# ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Тугаевой Кристины Владимировны "Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека", представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия

**Актуальность**

Стероидные гормоны являются важнейшими регуляторами физиологических функций организма, контролирующими процесс размножения, работу сердечно-сосудистой системы, метаболизм, реализацию воспалительных реакций и ответа на стресс. Синтез стероидных гормонов происходит в стероидогенных клетках, которые располагаются в надпочечниках, половых железах, плаценте, а также в мозге, жировой ткани и кишечнике. Стероидные гормоны синтезируются на основе холестерола в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме. В их синтезе участвует более 25 ферментов, располагающихся в этих органеллах. На молекулярном уровне лимитирующей стадией стероидогенеза является доставка холестерола к внутренней мембране митохондрий. Ее осуществляет специальный белок STARD1, относящийся к семейству белков STARD. В гене *star*, кодирующем белок STARD1, выявлено более 25 мутаций, приводящих к аминокислотным заменам, возникновению стоп-кодонов или нарушению сплайсинга мРНК STARD1. С генетическими нарушениями в STARD1 ассоциировано развитие тяжелой формы липоидной врожденной гиперплазии надпочечников (Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia, LCAH). В связи с этим обстоятельством STARD1 находится в фокусе многих исследований в мире. Вместе с тем, ряд важнейших свойств белком STARD1 изучен слабо, и в литературе имеются противоречивые сведения об этом белке и его взаимодействиях. В частности, поверхностно описаны параметры взаимодействия STARD1 с холестеролом, и имеются обоснованные сомнения в корректности предложенного другими авторами механизма связывания STARD1 с белками семейства 14-3-3, которые образуют комплексы с некоторыми фосфорилированными белками. В диссертационной работе К.В. Тугаевой актуальные вопросы изучения STARD1 получили дальнейшее развитие.

**В работе сформулированы следующие экспериментальные задачи**

1. Получить препарат рекомбинантного STARD1 из бактерий и проанализировать его свойства с помощью биохимических и спектральных методов.
2. Охарактеризовать конформацию STARD1 в растворе и сопоставить ее с известной кристаллической структурой апоформы белка.

3. Исследовать взаимодействие STARD1 с флуоресцентными аналогами холестерола.

4. Изучить механизм взаимодействия STARD1 с белками семейства 14-3-3.

**Методы и подходы, примененные в работе**

Методы молекулярного клонирования были использованы для создания необходимых генетических конструкций STARD1. Рекомбинантные белки получали в бактериальных системах, варьируя штаммы-продуценты и температуру культивирования для оптимизации протоколов получения максимального количества белков в растворимой форме. Автор использовал оригинальную лабораторную методику получения фосфорилированных форм STARD1 при их коэкспрессии с каталитической субъединицей протеинкиназы А. Очистку белков проводили комбинацией хроматографических методов. Структурно-функциональные свойства полученных белков и их комплексов исследовали методами нативного и денатурирующего электрофореза, аналитической гель-фильтрации. Широко применялись биофизические методы, такие как абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия (собственная флуоресценция триптофана в белках, поляризация и анизотропия флуоресценции, методы стационарной и время-разрешенной флуориметрии), метод кругового дихроизма, малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, поверхностного плазмонного резонанса. Подробно описан математический аппарат, применявшийся при анализе полученных данных. Использованы биоинформатические подходы и компьютерное моделирование. Знакомство с методическим разделом диссертационной работы Тугаевой К.В. не оставляет сомнений в том, что автором при решении поставленных задач были использованы современные методические подходы, позволяющие получать достоверные и воспроизводимые результаты.

**Основные результаты, полученные в работе**

1. Была разработана эффективная методика получения в бактериальной экспрессионной системе рекомбинантного белка STARD1 в растворимой форме. Для этого была использована генетическая конструкция STARD1 с отщепляемым мальтозо-связывающим белком, несущим гексагистидиновую последовательность. В результате были сняты вопросы относительно полноты восстановления нативной укладки STARD1 при денатурации и рефолдинге белка in vitro. В частности, было продемонстрировано, что полученный препарат STARD1 является мономером и имеет структуру в растворе, близкую к кристаллической.

2. Анализ данных малоуглового рассеяния рентгеновских лучей указал на то, что белок STARD1 является глобулярным, имеет ограниченную конформационную гибкость, и для захвата лиганда (холестерола или его производных) достаточно изменения положения т.н. Ω1-петли.

3. При изучении параметров связывания STARD1 с флуоресцентными аналогами холестерола, мечеными с помощью NBD флуорофора (среди которых были новые ранее не изученные молекулы, например, 20NBD, 3NBD) было показано, что положение NBD-группы в структуре молекулы холестерола влияет на связывание его флуоресцентных аналогов в полости STARD1. Наиболее оптимальным оказался 20NBD, связывание которого по данным флуоресцентного титрования и молекулярного докинга было практически эквивалентно связыванию холестерола и приводило к увеличению термостабильности STARD1.

4. В процессе систематического изучения взаимодействия STARD1 с адапторными белками 14-3-3 в зависимости от фосфорилирования остатков серина 57 и 195, модифицируемых протеинкиназой А в STARD1, было установлено, что ведущую роль во взаимодействии играет Сер57. Его фосфорилирование делает возможным связывание димера 14-3-3 с двумя мономерами STARD1. В то же время фосфорилирование Сер195 на влияет на связывание STARD1 с 14-3-3.

**Научная новизна и практическая ценность полученных результатов**

Диссертант разработал новую методику получения стероидогенного регуляторного белка STARD1 человека в бактериальной системе, позволяющую нарабатывать в препаративных количествах растворимый белок STARD1, пригодный для различных исследований in vitro. Полученный препарат белка позволил впервые исследовать конформацию STARD1 в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и подтвердить, что она близка к той, которую STARD1 имеет в кристалле. Результаты МУРР позволили выбрать из предложенных ранее механизмов функционирования STARD1, как акцептора холестерола, наиболее вероятный: для захвата лиганда достаточно изменения положения Ω1-петли в структуре STARD1.

Был сделан шаг вперед в изучении связывания флуоресцентных NBD-аналогов холестерола с STARD1. Был идентифицирован новый NBD-аналог холестерола, т.н. 20NBD, который оказался наиболее оптимальным для изучения лиганд-связывающих свойств STARD1 с помощью флуоресцентных методов. Таким образом, помимо генерации новых знаний в практику исследований был введен новый молекулярный инструмент для анализа взаимодействия STARD1 холестеролом.

Впервые исследован молекулярный механизм взаимодействия STARD1 с регуляторными белками семейства 14-3-3. Получены новые данные о роли фосфорилирования остатков Ser57 и Ser195 STARD1 в регуляции его взаимодействия с белками 14-3-3. Эти данные позволяют более полно представить, каким образом

образуется белковый комплекс, в составе которого STARD1 переносит холестерол ко внутренней мембране митохондрий в процессе стероидогенеза.

**Основные замечания и вопросы по сути диссертационной работы**

1. Обзор литературы очень содержательный, сфокусированный на изучаемой проблеме, хорошо структурированный и прекрасно иллюстрированный. Замечаний нет.

2. Материалы и Методы. При описании экспериментов по измерению флуоресценции, например, 2.6.1.1. Метод стационарной флуориметрии, автор указывает, что измерения проводили при напряжении 700 В. Что дает эта информация?

3. Результаты и их обсуждение. Основные вопросы и замечания касаются этого раздела работы.

а) Рис. 30Б. Термостабильность STARD1 в присутствии лигандов. Какими соображениями определялось именно такое соотношение лигандов при титровании: 1 мкМ 20NBD и 5 мкМ 3NBD? Какое $T_{0.5}$ давал 1 мкМ 20NBD отдельно?

б) Таблица 9. Что означают проценты в колонках 2 и 3?

в) 3.4.2.1. Получение и характеристика препаратов белков. Почему возникла необходимость делать конструкции STARD146-285-S56A/L59P? Было ли включение фосфата РКА при экспрессии в Сер57 в растворимой конструкции $STARD1_{46-285}$?

г) с. 107 «Повышенная склонность к агрегации белка pSTARD146-285-S56A не позволила получить сенсограммы….». Означает ли это, что замена L59P снижает склонность STARD1к агрегации?

д) с. 108 «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». Не совсем удачное выражение. Здесь возникает важный вопрос. В работе показано, что фосфорилирование Сер195 в STARD1 не приводит к образованию комплекса с 14-3-3. Примерно тот же результат получается, если не мутировать L59P - слабое взаимодействие in vitro. Если же оставить интактным тандем Сер56-Сер57, где оба остатка серина могут фосфорилироваться протеинкиназой А, можно вообще не получить желаемого взаимодействия. Насколько результаты с двойным мутантом STARD1 транслируются в ситуацию in vivo?

е) 3.4.2.5. Исследование взаимодействия 14-3-3 и STARD1 с помощью анизотропии флуоресценции NBD-холестерола. Почему для экспериментов по анизотропии флуоресценции выбрали 22NBD, а не 20 NBD, у которого флуоресцентный отклик вдвое лучше?

4. Выводы. На мой взгляд, фрагмент вывода 5: «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» является не выводом по работе, а предположением и более уместен в обсуждении результатов.

**Структура диссертационной работы**

Диссертационная работа написана в классическом стиле и состоит из глав "Обзор литературы", "Материалы и методы исследования" и "Результаты и их обсуждение", заключения, пяти выводов, восьми приложений и списка используемой литературы (226 источников). Работа изложена на 140 страницах и содержит 39 рисунков и 10 таблиц.

Все разделы написаны ясно, логично и компактно. Работа содержит много наглядных иллюстраций и таблиц, облегчающих восприятие материала читателем, исходно не углубленным в предмет исследования.

Недостатки в оформлении работы малочисленны. Во всей рукописи обнаружилось всего две (!) опечатки (с. 56 и 109). В списке литературы в источнике 175 не указаны инициалы авторов. Автор не избежал англоязычного и лабораторного научного жаргона типа фьюжн, фитирование, конструкт, зашкал, белок-таг и др.

Высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности и значимости диссертационной работы К.В. Тугаевой.

Сделанные автором выводы представляются корректными. Результаты работы неоднократно доложены на российских и международных конференциях и симпозиумах, по теме работы опубликовано 7 статей в журналах, рекомендованных ВАК и входящих в международные базы научных данных Scopus и/или Web of Science Core Collection. В четырех публикациях диссертант является первым автором / первым соавтором (Nature Communications). Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

**Заключение**

Представляемая Тугаевой Кристиной Владимировной диссертационная работа «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия», несомненно, является оригинальным научным исследованием, выполненным лично автором. В результате проведенных исследований автором получены новые данные фундаментального характера о белке STARD1, играющем важную роль в процессе стероидогенеза у млекопитающих и вовлеченном в развитие серьезных эндокринных патологий у человека. В работе разработаны новые методические подходы

и охарактеризованы новые молекулярные инструменты, позволяющие эффективно проводить дальнейшие исследования в данной проблемной области.

По актуальности, научной и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пп. 9-10 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N° 842 (в действующей редакции), а ее автор, Тугаева Кристина Владимировна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Главный научный сотрудник
и.о. руководителя лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
имени академика В.Н. Смирнова
Национального медицинского исследовательского
центра кардиологии имени академика Е.И. Чазова
Минздрава России
доктор биологических наук, профессор В.П. Ширинский

Специальности: 14.00.06 Кардиология, 03.00.04 Биохимия
Ширинский Владимир Павлович
ул. Академика Чазова д. 15а, Москва 121552, Россия
эл. почта: shirinsky@gmail.com
тел.: 8495-414-7246

Подпись д.б.н., профессора В.П. Ширинского заверяю:
Ученый секретарь ИЭК им. ак. В.Н. Смирнова
НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова кардиологии
Минздрава России
доктор медицинских наук О.С. Плеханова

27.04.2023