

Утверждаю  
Проректор Федянин А.А.



## ОТЗЫВ

официального оппонента Тюрин-Кузьмина Петра Алексеевича  
на диссертацию 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 темы

В работе Тугаевой К.В. изучался механизм работы ключевого белкового компонента комплекса транспорта холестерина в митохондрии, стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека. Одной из ключевых стадией синтеза стероидных гормонов является транслокация холестерина в митохондрии, где он подвергается окислению с образованием прегненолона. Из последнего далее синтезируется все разнообразие стероидных гормонов. Таким образом, STARD1- зависимый транспорт холестерина в митохондрии является ключевым этапом синтеза стероидных гормонов, а нарушения этого процесса ассоциированы с целым рядом болезней. Понимание молекулярных механизмов транспорта холестерина в митохондрии позволит подобрать новые субстанции для создания лекарственных средств, регулирующих синтез стероидных гормонов и связанные с ними процессы. В связи с этим, рецензируемая работа, посвященная детальному изучению структуры, функциональных свойств, механизмов связывания лиганда и выполнения его функций в процессе стероидогенеза, является актуальной как для фундаментальной науки, так и в практическом отношении.

**Цель исследования и задачи** сформулированы корректно и отражают различные аспекты комплексного исследования структуры и молекулярных механизмов связывания с лигандом изучаемого белка. При этом стоит отметить, что задачи сформулированы достаточно общими словами, что несколько диссонирует с поражающей глубиной проработки темы в самой работе, обоснованностью всех полученных выводов путем проверки каждого из них целым набором различных методов и компетентностью сделанных заключений.

### **Научная новизна**

Проведенная исследовательская работа обладает не вызывающей сомнения новизной. В ней впервые налажен протокол выделения белка STARD1 в нативной конформации без необходимого ранее этапа денатурации-ренатурации, который, по-видимому, вносил ошибки в структуру изучаемого белка. Впервые проведен комплекс исследований по изучению структурных конформационных особенностей белка STARD1 самого по себе и в комплексе с белком-регулятором 14-3-3. Впервые изучены конформационные особенности связывания этим белком своего субстрата холестерина. При этом был подобран новый флуоресцентно-меченный аналог субстрата, который лучше имитировал связывание нативного субстрата по сравнению с коммерчески доступными.

### **Научно-практическая значимость работы**

В практическом плане данные, полученные в работе Тугаевой К.В., дают важную базу для подбора и разработки новых лекарственных средств терапии ряда заболеваний, ассоциированных с нарушениями синтеза стероидных гормонов и транспорта холестерина в митохондрии, например, липоидной врожденной гиперплазии надпочечников.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Степень достоверности результатов обусловлена крайне большим объемом экспериментального материала. Несмотря на то, что статистическая обработка полученных результатов не была произведена, каждый вывод работы подтвержден проведением целого комплекса исследований, использующих разнообразные методы, базирующиеся на различных биофизических принципах. Это существенно повышает достоверность представленных данных. Идея работы, а также выдвинутые в ней цель и задачи базируются на обобщении и существенном анализе имеющихся в литературе сведений по обсуждаемой проблеме. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 9 научных конференциях разного уровня (международных и российских). Список публикаций включает 7 работ, все из которых изданы в ведущих российских и международных научных журналах. Все это свидетельствует о хорошем качестве работы и независимой высокой оценке специалистами ее результатов.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 140 страницах. Структура диссертации стандартная, состоящая из введения, 3 глав ("Обзор литературы", "Материалы и методы исследования" и "Результаты и их обсуждение"), заключения, выводов, 8 приложений и списка цитированной литературы. Список литературы включает 226 источников. Иллюстративный материал составляет 10 таблиц и 39 рисунков.

В главе 1 «Обзор литературы» автор подробно и глубоко проанализировала имеющиеся на сегодняшний день данные, касающиеся механизма работы белка STARD1. Обзор литературы начат с введения базовых понятий и насущных проблем - болезней человека, ассоциированных с мутациями в изучаемом белке и нарушениями его синтеза. В Обзоре литературы детально и основательно рассмотрены

существующие гипотезы механизма переноса холестерина в митохондрию, ключевая роль в этом процессе белка STARD1 и его регуляторов, в частности, 14-3-3. Обоснованно показано, почему ни одна из существующих гипотез механизмов работы STARD1 по переносу холестерина не может претендовать на звание наиболее вероятной. В каждой из них имеются противоречия с экспериментальными данными. В целом, Обзор литературы дает полное представление об изучаемой проблеме и даже читателю, далекому от изучаемой темы, позволяет погрузиться в проблему.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» автором дана характеристика методов исследования и используемых материалов. Детально и подробно описан каждый используемый в работе метод. Для не общеупотребимых методов детально описаны сферы их применения, достоинства и недостатки метода, с чем они связаны. Более того, для методов, требующих математических вычислений, приведены формулы, используемые для расчетов с описанием всех используемых параметров. Это значительно повышает доверие читателя к приведенным расчетам и выводам. Вообще, подробность и глубина погружения читателя в характеристику используемых методов столь высоки, что можно порекомендовать на основе раздела Методы издать методическое пособие для студентов и научных сотрудников по современным биохимическим методам изучения структуры белков.

Состав используемых в работе буферов приведен в отдельном Приложении 6. Однако в тексте работы указание на вышеупомянутое приложение приведено лишь однажды. Везде в тексте буферы просто названы шифрами "А", "Б", и т.д. Пропустив это указание, лишь дойдя до конца работы можно найти таблицу с описанием состава буферов. Хотелось бы порекомендовать дублировать ссылку на список используемых буферов и в других частях работы, где они упоминаются, для удобства читателя.

Хочется отметить значительное разнообразие использованных в исследовании методов, которые охватывают самые разные аспекты изучения структуры, свойств и механизмов функционирования изучаемого белка. Разнообразие использованных методик позволило диссертанту получить целостную картину механизмов функционирования белка STARD1 и обосновать достоверность полученных результатов.

Глава 3 посвящена описанию и анализу полученных результатов исследования. Автор на первом этапе поставил перед собой задачу наработать достаточное для исследования количество нативно свернутого белка STARD1. Уже эта первая задача оказалась настоящим вызовом. Автор перепробовал множество различных подходов к наработке и выделению целевого белка и, в итоге, разработал совершенно оригинальный подход к экспрессии в бактериях нативно свернутого белка STARD1 в больших количествах. Насколько можно судить из литературных данных, для белка STARD1 это было сделано впервые.

На втором этапе Тугаева К.В. проанализировала конформационную структуру белка STARD1 при помощи целого ряда современных биофизических методов. Из этого она сделала достоверный вывод о том, что конформация белка, наработанного по представленной в этой работе методике, в высокой степени соответствует нативной конформации белка.

В продолжение работы Автор исследовала особенности связывания лиганда изучаемого белка на модели различных флуоресцентно-меченых аналогов холестерина. По ходу выполнения этой части работы Тугаева К.В. подобрала новое флуоресцирующее соединение, которое по своим особенностям связывания с белком STARD1 максимально соответствовало самому холестерину и превосходило по этому параметру коммерчески доступные лиганды.

И, наконец, в завершающем разделе главы «Результаты и их обсуждение» Тугаева К.В. детально изучила связывание белка STARD1 с его важным регулятором белком 14-3-3. Комбинируя

биоинформатические, биохимические и биофизические методы, показала критически важные для этого взаимодействия сайты фосфорилирования изучаемого белка и сделала необходимые функциональные тесты для проверки альтернативных гипотез.

В целом, критический анализ работы несколько осложнялся тем, что, когда при ее чтении у меня возникали какие-то вопросы, в ближайших же разделах я получал на них ответ. В связи с этим, вопросов к разделу Результаты у меня нет.

В Заключение автором обобщены полученные данные и выделены основные, наиболее значимые, результаты работы, некоторые дискуссионные моменты, и намечены направления будущих исследований по рассматриваемой проблеме. Выводы соответствуют поставленным задачам, согласуются с приведенными в таблицах и рисунках экспериментальными данными и не противоречат ранее полученным данным и идеям других исследователей, но значительно дополняют их.

Диссертация удачно и полно иллюстрирована, документирована рисунками, схемами описываемых механизмов, рассчитанными структурами белков, таблицами. Она очень хорошо выверена и отредактирована, практически не встречаются ошибки и опечатки. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы, в нем показан вклад автора в проведенное исследование, а также степень новизны и теоретическая и практическая значимость результатов исследований.

### **Замечания и вопросы по работе**

К диссертации имеются некоторые замечания и вопросы.

Замечания:

1. Не вполне корректная формулировка на стр 12: "аминокислоты и их производные (пептиды и белки)". Классически под производными аминокислот понимают такие соединения как, например, катехоламины или серотонин. Пептидные и белковые гормоны обычно выносят в отдельную группу гормонов, но не производных аминокислот.
2. Стр 17 "Прямое влияние этих белков на стероидогенез было доказано при трансформации клеток соответствующей кДНК". Термин трансформация применяется для описания введения генетического материала в прокариоты. Для эукариот используют термины трансфекция (плазмида) и трансдукция (вирусные носители).
3. Сокращение ОММ (Outer membrane of mitochondria), как и IMM, все-таки можно было сделать на русском. Это не какая-то общепринятая во всем мире и вошедшая во все учебники аббревиатура, которую нет смысла переводить.

#### Вопросы:

1. В состав трансдуцесомы входит регуляторная субъединица протеинкиназы А. Но ничего не говорится о наличии ее классического партнера по взаимодействию - каталитической субъединицы протеинкиназы А. При этом вскользь упоминается возможная регуляция комплекса за счет фосфорилирования. Просьба уточнить, рассматривается ли существование в этом комплексе полноценной протеинкиназы А с возможностью активации ее киназной активности или же роль регуляторной субъединицы не зависит от каталитической? В обзоре литературы в контексте возможного действия ПКА на STARD1 обсуждается несколько сайтов фосфорилирования. Было бы полезно уточнить, насколько вероятно, что упоминаемые сайты фосфорилируются именно ПКА, насколько аминокислотная последовательность,

окружающая эти сайты фосфорилирования, близка к консенсусной последовательности протеинкиназы А.

2. Хотелось бы пояснения фразы стр 36: "Обнаружение регуляторных белков 14-3-3 в составе трансдуцеосомы указывает на то, что этот многокомпонентный белковый комплекс <...> также обладает способностью регулировать свою активность в соответствии с нуждами клетки." С одной стороны, как наличие в комплексе одного адаптерного белка может приводить к таким значимым выводам? А с другой, сложно было бы представить, чтобы ключевой этап синтеза стероидных гормонов был бы не регулируемым. Далее описывается важная роль белка 14-3-3 в регуляции множества процессов в клетке, но аналогичные выводы можно было бы сделать и из, например, вовлеченности в трансдуцеосому протеинкиназы А, которая более прямым образом регулирует клеточные процессы в зависимости от внешних стимулов.

**Заключение.** Диссертация Тугаевой Кристины Владимировны «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» является законченным и очень значимым научным исследованием. Работа выполнена и оформлена в соответствии с современными требованиями, диссертация и автореферат хорошо иллюстрированы. Достоверность полученных результатов базируется на большом объеме проведенных экспериментов с использованием разнообразных методов исследования. Выводы в полной мере отражают результаты исследования. Результаты диссертации доложены на российских и международных конференциях и полностью отражены в 16 печатных работах, из них 7 статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК, 9 тезисов докладов и материалов конференций. Автореферат полностью отражает содержание диссертации и соответствует положениям, выносимым на защиту.



В целом, по объему выполненного исследования, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа Тугаевой Кристины Владимировны «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» полностью соответствует требованиям пунктов «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Тугаева Кристина Владимировна заслуживает присуждения ей искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Официальный оппонент,

Доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины  
факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский  
государственный университет имени М.В.Ломоносова»

кандидат биологических наук

Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич

119991, Россия, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 27, корп. 1

Телефон: (495) 932-8814

Адрес электронной почты: [tyurinkuzmin.p@gmail.com](mailto:tyurinkuzmin.p@gmail.com)



*И.А. Жевнова*  
ЖЕВНОВА И.А.  
28.04.2023г.

Декан факультета фундаментальной медицины

МГУ имени М.В. Ломоносова,

академик, профессор, д.б.н. Ткачук В.А.

