

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ СТЕРОИДОГЕННОГО РЕГУЛЯТОРНОГО БЕЛКА ОСТРОЙ ФАЗЫ (STARD1) ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 2022 С.В. Замалутдинова^{1*}, Л.В. Исаева², А.В. Замалутдинов¹, Я.В. Фалетров³, М.А. Рубцов^{1,4}, Л.А. Новикова^{2*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия; электронная почта: podgorodova.sofya@yandex.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119234 Москва, Россия; электронная почта: novik@genebee.msu.ru

³ Белорусский государственный университет, НИИ физико-химических проблем, 220030 Минск, Беларусь; электронная почта: yaroslav82@tut.by

⁴ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, 119991 Москва, Россия; электронная почта: ma_rubtsov@mail.ru

Поступила в редакцию 17.07.2022

После доработки 18.08.2022

Принята к публикации 19.08.2022

Одним из главных препятствий для успешного использования в биотехнологических процессах клеток *Escherichia coli*, способных осуществлять трансформацию стероидов, является неэффективный транспорт в клетки стероидных субстратов. В работе тестирована возможность использования белка-переносчика холестерина человека – стероидогенного регуляторного белка острой фазы (STARD1) – для повышения эффективности поглощения стероидов клетками *E. coli*. Получены генетические конструкции для синтеза в клетках *E. coli* BL21(DE3) делетированной версии белка STARD1, включающей функциональный домен (66–285 аминокислотные остатки), или белка STARD1(66–285)-GFP, несущих на *N*-конце последовательность бактериального белка *pelB*, адресующую белок в периплазму. Анализ препаратов клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP с использованием флуориметрии и Вестерн-иммуноблоттинга подтвердил, что использованная система экспрессии обеспечивает синтез полноразмерного гетерологичного белка. С использованием флуоресцентной спектроскопии показано, что присутствие STARD1 обеспечивает увеличение эффективности ассимиляции NBD-меченых аналогов холестерина клетками *E. coli*/pET22b/STARD1 в 1,3–1,6 раза ($p < 0,05$) в сравнении с клетками дикого штамма. Таким образом, впервые обнаружено, что STARD1 человека способен проявлять функциональную активность в клетках бактерий, что открывает перспективы для оптимизации и использования фундаментально нового подхода для повышения эффективности поглощения стероидов клетками – включения в мембрану клетки специфического белка-переносчика, который может расширить арсенал методов, используемых при получении штаммов микроорганизмов для синтеза широко востребованных стероидных соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стероидогенный регуляторный белок острой фазы, *Escherichia coli*, холестерол, биотрансформация стероидов, флуоресценция.

DOI: 10.31857/S0320972522090111, **EDN:** BVHEIB

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время всё шире используются технологии, основанные на биокатализе.

Большой интерес, в частности, представляют штаммы микроорганизмов, с использованием которых можно обеспечить более дешёвое и экологически безопасное по сравнению с

Принятые сокращения: МЦД – метилированный β-циклодекстрин; 20NP – 20-((NBD)амино)-прегн-5-ен-3β-ол; GFP – зелёный флуоресцентный белок; NBD – 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил; *pelB* – *N*-концевая сигнальная последовательность пектаглизы В *Erwinia carotovora*; STARD1 – стероидогенный регуляторный белок острой фазы (StAR, steroidogenic acute regulatory protein).

* Адресат для корреспонденции.

химическими способами производство стероидных соединений, в том числе и различных лекарственных препаратов, которые пользуются очень высоким спросом на фармацевтическом рынке [1]. В литературе представлено множество сообщений о получении и использовании штаммов микроорганизмов, содержащих функционально активные стероид-трансформирующие ферменты, способные осуществлять стерео- и региоспецифичные реакции (см, например, [2–5]), однако такие микроорганизмы часто демонстрируют низкую каталитическую активность. Основным ограничивающим фактором является плохая растворимость экзогенных стероидных субстратов в водной среде, что лимитирует их поглощение клеткой из среды культивирования [5, 6]. Подходы, используемые для увеличения растворимости стероидов и снятия данного ограничения, включают как внесение в среды органических добавок (например, органических растворителей или детергентов, которые часто нарушают целостность и жизнеспособность клеток и таким образом снижают их биокаталитическую активность) [7], так и использование жидких двухфазных систем [8] (что может приводить к усложнению технологических процессов).

В клетках коры надпочечников и половых желез млекопитающих транспорт холестерина к внутренней мембране митохондрий, лимитирующий процесс синтеза стероидных гормонов, осуществляется с участием белка StAR (*steroidogenic acute regulatory protein* – стероидогенный регуляторный белок острой фазы), называемого также STARD1 [9]. Данный белок, имеющий липид-связывающий домен START, доставляет холестерол от наружной к внутренней митохондриальной мембране, где локализован цитохром P450_{scc} (CYP11A1), катализирующий начальные реакции каскада конверсии холестерина в стероидные гормоны [10, 11]. В нескольких работах, проводимых с целью выделения STARD1 и изучения его каталитических и структурных характеристик *in vitro*, продемонстрирована возможность синтеза STARD1 в клетках *E. coli* и правильного последующего фолдинга (например, [12, 13]). Однако к настоящему времени не проводилось исследований, направленных на изучение функционирования STARD1 в живых микроорганизмах.

Целью данной работы являлось тестирование активности STARD1 человека в клетках *E. coli* и возможности использования данного белка-переносчика холестерина для повышения эффективности транспорта стероидных соединений в клетку бактерий.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе использованы: метилированный β-циклодекстрин (МЦД) («Wacker Chemie», Германия), нитроцеллюлозные фильтры Hybond-C Extra («Amersham Biosciences», Великобритания), конъюгат первичных антител козы против зелёного флуоресцентного белка (GFP) с пероксидазой хрена («Rockland», США), 22-NBD-холестерол («Thermo Fisher Scientific», США), наборы реактивов для работы с ДНК – ZymoPURE™ Plasmid Miniprep Kit и ZymoClean™ Gel DNA Recovery Kit («Zymo Research», США), и Western blotting detection kit Western Bright™ ECL («Advanta», США), эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимеразы и ДНК-модифицирующие ферменты («MBI Fermentas», Литва). Олигонуклеотиды синтезированы в компании «Евроген» (Россия). Аналог холестерина 20-((NBD)амино)-прегн-5-ен-3β-ол (20NP) синтезирован ранее как описано Фалетровым и соавторами [14].

Использованные штаммы *E. coli* и плазмиды. В работе использованы клетки *E. coli*, штамм Top10 («Евроген») и штамм BL21(DE3) («Gibco BRL», США). Вектор pET-22b(+), содержащий промотор бактериофага T7 и *pelB*, кодирующую N-концевую адресующую в периплазму последовательность пектатлиазы В *Erwinia carotovora*, поставлен фирмой «Novagen» (США). Плазмида Н-МБР-3С-STARD1_{66–285} [13], содержащая кДНК, кодирующую STARD1(66–285), любезно предоставлена Н.Н. Случанко (Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва); плазмида pсDNA3.1/pCoxIV-P450_{scc}-2A-GFP [15], содержащая кДНК, кодирующую GFP, сконструирована ранее.

Конструирование плазмид. Молекулярное клонирование осуществляли с использованием *E. coli* Top10 согласно стандартным протоколам [16]. **pET-22b/STARD1.** Фрагмент ДНК -*Bam*HI-STARD1(66–285)-*Hind*III- вырезали из Н-МБР-3С-STARD1_{66–285} и лигировали с вектором pET-22b(+), расщеплённым по тем же сайтам. Промежуточный вектор обрабатывали *Bam*HI и фрагментом Кленова (для удаления двух пар оснований) и лигировали по тупым концам. Целевая плазмида pET-22b/STARD1 содержала в рамке считывания кДНК для STARD1(66–285) с N-концевой сигнальной последовательностью *pelB* (22 а.о.). **pET-22b/STARD1–GFP.** Последовательности кДНК, кодирующие STARD1 и GFP, получены с помощью ПЦР-амплификации: STARD1 – с использованием pET22b/STARD1 в качестве матрицы и прямого (содержащего

сайт рестрикции *Bam*HI) и обратного (содержащего сайт рестрикции *Xba*I и точечные нуклеотидные замены для удаления стоп-кодона) праймеров; *GFP* – с использованием pCNA3.1/pCoxIV-P450_{scs}-2A-GFP и прямого и обратного праймеров с сайтами рестрикции *Xba*I и *Not*I соответственно. ПЦП-Продукты обрабатывали *Bam*HI/*Xba*I (ген *STARD1*) или *Xba*I/*Not*I (ген *GFP*) и встраивали в вектор pET-22b(+), рестрицированный *Bam*HI/*Not*I. Получена плазмида, включающая последовательности, кодирующие *STARD1* с *N*-концевым сигнальным пептидом *pelB* и белок *GFP*, слитые в одну рамку считывания. Структуры плазмид подтверждали секвенированием.

Экспрессия кДНК рекомбинантных белков.

Гетерологичные гены экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3), культивируемых в «среде для аутоиндукции» (среда LB с добавлением солей и сахаров) [17] в присутствии ампициллина (100 мкг/мл). Синтез рекомбинантных белков индуцировали добавлением 0,2%-ной α -лактозы и осуществляли в течение 3–48 ч при 26 °C–28 °C.

Ds-Na-ПААГ-электрофорез и Вестерн-блот-анализ. Клетки из 1,5 мл культуры осаждали центрифугированием (12 000 g, 5 мин, «Eppendorf Minispin», Германия), осадки ресуспендировали в 100 мкл буфера для приготовления образцов для электрофореза (Sample Buffer) [18] и денатурировали белки кипячением (100 °C, 2 мин). Лизаты клеток анализировали, используя Ds-Na-ПААГ-электрофорез [18] и Вестерн-блоттинг [19]. При проведении иммуноблоттинга мембраны последовательно обрабатывали конъюгатом первичных антител козы против *GFP* с пероксидазой хрена в разведении 1 : 10000 (v/v) и хемилюминесцентным (ECL) субстратом в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [20].

Анализ клеток на наличие GFP. Клетки, трансформированные pET-22b/*STARD1*-*GFP*, выращенные в течение 17 или 25 ч в присутствии лактозы [17], осаждали из 2 мл культуры (12 000 g, 5 мин, «Eppendorf Minispin») и ресуспендировали в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 150 mM NaCl. Указанный буфер использовали для разведения и получения проб с величиной поглощения A_{600} , соответствующей 0,125, 0,25, 0,5, 1,0 или 3,0. Испускание *GFP* в пробах (объем 2 мл) измерялось с помощью флуориметра FluoroMax-3 («HORIBA Jobin Yvon GmbH», Германия). Условия регистрации спектра флуоресценции: поглощение 395 нм/испускание 507 нм, щель 5 нм.

Анализ функциональной активности *STARD1* в клетках *E. coli*. Культуры нетрансформированных клеток и клеток, экспрессирующих кДНК *STARD1*, выращенные в течение ночи в присутствии лактозы [17], разбавляли свежей средой до $A_{600} = 1,0$ и далее культивировали в условиях индукции синтеза рекомбинантных белков в присутствии МЦД (0,01 mM), ампициллина (100 мкг/мл) и стероида 22-NBD-холестерола (10 мкМ) или 20NP (4 мкМ), периодически отбирая аликвоты контрольных и опытных суспензий, содержащие одинаковое количество клеток. Клетки осаждали (12 000 g, 2 мин, «Eppendorf Minispin»), трижды промывали раствором МЦД (0,05 mM) и разрушали, обрабатывая суспензию клеток в 96%-ном EtOH ультразвуком (15 сек и 20 сек, интервал 10 сек). Полученные после центрифугирования (12 000 g, 2 мин) супернатанты и осадки, суспендированные в 0,5 мл 96%-ного EtOH, использовали для анализа. Объем проб – 2 мл, состав проб: 0,4 мл опытного образца (фон – 0,4 мл 96%-ного EtOH) и 1,6 мл 72%-ного EtOH. Уровень содержания NBD-меченых стеролов в пробах оценивали с использованием флуориметра (FluoroMax-3, «HORIBA Jobin Yvon GmbH»); условия регистрации спектра флуоресценции: поглощение 470 нм/испускание 535 нм, щель 5 нм. Для статистической обработки полученных данных использовали язык программирования R 4.2.1. [21]. При сравнении групп использовали двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Белок *STARD1*, осуществляющий в стероидогенных клетках млекопитающих перенос молекул холестерина от наружной к внутренней мембране митохондрий, обнаружен как на наружной мембране, так и в межмембранном пространстве [22]. Для получения аналогичной модели на основе клеток бактерий для изучения функциональных характеристик *STARD1* мы планировали осуществить синтез *STARD1*, который будет направляться в периплазму клеток.

В работе использована кДНК, кодирующая *STARD1*(66–285 а.о.), включающий только функциональный *START*-домен, так как известно, что такая версия белка проявляет ту же функциональную активность, что и полноразмерный *STARD1* – укороченный с *N*-конца *STARD1* теряет способность импортироваться в митохондрии, но остается полностью активным [11]. Далее в тексте для удобства *STARD1*(66–285) обозначен как *STARD1*.

Анализ экспрессии кДНК слитого белка STARD1-GFP в рекомбинантных клетках. Первой задачей исследования являлась оценка возможности синтеза в клетках *E. coli* белка человека STARD1, несущего адресующий сигнал для периплазматической локализации. Рекомбинантный штамм получен с использованием плазмиды pET22b/STARD1-GFP, включающей кДНК, кодирующую слитый белок, составленный из STARD1 с N-концевым сигнальным пептидом пектатлиазы В (pelB) и слитого с его C-концом репортерного флуоресцентного белка GFP. Присоединение GFP предпринято для облегчения анализа синтеза гетерологичного белка в клетках *E. coli*.

Для проведения анализа использованы суспензии клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP и контрольных нетрансформированных клеток, выращенных в условиях индукции экспрессии гетерологичных генов в течение 17 или 25 ч (см. раздел «Материалы и методы») с A_{600} от 0,125 до 3,0. Для идентификации STARD1-GFP в пробах осуществлялась регистрация спектра флуоресценции GFP. Во всех пробах, содержащих рекомбинантные клетки, в отличие от контрольных, детектирован флуоресцентный белок. На рис. 1, а приведены спектры, полученные при анализе суспензий рекомбинантных и контрольных клеток, выращенных в течение 17 ч, с $A_{600} = 3,0$. Зарегистрированный максимум

испускания флуоресценции (507 нм) соответствует максимуму испускания флуоресценции индивидуального GFP, что свидетельствует о присутствии в клетках полноразмерного STARD1-GFP и о правильной конформации хромофора GFP в составе слитого белка.

Анализ лизатов клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP, культивированных в условиях индукции синтеза гетерологичных белков методом Вестерн-иммуоблоттинга с использованием антисыворотки против GFP, подтвердил, что в них присутствует слитый белок с ожидаемой молекулярной массой ~57 кДа (рис. 1, б, дорожка 1). STARD1-GFP в клетках бактерий, вероятно, частично подвергается деградации — в лизате клеток детектируется некоторое количество меньшего по размеру иммуноспецифичного белка (рис. 1, б, дорожка 1).

Таким образом, мы показали, что генетическая конструкция pET22b/STARD1-GFP обеспечивает синтез полноразмерного гетерологичного белка в клетках *E. coli*.

Анализ функциональной активности STARD1 в клетках *E. coli*. Для проведения экспериментов с целью оценки влияния STARD1 человека на эффективность поглощения стероидных соединений клетками *E. coli* получена плаزمида pET22b/STARD1, способная направлять синтез в клетках бактерий индивидуального белка STARD1(66–285) с N-концевой адресующей

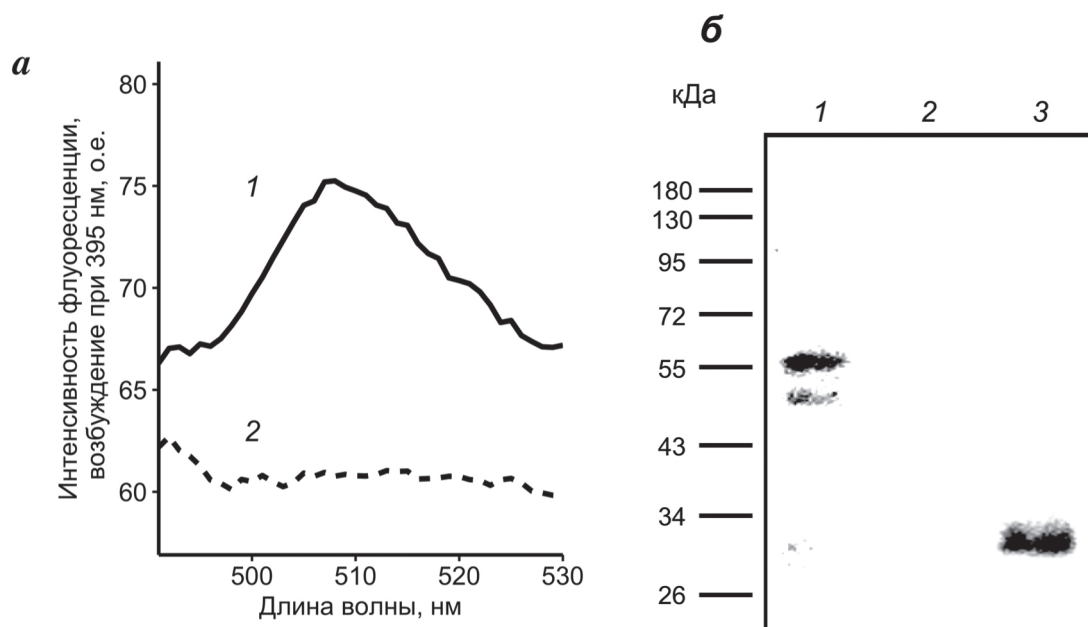


Рис. 1. Идентификация STARD1-GFP в клетках *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP. а — Анализ суспензий клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP (1) и клеток контрольного штамма (2) с использованием флуориметрии; время индукции 17 ч, $A_{600} = 3,0$. Максимум испускания флуоресценции — 507 нм. б — Анализ лизатов клеток методом Вестерн-блоттинга: Ds-Na-ПААГ-электрофорез в 10%-ном геле с последующей иммунодетекцией белков с использованием антител к GFP. 1 — Лизат клеток *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP (50 мкг), 2 — лизат контрольных нетрансформированных клеток (50 мкг), 3 — белок-стандарт GFP (20 мкг). Слева показано положение белков-маркеров молекулярной массы

последовательностью *relB*, но без репортерного белка на С-конце, так как присутствие GFP могло препятствовать его функционированию. Для оценки способности STARD1 переносить стеролы в клетки проведён сравнительный анализ эффективности включения флуоресцирующих аналогов холестерина, 22-NBD-холестерола и 20NP, в клетки контрольного штамма и штамма клеток *E. coli*/pET22b/STARD1. Ранее нами было показано, что 22-NBD-холестерол и 20NP способны проникать в клетки *E. coli* [23]. Кроме того, в нескольких работах при проведении экспериментов в системе *in vitro* была продемонстрирована способность изолированного белка STARD1 связывать данные стероидные соединения (например, [24]).

Клетки культивировали в условиях индукции синтеза STARD1 в присутствии 22-NBD-холестерола или 20NP в течение 48 ч, периодически отбирая аликвоты контрольных и опытных суспензий, содержащие одинаковое количество клеток. Для удаления стеролов с поверхности клеток их несколько раз промывали раствором МЦД. Клетки суспендировали в EtOH и разрушали с использованием ультразвука; пробы центрифугировали и в полученных осадках и супернатантах определяли уровень содержания флуоресцирующих стеролов с использованием флуоресцентной спектроскопии (см. раздел «Материалы и методы»). Можно сразу отметить, что флуоресцентные субстраты полностью экстрагируются EtOH и присутствуют только в пробах-супернатантах, которые далее обозначе-

ны как «препараты клеток», в полученных осадках флуоресценция не регистрируется (данные не приведены).

Обнаружено, что во всех временных точках (4, 7, 24 или 48 ч инкубации) содержание флуоресцентных соединений в рекомбинантных клетках превышает их содержание в клетках контрольного штамма.

На рис. 2 представлены результаты одного из проведённых экспериментов: спектры флуоресценции 22-NBD-холестерола и стерола 20NP, регистрируемые в препаратах клеток, несущих ген белка STARD1, в сравнении со спектрами препаратов контрольных клеток, иллюстрирующие разницу в эффективности накопления стероидов в клетках в течение 7 ч. В случае 22-NBD-холестерола экспрессия гена *STARD1* приводит к превышению его содержания в клетке примерно в ~1,8 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 2, а), в случае 20NP содержание стероида выше в ~2,5 раза (рис. 2, б). Согласно результатам статистической обработки полученных данных (результатов 12 измерений для каждого флуоресцентного субстрата при проведении 3 независимых экспериментов), присутствие STARD1 в клетках увеличивает эффективность транспорта аналогов холестерина в $1,31 \pm 0,16$ раза для 22-NBD-холестерола и в $1,58 \pm 0,32$ раза для 20NP (Mean \pm SD; $p < 0,05$). Регистрируемая разница в эффективности ассимиляции 22-NBD-холестерола и 20NP клетками (рис. 2), возможно, является следствием различия фи-

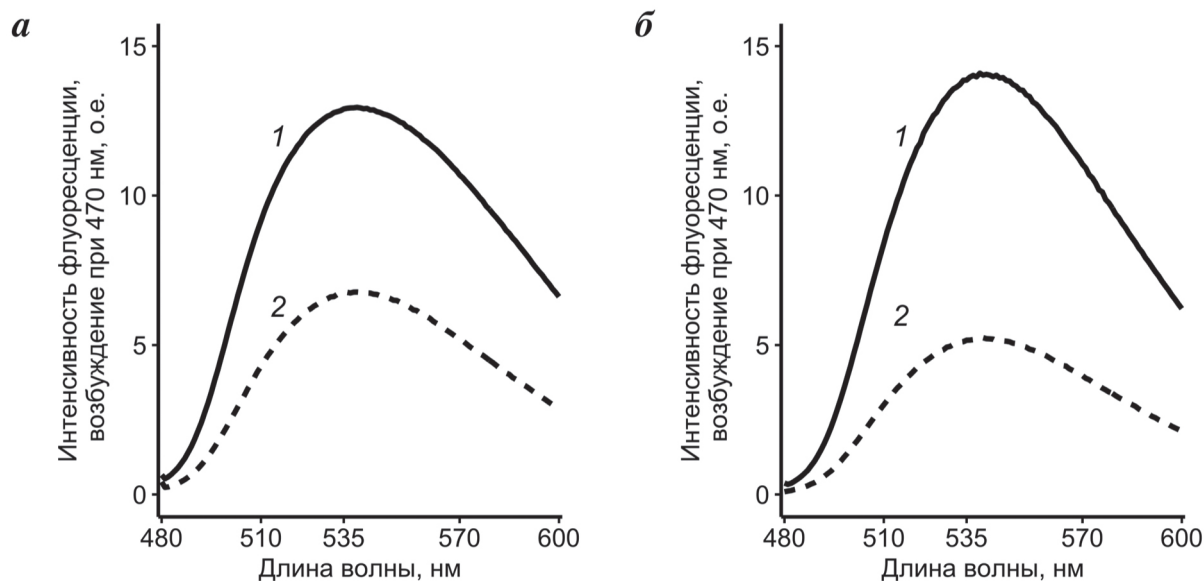


Рис. 2. Влияние рекомбинантного STARD1 на эффективность включения NBD-меченых стеролов в клетки бактерий. Анализ препаратов клеток, культивированных в течение 7 ч в условиях индукции синтеза рекомбинантного белка в присутствии (а) 22-NBD-холестерола или (б) 20NP. а, б: 1 – препарат клеток *E. coli*/pET22b/STARD1, 2 – препарат клеток контрольного штамма *E. coli*. Максимум испускания флуоресценции – 530 нм

зико-химических свойств данных стероидов, обладающих разной структурой, либо связана с разным положением NBD-группы в составе стероида, что, как ранее сообщалось, влияет на взаимодействие NBD-меченых аналогов холестерина с белком STARD1 [24].

Из представленных данных следует, что STARD1 человека способен проявлять функциональную активность в клетках бактерий – связывать аналоги холестерина и осуществлять их транспорт через мембрану клеток и таким образом влиять на внутриклеточное содержание стероидных соединений. Присутствие STARD1 в клетках в функционально-активном состоянии указывает на его корректный фолдинг в клетках *E. coli*. STARD1 является чрезвычайно важным регуляторным белком и вовлечён в развитие ряда серьёзных заболеваний, однако к настоящему времени нет однозначных данных о механизме его функционирования [22]. С учётом данных о том, что STARD1 способен осуществлять транспорт холестерина не только в стероидогенных клетках млекопитающих, но и в нестероидогенных клетках, таких как клетки почек обезьяны COS-1 [25] и клетки карциномы печени человека HepG2 [26], King et al. [26] высказали предположение, что механизм, посредством которого функционирует STARD1, может быть реализован в разных типах клеток. Наши результаты свидетельствуют в пользу этого предположения и указывают на то, что STARD1 может функционировать не только в разных типах клеток млекопитающих, но и, возможно, в клетках разных микроорганизмов. Возможность присутствия в клетках *E. coli* активного STARD1 человека открывает перспективы для проведения исследований его характеристик не только с использованием выделенного белка или культур клеток млекопитающих, но и в простых модельных системах *in vivo* на основе клеток *E. coli*.

В данном исследовании впервые обнаружено, что рекомбинантные клетки *E. coli*, осуществляющие синтез белка-переносчика холестерина STARD1, демонстрируют способность более эффективно ассимилировать аналоги холестерина в сравнении с клетками дикого штамма. Полученные результаты указывают на то, что предложенный подход – включение в мембрану специфического белка-переносчика для повышения эффективности транспорта в клетки стероидов или других гидрофобных субстратов – является перспективным и может быть использован, в частности, для оптимизации функционирования микроорганизмов-биокаATALизаторов. Результаты работы представляют собой основу для дальнейших исследований, направленных на понимание механизма функционирования STARD1 в живых клетках *E. coli*, а также на развитие указанного подхода и поиск других белков-переносчиков стероидов, пригодных для повышения эффективности биотрансформации стероидов клетками *E. coli*.

Вклад авторов. Л.А. Новикова, М.А. Рубцов – концепция и руководство работой, написание текста; С.В. Замалутдинова, Л.В. Исаева, А.В. Замалутдинов, Я.В. Фалетров, Л.А. Новикова – проведение экспериментов; А.В. Замалутдинов – статистическая обработка результатов.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-08-00467-а). Авторы выражают благодарность Случанко Н.Н. за предоставленные плазмиды pET-22b(+) и H-MBP-3C-STARD1_{66–285}.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuhl, H. (2011) Pharmacology of progestogens, *J. Reproduktionsmed. Endokrinol.*, **8**, 157-176, doi: 10.1007/978-3-319-14385-9_2.
2. Fu, B., Ren, Q., Ma, J., Chen, Q., Zhang, Q., et al. (2022) Enhancing the production of physiologically active vitamin D3 by engineering the hydroxylase CYP105A1 and the electron transport chain, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 14, doi: 10.1007/s11274-021-03193-1.
3. Novikova, L. A., Faletrov Y. V., Kovaleva I. E., Mauersberger, S., Luzikov, V. N., et al. (2009) From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 1482-1504, doi:10.1134/s0006297909130057.
4. Mauersberger, S., Novikova, L. A., and Shkumatov, V. M. (2013) in *Yarrowia Lipolytica. Microbiology Monographs* (Barth, G., ed.) vol. 25. Springer, Berlin, Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-38583-4_7.
5. Donova, M. V., and Egorova, O. V. (2012) Microbial steroid transformations: Current state and prospects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **94**, 1423-1447, doi: 10.1007/s00253-012-4078-0.
6. Efimova, V. S., Isaeva, L. V., Rubtsov, M. A., and Novikova, L. A. (2019) Analysis of *in vivo* activity

- of the bovine cholesterol hydroxylase/lyase system proteins expressed in *Escherichia coli*, *Mol. Biotechnol.*, **61**, 261-273, doi: 10.1007/s12033-019-00158-6.
7. Thevenieau, F., Beopoulos, F., Desfougeres, T., Sabirova, J., Albertin, K., et al. (2010) in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Timmis, K., ed.) 2nd Edn Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1514-1527.
 8. Liu, W.-H., Horng, W.-C., and Tsai, M.-S. (1996) Bioconversion of cholesterol to cholest-4-en-3-one in aqueous/organic solvent two-phase reactors, *Enzyme Microb. Technol.*, **18**, 184-189, doi: 10.1016/0141-0229(95)00091-7.
 9. Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., and Stocco, D. M. (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), *J. Biol. Chem.*, **269**, 28314-28322.
 10. Kallen, C. B., Billheimer, J. T., Summers, S. A., Stayrook, S. E., Lewis, M., et al. (1998) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein, *J. Biol. Chem.*, **273**, 26285-26288, doi: 10.1074/jbc.273.41.26285.
 11. Arakane, F., Sugawara, T., Nishino, H., Liu, Z., Holt, J. A., et al. (1996) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) retains activity in the absence of its mitochondrial import sequence: Implications for the mechanism of StAR action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13731-13736, doi: 10.1073/pnas.93.24.13731.
 12. Arakane, F., Kallen, C. B., Watari, H., Foster, J. A., Sepuri, N. B. V., et al. (1998) The mechanism of action of steroidogenic acute regulatory protein (StAR). StAR acts on the outside of mitochondria to stimulate steroidogenesis, *J. Biol. Chem.*, **273**, 16339-16345, doi: 10.1074/jbc.273.26.16339.
 13. Sluchanko, N. N., Tugaeva, K. V., Faletrov, Y. V., and Levitsky, D. I. (2016) 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.*, **119**, 27-35, doi: 10.1016/j.pep.2015.11.002.
 14. Faletrov, Y., Brzostek, A., Plocinska, R., Dziadek, J., Rudaya, E., et al. (2017) Uptake and metabolism of fluorescent steroids by mycobacterial cells, *Steroids*, **117**, 29-37, doi: 10.1016/j.steroids.2016.10.001.
 15. Efimova, V. S., Isaeva, L. V., Labudina, A. A., Tashlitsky, V. N., Rubtsov, M. A., et al. (2019) Polycistronic expression of the mitochondrial steroidogenic P450scc system in the HEK293T cell line, *J. Cell. Biochem.*, **120**, 3124-3136, doi: 10.1002/jcb.27577.
 16. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
 17. Studier, F. W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures, *Protein Expr. Purif.*, **41**, 207-34, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.016.
 18. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
 19. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354, doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
 20. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-270.
 21. R. Core Team (2021) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
 22. Tugaeva, K. V., and Sluchanko, N. N. (2019) Steroidogenic acute regulatory protein: structure, functioning, and regulation, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 233-253, doi: 10.1134/S0006297919140141.
 23. Efimova, V., Faletrov, Y., Isaeva, L., Novikova, L., Rubtsov, M., et al. (2015) Interaction of NBD-labelled fluorescent steroids and a fatty acid with *Escherichia coli*, *FEBS J.*, **282**, Suppl. 1, p. 135, doi: 10.1111/febs.13321.
 24. Tugaeva, K. V., Faletrov, Y. V., Allakhverdiev, E. S., Shkumatov, V. M., Maksimov, E. G., et al. (2018) Effect of the NBD-group position on interaction of fluorescently-labeled cholesterol analogues with human steroidogenic acute regulatory protein STARD1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **497**, 58-64, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.02.014.
 25. Sugawara, T., Holt, J. A., Driscoll, D., Strauss, J. F. 3rd, Lin, D., et al. (1995) Human steroidogenic acute regulatory protein: functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4778-4782, doi: 10.1073/pnas.92.11.4778.
 26. King, S. R., Liu, Z., Soh, J., Eimerl, S., Orly, J., et al. (1999) Effects of disruption of the mitochondrial electrochemical gradient on steroidogenesis and the Steroidogenic Acute Regulatory (StAR) protein, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**, 143-154, doi: 10.1016/S0960-0760(98)00152-6.

ANALYSIS OF THE ACTIVITY OF THE HUMAN STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY PROTEIN (STARD1) EXPRESSED IN *Escherichia coli*

S. V. Zamalutdinova^{1*}, L. V. Isaeva², A. V. Zamalutdinov¹, Y. V. Faletrov³,
M. A. Rubtsov^{1,4}, and L. A. Novikova^{2*}

¹ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: zamalutdinova.sofya@mail.ru

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: novik@genebee.msu.su

³ Research Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,
220030 Minsk, Belarus. e-mail: yaroslav82@tut.by

⁴ Sechenov First Moscow State Medical University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: ma_rubtsov@mail.ru

One of the main obstacles to the successful use in biotechnological processes of *Escherichia coli* cells capable of steroid transformation is the inefficient transport of steroid substrates into cells. We tested the possibility of using a human cholesterol transfer protein, steroidogenic acute regulatory protein (STARD1), to increase the efficiency of steroid uptake by bacterial cells. Genetic constructs were obtained for the synthesis in *E. coli* BL21(DE3) cells of a deleted version of the STARD1 protein, including a functional domain (66-285 amino acid residues), or of the STARD1(66-285)-GFP protein, both bearing periplasmic targeting sequence of the bacterial protein *pelB* at the N terminus. Analysis of *E. coli*/pET22b/STARD1-GFP cell preparations using fluorimetry and Western immunoblotting confirmed that the expression system used provides the synthesis of a full-length heterologous protein. Using fluorescence spectroscopy, it was shown that the presence of STARD1 provides an increase in the efficiency of assimilation of NBD-labeled cholesterol analogues by *E. coli*/pET22b/STARD1 cells by 1.3-1.6 times ($p < 0.05$) compared with the cells of the wild strain. Thus, for the first time it was found that human STARD1 is able to exhibit functional activity in bacterial cells, which opens up prospects for optimization and use of a fundamentally new approach to increase the efficiency of steroid uptake by cells - the inclusion of a specific carrier protein in the cell membrane, which can expand the arsenal of methods used to create microorganism strains for the synthesis of widely demanded steroid compounds.

Keywords: steroidogenic acute regulatory protein, STARD1, *Escherichia coli*, cholesterol, biotransformation of steroids, fluorescence