая, в том числе, PKA (RI α) и белки 14-3-3, обозначена вопросительным знаком). PKA (RI α) фосфорилирует STARD1 по остаткам Ser57 и Ser195, после чего 14-3-3 связывают 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 трансдуцесомы способствует переносу холестерина в IMM к ферменту P450_{scs} через циклы разворачивания/сворачивания (3), до тех пор, пока его не узнают белки TOM-TIM (4) для импорта в митохондрию (5). Бидентатное связывание развернутого pSTARD1, фосфорилированного по сайтам Ser57 и Ser195, с димером 14-3-3 защищает pSTARD1 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 pSTARD1 из свернутого (folded) состояния в развернутое (unfolded), что, как предполагается, необходимо для транспорта холестерина.

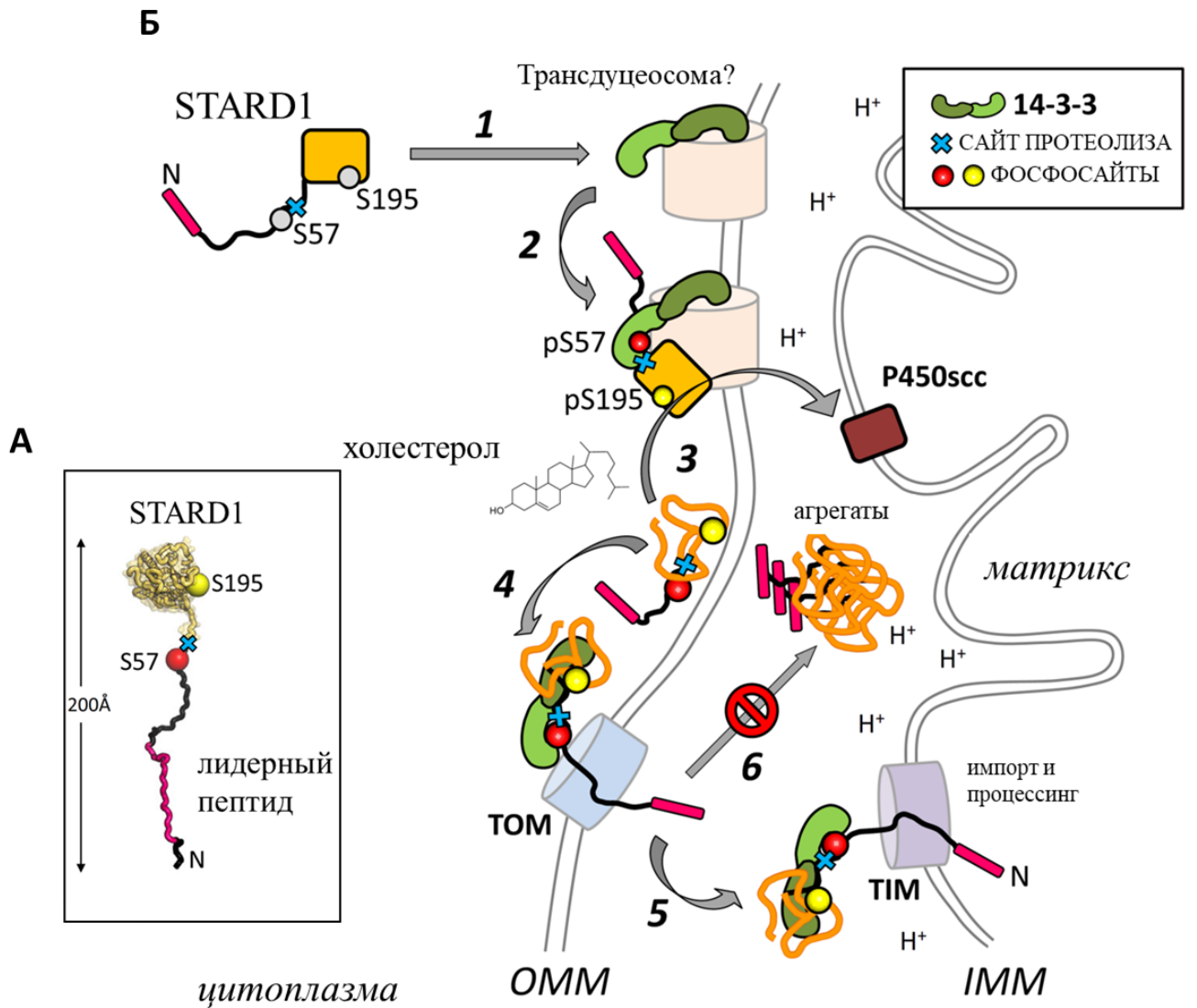


Рис. 39. Возможный механизм регуляции активности STARD1 белками семейства 14-3-3. **А.** Модель полноразмерного STARD1 (остатки 1-285), построенная с помощью *BioSerf* [225]. Изображены реальные пропорции N-концевого лидерного пептида и функционального домена STARD1. Голубым крестиком отмечено предполагаемое место протеолиза. Остатки Ser57 и Ser195, которые подвергаются фосфорилированию РКА 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. ТОМ и ТИМ - 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ 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 холестерина-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). - C. 257-257.

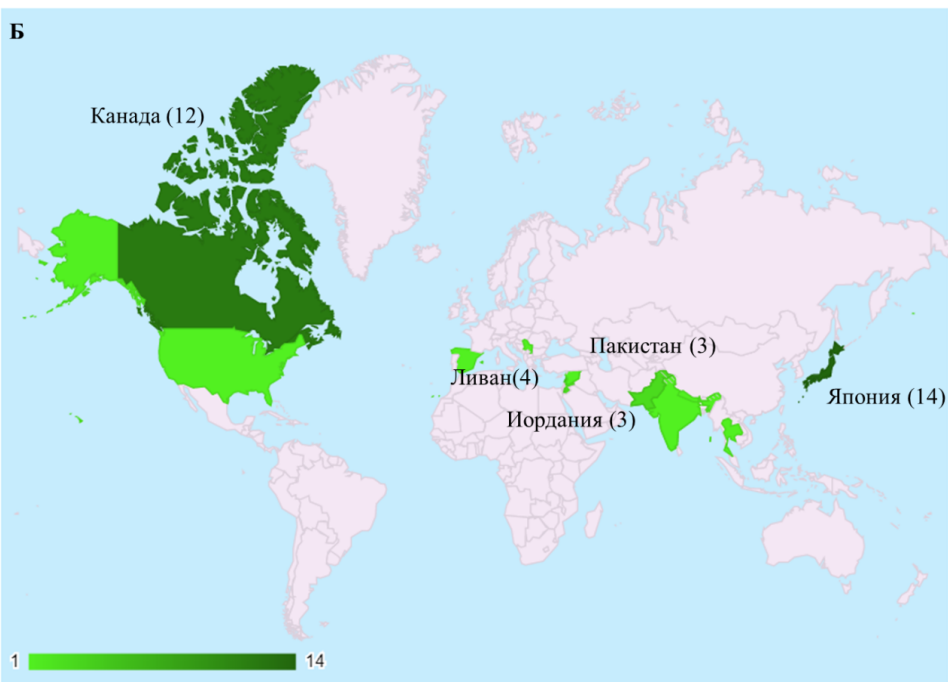
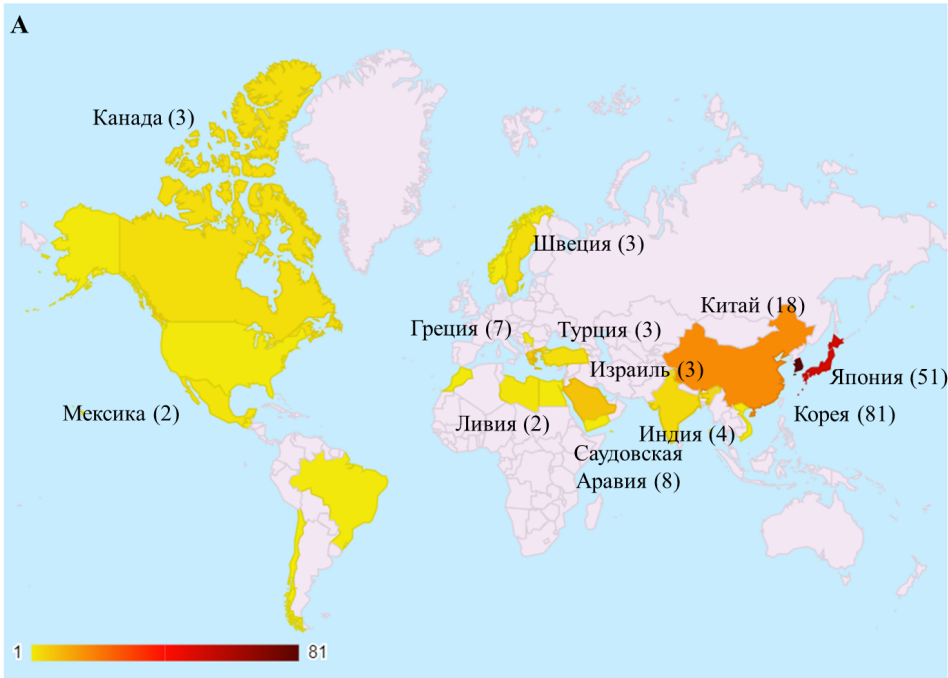
ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Основные стероидные гормоны человека и их физиологическая роль (по [226]).

Стероидогенные клетки	Тропный гормон	Примеры гормонов (класс стероидных гормонов)	Физиологическая роль
Яичники			
Гранулезные клетки	Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Эстрадиол (эстрогены)	Развитие яичников, вторичных женских половых признаков, овуляция, регуляция сердечно-сосудистой системы, поддержание целостности костей, рост нейронов
Гранулезные клетки	Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	Прогестерон (прогестины)	Рост фолликул, овуляция, регуляция менструального цикла, поддержание беременности на ранних сроках
Текальные клетки	ЛГ	Тестостерон, андростендион (андрогены)	Предшественники эстрогенов
Семенники			
Клетки Лейдига	ЛГ	Тестостерон, дигидротестостерон (андрогены)	Сперматогенез и половое развитие, развитие вторичных мужских половых признаков, рост мышечной массы и волос на теле, уменьшение риска развития остеопороза
Надпочечники			
Клетки клубочковой зоны	Адренокортикотропный гормон (АКТГ), К ⁺ , ангиотензин II	Альдостерон (минералокортикоиды)	Повышение кровяного давления и объема жидкости в организме, увеличение реабсорбции Na ⁺ , увеличение секреции K ⁺ и H ⁺
Клетки пучковой зоны	АКТГ	Кортизол (глюкокортикоиды)	Повышение кровяного давления и захвата Na ⁺ , адаптация к стрессу, регуляция метаболизма углеводов, белков и липидов, формирование воспалительных реакций
Клетки сетчатой зоны	АКТГ	Андростендион, дигидротестостерон (андрогены)	Функция недостаточно изучена, но, возможно, участвуют в регуляции минеральной плотности костей, мышечной массы
Плацента			
Трофобласты	Пептидные факторы роста, цАМФ	Прогестерон, эстрогены	Поддержание беременности
Мозг			
Нейроны, глиальные клетки, клетки Пуркинье	Нейротрансмиттеры, нейропептиды	Прогестерон, эстрадиол, дегидроэпиандростерон, аллопрегнанолон, аллотетрагидродеоксикортикостерон	Регуляция пролиферации, дифференциации, активности и выживаемости нервных клеток, поддержание нейроэндокринных и метаболических процессов

Карты распространения *классической (А)* и *неклассической (Б)* формы заболевания ЛСАН. Страны, в которых были описаны случаи заболевания в период 1995-2020 гг., обозначены цветом согласно градиенту. Те страны, в которых описано более 1 случая, обозначены на карте с указанием количества больных людей в скобках. Карты созданы с помощью плагина *Google Chrome Visualization: GeoChart* (<https://developers.google.com/chart/interactive/docs/gallery/geochart>).



Множественное выравнивание последовательностей START-доменов белков STARD1₆₆₋₂₈₅ (Uniprot ID *P49675*), STARD2₁₋₂₁₄ (Uniprot ID *Q9UKL6*), STARD3₂₁₆₋₄₄₅ (Uniprot ID *Q14849*), STARD4₁₋₂₀₅ (Uniprot ID *Q96DR4*), STARD5₁₋₂₁₃ (Uniprot ID *Q9NSY2*), STARD6₁₋₂₂₀ (Uniprot ID *P59095*), STARD7₁₁₂₋₃₂₇ (Uniprot ID *Q9NQZ5*), STARD8₈₀₉₋₁₀₁₇ (Uniprot ID *Q92502*), STARD9₄₄₈₃₋₄₇₀₀ (Uniprot ID *Q9P2P6*), STARD10₁₄₋₂₂₄ (Uniprot ID *Q9Y365*), STARD11₃₈₉₋₆₁₈ (Uniprot ID *Q9Y5P4*), STARD12₁₃₁₄₋₁₅₂₁ (Uniprot ID *Q96QB1*), STARD13₈₉₉₋₁₁₀₇ (Uniprot ID *Q9Y3M8*), STARD14₃₇₅₋₅₈₅ (Uniprot ID *Q8WXI4*), STARD15₃₄₀₋₅₄₉ (Uniprot ID *Q8WYK0*), где STARD1 - STARD15 название белка, нижний индекс в названии обозначает границы соответствующего START-домена, в скобках - номер идентификатора в Uniprot (<https://www.uniprot.org/>). Выравнивание последовательностей было построено с использованием программы *Clustal Omega* (<http://www.clustal.org/omega/>), а визуализировано с помощью веб-сервиса *ESPrpt* 3.0 [204]. Идентичные аминокислотные остатки в соответствующих положениях обозначены белым цветом на черном фоне. Сходные по свойствам аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и заключены в рамку.

```

          66      70      80      90      100      110      120
STARD1  . . . . . TLYSDQELAYLQGGEEAMQKALGIL.SNQGEGWKKESQQDNGDKVMSKVV.PDV..GK.VFRLLIEVVVD
STARD2  . . . . . MELAAGSF.SEEQFWE. . . . . ACAELQOPA.LAGADWQLLVETSGISL.YRLLD.KKT..GLYEYKVFGLLE
STARD3  GSDNESDEEVAGKKSFSQAQEREYIROGKEATAVDQIL.AQENWKFQKNNYEGDITVYITIEV.PFH..GK.TFILKTEILP
STARD4  . . . . . MEGLSD. . . . . VASFATKLKNTLIQHSIEEDKRWVAKKTKDVTWNRKPS.EFN..GY.LYKAQGGVID
STARD5  . . . . . MDP.AL. . . . . AAQMSEAVAEMKMLQYR.RDTAGWKICRENGVSVSWRPSV.EFP..GN.LYRGEGLIP
STARD6  . . . . . MD. . . . . FKAIQAQTAQEVLYGN.RDTSGWKVVKTSKKITVSSKASR.KFH..GN.LYRVEGILIP
STARD7  . . . . . F.QSSGVQHHPPEPKAQTEGNEDE.GKEQRWEMVMDKKHFKL.WRRPT.TGT..HLYQYRVFGITIT
STARD8  . . . . . AQAAGVSLSLYMEENIQDLL. . . . . RDAA.ERFKGMSVPGQHTELACRKAP.DGH..PLRLWKASTEVA
STARD9  . . . . . SYQDLAKHVVDTSMD.VMAACSDNL. . . . . HNLFSQ.QATAGWNYQGEEQAVQLYKVFSPTRH..GFLG..AGVVS
STARD10 . . . . . RPYL.GRESVQV.PD..DQDFRSFRSEC.EAEVGNWLTYSRAGVSV.VWQAV.EMDR.TLHKIKCRMCC
STARD11 . . . . . DVHRFSSQVEEMVQN. . . . . HMTYSLODV.GGDANWQLVVEEGEMKV.YRREV.EENGVLDPDLKATHAVK
STARD12 . . . . . GNDSDADYQHFLQDCVDGLF. . . . . KEVK.EKFKGWVSYSTSEQAELESYKKVS.EGP..PLRLWRSVIEVP
STARD13 . . . . . LEESGATFHTYLNHLIQGLQ. . . . . KEAK.EKFKGWVTCSSDNTDILAFKKVG.DGN..PLKWLKASVEVE
STARD14 . . . . . LSVPPWDPNS.QVYLSYNNV. . . . . SSLKML.VAKDNWVLSSEISQVRLYTL. . . . . EDD..KFLSFHMEMVH
STARD15 . . . . . CIHWDISK..QASLSDSNV. . . . . EALKKL.AAKRGWEVTSTVEKIKLYTL. . . . . EEH..DVLVSWVEKHVIG

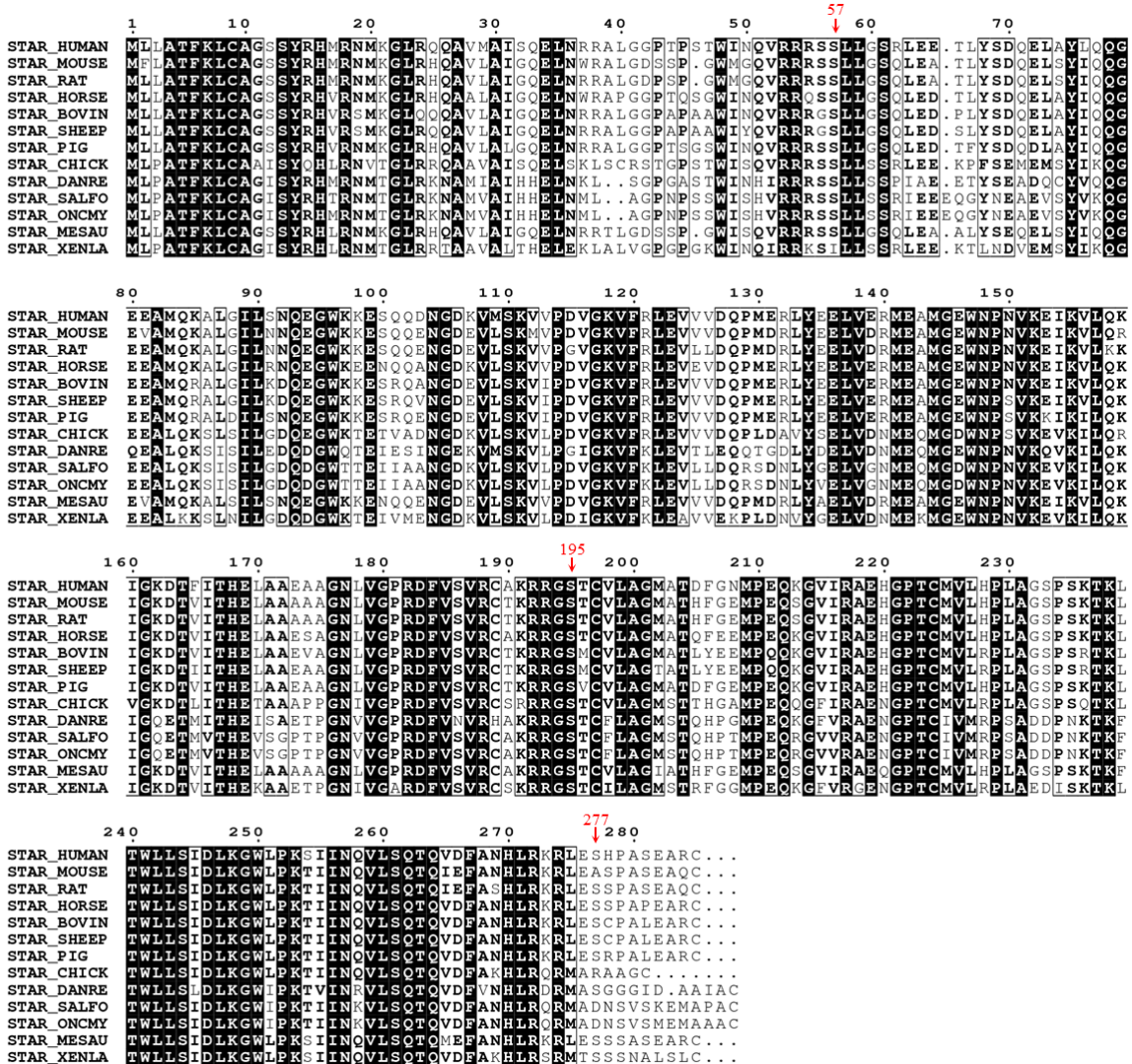
          130      140      150      160      170      180      190
STARD1  .QPMERLYEELVE.RMEAMGGEWNPVKEIKVLIKIGKDT.FITHELAAEAAGNLVGFPRDFVSVRCACR. . . . . RGSTC
STARD2  DCSPPTLLADIYM..DSDYRKWDQYVKELY..EJQECNGETVYVWEVKYPPF..PMSNRDYYVLRQRDL..DMEGRKIH
STARD3  .CPAELVYQEVIL.QPERMVLWNKTVTACQILQVVEDNT.LISYDVSAAGAGGVVSPRDFVSVRRIR. . . . . RRDQY
STARD4  .DLVYSIIDHIR..PGPCRLLDWSLMTSLDILENFEENC.EVMRYTTAGOLWNIISPRDFVDFSYTVG. . . . . YKEGL
STARD5  .GTLEEVWDCVKPAVGGRLVWDENVTFGEILOSITDITL.CVSTRTPSAAAMKLISPRDFVDFLVVVKR. . . . . YEDGT
STARD6  .ESPAKLSDFLY..QTGDRITWDKSLQVYNMVHRIDSDT.FICHTITQSFVAVGSISPRDFDIDLVIYIKR. . . . . YEGNM
STARD7  DVTPTQVFNQVL..DTEYRKKWDALVIKLEVLEDRVVSQSEVLLHWVTHFFPY..PMYSRDFVSVRRYSV. . . . . D.QENMM
STARD8  APPAVVLRHV. . . . . LRERALWDEDLIRAQVLEALMPGV.ELYHYVTDMSA..PHPCRDFVVLRRMRS. . . . . LPRGGC
STARD9  .QPLSRVMAAVS..DPTVMPLLYKPIQATARLHQVTVNSI.SLVYLVNTTLLCALQKPRDFVCCVVEA. . . . . KEGHL
STARD10 DVPAETLYDVLH..DIEYRKKWDSNVLETFDIARLTVNA.DVGYYSWRCPK..PLKNRDVITLRSWLP. . . . . ADY
STARD11 GVTGHEVCNYFW..NVDVNRDWEITENFHVETLADNA.IIYQTHKRV..PASQRDVLVLSVIRKIPALTENDPETW
STARD12 AVPEELKRL. . . . . LKEQHLLWVDLDSKVIIEIDSDT.EIYQYVNSMA..PHPARDYYVLRRTWRTN. . . . . LPKGAC
STARD13 APPSVVLRNV. . . . . LRERHLWDEDFVQWKVVEITLDRQTEIYQYVLSMA..PHPSRDFVVLRTWRTD. . . . . LPKGAC
STARD14 .VDAQAALLLS..DLRQRPEDWKHYRSVEVLOVVEDD..AIYHVTSPALGGHTKPRDFVILASRRK. . . . . CDNGDP
STARD15 .SPAHLAYRLLS..DFTKRPLWDPHEVSCVVIDWVSEDD..QLYHITCPIILND.PFKKDLVVLVSRK. . . . . LKGDPT

          200      210      220      230      240      250      260
STARD1  VLAGM.AIDFG.NMPEQKGVTRAEHG. . . . . PTCMVLHPLAG. . . . . SPSKTKITWLLSIDL..K..GWLPRKSIINQVL
STARD2  VILA.RSTSM.PQLGERSGVTRVKQY. . . . . KQSLAESD. . . . . KKGSKVFMYYFDNP. . . . . GQIPSWLINWAA
STARD3  LSSGI.ATSHS.AKPTTHKYVRGENG. . . . . PGGFLVLEKAS. . . . . NPRVCTFVWILNTDL..K..GRLPYLIHQSL
STARD4  LSCGI. . . . . SLD.WDEKRPEFVRGYNH. . . . . PCGWFCVPLKD. . . . . NPNQSLLTGYIQTDL. . . . . GMIPQASAVDTM
STARD5  ISSNATHVEHP.LCPKPGFVRGFNH. . . . . PCGFCFCEPLG. . . . . EPTKTNLVTFHTDL. . . . . GYLPQNVVDSFF
STARD6  NIISKSVDFF.EYPPSSNYIRGYNH. . . . . PCGFVCSPEMEE. . . . . NPAYSKLVMPFVQTEM. . . . . GKLSPSIIEKTM
STARD7  VLVS.RAVEHP.SVPESEFVVRVRSY. . . . . ESQMVIRPHK. . . . . SFDENGFDYLLTYSDNP. . . . . TVFPRYCVSWMV
STARD8  LLVS.QSLDPE.QPVPESG.VRALML. . . . . TSQYLMFPCG. . . . . LGRSRLLTHICRADL. . . . . GRSPDWYNKVFQ
STARD9  SVMAAQSVYDTSMPRPSRKMVGEIL. . . . . PSAWILQPIV. . . . . EGKEVTRVIYLAQVE. . . . . LGAPQLLSGFIK
STARD10 IIMN.YSVKHP.KYPPRKDLVRAVSI. . . . . QTGYLIQSTG. . . . . P..KSCVITTYLAQVDP. . . . . GSLPKWVVKSS
STARD11 IVCN.FSVVDH.SAPLNNRCVRAKINVAMICQTLVSPPEGNQIEISRDNILCKITIVANVNP. . . . . GWAPASVLRAVA
STARD12 ALLL.TSVVDH.RA.PVVGVVVNL. . . . . LSRYLIEPCG. . . . . PGKSLTYMCRVDL. . . . . GHMPEWYTKSFG
STARD13 TLVS.LSVEHE.EAQLGG.VRAVHM. . . . . DSQYLIIEPCG. . . . . SGKSRLLTHICRIDL. . . . . GHPPEWYSKGFQ
STARD14 YVIALRSVITLP.THRETPEYRGETL. . . . . CSGFCLWREGD. . . . . QLTKCCVWRVSLTELVSASGFYVWGLSRS.
STARD15 YIVAVKSMIILP.SVPPSPQYIRSEIT. . . . . CAGFLIHAIDS. . . . . NSCLVSYFNHMS. . . . . ASILPYFJ. . . . .

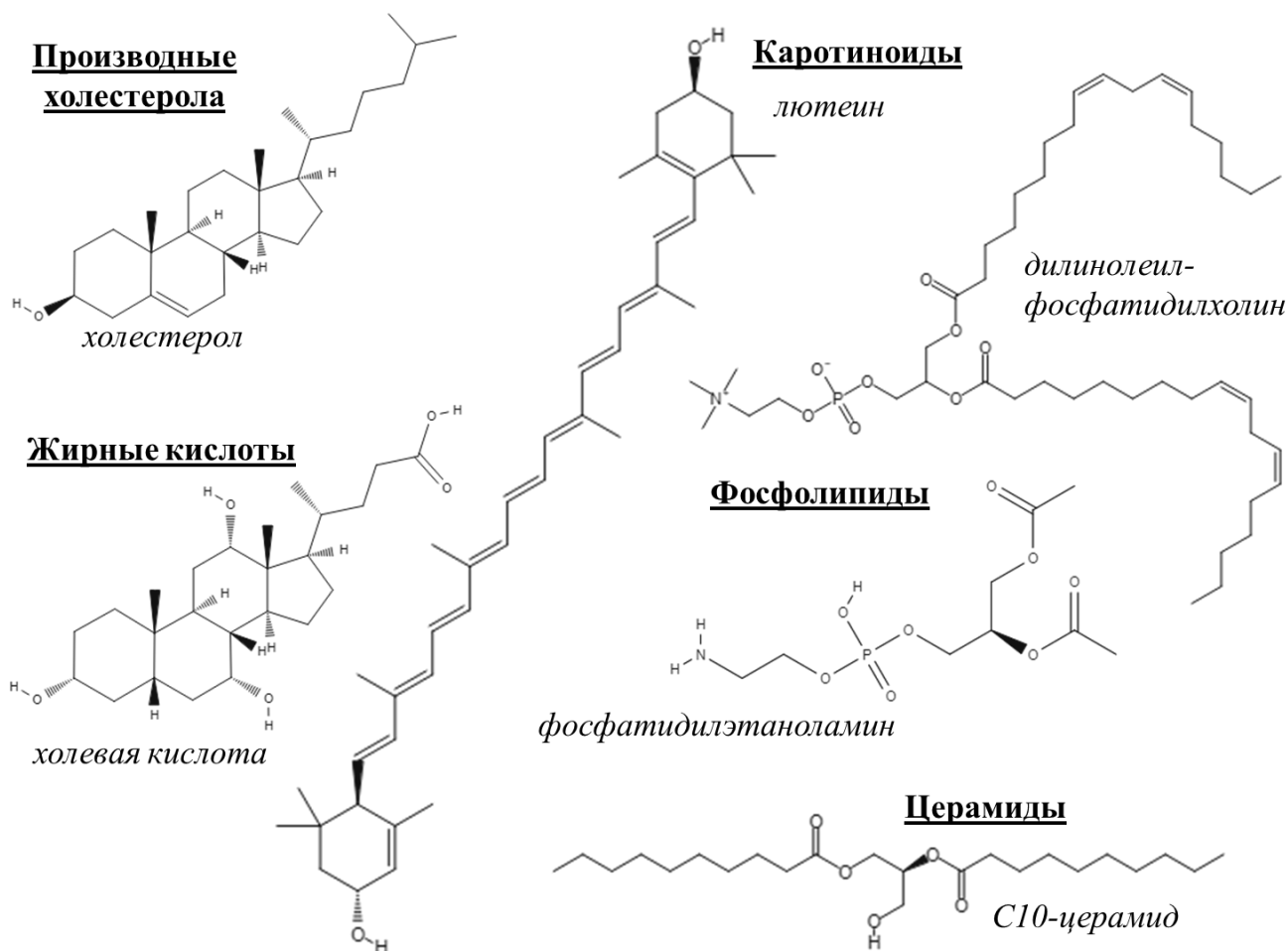
          270      280
STARD1  SQTQVDFANHLRKRLESHPASEARC. . . . .
STARD2  KNGVPNFLKDMARACQNYLKKT. . . . .
STARD3  AATMFEFAFHLRQRISLGGARA. . . . .
STARD4  ASTLTINFGDLRKAL. . . . .
STARD5  PRSMTRFYANLQKAVKQFHE. . . . .
STARD6  PSNLVNFIILNAKDGIAKARTPSRRGFHHNSHS. . . . .
STARD7  SSGMPDFLEKLEHMAATLAKAN. . . . .
STARD8  HLCAMEVAKIRDSFPTLQAA. . . . .
STARD9  RQ..PLVILARLASFLGR. . . . .
STARD10 QFLAPKAMKKMYKACLKYPE. . . . .
STARD11 KREYPKFLKRRFTSYVQEKTA. . . . .
STARD12 HLCAAEVVKIRDSFSNQTE. . . . .
STARD13 HLCAAEVARIRNSFQPLIAE. . . . .
STARD14 . . . . . KGRRSDBGWNGKLAGGH. . . . .
STARD15 . . . . . AGNLGGWSKSIETEAASCIQFLENPPDD

```


Множественное выравнивание аннотированных в Uniprot последовательностей STAR1 из разных организмов: HUMAN (Uniprot ID P49675) - *Homo sapiens* (человек), MOUSE (Uniprot ID P51557) - *Mus musculus* (домовая мышь), RAT (Uniprot ID P97826) - *Rattus norvegicus* (серая крыса), HORSE (Uniprot ID O46689) - *Equus caballus* (домашняя лошадь), BOVIN (Uniprot ID Q28918) - *Bos taurus* (домашний бык), SHEEP (Uniprot ID P79245) - *Ovis aries* (домашняя овца), PIG (Uniprot ID Q28996) - *Sus scrofa* (дикая свинья), CHICK (Uniprot ID Q9DG09) - *Gallus gallus* (банкивская джунглевая курица), DANRE (Uniprot ID Q9DG10) - *Danio rerio* (данио-рерио), SALFO (Uniprot ID Q9DE06) - *Salvelinus fontinalis* (американский голец), ONCMY (Uniprot ID Q9DEB4) - *Oncorhynchus mykiss* (радужная форель), MESAU (Uniprot ID P70114) - *Mesocricetus auratus* (золотистый хомячок) и XENLA (Uniprot ID Q9DG08) - *Xenopus laevis* (гладкая шпорцевая лягушка).. Выравнивание последовательностей было построено с использованием программы Clustal Omega (<http://www.clustal.org/omega/>), а визуализировано с помощью веб-сервиса ESPrpt 3.0 [204]. Идентичные аминокислотные остатки в соответствующих положениях обозначены белым цветом на черном фоне. Сходные по свойствам аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и заключены в рамку. Стрелками обозначены остатки Ser57, Ser195 и Ser277 (нумерация STAR1 человека), которые предсказываются программами 14-3-3-Pred [151] и SCANSITE 4.0 [211] как наиболее вероятные сайты узнавания 14-3-3.



Разнообразие лигандов белков STARD-семейства. На рисунке изображены представители основных классов соединений (производные холестерина, жирные кислоты, каротиноиды, фосфолипиды и церамиды), которые являются лигандами белков STARD-семейства. Химические структуры подготовлены с помощью веб-сервиса *MolView* v2.4 (<https://molview.org/>).



Состав наиболее используемых в работе буферов

Название буфера	Состав
А	30 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, 0,01 мМ ФМСФ
Б	30 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ NaCl, 510 мМ имидазола, 0,01 мМ ФМСФ
В	30 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 300 мМ NaCl, 200 мМ имидазола, 0,01 мМ ФМСФ
Г1	20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 300 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 2 мМ β-МЭ, 0,1 мМ ФМСФ
Г2	20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 150 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 2 мМ ДТТ, 3% глицерол
К	20 мМ Трис –НСl, рН 7,6, 10 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 15 мМ β-МЭ, 0,1 мМ ФМСФ
М	20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl ₂
Н	20 мМ Хепес-NaOH, рН 7,5, 300 мМ NaCl
С	20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 250 мМ NaCl, 5 мМ MgCl ₂ , 2 мМ β-МЭ
Ф1	20 мМ Хепес-NaOH, рН 7,1, 300 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 2 мМ β-МЭ
Ф2	15 мМ Цитрат, рН 3,7, 300 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 2 мМ β-МЭ
Х1	20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 150 мМ NaCl
Х2	20 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 150 мМ NaCl, 5 мМ MgCl ₂ , 3 мМ β-МЭ

Поиск потенциальных сайтов узнавания 14-3-3 в белке STARD1 человека с помощью программы *14-3-3-Pred* [151]. В программе были проанализированы 11-членные аминокислотные последовательности: шесть аминокислотных остатков до и четыре аминокислотного остатка после относительно центральных (положение 0) остатков серина или треонина. Остатки серина или треонина в центральном положении потенциального сайта подчеркнуты и выделены жирным шрифтом. Итоговая оценка - среднее значение между оценками, полученными тремя встроенными в программу *14-3-3-Pred* алгоритмами: *ANN* (*Artificial Neural Network*), *PSSM* (*Position-Specific Scoring Matrix*), *SVM* (*Support Vector Machine*). Итоговые оценки, превышающие пороговое значение (0,50), выделены жирным шрифтом. Зеленым цветом выделены те сайты, которые получили высокую оценку тремя алгоритмами, голубым - только двумя алгоритмами, бежевым - только одним алгоритмом.

Сайт	Последовательность [-6;4]	Итоговая оценка (>0,50)
12	FKLCAG <u>S</u> SYRH	-0,306
13	KLCAG <u>S</u> SYRHM	-0,470
32	QAVMAI <u>S</u> QELN	-0,330
44	RALGGP <u>T</u> PSTW	-0,762
46	LGGPT <u>P</u> STWIN	-0,359
47	GGPT <u>P</u> STWINQ	-0,502
56	NQVRRR <u>S</u> SLLG	0,480
57	QVRRR <u>S</u> SLLGS	0,928
61	RSLLG <u>S</u> RLEE	-0,685
66	GSRL <u>E</u> E <u>T</u> LYSD	0,038
69	LEETLY <u>S</u> DQEL	-0,174
91	KALGIL <u>S</u> NQEG	-0,366
100	EGWK <u>K</u> E <u>S</u> QQDN	-0,227
110	NGDKVM <u>S</u> KVVP	-0,080
164	QKIGKD <u>T</u> FITH	-0,351
167	GKDT <u>F</u> I <u>T</u> HELA	-0,071

186	GPRDFV <u>S</u> VRCA	0,146
195	CAKRRG <u>S</u> TCVL	0,658
196	AKRRGS <u>T</u> CVLA	0,768
204	VLAGMA <u>T</u> DFGN	0,037
223	RAEHGP <u>T</u> CMVL	-0,311
233	LHPLAG <u>S</u> PSKT	-0,913
235	PLAGSP <u>S</u> KTKL	0,249
237	AGSPSK <u>T</u> KLTW	-0,008
240	PSKTKL <u>T</u> WLLS	-0,447
244	KLTWLL <u>S</u> IDLK	-0,222
254	KGWLPK <u>S</u> IINQ	-0,286
261	IINQVL <u>S</u> QTQV	-0,335
263	NQVLSQ <u>T</u> QVDF	-0,035
277	LRKRLE <u>S</u> HPAS	1,223
281	LESHPA <u>S</u> EARC	-0,527

Поиск потенциальных сайтов узнавания 14-3-3 в белках STARD1 человека и мыши и STARD3 человека с помощью программы SCANSITE 4.0 [211]. Для идентифицированных сайтов (остатки серина или треонина в центральном положении участка подчеркнуты и выделены жирным шрифтом) были рассчитаны также вероятности фосфорилирования РКА. Чем ниже значение *Score*, тем выше вероятность узнавания 14-3-3/фосфорилирования РКА. Для сравнения приведены вероятности узнавания белками 14-3-3 и фосфорилирования РКА для участка вокруг Ser186 у человека (*) и гомологичного ему остатка Ser185 у мыши (**), который был описан в работе [20], а также для участка вокруг Ser395 STARD3 человека (***) - участка связывания с белками 14-3-3 по данным работы [209]. Для наглядности рассчитанные соответствующие вероятности закодированы в виде градиента от зеленого (наибольшая вероятность) к красному (наименьшая вероятность). Итоговая оценка отражает вероятность взаимодействия 14-3-3 с фосфосайтом с учетом обоих значений *Score*, полученных в программе SCANSITE 4.0 [211], от наиболее вероятного “++” до наименее вероятного “-”.

Сайт	Последовательность	Расположение	14-3-3		РКА		Итоговая оценка
			<i>Score</i>	Процентиль	<i>Score</i>	Процентиль	
STARD1 человека (Uniprot ID P49675)							
S ²⁷⁷	HLRKRLE S HPASEAR	START-домен	0,42	0,63	0,72	12,67	-
S ⁵⁷	NQVRRRS S LLGSRL	N-концевой пептид	0,54	2,42	0,30	0,11	++
S ⁵⁶	INQVRRRS S LLGSRL	N-концевой пептид	0,62	5,08	0,45	0,79	-/+
S ¹⁹⁵	RCAKRRG S TCVLAGM	START-домен	0,63	5,44	0,37	0,34	+
T ¹⁹⁶	CAKRRG S TCVLAGMA	START-домен	0,71	10,77	0,64	6,89	-
* S ¹⁸⁶	VGPRDFV S VRCARR	START-домен	-	-	0,60-1,03	10,54-11,99	-
STARD1 мыши (Uniprot ID P51557)							
S ⁵⁶	GQVRRRS S LLGSQLE	N-концевой пептид	0,54	2,333	0,282	0,083	++
S ⁵⁵	MGQVRRRS S LLGSQLE	N-концевой пептид	0,62	4,906	0,412	0,568	-/+
S ¹⁹⁴	RCTKRRG S TCVLAGM	START-домен	0,64	5,875	0,389	0,438	+
T ¹⁹⁵	CTKRRG S TCVLAGMA	START-домен	0,70	9,753	0,635	6,335	-
** S ¹⁸⁵	VGPRDFV S VRCARR	START-домен	-	-	0,564-0,972	7,549-11,506	-
*** STARD3 человека (Uniprot ID Q14849)							
S ³⁹⁵	FIVLKSA S NPVCTF	START-домен	0,50	1,563	1,05	14,889	-

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Litwack G. Chapter 16 - Steroid Hormones // Human Biochemistry / ed. Litwack G. Boston: Academic Press, - 2018. - P. 467–506.
2. Miller W.L., Auchus R.J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders // *Endocr. Rev.* - 2011. - Vol. 32, № 1. - P. 81–151.
3. Auchus R.J. The classic and nonclassic congenital adrenal hyperplasias // *Endocr. Pract.* - 2015. - Vol. 21, № 4. - P. 383–389.
4. Miller W.L. Mechanisms in endocrinology: Rare defects in adrenal steroidogenesis // *Eur. J. Endocrinol.* - 2018. - Vol. 179, № 3. - P. R125–R141.
5. Stocco D.M. A StAR search: implications in controlling steroidogenesis // *Biol. Reprod.* - 1997. - Vol. 56, № 2. - P. 328–336.
6. Artemenko I.P., Zhao D., Hales D.B., Hales K.H., Jefcoate C.R. 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.* - 2001. - Vol. 276, № 49. - P. 46583–46596.
7. Bose H.S., Baldwin M.A., Miller W.L. Incorrect folding of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in congenital lipoid adrenal hyperplasia // *Biochemistry.* - 1998. - Vol. 37, № 27. - P. 9768–9775.
8. Roostae A., Barbar E., Lehoux J.-G., Lavigne P. Cholesterol binding is a prerequisite for the activity of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) // *Biochem. J.* - 2008. - Vol. 412, № 3. - P. 553–562.
9. Roostae A., Barbar E., Lavigne P., LeHoux J.-G. 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.* - 2009. - Vol. 29, № 2. - P. 89–101.
10. Bose H.S., Whittal R.M., Bose M., Debnath D. Hydrophobic core of the steroidogenic acute regulatory protein for cholesterol transport // *Biochemistry.* - 2009. - Vol. 48, № 6. - P. 1198–1209.
11. Yaworsky D.C., Baker B.Y., Bose H.S., Best K.B., Jensen L.B., Bell J.D., Baldwin M.A., Miller W.L. pH-dependent Interactions of the carboxyl-terminal helix of steroidogenic acute regulatory protein with synthetic membranes // *J. Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280, № 3. - P. 2045–2054.
12. Bose H.S., Whittal R.M., Debnath D., Bose M. Steroidogenic acute regulatory protein has a more open conformation than the independently folded smaller subdomains // *Biochemistry.* - 2009. - Vol. 48, № 49. - P. 11630–11639.
13. Murcia M., Faráldo-Gómez J.D., Maxfield F.R., Roux B. Modeling the structure of the StART domains of MLN64 and StAR proteins in complex with cholesterol // *J. Lipid Res.* - 2006. - Vol. 47, № 12. - P. 2614–2630.
14. Mathieu A.P., Lavigne P., LeHoux J.-G. Molecular modeling and structure-based thermodynamic analysis of the StAR protein // *Endocr. Res.* - 2002. - Vol. 28, № 4. - P. 419–423.
15. Mathieu A.P., Fleury A., Ducharme L., Lavigne P., LeHoux J.G. 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.* - 2002. - Vol. 29, № 3. - P. 327–345.
16. Rone M.B., Midzak A.S., Issop L., Rammouz G., Jagannathan S., Fan J., Ye X., Blonder J., Veenstra T., Papadopoulos V. Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones // *Mol. Endocrinol.* - 2012. - Vol. 26, № 11. - P. 1868–1882.
17. Obsil T., Obsilova V. Structural basis of 14-3-3 protein functions // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2011. - Vol. 22, № 7. - P. 663–672.
18. Yaffe M.B. How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis // *FEBS Lett.* - 2002. - Vol. 513, № 1. - P. 53–57.

19. Arakane F., King S.R., Du Y., Kallen C.B., Walsh L.P., Watari H., Stocco D.M., Strauss J.F. 3rd. Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity // *J. Biol. Chem.* - 1997. - Vol. 272, № 51. - P. 32656–32662.
20. Aghazadeh Y., Rone M.B., Blonder J., Ye X., Veenstra T.D., Hales D.B., Culty M., Papadopoulos V. Hormone-induced 14-3-3 γ adaptor protein regulates steroidogenic acute regulatory protein activity and steroid biosynthesis in MA-10 Leydig cells // *J. Biol. Chem.* - 2012. - Vol. 287, № 19. - P. 15380–15394.
21. Aghazadeh Y., Martinez-Arguelles D.B., Fan J., Culty M., Papadopoulos V. Induction of androgen formation in the male by a TAT-VDAC1 fusion peptide blocking 14-3-3 ϵ protein adaptor and mitochondrial VDAC1 interactions // *Mol. Ther.* - 2014. - Vol. 22, № 10. - P. 1779–1791.
22. Aghazadeh Y., Papadopoulos V. The role of the 14-3-3 protein family in health, disease, and drug development // *Drug Discov. Today.* - 2016. - Vol. 21, № 2. - P. 278–287.
23. Holst J.P., Soldin O.P., Guo T., Soldin S.J. Steroid hormones: relevance and measurement in the clinical laboratory // *Clin. Lab. Med.* - 2004. - Vol. 24, № 1. - P. 105–118.
24. Filippo Acconcia M.M. Steroid hormones: Synthesis, secretion, and transport // *Principles of Endocrinology and Hormone Action* / ed. Antonino Belfiore D.L. - P. 43–72.
25. Reddy D.S. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials // *Prog. Brain Res.* - 2010. - Vol. 186. - P. 113–137.
26. Stocco D.M., Clark B.J. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells // *Endocr. Rev.* - 1996. - Vol. 17, № 3. - P. 221–244.
27. Vaillancourt C., Lafond J. Human embryogenesis: overview // *Methods Mol. Biol.* - 2009. - Vol. 550. - P. 3–7.
28. Diotel N., Charlier T.D., Lefebvre d'Hellencourt C., Couret D., Trudeau V.L., Nicolau J.C., Meilhac O., Kah O., Pellegrini E. Steroid Transport, Local Synthesis, and Signaling within the Brain: Roles in Neurogenesis, Neuroprotection, and Sexual Behaviors // *Front. Neurosci.* - 2018. - Vol. 12. - P. 84.
29. Li J., Papadopoulos V., Vihma V. Steroid biosynthesis in adipose tissue // *Steroids.* - 2015. - Vol. 103. - P. 89–104.
30. Bouguen G., Dubuquoy L., Desreumaux P., Brunner T., Bertin B. Intestinal steroidogenesis // *Steroids.* - 2015. - Vol. 103. - P. 64–71.
31. Bollag W.B. Regulation of aldosterone synthesis and secretion // *Compr. Physiol.* - 2014. - Vol. 4, № 3. - P. 1017–1055.
32. Sugawara T., Holt J.A., Driscoll D., Strauss J.F., Lin D., Miller W.L., Patterson D., Clancy K.P., Hart I.M., Clark B.J. 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 // *PNAS.* - 1995. - Vol. 92, № 11. - P. 4778–4782.
33. Bose H.S., Sugawara T., Strauss J.F. 3rd, Miller W.L., International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia Consortium. The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia // *N. Engl. J. Med.* - 1996. - Vol. 335, № 25. - P. 1870–1878.
34. Bose H.S., Sato S., Aisenberg J., Shalev S.A., Matsuo N., Miller W.L. Mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in six patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2000. - Vol. 85, № 10. - P. 3636–3639.
35. Lekarev O., Mallet D., Yuen T., Morel Y., Maria I. New. 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.* - 2012. - Vol. 171, № 5. - P. 787–793.
36. González A.A., Loreto Reyes M., Carvajal C.A., Tobar J.A., Mosso L.M., Baquedano P., Solar A., Venegas A., Fardella C.E. Congenital lipoid adrenal hyperplasia caused by a novel splicing mutation in the gene for the steroidogenic acute regulatory protein // *J Clin Endocrinol Metab.* - 2004. - Vol. 89, № 2. - P. 946–951.
37. 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. 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.* - 2011. - Vol. 165, № 5. - P. 771–778.
38. Okuyama E., Nishi N., Onishi S., Itoh S., Ishii Y., Miyanaka H., Fujita K., Ichikawa Y. A novel splicing junction mutation in the gene for the steroidogenic acute regulatory protein causes congenital lipoid adrenal hyperplasia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1997. - Vol. 82, № 7. - P. 2337–2342.
 39. Camats N., Pandey A.V., Fernández-Cancio M., Fernández J.M., Ortega A.M., Udhane S., Andaluz P., Audí L., Flück C.E. STAR splicing mutations cause the severe phenotype of lipoid congenital adrenal hyperplasia: insights from a novel splice mutation and review of reported cases // *Clin. Endocrinol.* - 2014. - Vol. 80, № 2. - P. 191–199.
 40. Bhangoo A., Gu W.-X., Pavlakis S., Anhalt H., Heier L., Ten S., Jameson J.L. Phenotypic features associated with mutations in steroidogenic acute regulatory protein // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2005. - Vol. 90, № 11. - P. 6303–6309.
 41. Bens S., Mohn A., Yüksel B., Kulle A.E., Michalek M., Chiarelli F., Nuri Ozbek M., Leuschner I., Grötzinger J., Holterhus P.-M., Riepe F.G. Congenital lipoid adrenal hyperplasia: functional characterization of three novel mutations in the STAR gene // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2010. - Vol. 95, № 3. - P. 1301–1308.
 42. Fujieda K., Tajima T., Nakae J., Sageshima S., Tachibana K., Suwa S., Sugawara T., Strauss J.F. Spontaneous puberty in 46,XX subjects with congenital lipoid adrenal hyperplasia. Ovarian steroidogenesis is spared to some extent despite inactivating mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene // *J. Clin. Invest.* - 1997. - Vol. 99, № 6. - P. 1265–1271.
 43. King S.R., Bhangoo A., Stocco D.M. Functional and physiological consequences of StAR deficiency: role in lipoid congenital adrenal hyperplasia // *Endocr. Dev.* - 2011. - Vol. 20. - P. 47–53.
 44. Sahakitrungruang T., Soccio R.E., Lang-Muritano M., Walker J.M., Achermann J.C., Miller W.L. Clinical, genetic, and functional characterization of four patients carrying partial loss-of-function mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2010. - Vol. 95, № 7. - P. 3352–3359.
 45. Baker B.Y., Lin L., Kim C.J., Raza J., Smith C.P., Miller W.L., Achermann J.C. Nonclassic congenital lipoid adrenal hyperplasia: a new disorder of the steroidogenic acute regulatory protein with very late presentation and normal male genitalia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2006. - Vol. 91, № 12. - P. 4781–4785.
 46. Ishii T., Hori N., Amano N., Aya M., Shibata H., Katsumata N., Hasegawa T. Pubertal and Adult Testicular Functions in Nonclassic Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia: A Case Series and Review // *J Endocr Soc.* - 2019. - Vol. 3, № 7. - P. 1367–1374.
 47. Flück C.E., Maret A., Mallet D., Portrat-Doyen S., Achermann J.C., Leheup B., Theintz G.E., Mullis P.E., Morel Y. A novel mutation L260P of the steroidogenic acute regulatory protein gene in three unrelated patients of Swiss ancestry with congenital lipoid adrenal hyperplasia // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2005. - Vol. 90, № 9. - P. 5304–5308.
 48. Epstein L.F., Orme-Johnson N.R. Regulation of steroid hormone biosynthesis. Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mitochondrion in stimulated rat adrenal cortex cells // *J. Biol. Chem.* - 1991. - Vol. 266, № 29. - P. 19739–19745.
 49. Clark B.J., Wells J., King S.R., Stocco D.M. 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.* - 1994. - Vol. 269, № 45. - P. 28314–28322.
 50. Epstein L.F., Orme-Johnson N.R. Acute action of luteinizing hormone on mouse Leydig cells: accumulation of mitochondrial phosphoproteins and stimulation of testosterone synthesis // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 1991. - Vol. 81, № 1-3. - P. 113–126.

51. Clark B.J., Stocco D.M. 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.* - 1995. - Vol. 21, № 1-2. - P. 243–257.
52. Bose H.S., Lingappa V.R., Miller W.L. The steroidogenic acute regulatory protein, StAR, works only at the outer mitochondrial membrane // *Endocr. Res.* - 2002. - Vol. 28, № 4. - P. 295–308.
53. Lin D., Sugawara T., Strauss J.F. 3rd, Clark B.J., Stocco D.M., Saenger P., Rogol A., Miller W.L. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis // *Science.* - 1995. - Vol. 267, № 5205. - P. 1828–1831.
54. Sugawara T., Lin D., Holt J.A., Martin K.O., Javitt N.B., Miller W.L., Strauss J.F. 3rd. Structure of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: StAR stimulates mitochondrial cholesterol 27-hydroxylase activity // *Biochemistry.* - 1995. - Vol. 34, № 39. - P. 12506–12512.
55. Anuka E., Gal M., Stocco D.M., Orly J. Expression and roles of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in “non-classical”, extra-adrenal and extra-gonadal cells and tissues // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2013. - Vol. 371, № 1-2. - P. 47–61.
56. Tuckey R.C., Bose H.S., Czerwionka I., Miller W.L. Molten globule structure and steroidogenic activity of N-218 MLN64 in human placental mitochondria // *Endocrinology.* - 2004. - Vol. 145, № 4. - P. 1700–1707.
57. Alpy F., Tomasetto C. Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals // *J. Cell Sci.* - 2005. - Vol. 118, № Pt 13. - P. 2791–2801.
58. Moog-Lutz C., Tomasetto C., Régnier C.H., Wendling C., Lutz Y., Muller D., Chenard M.P., Basset P., Rio M.C. MLN64 exhibits homology with the steroidogenic acute regulatory protein (STAR) and is over-expressed in human breast carcinomas // *Int. J. Cancer.* - 1997. - Vol. 71, № 2. - P. 183–191.
59. Arakane F., Kallen C.B., Watari H., Foster J.A., Sepuri N.B., Pain D., Stayrook S.E., Lewis M., Gerton G.L., Strauss J.F. 3rd. The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis // *J. Biol. Chem.* - 1998. - Vol. 273, № 26. - P. 16339–16345.
60. Petrescu A.D., Gallegos A.M., Okamura Y., Strauss J.F. 3rd, Schroeder F. Steroidogenic acute regulatory protein binds cholesterol and modulates mitochondrial membrane sterol domain dynamics // *J. Biol. Chem.* - 2001. - Vol. 276, № 40. - P. 36970–36982.
61. Korytowski W., Wawak K., Pabisz P., Schmitt J.C., Chadwick A.C., Sahoo D., Girotti A.W. Impairment of Macrophage Cholesterol Efflux by Cholesterol Hydroperoxide Trafficking: Implications for Atherogenesis Under Oxidative Stress // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 2015. - Vol. 35, № 10. - P. 2104–2113.
62. Baker B.Y., Epand R.F., Epand R.M., Miller W.L. Cholesterol binding does not predict activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR // *J. Biol. Chem.* - 2007. - Vol. 282, № 14. - P. 10223–10232.
63. Clark B.J., Stocco D.M. StAR-A tissue specific acute mediator of steroidogenesis // *Trends Endocrinol. Metab.* - 1996. - Vol. 7, № 7. - P. 227–233.
64. Tsujishita Y., Hurley J.H. Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain // *Nat. Struct. Biol.* - 2000. - Vol. 7, № 5. - P. 408–414.
65. 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. Structure of the lutein-binding domain of human StARD3 at 1.74 Å resolution and model of a complex with lutein // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun.* - 2016. - Vol. 72, № Pt 8. - P. 609–618.
66. Li B., Vachali P., Frederick J.M., Bernstein P.S. Identification of StARD3 as a lutein-binding protein in the macula of the primate retina // *Biochemistry.* - 2011. - Vol. 50, № 13. - P. 2541–2549.
67. Vachali P., Li B., Nelson K., Bernstein P.S. Surface plasmon resonance (SPR) studies on the interactions of carotenoids and their binding proteins // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2012. - Vol. 519, № 1. - P. 32–37.
68. Rodriguez-Agudo D., Ren S., Wong E., Marques D., Redford K., Gil G., Hylemon P., Pandak W.M.

- Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation // *J. Lipid Res.* - 2008. - Vol. 49, № 7. - P. 1409–1419.
69. Korytowski W., Rodriguez-Agudo D., Pilat A., Girotti A.W. StarD4-mediated translocation of 7-hydroperoxycholesterol to isolated mitochondria: deleterious effects and implications for steroidogenesis under oxidative stress conditions // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2010. - Vol. 392, № 1. - P. 58–62.
 70. Romanowski M.J., Soccio R.E., Breslow J.L., Burley S.K. Crystal structure of the *Mus musculus* cholesterol-regulated START protein 4 (StarD4) containing a StAR-related lipid transfer domain // *PNAS.* - 2002. - Vol. 99, № 10. - P. 6949–6954.
 71. Rodriguez-Agudo D., Calderon-Dominguez M., Ren S., Marques D., Redford K., Medina-Torres M.A., Hylemon P., Gil G., Pandak W.M. Subcellular localization and regulation of StarD4 protein in macrophages and fibroblasts // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2011. - Vol. 1811, № 10. - P. 597–606.
 72. Mesmin B., Pipalia N.H., Lund F.W., Ramlall T.F., Sokolov A., Eliezer D., Maxfield F.R. STARD4 abundance regulates sterol transport and sensing // *Mol. Biol. Cell.* - 2011. - Vol. 22, № 21. - P. 4004–4015.
 73. Iaea D.B., Mao S., Lund F.W., Maxfield F.R. Role of STARD4 in sterol transport between the endocytic recycling compartment and the plasma membrane // *Mol. Biol. Cell.* - 2017. - Vol. 28, № 8. - P. 1111–1122.
 74. Rodriguez-Agudo D., Ren S., Hylemon P.B., Redford K., Natarajan R., Del Castillo A., Gil G., Pandak W.M. Human StarD5, a cytosolic StAR-related lipid binding protein // *J. Lipid Res.* - 2005. - Vol. 46, № 8. - P. 1615–1623.
 75. Létourneau D., Lorin A., Lefebvre A., Frappier V., Gaudreault F., Najmanovich R., Lavigne P., LeHoux J.-G. StAR-related lipid transfer domain protein 5 binds primary bile acids // *J. Lipid Res.* - 2012. - Vol. 53, № 12. - P. 2677–2689.
 76. Soccio R.E., Adams R.M., Romanowski M.J., Sehayek E., Burley S.K., Breslow J.L. The cholesterol-regulated StarD4 gene encodes a StAR-related lipid transfer protein with two closely related homologues, StarD5 and StarD6 // *PNAS.* - 2002. - Vol. 99, № 10. - P. 6943–6948.
 77. Létourneau D., Lorin A., Lefebvre A., Cabana J., Lavigne P., LeHoux J.-G. Thermodynamic and solution state NMR characterization of the binding of secondary and conjugated bile acids to STARD5 // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2013. - Vol. 1831, № 11. - P. 1589–1599.
 78. Soccio R.E., Breslow J.L. StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism // *J. Biol. Chem.* - 2003. - Vol. 278, № 25. - P. 22183–22186.
 79. Létourneau D., Lefebvre A., Lavigne P., LeHoux J.-G. STARD5 specific ligand binding: comparison with STARD1 and STARD4 subfamilies // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2013. - Vol. 371, № 1-2. - P. 20–25.
 80. Létourneau D., Lefebvre A., Lavigne P., LeHoux J.-G. The binding site specificity of STARD4 subfamily: Breaking the cholesterol paradigm // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2015. - Vol. 408. - P. 53–61.
 81. Létourneau D., Bédard M., Cabana J., Lefebvre A., LeHoux J.-G., Lavigne P. STARD6 on steroids: solution structure, multiple timescale backbone dynamics and ligand binding mechanism // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6. - P. 28486.
 82. Bose H.S., Whittall R.M., Ran Y., Bose M., Baker B.Y., Miller W.L. StAR-like activity and molten globule behavior of StARD6, a male germ-line protein // *Biochemistry.* - 2008. - Vol. 47, № 8. - P. 2277–2288.
 83. Chang I.Y., Jeon Y.J., Jung S.M., Jang Y.H., Ahn J.B., Park K.S., Yoon S.P. Does the StarD6 mark the same as the StAR in the nervous system? // *J. Chem. Neuroanat.* - 2010. - Vol. 40, № 3. - P. 239–242.
 84. Calderon-Dominguez M., Gil G., Medina M.A., Pandak W.M., Rodríguez-Agudo D. The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain proteins: new players in cholesterol metabolism // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2014. - Vol. 49. - P. 64–68.
 85. Kang H.W., Wei J., Cohen D.E. PC-TP/StARD2: Of membranes and metabolism // *Trends Endocrinol. Metab.* - 2010. - Vol. 21, № 7. - P. 449–456.

86. Horibata Y., Sugimoto H. StarD7 mediates the intracellular trafficking of phosphatidylcholine to mitochondria // *J. Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285, № 10. - P. 7358–7365.
87. Cohen D.E., Green R.M., Wu M.K., Beier D.R. Cloning, tissue-specific expression, gene structure and chromosomal localization of human phosphatidylcholine transfer protein // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1999. - Vol. 1447, № 2-3. - P. 265–270.
88. de Brouwer A.P.M., Westerman J., Kleinnijenhuis A., Bevers L.E., Roelofsen B., Wirtz K.W.A. Clofibrate-induced relocation of phosphatidylcholine transfer protein to mitochondria in endothelial cells // *Exp. Cell Res.* - 2002. - Vol. 274, № 1. - P. 100–111.
89. Kanno K., Wu M.K., Scapa E.F., Roderick S.L., Cohen D.E. Structure and function of phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP)/StarD2 // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2007. - Vol. 1771, № 6. - P. 654–662.
90. Flores-Martin J., Rena V., Angeletti S., Panzetta-Dutari G.M., Genti-Raimondi S. The Lipid Transfer Protein StarD7: Structure, Function, and Regulation // *Int. J. Mol. Sci.* - 2013. - Vol. 14, № 3. - P. 6170–6186.
91. Olayioye M.A., Vehring S., Müller P., Herrmann A., Schiller J., Thiele C., Lindeman G.J., Visvader J.E., Pomorski T. StarD10, a START domain protein overexpressed in breast cancer, functions as a phospholipid transfer protein // *J. Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280, № 29. - P. 27436–27442.
92. Alpy F., Tomasetto C. START ships lipids across interorganelle space // *Biochimie.* - 2014. - Vol. 96. - P. 85–95.
93. Zhang S., Chang X., Ma J., Chen J., Zhi Y., Li Z., Dai D. Downregulation of STARD8 in gastric cancer and its involvement in gastric cancer progression // *Oncotargets. Ther.* - 2018. - Vol. 11. - P. 2955–2961.
94. Braun A.C., Olayioye M.A. Rho regulation: DLC proteins in space and time // *Cell. Signal.* - 2015. - Vol. 27, № 8. - P. 1643–1651.
95. Naumann H., Rathjen T., Poy M.N., Spagnoli F.M. The RhoGAP Stard13 controls insulin secretion through F-actin remodeling // *Mol. Metab.* - 2018. - Vol. 8. - P. 96–105.
96. Basak P., Leslie H., Dillon R.L., Muller W.J., Raouf A., Mowat M.R.A. In vivo evidence supporting a metastasis suppressor role for Stard13 (Dlc2) in ErbB2 (Neu) oncogene induced mouse mammary tumors // *Genes Chromosomes Cancer.* - 2018. - Vol. 57, № 4. - P. 182–191.
97. 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. 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.* - 2001. - Vol. 360, № Pt 1. - P. 135–142.
98. Han S., Cohen D.E. Functional characterization of thioesterase superfamily member 1/Acyl-CoA thioesterase 11: implications for metabolic regulation // *J. Lipid Res.* - 2012. - Vol. 53, № 12. - P. 2620–2631.
99. 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. The STARD9/Kif16a kinesin associates with mitotic microtubules and regulates spindle pole assembly // *Cell.* - 2011. - Vol. 147, № 6. - P. 1309–1323.
100. Thorsell A.-G., Lee W.H., Persson C., Siponen M.I., Nilsson M., Busam R.D., Kotenyova T., Schöler H., Lehtiö L. Comparative structural analysis of lipid binding START domains // *PLoS One.* - 2011. - Vol. 6, № 6. - P. e19521.
101. Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction // *Nat. Methods.* - 2015. - Vol. 12, № 1. - P. 7–8.
102. Arakane F., Sugawara T., Nishino H., Liu Z., Holt J.A., Pain D., Stocco D.M., Miller W.L., Strauss J.F. 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: implications for the mechanism of StAR action // *PNAS.* - 1996. - Vol. 93, № 24. - P. 13731–13736.

103. Prasad M., Kaur J., Pawlak K.J., Bose M., Whittal R.M., Bose H.S. 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.* - 2015. - Vol. 290, № 5. - P. 2604–2616.
104. Sasaki G., Ishii T., Jeyasuria P., Jo Y., Bahat A., Orly J., Hasegawa T., Parker K.L. 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.* - 2008. - Vol. 22, № 4. - P. 951–964.
105. Kallen C.B., Billheimer J.T., Summers S.A., Stayrook S.E., Lewis M., Strauss J.F. 3rd. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein // *J. Biol. Chem.* - 1998. - Vol. 273, № 41. - P. 26285–26288.
106. Lee J., Tong T., Duan H., Foong Y.H., Musaitif I., Yamazaki T., Jefcoate C. Regulation of StAR by the N-terminal Domain and Coinduction of SIK1 and TIS11b/Znf3611 in Single Cells // *Front. Endocrinol.* - 2016. - Vol. 7. - P. 107.
107. Granot Z., Melamed-Book N., Bahat A., Orly J. Turnover of StAR protein: roles for the proteasome and mitochondrial proteases // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2007. - Vol. 265-266. - P. 51–58.
108. 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. Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins // *Mol. Endocrinol.* - 2003. - Vol. 17, № 12. - P. 2461–2476.
109. Clark B.J., Hudson E.A. StAR Protein Stability in Y1 and Kin-8 Mouse Adrenocortical Cells // *Biology.* - 2015. - Vol. 4, № 1. - P. 200–215.
110. Iyer L.M., Koonin E.V., Aravind L. Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily // *Proteins.* - 2001. - Vol. 43, № 2. - P. 134–144.
111. Roderick S.L., Chan W.W., Agate D.S., Olsen L.R., Vetting M.W., Rajashankar K.R., Cohen D.E. Structure of human phosphatidylcholine transfer protein in complex with its ligand // *Nat. Struct. Biol.* - 2002. - Vol. 9, № 7. - P. 507–511.
112. Kudo N., Kumagai K., Matsubara R., Kobayashi S., Hanada K., Wakatsuki S., Kato R. Crystal structures of the CERT START domain with inhibitors provide insights into the mechanism of ceramide transfer // *J. Mol. Biol.* - 2010. - Vol. 396, № 2. - P. 245–251.
113. Kumar K.K., Devi B.U., Neeraja P. Molecular activities and ligand-binding specificities of StAR-related lipid transfer domains: exploring integrated in silico methods and ensemble-docking approaches // *SAR QSAR Environ. Res.* - 2018. - Vol. 29, № 6. - P. 483–501.
114. Im Y.J., Raychaudhuri S., Prinz W.A., Hurley J.H. Structural mechanism for sterol sensing and transport by OSBP-related proteins // *Nature.* - 2005. - Vol. 437, № 7055. - P. 154–158.
115. Jentsch J.-A., Kiburu I., Pandey K., Timme M., Ramlall T., Levkau B., Wu J., Eliezer D., Boudker O., Menon A.K. Structural basis of sterol binding and transport by a yeast StARkin domain // *J. Biol. Chem.* - 2018. - Vol. 293, № 15. - P. 5522–5531.
116. Baker B.Y., Yaworsky D.C., Miller W.L. A pH-dependent molten globule transition is required for activity of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR // *J. Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280, № 50. - P. 41753–41760.
117. Katsumata N., Tanae A., Shinagawa T., Nagashima-Miyokawa A., Shimizu M., Yasunaga T., Tanaka T., Hibi I. Homozygous Q258X mutation in the steroidogenic acute regulatory gene in a Japanese patient with congenital lipid adrenal hyperplasia // *Endocr. J.* - 1997. - Vol. 44, № 3. - P. 441–446.
118. Bose H.S., Pescovitz O.H., Miller W.L. Spontaneous feminization in a 46,XX female patient with congenital lipid adrenal hyperplasia due to a homozygous frameshift mutation in the steroidogenic acute regulatory protein // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* - 1997. - Vol. 82, № 5. - P. 1511–1515.
119. Feng L., Chan W.W., Roderick S.L., Cohen D.E. High-level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C-terminal membrane

- binding domain // *Biochemistry*. - 2000. - Vol. 39, № 50. - P. 15399–15409.
120. Bose H.S., Lingappa V.R., Miller W.L. Rapid regulation of steroidogenesis by mitochondrial protein import // *Nature*. - 2002. - Vol. 417, № 6884. - P. 87–91.
 121. Thomson M. Does cholesterol use the mitochondrial contact site as a conduit to the steroidogenic pathway? // *Bioessays*. - 2003. - Vol. 25, № 3. - P. 252–258.
 122. Englander S.W. Protein folding intermediates and pathways studied by hydrogen exchange // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* - 2000. - Vol. 29. - P. 213–238.
 123. van der Goot F.G., González-Mañas J.M., Lakey J.H., Pattus F. A “molten-globule” membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A // *Nature*. - 1991. - Vol. 354, № 6352. - P. 408–410.
 124. Бычкова В.Е., Семисотнов Г.В., Балобанов В.А., Финкельштейн А.В. Расплавленная глобула: 45 лет спустя // *Успехи Биологической Химии*. - 2018. - Vol. 58. - P. 67–100.
 125. Bose H.S., Whittal R.M., Baldwin M.A., Miller W.L. The active form of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR, appears to be a molten globule // *PNAS*. - 1999. - Vol. 96, № 13. - P. 7250–7255.
 126. Rajapaksha M., Kaur J., Bose M., Whittal R.M., Bose H.S. Cholesterol-mediated conformational changes in the steroidogenic acute regulatory protein are essential for steroidogenesis // *Biochemistry*. - 2013. - Vol. 52, № 41. - P. 7242–7253.
 127. Horvath S.E., Daum G. Lipids of mitochondria // *Prog. Lipid Res.* - 2013. - Vol. 52, № 4. - P. 590–614.
 128. Papadopoulos V., Aghazadeh Y., Fan J., Campioli E., Zirkin B., Midzak A. Translocator protein-mediated pharmacology of cholesterol transport and steroidogenesis // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2015. - Vol. 408. - P. 90–98.
 129. Liu J., Rone M.B., Papadopoulos V. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis // *J. Biol. Chem.* - 2006. - Vol. 281, № 50. - P. 38879–38893.
 130. Rone M.B., Fan J., Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states // *Biochim. Biophys. Acta*. - 2009. - Vol. 1791, № 7. - P. 646–658.
 131. LeHoux J.-G., Fleury A., Ducharme L., Hales D.B. Phosphorylation of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein as analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoreses // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 2004. - Vol. 215, № 1-2. - P. 127–134.
 132. Bose M., Whittal R.M., Miller W.L., Bose H.S. Steroidogenic activity of StAR requires contact with mitochondrial VDAC1 and phosphate carrier protein // *J. Biol. Chem.* - 2008. - Vol. 283, № 14. - P. 8837–8845.
 133. Papadopoulos V., Miller W.L. Role of mitochondria in steroidogenesis // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* - 2012. - Vol. 26, № 6. - P. 771–790.
 134. van Hemert M.J., Steensma H.Y., van Heusden G.P. 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis // *Bioessays*. - 2001. - Vol. 23, № 10. - P. 936–946.
 135. Aghazadeh Y., Ye X., Blonder J., Papadopoulos V. Protein modifications regulate the role of 14-3-3 γ adaptor protein in cAMP-induced steroidogenesis in MA-10 Leydig cells // *J. Biol. Chem.* - 2014. - Vol. 289, № 38. - P. 26542–26553.
 136. Gardino A.K., Yaffe M.B. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis // *Semin. Cell Dev. Biol.* - 2011. - Vol. 22, № 7. - P. 688–695.
 137. Xu M., Chang Y.P., Chen X.S. Expression, purification and biochemical characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Mcm4, 6 and 7 // *BMC Biochem.* - 2013. - Vol. 14. - P. 5.
 138. Moore B.W., Perez V.J., Gehring M. Assay and regional distribution of a soluble protein characteristic of the nervous system // *J. Neurochem.* - 1968. - Vol. 15, № 4. - P. 265–272.
 139. Aitken A. 14-3-3 proteins: a historic overview // *Semin. Cancer Biol.* - 2006. - Vol. 16, № 3. - P. 162–172.
 140. 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.
141. Liu D., Bienkowska J., Petosa C., Collier R.J., Fu H., Liddington R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein // *Nature*. - 1995. - Vol. 376, № 6536. - P. 191–194.
 142. Jones D.H., Ley S., Aitken A. Isoforms of 14-3-3 protein can form homo- and heterodimers in vivo and in vitro: implications for function as adapter proteins // *FEBS Lett.* - 1995. - Vol. 368, № 1. - P. 55–58.
 143. Wilker E.W., Grant R.A., Artim S.C., Yaffe M.B. A structural basis for 14-3-3sigma functional specificity // *J. Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280, № 19. - P. 18891–18898.
 144. Yang X., Lee W.H., Sobott F., Papagrigoriou E., Robinson C.V., Grossmann J.G., Sundström M., Doyle D.A., Elkins J.M. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family // *PNAS*. - 2006. - Vol. 103, № 46. - P. 17237–17242.
 145. Denison F.C., Gökirmak T., Ferl R.J. Phosphorylation-related modification at the dimer interface of 14-3-3 ω dramatically alters monomer interaction dynamics // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2014. - Vol. 541. - P. 1–12.
 146. Gu Y.-M., Jin Y.-H., Choi J.-K., Baek K.-H., Yeo C.-Y., Lee K.-Y. Protein kinase A phosphorylates and regulates dimerization of 14-3-3 epsilon // *FEBS Lett.* - 2006. - Vol. 580, № 1. - P. 305–310.
 147. Trošanová Z., Louša P., Kozeleková A., Brom T., Gašparik N., Tungli J., Weisová V., Župa E., Žoldák G., Hritz J. Quantitation of Human 14-3-3 ζ Dimerization and the Effect of Phosphorylation on Dimer-monomer Equilibria // *J. Mol. Biol.* - 2022. - Vol. 434, № 7. - P. 167479.
 148. Sluchanko N.N., Uversky V.N. Hidden disorder propensity of the N-terminal segment of universal adapter protein 14-3-3 is manifested in its monomeric form: Novel insights into protein dimerization and multifunctionality // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2015. - Vol. 1854, № 5. - P. 492–504.
 149. Sluchanko N.N., Roman S.G., Chebotareva N.A., Gusev N.B. Chaperone-like activity of monomeric human 14-3-3 ζ on different protein substrates // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2014. - Vol. 549. - P. 32–39.
 150. Uhart M., Bustos D.M. Human 14-3-3 paralogs differences uncovered by cross-talk of phosphorylation and lysine acetylation // *PLoS One*. - 2013. - Vol. 8, № 2. - P. e55703.
 151. Madeira F., Tinti M., Murugesan G., Berrett E., Stafford M., Toth R., Cole C., MacKintosh C., Barton G.J. 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides // *Bioinformatics*. - 2015. - Vol. 31, № 14. - P. 2276–2283.
 152. Coblitz B., Shikano S., Wu M., Gabelli S.B., Cockrell L.M., Spieker M., Hanyu Y., Fu H., Amzel L.M., Li M. C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors // *J. Biol. Chem.* - 2005. - Vol. 280, № 43. - P. 36263–36272.
 153. Yaffe M.B., Rittinger K., Volinia S., Caron P.R., Aitken A., Leffers H., Gamblin S.J., Smerdon S.J., Cantley L.C. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity // *Cell*. - 1997. - Vol. 91, № 7. - P. 961–971.
 154. Johnson C., Crowther S., Stafford M.J., Campbell D.G., Toth R., MacKintosh C. Bioinformatic and experimental survey of 14-3-3-binding sites // *Biochem. J.* - 2010. - Vol. 427, № 1. - P. 69–78.
 155. Wang B., Yang H., Liu Y.C., Jelinek T., Zhang L., Ruoslahti E., Fu H. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display // *Biochemistry*. - 1999. - Vol. 38, № 38. - P. 12499–12504.
 156. Pietromonaco S.F., Seluja G.A., Aitken A., Elias L. Association of 14-3-3 proteins with centrosomes // *Blood Cells Mol. Dis.* - 1996. - Vol. 22, № 3. - P. 225–237.
 157. Mukhopadhyay A., Sehgal L., Bose A., Gulvady A., Senapati P., Thorat R., Basu S., Bhatt K., Hosing A.S., Balyan R., Borde L., Kundu T.K., Dalal S.N. 14-3-3 γ Prevents Centrosome Amplification and Neoplastic Progression // *Sci. Rep.* - 2016. - Vol. 6. - P. 26580.
 158. Schindler C.K., Heverin M., Henshall D.C. Isoform- and subcellular fraction-specific differences in hippocampal 14-3-3 levels following experimentally evoked seizures and in human temporal lobe epilepsy // *J. Neurochem.* - 2006. - Vol. 99, № 2. - P. 561–569.
 159. Lamba S., Ravichandran V., Major E.O. Glial cell type-specific subcellular localization of 14-3-3 zeta:

- an implication for JCV tropism // *Glia*. - 2009. - Vol. 57, № 9. - P. 971–977.
160. Abdrabou A., Brandwein D., Wang Z. Differential Subcellular Distribution and Translocation of Seven 14-3-3 Isoforms in Response to EGF and During the Cell Cycle // *Int. J. Mol. Sci.* - 2020. - Vol. 21, № 1.
 161. Alam R., Hachiya N., Sakaguchi M., Kawabata S., Iwanaga S., Kitajima M., Mihara K., Omura T. cDNA cloning and characterization of mitochondrial import stimulation factor (MSF) purified from rat liver cytosol // *J. Biochem.* - 1994. - Vol. 116, № 2. - P. 416–425.
 162. Hachiya N., Alam R., Sakasegawa Y., Sakaguchi M., Mihara K., Omura T. A mitochondrial import factor purified from rat liver cytosol is an ATP-dependent conformational modulator for precursor proteins // *EMBO J.* - 1993. - Vol. 12, № 4. - P. 1579–1586.
 163. Ford H.C., Allen W.J., Pereira G.C., Liu X., Dillingham M.S., Collinson I. Towards a molecular mechanism underlying mitochondrial protein import through the TOM and TIM23 complexes // *Elife*. - 2022. - Vol. 11.
 164. Trcka F., Durech M., Vankova P., Vandova V., Simoncik O., Kavan D., Vojtesek B., Muller P., Man P. The interaction of the mitochondrial protein importer TOMM34 with HSP70 is regulated by TOMM34 phosphorylation and binding to 14-3-3 adaptors // *J. Biol. Chem.* - 2020. - Vol. 295, № 27. - P. 8928–8944.
 165. Bauer M.F., Hofmann S., Neupert W., Brunner M. Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes // *Trends Cell Biol.* - 2000. - Vol. 10, № 1. - P. 25–31.
 166. Kozeleková A., Náplavová A., Brom T., Gašparik N., Šimek J., Houser J., Hritz J. Phosphorylated and Phosphomimicking Variants May Differ-A Case Study of 14-3-3 Protein // *Front Chem.* - 2022. - Vol. 10. - P. 835733.
 167. Coblitz B., Wu M., Shikano S., Li M. C-terminal binding: an expanded repertoire and function of 14-3-3 proteins // *FEBS Lett.* - 2006. - Vol. 580, № 6. - P. 1531–1535.
 168. Sarkar G., Sommer S.S. The “megaprimer” method of site-directed mutagenesis // *Biotechniques*. - 1990. - Vol. 8, № 4. - P. 404–407.
 169. Tugaeva K.V., Tsvetkov P.O., Sluchanko N.N. Bacterial co-expression of human Tau protein with protein kinase A and 14-3-3 for studies of 14-3-3/phospho-Tau interaction // *PLoS One*. - 2017. - Vol. 12, № 6. - P. e0178933.
 170. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. - 1970. - Vol. 227, № 5259. - P. 680–685.
 171. Sluchanko N.N., Chernik I.S., Seit-Nebi A.S., Pivovarova A.V., Levitsky D.I., Gusev N.B. Effect of mutations mimicking phosphorylation on the structure and properties of human 14-3-3zeta // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2008. - Vol. 477, № 2. - P. 305–312.
 172. Ghorbani S., Fossbakk A., Jorge-Finnigan A., Flydal M.I., Haavik J., Kleppe R. Regulation of tyrosine hydroxylase is preserved across different homo- and heterodimeric 14-3-3 proteins // *Amino Acids*. - 2016. - Vol. 48, № 5. - P. 1221–1229.
 173. Кантор Ч. Ш.П. Биофизическая химия. Мир.
 174. Фрайфелдер Д. Физическая биохимия / ed. Фриман В.Х. Москва: Мир, - 1980.
 175. Птицын, Финкельштейн. Физика белка: Курс лекций // Москва: Университет.
 176. Пермяков Е.А. Метод собственной люминесценции белка. Наука, - 2003.
 177. Da Vela S., Svergun D.I. Methods, development and applications of small-angle X-ray scattering to characterize biological macromolecules in solution // *Curr Res Struct Biol.* - 2020. - Vol. 2. - P. 164–170.
 178. Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, - 2003. - Vol. 36, № 5. - P. 1277–1282.
 179. Rambo R.P., Tainer J.A. Accurate assessment of mass, models and resolution by small-angle scattering // *Nature*. - 2013. - Vol. 496, № 7446. - P. 477–481.

180. Volkov V.V., Svergun D.I., IUCr. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, - 2003. - Vol. 36, № 3. - P. 860–864.
181. Svergun D., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates // *J. Appl. Crystallogr. International Union of Crystallography*, - 1995. - Vol. 28, № 6. - P. 768–773.
182. Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* - 2004. - Vol. 60, № Pt 12 Pt 1. - P. 2126–2132.
183. Bernadó P., Mylonas E., Petoukhov M.V., Blackledge M., Svergun D.I. Structural characterization of flexible proteins using small-angle X-ray scattering // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - Vol. 129, № 17. - P. 5656–5664.
184. Petoukhov M.V., Franke D., Shkumatov A.V., Tria G., Kikhney A.G., Gajda M., Gorba C., Mertens H.D.T., Konarev P.V., Svergun D.I. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis // *J. Appl. Crystallogr.* - 2012. - Vol. 45, № Pt 2. - P. 342–350.
185. Reitz J., Gehrig-Burger K., Strauss J.F. 3rd, Gimpl G. Cholesterol interaction with the related steroidogenic acute regulatory lipid-transfer (START) domains of StAR (STARD1) and MLN64 (STARD3) // *FEBS J.* - 2008. - Vol. 275, № 8. - P. 1790–1802.
186. Avdulov N.A., Chochina S.V., Igbavboa U., Warden C.S., Vassiliev A.V., Wood W.G. Lipid binding to amyloid beta-peptide aggregates: preferential binding of cholesterol as compared with phosphatidylcholine and fatty acids // *J. Neurochem.* - 1997. - Vol. 69, № 4. - P. 1746–1752.
187. Bushueva T.L., Busel E.P., Burstein E.A. Relationship of thermal quenching of protein fluorescence to intramolecular structural mobility // *Biochim. Biophys. Acta.* - 1978. - Vol. 534, № 1. - P. 141–152.
188. Gaudreault F., Morency L.-P., Najmanovich R.J. NRGsuite: a PyMOL plugin to perform docking simulations in real time using FlexAID // *Bioinformatics.* - 2015. - Vol. 31, № 23. - P. 3856–3858.
189. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J. Comput. Chem.* - 2009. - Vol. 30, № 16. - P. 2785–2791.
190. Perrie W.T., Perry S.V. An electrophoretic study of the low-molecular-weight components of myosin // *Biochem. J.* - 1970. - Vol. 119, № 1. - P. 31–38.
191. Costa S., Almeida A., Castro A., Domingues L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in *Escherichia coli*: the novel Fh8 system // *Front. Microbiol.* - 2014. - Vol. 5. - P. 63.
192. Ferrer M., Chernikova T.N., Yakimov M.M., Golyshin P.N., Timmis K.N. Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures // *Nat. Biotechnol.* - 2003. - Vol. 21, № 11. - P. 1266–1267.
193. Wang X., Liu Z., Eimerl S., Timberg R., Weiss A.M., Orly J., Stocco D.M. Effect of truncated forms of the steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transfer // *Endocrinology.* - 1998. - Vol. 139, № 9. - P. 3903–3912.
194. Raran-Kurussi S., Waugh D.S. The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated // *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7, № 11. - P. e49589.
195. Whitmore L., Wallace B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - Vol. 32, № Web Server issue. - P. W668–W673.
196. 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.
197. Slonimskiy Y.B., Egorkin N.A., Ashikhmin A.A., Friedrich T., Maksimov E.G., Sluchanko N.N. Reconstitution of the functional Carotenoid-Binding Protein from silkworm in *E. coli* // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2022. - Vol. 214. - P. 664–671.
198. García De La Torre J., Huertas M.L., Carrasco B. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure // *Biophys. J.* - 2000. - Vol. 78, № 2. - P. 719–730.

199. Barbar E., Lavigne P., Lehoux J.-G. Validation of the mechanism of cholesterol binding by StAR using short molecular dynamics simulations // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* - 2009. - Vol. 113, № 1-2. - P. 92–97.
200. Li N.C., Fan J., Papadopoulos V. Sterol Carrier Protein-2, a Nonspecific Lipid-Transfer Protein, in Intracellular Cholesterol Trafficking in Testicular Leydig Cells // *PLoS One.* - 2016. - Vol. 11, № 2. - P. e0149728.
201. Robalo J.R., Ramalho J.P.P., Loura L.M.S. NBD-labeled cholesterol analogues in phospholipid bilayers: insights from molecular dynamics // *J. Phys. Chem. B.* - 2013. - Vol. 117, № 44. - P. 13731–13742.
202. 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.
203. Medvedeva M.V., Bushueva T.L., Shirinsky V.P., Lukas T.J., Watterson D.M., Gusev N.B. Interaction of smooth muscle caldesmon with calmodulin mutants // *FEBS Lett.* - 1995. - Vol. 360, № 1. - P. 89–92.
204. Robert X., Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server // *Nucleic Acids Res.* - 2014. - Vol. 42, № Web Server issue. - P. W320–W324.
205. Tugaeva K.V., Hawkins D.E.D.P., Smith J.L.R., Bayfield O.W., Ker D.-S., Sysoev A.A., Klychnikov O.I., Antson A.A., Sluchanko N.N. The Mechanism of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Recognition by the Human 14-3-3 Proteins // *J. Mol. Biol.* - 2021. - Vol. 433, № 8. - P. 166875.
206. Tugaeva K.V., Remeeva A., Gushchin I., Cooley R.B., Sluchanko N.N. Design, expression, purification and crystallization of human 14-3-3 ζ protein chimera with phosphopeptide from proapoptotic protein BAD // *Protein Expr. Purif.* - 2020. - Vol. 175. - P. 105707.
207. Sluchanko N.N., Tugaeva K.V., Greive S.J., Antson A.A. Chimeric 14-3-3 proteins for unraveling interactions with intrinsically disordered partners // *Sci. Rep.* - 2017. - Vol. 7, № 1. - P. 12014.
208. Tugaeva K.V., Kalacheva D.I., Cooley R.B., Strelkov S.V., Sluchanko N.N. Concatenation of 14-3-3 with partner phosphoproteins as a tool to study their interaction // *Sci. Rep.* - 2019. - Vol. 9, № 1. - P. 15007.
209. Liapis A., Chen F.W., Davies J.P., Wang R., Ioannou Y.A. MLN64 transport to the late endosome is regulated by binding to 14-3-3 via a non-canonical binding site // *PLoS One.* - 2012. - Vol. 7, № 4. - P. e34424.
210. Chernik I.S., Seit-Nebi A.S., Marston S.B., Gusev N.B. Small heat shock protein Hsp20 (HspB6) as a partner of 14-3-3 γ // *Mol. Cell. Biochem.* - 2007. - Vol. 295, № 1-2. - P. 9–17.
211. Obenauer J.C., Cantley L.C., Yaffe M.B. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs // *Nucleic Acids Res.* - 2003. - Vol. 31, № 13. - P. 3635–3641.
212. Sluchanko N.N., Seit-Nebi A.S., Gusev N.B. Effect of phosphorylation on interaction of human tau protein with 14-3-3 ζ // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2009. - Vol. 379, № 4. - P. 990–994.
213. Sluchanko N.N. Association of Multiple Phosphorylated Proteins with the 14-3-3 Regulatory Hubs: Problems and Perspectives // *J. Mol. Biol.* - 2018. - Vol. 430, № 1. - P. 20–26.
214. Kalabova D., Smidova A., Petrvalska O., Alblova M., Kosek D., Man P., Obsil T., Obsilova V. Human procaspase-2 phosphorylation at both S139 and S164 is required for 14-3-3 binding // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2017. - Vol. 493, № 2. - P. 940–945.
215. Bustos D.M., Iglesias A.A. Intrinsic disorder is a key characteristic in partners that bind 14-3-3 proteins // *Proteins.* - 2006. - Vol. 63, № 1. - P. 35–42.
216. Sluchanko N.N., Bustos D.M. Intrinsic disorder associated with 14-3-3 proteins and their partners // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* - 2019. - Vol. 166. - P. 19–61.
217. Qi X.-J., Wildey G.M., Howe P.H. Evidence that Ser87 of BimEL is phosphorylated by Akt and regulates BimEL apoptotic function // *J. Biol. Chem.* - 2006. - Vol. 281, № 2. - P. 813–823.
218. Laflamme C., Galan J.A., Ben El Kadhi K., Méant A., Zeledon C., Carréno S., Roux P.P., Emery G. Proteomics Screen Identifies Class I Rab11 Family Interacting Proteins as Key Regulators of

Cytokinesis // *Mol. Cell. Biol.* - 2017. - Vol. 37, № 3.

219. Gambaryan S., Butt E., Marcus K., Glazova M., Palmethofer A., Guillon G., Smolenski A. cGMP-dependent protein kinase type II regulates basal level of aldosterone production by zona glomerulosa cells without increasing expression of the steroidogenic acute regulatory protein gene // *J. Biol. Chem.* - 2003. - Vol. 278, № 32. - P. 29640–29648.
220. Fleury A., Mathieu A.P., Ducharme L., Hales D.B., LeHoux J.-G. Phosphorylation and function of the hamster adrenal steroidogenic acute regulatory protein (StAR) // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* - 2004. - Vol. 91, № 4-5. - P. 259–271.
221. Astuti P., Boutros R., Ducommun B., Gabrielli B. Mitotic phosphorylation of Cdc25B Ser321 disrupts 14-3-3 binding to the high affinity Ser323 site // *J. Biol. Chem.* - 2010. - Vol. 285, № 45. - P. 34364–34370.
222. Sluchanko N.N., Beelen S., Kulikova A.A., Weeks S.D., Antson A.A., Gusev N.B., Strelkov S.V. Structural Basis for the Interaction of a Human Small Heat Shock Protein with the 14-3-3 Universal Signaling Regulator // *Structure.* - 2017. - Vol. 25, № 2. - P. 305–316.
223. Gardino A.K., Smerdon S.J., Yaffe M.B. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms // *Semin. Cancer Biol.* - 2006. - Vol. 16, № 3. - P. 173–182.
224. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy // *Principles of Fluorescence Spectroscopy* / ed. Lakowicz J.R. Boston, MA: Springer US, - 2006. - P. 27–61.
225. Buchan D.W.A., Minneci F., Nugent T.C.O., Bryson K., Jones D.T. Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench // *Nucleic Acids Res.* - 2013. - Vol. 41, № Web Server issue. - P. W349–W357.
226. Hu J., Zhang Z., Shen W.-J., Azhar S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones // *Nutr. Metab.* - 2010. - Vol. 7. - P. 47.

Благодарности

Я глубоко благодарна своему научному руководителю, доктору биологических наук Случанко Николаю Николаевичу за предложенную тему диссертации, за ключевой вклад в становление меня как научного работника, за чуткое руководство и умение вдохновлять, за мудрые советы, поддержку и приятные беседы.

Автор глубоко благодарна д.б.н. Е.Г. Максимова за помощь в проведении экспериментов с использованием время-разрешенной флуориметрии. Автор глубоко благодарна к.х.н. Д.В. Сотникову за помощь в проведении исследований с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса.

Я благодарна членам группы белок-белковых взаимодействий, особенно Ю.Б. Слонимскому, А.А. Капитоновой, Д.А. Лунеговой и Н.А. Егоркину за создание приятной рабочей атмосферы и хорошего настроения, за взаимовыручку и за интересные научные и ненаучные дискуссии.

Я благодарна профессору, д.б.н. Д.И. Левицкому и членам Лаборатории структурной биохимии белка за ценные советы, за готовность всегда прийти на помощь и за душевные разговоры.

Я выражаю благодарность чл.-корр. РАН, профессору, д.б.н. Н.Б. Гусеву и сотрудникам кафедры биохимии МГУ имени М.В. Ломоносова за неоценимый вклад в мой научный опыт и за постоянную поддержку на протяжении многих лет.

Я благодарна своим родителям, своей семье и близким за помощь и всестороннюю поддержку, за неиссякаемую веру в меня - без их внимания и заботы я бы не справилась.