

## Отзыв на автореферат диссертации

**Тугаевой Кристины Владимировны** «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия

Работа Тугаевой К. В. посвящена изучению структуры и некоторых особенностей функционирования STARD1 (StAR, Steroidogenic acute regulatory protein), который является одним из ключевых белков, вовлеченных в регуляцию стероидогенеза у млекопитающих. В стероидогенных клетках STARD1 опосредует транспорт холестерина от наружной к внутренней мембране митохондрий, где осуществляются начальные реакции конверсии холестерина в каскаде стероидогенеза. Нарушение функционирования STARD1 приводит к нарушению синтеза регулирующих жизненно-важные функции стероидных гормонов и развитию серьезных заболеваний. Такое важное участие в метаболизме стероидов делает STARD1 объектом пристального внимания современных исследователей. Однако к настоящему времени остаются не выясненными ряд деталей, касающихся топогенеза и регуляции активности белка, нет однозначных данных о механизме его функционирования. Очевидно, что информация о структурно-функциональных свойствах и механизмах регуляции белков, обеспечивающих синтез стероидных гормонов, дает возможность разрабатывать подходы к коррекции нарушений стероидогенеза при различных заболеваниях, и, кроме того, конструировать биотехнологические системы синтеза физиологически активных стероидов, крайне востребованных в фармакологии. В этой связи работа Тугаевой К. В., несомненно, является актуальной и своевременной.

Диссертационная работа Тугаевой К.В. хорошо спланирована и имеет четко сформулированные цели и задачи. Первой задачей автора являлась разработка новой методики для получения рекомбинантного белка STARD1 (делетированного STARD1(66-285 а.о.), включающего функциональный START-домен). С целью оптимизации процесса выделения с использованием изящного модульного подхода получена генетическая конструкция, обеспечивающая синтез STARD1, слитого для увеличения растворимости с отщепляемым впоследствии белком, связывающим мальтозу, несущим гексагистидиновый таг. Предложенная стратегия выделения, не включающая стадии денатурации-ренатурации белка, позволила получить полностью растворимый электрофоретически гомогенный STARD1 в миллиграммовых количествах, достаточных для изучения его структурных и каталитических характеристик. Полученный STARD1 является мономером и имеет в растворе компактную глобулярную структуру, близкую к известной кристаллической структуре апоформы белка STARD1. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что для попадания холестерина в лиганд-связывающую полость STARD1 достаточно отгибания  $\Omega_1$ -петли и не требуется существенных перестроек в структуре белка. Следует отметить, что разработка методики получения из клеток *E. coli* STARD1 человека является бесспорным достижением автора, т.к. наличие выделенного белка открывает перспективы для детального изучения механизма функционирования STARD1 в *in vitro* модельных системах. Более того, разработанный подход может быть использован для выделения других рекомбинантных белков, склонных к агрегации в клетках бактерий.

При выполнении основной части работы, посвященной изучению функциональных свойств STARD1, Тугаевой К.В. впервые обнаружена способность STARD1 взаимодействовать с рядом флуоресцентных аналогов холестерина (20NBD, 22NBD, 25NBD и 3NBD), что открывает возможность для их использования, как и широко используемого аналога 22NBD, для изучения лиганд-связывающих свойств STARD1 с помощью флуоресцентных методов. Впервые продемонстрировано, что положение NBD-группы в составе стероида может существенно влиять на параметры связывания лиганда с белком. Установлено, что наиболее оптимальным вариантом из данных флуоресцентных соединений для изучения лиганд-связывающих свойств STARD1 является 20NBD, связывание которого по данным флуоресцентного титрования и молекулярного докинга практически эквивалентно связыванию холестерина и приводит к увеличению термостабильности STARD1.

В данной работе впервые исследован механизм взаимодействия STARD1 с регуляторными белками семейства 14-3-3, взаимодействие с которыми в составе



трансдуцеосомы необходимо для проявления активности STARD1. Проведение большой серии экспериментов позволило диссертанту сделать ряд важных выводов о роли процессов фосфорилирования STARD1, получить новые данные о том, способен ли фосфорилированный белок (ppSTARD1<sub>(46-285)</sub>) в составе комплекса с 14-3-3 связывать лиганд и влияет ли фосфорилирование STARD1 на взаимодействие с белками 14-3-3. Обнаружено, что i) образование комплекса фосфорилированного STARD1 с белками 14-3-3 не влияет на конформацию START-домена и его способность связывать лиганды; ii) для образования комплекса требуется фосфорилирование остатка Ser57, что делает возможным связывание димера 14-3-3 с двумя мономерами STARD1; iii) фосфорилированный остаток Ser195 вероятно участвует в связывании с 14-3-3 только при частичном разворачивании STARD1, например, в процессе транслокации белка в митохондрии. В целом автором продемонстрирована разная роль остатков Ser195 и Ser57 в образовании комплекса STARD1 - 14-3-3 и предложен молекулярный механизм взаимодействия STARD1 с белками семейства 14-3-3 в процессе стероидогенеза.

Тугаевой К.В. проведена серьезная научная работа, которая требовала глубокого понимания предмета изучения, нахождения нестандартных путей решения, что, как правило, напрямую зависит от квалификации, грамотности и трудолюбия исследователя, и получен ряд абсолютно новых, интересных и значимых результатов. Следует отметить, что данная работа характеризуется многоплановостью проведенных исследований, выполненных на очень высоком экспериментальном уровне с использованием большого арсенала самых современных методов (молекулярно-биологических, биохимических, спектральных, методов биоинформатики и др.)

Результаты диссертационной работы были представлены в виде 7 статей в международных рецензируемых журналах, а также в виде стендовых и устных докладов на научных конференциях.

По объему представленных материалов, их научно-практической значимости, актуальности, публикациям и современному систематическому подходу диссертационная работа соответствует всем требованиям для присвоения соискателю ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - биохимия.

25 апреля 2023 г.

Доктор биологических наук,  
ведущий научный сотрудник отдела молекулярных основ онтогенеза  
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова



Л.А. Новикова

