



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@imb.ru](mailto:isinfo@imb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001



**«УТВЕРЖДАЮ»**

**Заместитель директор ИМБ РАН**

**Член-корреспондент РАН**

**В.А. Митькевич**

**2023 г.**

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

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

**Актуальность темы**

Стероидные гормоны - важная группа биологически активных соединений, которые играют роль во многих процессах жизнедеятельности организма (регуляция водно-солевого баланса и метаболизма, развитие воспалительного ответа, развитие половых признаков). Поскольку стероидные гормоны обладают мощным физиологическим действием, они не накапливаются в организме, а синтезируются в процессе стероидогенеза. Стероидогенный регуляторный белок STARD1 участвует в лимитирующей стадии стероидогенеза, а именно осуществляет доставку холестерина из цитоплазмы во внутреннюю мембрану митохондрии, где он превращается в прегненолон - общего предшественника всех стероидных гормонов. STARD1 синтезируется в виде белка-предшественника, состоящего из холестерол-связывающего домена (START-домена) и сигнального пептида с митохондриальной локализацией.

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. Известно, что рекомбинантный STARD1 обладает повышенной склонностью к агрегации и экспрессируется в бактериях, главным образом, в виде телец включения. Традиционная методика выделения STARD1 содержала стадию денатурации мочевиной с последующей стадией ренатурации. Такая методика существенно ограничивала структурно-функциональные исследования STARD1. Ввиду отсутствия кристаллической структуры комплекса STARD1/холестерол, также оставался открытым вопрос, каким образом природный лиганд ориентирован в полости белка. Считается, что STARD1 функционирует в составе многокомпонентного белкового комплекса, в состав которого входят белки семейства 14-3-3 - известные фосфопептид-связывающие белки-регуляторы. Однако на момент начала исследования, предложенный в литературе механизм взаимодействия 14-3-3 с STARD1 был неполным и требовал дальнейших проверок и уточнений.

Таким образом, изучение свойств белка STARD1 и механизмов его функционирования является актуальным и необходимым не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

### **Научная новизна и научно-практическая значимость работы**

В рамках работы была предложена новая методика получения STARD1 человека в бактериальной системе *E. coli*, основанная на экспрессии химерной конструкции STARD1 с отщепляемым мальтозо-связывающим белком (MBP), несущим гексагистиридиновый таг. Впервые была исследована конформация STARD1 в растворе (метод МУРР), что позволило выделить из предложенных ранее механизмов функционирования STARD1 наиболее вероятный. Проведено сравнение ряда флуоресцентных аналогов холестерина, содержащих флуоресцентную группу у разных атомов холестерина и показано, что положение NBD-группы влияет на эффективность связывания NBD-аналога холестерина с STARD1. Выявлен наиболее оптимальный лиганд для дальнейшего изучения лиганд-связывающих свойств STARD1 с помощью флуоресцентных методов. Впервые детально исследован механизм взаимодействия STARD1 с универсальными регуляторными белками семейства 14-3-3. Исследована роль 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.

### **Структура диссертации**

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

В работе поставлено пять задач, по которым сформулировано пять положений, выносимых на защиту, полностью отражающих эти задачи. По результатам диссертации сделано заключение и сформулировано пять выводов, которые соответствуют поставленным цели и задачам. Научные положения, сформулированные автором диссертационного исследования обоснованы, достоверны и логически вытекают из результатов проведенного исследования и полностью их отражают. Выводы, которые делает автор на основании совокупности данных, представленных в работе, полностью обоснованы.

### **Оценка содержания диссертационной работы, ее завершенность**

Во **введении** автор описывает актуальность темы исследования, формулирует цель и задачи, обосновывает научную новизну и научно-практическую значимость работы. Также в данном разделе приводятся сведения об апробации работы на научных конференциях и о публикациях, содержащих результаты по теме диссертации.

Глава «**Обзор литературы**» начинается с общего описания стероидных гормонов и стероидогенеза. Затем следует описание истории открытия белка STARD1, приводится сравнительная информация о других представителях семейства STARD-белков. Далее рассматриваются предложенные ранее механизмы захвата холестерина STARD1 и возможные механизмы его функционирования в процессе стероидогенеза, а также взаимодействие с другими белками, в том числе универсальными регуляторными белками 14-3-3. Конец раздела посвящен описанию белков семейства 14-3-3, а также их роли в регуляции активности STARD1.

В главе «**Материалы и методы исследования**» описаны многочисленные методы, использованные в работе. Работа проведена с использованием современных молекулярно-биологических, биохимических и биофизических методов. Так, рекомбинантные белки нарабатывали в клетках *E. coli*, затем очищали сочетанием различных видов хроматографий. Вторичную структуру оценивали с использованием метода кругового дихроизма в дальнем ультрафиолете. Изменения в третичной структуре косвенно оценивали по изменению триптофановой флуоресценции. Олигомерное состояние STARD1 в растворе исследовали методом аналитической гель-фильтрации, а также с использованием метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Влияние

флуоресцентных аналогов холестерина на термостабильность STARD1 оценивали по изменению температуры полуперехода белка. Кажущуюся константу диссоциации комплексов STARD1 с NBD-лигандами оценивали с помощью флуоресцентного титрования. Моделирование ориентации холестерина и NBD-лигандов в полости STARD1 проводили с помощью докинга с использованием современных программ. За взаимодействием белков 14-3-3 с разными вариантами STARD1 следили с помощью метода аналитической гель-фильтрации. Изучение параметров взаимодействия STARD1 с 14-3-3 проводили методом поверхностного плазмонного резонанса. Способность STARD1 связывать лиганд в присутствии 14-3-3 исследовали по изменению скорости релаксации анизотропии флуоресценции NBD-лиганда.

В главе **«Результаты и обсуждение»** описаны и проанализированы собственные результаты исследования. Результаты изложены в виде 4 частей, соответствующих основным направлениям исследований. Первая часть главы **«Результаты и обсуждение»** посвящена разработке метода получения растворимого белка STARD1 в бактериях *E.coli*. Автор показала, что экспрессия STARD1 в виде химерной конструкции с мальтозосвязывающим белком увеличивала растворимость целевого белка и позволяла получить гомогенный препарат растворимого STARD1 в количестве, достаточном для дальнейших его структурно-функциональных исследований.

Во второй части главы **«Результаты и обсуждение»** приведено описание свойств полученного рекомбинантного белка STARD1 и сравнение их с литературными данными. Полученный белок STARD1 имел выраженный спектр КД в дальней УФ-области, характерный для белка со смешанным « $\alpha/\beta$ » типом вторичной структуры, а состав вторичных структур был сходным с таковым из имеющейся кристаллической структуры для STARD1. Представление о третичной структуре белка было получено из спектра триптофановой флуоресценции. Наконец, в диапазоне исследуемых концентраций STARD1 был стабилен и хорошо растворим. Таким образом, с помощью биохимических, спектральных и структурных методов было показано, что полученный по новой предложенной методике STARD1 является мономером и обладает компактной структурой, близкой к сферической.

Третья часть главы **«Результаты и обсуждение»** посвящена исследованию конформационной подвижности STARD1 в растворе методом малоуглового рентгеновского рассеяния. Полученная кривая рассеяния МУРР была сравнена с теоретически рассчитанными для разных конформаций. Автор продемонстрировала, что конформация STARD1 в растворе близка к той, которую белок имеет в кристаллической структуре, т.е. в растворе отсутствовали спонтанные значительные конформационные

изменения. Модели, согласно которым происходит взаимное движение  $\alpha$ -спирали и  $\Omega_1$ -петли или конформационные изменения  $\alpha$ -спирали, оказались наименее вероятными, в отличие от модели с набором разных позиций  $\Omega_1$ -петли, которая хорошо описывала экспериментальные данные.

Четвёртая часть главы «**Результаты и обсуждение**» посвящена исследованию функциональных свойств STARD1 – взаимодействию с флуоресцентными аналогами холестерина и взаимодействию с белками 14-3-3. Для исследования были выбраны флуоресцентные аналоги холестерина, содержащие NBD-группу у 3-го (3NBD), 20-го (20NBD), 22-го (22NBD) и 25-го (25NBD) атома углерода. В результате серии экспериментов (титрования, исследования термостабильности белка в присутствии лигандов, молекулярного докинга) было установлено, что положение NBD-группы влияет на связывание лиганда с STARD1. Наиболее оптимальным вариантом оказался вариант 20NBD, связывание которого по данным флуоресцентного титрования и молекулярного докинга практически эквивалентно связыванию холестерина и приводит к увеличению термостабильности STARD1. Также в работе было проведено исследование взаимодействия STARD1 с универсальными регуляторными белками 14-3-3. Было показано, 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 – транзитное, с кажущейся константой диссоциации комплекса, находящейся в микромолярном диапазоне.

В разделе «**Заключение**» сделано обобщение результатов и предложен механизм участия белков 14-3-3 в регуляции активности STARD1 в процессе стероидогенеза.

Выводы, сформулированные в диссертации, логично вытекают из результатов проведенных экспериментов и являются в полной мере обоснованными. Представленные в диссертации результаты экспериментов, несомненно, свидетельствуют, что поставленные автором задачи были успешно решены. Тема диссертации, ее положения и выводы полностью соответствуют специальности 1.5.4. Биохимия.

#### **Соответствия автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат диссертации оформлен по стандартной форме, соответствует установленным требованиям и дает представление о содержании разделов диссертации и степени участия автора в исследованиях.

### **Апробация диссертации и личный вклад соискателя**

Основные положения и результаты диссертационной работы отражены в публикациях автора. Всего 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.

### **Рекомендации по использованию научных выводов диссертационной работы**

Результаты исследования имеют существенное значение для биохимии и медицины, могут быть рекомендованы для разработки новых подходов к лечению врожденной липоидной гиперплазии надпочечников, а также для использования в экспериментальной работе: например, получение белка STARD1 в растворимом виде или использование нового флуоресцентного аналога холестерина 20NBD, который не отличается по биохимическим свойствам по взаимодействию с STARD1, но обладает более сильным флуоресцентным откликом на взаимодействие 22NBD/STARD1 для исследования белок-лигандных взаимодействий.

### **Замечания и вопросы**

- В работе различными методами (изменение флуоресценции, ППР и др.) исследованы взаимодействия STARD1 и его модифицированных форм с холестерином и белками 14-3-3. Однако, каждый из этих методов имеет существенные ограничения и автору пришлось идти на различные ухищрения, чтобы определить параметры взаимодействия. В качестве рекомендации на будущее, намного более простым и информативным методом исследования подобных взаимодействий является метод изотермической калориметрии титрования, с помощью которого можно получить полное термодинамическое описание образования комплекса. Это позволяет наиболее достоверно интерпретировать данные.

- Такая же рекомендация касается экспериментов по термостабильности белков. Можно использовать метод дифференциальной сканирующей калориметрии, который не только дает температуру плавления, но и информацию о третичной структуре белка.

Эти замечания не носят принципиального характера и не подвергают сомнению корректность сделанных в диссертации выводов.

## Заключение

Работа Тугаевой Кристины Владимировны «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» представляет собой целостное и завершенное исследование, выполненное на высоком методологическом уровне. Она отвечает всем требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Диссертационная работа Тугаевой Кристины Владимировны «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, заслушана, отзыв на нее заслушан и утвержден на объединенном научном семинаре профильных лабораторий ИМБ РАН 12 апреля 2023 г., (протокол №2).

Отзыв на диссертационную работу Тугаевой К.В. подготовлен главным научным сотрудником ИМБ РАН Козиным Сергеем Александровичем.

Доктор биологических наук  
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология,  
главный научный сотрудник Федерального  
государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория конформационного  
полиморфизма белков в норме и патологии

С.А. Козин

119991, г. Москва, ул. Вавилова 32,  
Рабочий телефон +7(499)1359824  
e-mail: kozinsa@gmail.com

Подпись С.А. Козина заверяю  
Ученый секретарь ИМБ РАН, к.в.н.

13.04.2023 г.



А.А. Бочаров