



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного учреждения

«Федеральный

исследовательский центр

«Фундаментальные основы

биотехнологии» РАН

д.б.н. Федоров А. Н.

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

25 ЯНВ 2023

№ 85-01-19/25

На №

от



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН на диссертационную работу Тугаевой Кристины Владимировны: «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в группе белок-белковых взаимодействий Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. Тема диссертационной работы «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» утверждена на заседании Ученого Совета ФИЦ Биотехнологии РАН (Протокол №8 от 18.10.2022 года).

В 2017 году Тугаева К.В. 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 РАН. В период 2015-2017 гг. работала в лаборатории структурной биохимии белка ФИЦ Биотехнологии РАН (рук. лаборатории проф. д.б.н. Левицкого 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 – доктор биологических наук Случанко Николай Николаевич, руководитель группы белок-белковых взаимодействий.

По результатам рассмотрения диссертации «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» принято следующее заключение:

Актуальность работы

Стероидные гормоны - важная группа биологически активных соединений, которые играют роль во многих процессах жизнедеятельности организма. Стероидные гормоны регулируют водно-солевой баланс и метаболизм, обеспечивают развитие воспалительного ответа, а также контролируют развитие половых признаков. Поскольку

стероидные гормоны обладают мощным физиологическим действием, организм не запасает их, а синтезирует по мере необходимости. Стероидогенез - многоступенчатый процесс, который начинается с переноса молекул холестерина в митохондрии и их превращения в прегненолон - общего предшественника всех стероидных гормонов. Всего в стероидогенезе задействовано более 25 ферментов. Нарушения в синтезе стероидных гормонов приводят к заболеваниям, объединенным в группу с общим названием «врожденная гиперплазия надпочечников» (Congenital Adrenal Hyperplasia, CAH). Наиболее тяжелое протекание этого заболевания вызывают мутации в стероидогенном регуляторном белке STARD1 (более раннее название - StAR), который участвует в лимитирующей стадии всего процесса стероидогенеза, осуществляя доставку холестерина к внутренней мембране митохондрий для дальнейшего превращения в прегненолон и стероидные гормоны.

STARD1 синтезируется de novo по мере необходимости в виде предшественника, состоящего из холестерол-связывающего домена (START-домена) и сигнального пептида с митохондриальной локализацией [1]. 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.

Рекомбинантный STARD1 обладает повышенной склонностью к агрегации и экспрессируется в бактериях, главным образом, в виде телец включения. Существенные недостатки традиционной методики выделения STARD1 путем денатурации-ренатурации [4] значительно ограничивали его структурно-функциональные исследования в прошлом. Из-за трудностей получения STARD1 в больших количествах, данных о его олигомерном состоянии и конформации в растворе почти не было опубликовано. Объяснение механизма захвата холестерина белком STARD1 основывалось на косвенных данных, полученных с помощью методов кругового дихроизма и ограниченного протеолиза, а также на результатах молекулярного моделирования. В отсутствие кристаллической структуры комплекса STARD1 с холестерином представление о том, как природный лиганд ориентирован в полости белка, было лишь умозрительным.

Принято считать, что STARD1 функционирует в составе многокомпонентного белкового комплекса – транduceосомы [2]. Помимо STARD1 в транduceосому входят белки семейства 14-3-3 - известные фосфопептид-связывающие белки-регуляторы. По данным литературы, белок STARD1 содержит два участка фосфорилирования - остатки Ser57 и Ser195 [3]. Это позволило предположить, что фосфорилирование STARD1 может влиять на его взаимодействие с 14-3-3 [4]. Однако противоречивость предложенного в литературе механизма регуляции STARD1 под действием фосфорилирования и взаимодействия с белками 14-3-3 требовала дальнейших исследований.

1. Artemenko I.P., et al., *Mitochondrial Processing of Newly Synthesized Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR), but Not Total StAR, Mediates Cholesterol Transfer to Cytochrome P450 Side Chain Cleavage Enzyme in Adrenal Cells*. J Biol Chem, 2001. 276(49): p. 46583–46596.
2. Rone M.B., et al., *Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones*. Mol Endocrinol, 2012. 26: p.1868–1882.
3. Arakane F., et al., *Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) modulates its steroidogenic activity*. J Biol Chem, 1997. 272: p.32656–32662.
4. Aghazadeh Y., et al., *Hormone-induced 14-3-3 γ adaptor protein regulates steroidogenic acute regulatory protein activity and steroid biosynthesis in MA-10 Leydig cells*. J Biol Chem, 2012. 287: p.15380–15394.

Целью работы стало исследование структуры и функциональных особенностей белка STARD1 человека.

Новизна и ценность результатов, полученных лично автором в ходе научного исследования

1. 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.

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

3. 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.

4. 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.

Научно-практическое значение

1. Экспрессия рекомбинантного белка STARD1 в виде фьюжн-конструкции с мальтозо-связывающим белком увеличивает растворимость STARD1, что исключает необходимость подвергать его денатурации-ренатурации при выделении. Разработанная методика позволяет получить миллиграммовые количества высокоочищенного препарата STARD1, пригодного 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 Ω_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.

Конкретное личное участие автора в получении результатов

Большинство экспериментов, вошедших в диссертацию, было выполнено либо непосредственно автором работы, либо с его участием. Научная работа соискателя была отмечена Стипендией им. академика С.Е. Северина первой степени (2015).

Степень достоверности

Достоверность результатов, полученных в ходе данной работы, подтверждается воспроизводимостью произведенных измерений и согласованностью результатов, полученных с использованием комбинации различных методов, адекватных поставленным задачам.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Представленная Тугаевой Кристиной Владимировной диссертационная работа посвящена изучению структуры в растворе стероидогенного регуляторного белка STARD1 человека, а также исследованию его функциональных особенностей, в частности взаимодействию STARD1 с лигандами-аналогами холестерина и белком-партнером 14-3-3. Работа соответствует специальности 1.5.4. Биохимия, по которой она рекомендуется к защите.

Апробация работы

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 Дагомьсе в 2016 году.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени

По теме диссертации было опубликовано 7 статей в международных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в международных рецензируемых журналах

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.

Избранные тезисы докладов

1. Завадская О. А., **К. В. Тугаева**, Фалетров Я. В., Случанко Н.Н. Новые белок-лигандные взаимодействия холестерина-переносящего белка STARD1 с оксистеролами и стероидными гормонами in silico и in vitro // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016». - 2016. - С. 83-83.

2. **Tugaeva K.V.**, Faletrov Y. V., Maksimov E. G., Sluchanko N.N. Novel Method of production of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) able to bind fluorescent cholesterol analogues // 1st B3 International Conference for Young Scientists Lomonosov Moscow State University. - 2016. - С. 39-39.

3. **Тугаева К. В.**, Завадская О. А., Фалетров Я. В., Максимов Е. Г., Случанко Н.Н. Исследование взаимодействия холестерина с белком StAR с помощью флуоресцентных аналогов холестерина с различным положением NBD-группы // Acta Naturae (русскоязычная версия). - 2016. - 2(спецвыпуск). - С. 50-51.

4. Sluchanko N. N., **Tugaeva K. V.**, Faletrov Y. V., Maksimov E. G. Solution structure of human STARD1 protein and its interaction with fluorescently-labeled cholesterol analogues with different position of the NBD-group // The FEBS Journal Supplement. - 2017. - Suppl. 1, том 284. - С. 182-183.

5. **Тугаева К. В.** Исследование особенностей взаимодействия белка StAR с универсальными адаптерными белками семейства 14-3-3 // Материалы XXIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2017". - 2017. - С.

6. **Тугаева К. В.**, Фалетров Я. В., Максимов Е. Г., Случанко Н. Н. Поиск оптимального флуоресцентного аналога холестерина среди его производных с различным положением NBD-группы для исследований взаимодействия с белком StAR // XVII зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Сборник тезисов. - 2017. - С. 91-91.

7. **Тугаева К. В.**, Сотников Д. В., Случанко Н. Н. Изучение роли фосфорилируемых участков белка StAR в его взаимодействии с белками семейства 14-3-3 // ActaNaturae. - 2017. - серия СПЕЦВЫПУСК, С. 58-58.

8. **Tugaeva K. V.**, Sotnikov D. V., Sluchanko N. N. Analysis of the interaction between 14-3-3 and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) // FEBS Open Bio. - 2018. - 8(S1). - P.18-009-Wed.

9. **Tugaeva K. V.**, Titterington J., Antson A., Sluchanko N. N. Structural basis for the interaction of 14-3-3 proteins with phosphopeptides of STARD1 revealed by the chimeric app // FEBS Open Bio. - 2019. - 9(Suppl. 1). - С. 257-257.

Рекомендуемые 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».

Рекомендуемая ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

Диссертационная работа Тугаевой Кристины Владимировны «Структура и функциональные свойства стероидогенного регуляторного белка (STARD1) человека» на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лабораторий структурной биохимии белка, инженерной энзимологии, иммунобиохимии и группы белок-белковых взаимодействий Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 20 человек. Результаты голосования: «за» – 20 человек, «против» – нет, «воздержались» – нет. Протокол № 5 от 23 декабря 2022 года.

Председатель совместного семинара лабораторий
Заведующий лабораторией структурной биохимии белка,
Доктор биологических наук, профессор

Д.И. Левицкий

Секретарь
Научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка,
кандидат биологических наук

В.В. Михайлова

26.12.2022 г.

