

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ  
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 25 мая 2023 г. № 12  
о присуждении Тугаевой Кристине Владимировне, гражданство Российская Федерация,  
ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» по специальности 1.5.4 Биохимия принята к защите 02 марта 2023 г. (протокол № 3) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк; от 10 февраля 2014 года № 55/нк; от 30.09.2015 №1166/нк; от 13 марта 2019 года № 222/нк; от 03.06.2021 №561/нк и 22 марта 2023 г. № 501/нк.

**Соискатель**

Тугаева Кристина Владимировна в 2017 году окончила кафедру биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» с присуждением степени магистра по направлению 06.04.01 «Биология» по программе Общая биохимия. С 2017 по 2021 гг. обучалась в очной аспирантуре на кафедре биохимии Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. В 2021

году Тугаевой К.В. присвоена квалификация Исследователь. Преподаватель-исследователь (Диплом об окончании аспирантуры АА 003056).

С 2015 года работает в Институте биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. В период 2015-2017 гг. работала в лаборатории структурной биохимии белка ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. лаборатории проф. д.б.н. Левицкий Д.И.). С 2017 года и по настоящее время работает в группе белок-белковых взаимодействий (рук. группы д.б.н. Случанко Н.Н.) в должности младшего научного сотрудника.

**Научный руководитель:**

**Случанко Николай Николаевич**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы белок-белковых взаимодействий ФИЦ Биотехнологии РАН

**Официальные оппоненты:**

**Ширинский Владимир Павлович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией клеточной подвижности научно-исследовательского института экспериментальной кардиологии имени академика В.Н. Смирнова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России.

**Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич**, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии и регенеративной медицины факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что доктор биологических наук, профессор Ширинский Владимир Павлович является одним из ведущих отечественных специалистов в области исследования регуляции белков путем фосфорилирования.

тем, что кандидат биологических наук, доцент Тюрин-Кузьмин Петр Алексеевич является одним из ведущих отечественных специалистов в области молекулярной эндокринологии, исследований механизмов внутриклеточной сигнализации и молекулярных механизмов регуляции клеточных функций.

Квалификация оппонентов подтверждается наличием у них большого числа публикаций в рецензируемых российских и международных журналах.

Оба официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Тугаевой К.В.



### **Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) в своем положительном отзыве, подписанном Козиным С.А., доктором биологических наук, главным научным сотрудником, и утвержденном заместителем директора ИМБ РАН Митькевичем В.А., членом-корреспондентом РАН, указала, что диссертационная работа Тугаевой К.В. является самостоятельной научно-квалификационной работой, которая соответствует критериям, установленным Положением о присуждении ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. к кандидатским диссертациям, а ее автор Тугаева К.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности – 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен с тем, что ИМБ РАН является признанным отечественным научным центром в области молекулярной биологии и биохимии и в своем составе имеет несколько лабораторий, специализирующихся на исследовании белков и их посттрансляционных модификаций в норме и патологии. Таким образом, сотрудники ИМБ РАН и, в частности, лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии являются высококвалифицированными специалистами, ведущими исследования, непосредственно связанные с тематикой диссертационной работы Тугаевой К.В.

В целом, высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность данной диссертационной работы.

### **Публикации.**

Основные результаты диссертационной работы Тугаевой К.В. изложены в 7 статьях в рецензируемых научных журналах, входящих в список изданий рекомендованных ВАК РФ, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

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.

Результаты работы также были представлены на 7 международных и 2 российских конференциях (и опубликованы в материалах этих конференций) в частности 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 Дагомьесе в 2016 году.

В перечисленных публикациях адекватно отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.



### **На диссертацию поступили следующие отзывы:**

Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук, доцента кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» **Тюрина-Кузьмина Петра Алексеевича** (положительный). Отзыв содержит следующие замечания и вопросы:

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.

4. 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 PKA на STARD1 обсуждается несколько сайтов фосфорилирования. Было бы полезно уточнить, насколько вероятно, что упоминаемые сайты фосфорилируются именно PKA, насколько аминокислотная последовательность, окружающая эти сайты фосфорилирования, близка к консенсусной последовательности протеинкиназы А.

5. Хотелось бы пояснения фразы стр 36: "Обнаружение регуляторных белков 14-3-3 в составе трансдуцесомы 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 трансдуцесому протеинкиназы А, которая более прямым образом регулирует клеточные процессы в зависимости от внешних стимулов.

Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора, главного научного сотрудника, 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 **Ширинского Владимира Павловича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

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 PKA при экспрессии в Ser57 в растворимой конструкции STARD146-285?

г) с. 107 «Повышенная склонность к агрегации белка pSTARD146-285-S56A не позволила получить сенсограммы...». Означает ли это, что замена L59P снижает склонность STARD1 к агрегации?

д) с. 108 «Так как известно, что наличие двух фосфосайтов значительно увеличивает сродство к 14-3-3, полученные результаты со столь высокими значениями KD 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 Ser195 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 Ser56-Ser57, 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.

Отзыв **ведущей организации** Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

1. 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.

2. 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.

**На автореферат поступили положительные отзывы от:**

**Новиковой Людмилы Александровны**, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника отдела молекулярных основ онтогенеза НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова. Замечаний и вопросов к работе нет.

**Клычникова Олега Игоревича**, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника кафедры биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. **В отзыве имеются следующие вопросы:**

1. Непонятна интерпретация быстрой компоненты кинетики релаксации анизотропии флуоресценции как «способность вращения внутри полости белка». При этом соотношение быстрой и медленных компонент находится в примерном соотношении 50/50. Говорит ли это о том, что лиганд-связывающий карман в 50% находится в «открытой» конформации, что дает возможность такому вращению? Возможны ли другие объяснения данному феномену? Например, наличие «неспецифического» сайта связывание, или диссипация энергии, приводящая к кажущему увеличению скорости релаксации?

2. Автор в автореферате совсем не упоминает о изоформах белка 14-3-3, а также о параметрах их взаимодействия в комплексе с белком STARD1PHOS. Вероятно это сделано в целях экономии места. Существует какая-то специфичность у разных изоформ при взаимодействии со STARD1PHOS и меняются ли параметры связывания тройного комплекса с разными изоформами 14-3-3?

**Горбачева Дмитрия Андреевича**, кандидата биологических наук, научного сотрудника группы синтетической биологии отдела биомолекулярной химии ИБХ РАН. Замечаний и вопросов к работе нет.

**С вопросами выступили:**

проф., д.х.н. Варламов В.П., проф., д.б.н. Шумянцева В.В., проф., д.б.н. Крицкий М.С., д.б.н. Агафонов М.О., проф., д.х.н. Савицкий А.П., д.б.н. Терешина В.М., проф., д.б.н. Шишкин С.С., проф., д.б.н. Левицкий Д.И.

**В обсуждении приняли участие:**

член-корр. РАН, проф., д.б.н. Гусев Н.Б., проф., д.б.н. Левицкий Д.И., проф., д.б.н. Шишкин С.С.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты:**

1. Продукция белка STARD1 человека в клетках бактерий в виде химеры с мальтозо-связывающим белком позволяет с достаточно высоким выходом получить его в растворимом виде без процедуры денатурации-ренатурации. Этот способ позволяет



получать миллиграммовые количества белка в лабораторных условиях 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  $\Omega_1$ -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.

#### **Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:**

- Впервые исследована конформация STARD1 в растворе (метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР)). Результаты МУРР позволили выделить из предложенных ранее механизмов функционирования STARD1 наиболее вероятный.
- 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.

#### **Практическая значимость работы заключается в том, что:**

- Предложена новая методика получения стероидогенного регуляторного белка STARD1 человека в бактериальной системе, основанная на фьюжн-конструкции STARD1 с отщепляемым мальтозо-связывающим белком, несущим гексагистиридиновый таг.
- 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.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:**

- использованные методики исследования и проведенные расчеты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

**Личный вклад соискателя состоит:**

- в получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- в обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- в подготовке публикаций по выполненной работе.

**Заключение.**

Диссертация Тугаевой К.В. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого набора современных методов, постановкой логически обоснованных задач, взаимосвязанностью сделанных выводов и полученных результатов. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, опубликованы в ведущих рецензируемых журналах (7 статей). Таким образом, из представленных материалов следует, что данная работа выполнена на высоком методическом уровне и представляет интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения.

На заседании 25 мая 2023 года диссертационный совет принял решение присудить Тугаевой Кристине Владимировне соискателя ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.



При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 14 докторов биологических наук, 6 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 26 человек, входящих в состав совета 24.1.233.01.

«За» присуждение ученой степени – 21,

«Против» – 0,

Недействительных бюллетеней – 0.

Заместитель председателя  
диссертационного совета  
ФИЦ биотехнологии РАН  
Доктор биологических наук, профессор

  
М.С. Крицкий

Ученый секретарь диссертационного совета  
ФИЦ биотехнологии РАН  
кандидат биологических наук

  
А.Ф. Орловский

«26» мая 2023 г.

