

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 18 октября 2018 г. № 16 о присуждении Дергоусовой Елене Александровне, гражданство Российская Федерация, учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация «Влияние глутатионилирования  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТФазы на свойства фермента» по специальности 03.01.04 «Биохимия» принята к защите 14 июня 18 года (протокол № 13) диссертационным советом Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13.02.2013 г. №74/нк и от 10.02.2014г. №55/нк и с учётом переименования Совета от 30.09.2015 г. № 1166/нк.

Соискатель Дергоусова Елена Александровна (1990 года рождения), в июне 2012 г. окончила с красным дипломом Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедру биохимии по специальности «Биохимия», и в октябре 2012 г. поступила в очную аспирантуру на этой кафедре, где проходила обучение по октябрь 2016 года. С февраля 2013 года работает лаборантом кафедры биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», а с мая 2017 года – старшим лаборантом в лаборатории конформационной стабильности белков и физических методов анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук».

Диссертационную работу соискатель Дергоусова Е.А. выполняла на кафедре биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский

государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в лаборатории конформационной стабильности белков и физических методов анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук».

Научный руководитель – **Лопина Ольга Дмитриевна**, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

**Медведев Алексей Евгеньевич**, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», заведующий лабораторией фармакопротеомики.

**Меньшиков Михаил Юрьевич**, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», в своём положительном заключении, подписанном заведующим кафедрой биохимии, доктором биологических наук, профессором Покровским В.С., доцентом кафедры биохимии, доктором биологических наук Калининой Е.В. и директором Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», доктором медицинских наук, профессором Абрамовым А.Ю. и утверждённым проректором по научной работе ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», доктором философских наук, профессором Кирабаевым Н.С., указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, а её автор Дергоусова Е.А. заслуживает присуждения искомой учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обосновывается тем, что доктор биологических наук, профессор Медведев Алексей Евгеньевич является хорошо известным специалистом в области изучения белок-белковых взаимодействий и сигнальных каскадов, а доктор биологических наук Меньшиков Михаил Юрьевич является признанным специалистом в

области изучения передачи внутриклеточного сигнала в патологических условиях, в частности, в условиях окислительного стресса. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высоко цитируемых российских и международных журналах. Выбор ведущей организации обусловлен тем, что медицинский институт ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» функционирует как многопрофильное учреждение, в котором помимо образовательной деятельности проводятся широкие научно-исследовательские работы. На кафедре биохимии медицинского института проводятся исследования окислительного стресса и глутатионилирования белков клетки. Сотрудники кафедры биохимии медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» являются высококвалифицированными специалистами в данной области, что подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 4 статьях в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Мэн С., Петрушанко И.Ю., Климанова Е.А., **Дергоусова Е.А.** и Лопина О.Д. (2014) Глутатионилирование альфа-субъединицы Na,K-АТРазы из сердца крысы под действием окисленного глутатиона приводит к ингибированию активности фермента. *Биохимия*, 79 (2), 209–16.
2. Петрушанко И.Ю., Симоненко О.В., Бурнышева К.М., Климанова Е.А., **Дергоусова, Е.А.**, Митькевич В.А., Лопина О.Д. и Макаров А.А. (2015) Способность клеток адаптироваться к условиям низкого содержания кислорода связана с глутатионилированием Na,K-АТРазы. *Молекулярная биология*, 49 (1), 175–83.
3. **Dergousova, E.A.**, Petrushanko, I.Y., Klimanova, E.A., Mitkevich, V.A., Ziganshin, R.H., Lopina, O.D., and Makarov, A.A. (2017) Effect of reduction of redox modifications of Cys-residues in the Na,K-ATPase  $\alpha$ 1-subunit on its activity. *Biomolecules*. 7 (1), E18
4. **Дергоусова Е.А.**, Петрушанко И.Ю., Климанова Е.А., Митькевич В.А., Зиганшин Р.Х., Лопина О.Д. и Макаров А.А. (2018) Усиление активности Na,K-АТРазы в результате снятия редокс-модификаций с остатков цистеина  $\alpha$ -1 субъединицы: эффект восстанавливающих агентов. *Молекулярная Биология*, 52 (2), 289–93.

Результаты работы были также представлены на 2-х отечественных и 1-й международной конференциях.

В публикациях отражены экспериментальные работы, проведённые в рамках выполнения диссертации.

На диссертацию поступили следующие отзывы:

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук, профессора Медведева А.Е. (положительный)** содержал следующие вопросы и замечания:

- В разделе «обзор литературы» присутствует определённая избыточность приведённого литературного материала, который далее оказывается невостребованным. Сказанное в первую очередь относится к белкам цитоскелета, а также мелиттину, Src-киназе, кавеолинам. Такое подробное рассмотрение этих важных вопросов функционирования Na,K-АТРазы, прямо не связанных с диссертационной работой, «несколько уводит в тень» те проблемы, которым и посвящено собственное экспериментальное исследование. Именно этим можно объяснить тот факт, что очень важный раздел обзора литературы – «1.2.4. Механизмы глутатионилирования белков» – уместился всего на трёх страницах и в нём не нашлось места для ряда интересных обзорных статей, например, «Causes and consequences of cysteine S-glutathionylation» (Grek et. al. (2013) J. Biol. Chem., 288: 26497-26504).
- Не все схемы, которыми хорошо иллюстрирован данный раздел диссертации, должным образом объяснены. Например, на стр. 50 автор приводит интересную схему возможных путей S-глутатионилирования белков (стр. 14), фрагменты объяснения которой оказались рассеянными по нескольким страницам.
- В разделе «Методы» в ряде случаев отсутствует важная методическая информация. Например, в разделе «2.7.2. Деглутатионилирование  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы с использованием ферментативной системы» автор приводит состав инкубационной смеси, ограничившись упоминанием количества используемых для деглутатионилирования ферментов – глутаредоксина и глутатионредуктазы без указания их активности. В разделе «2.13. Использованные реактивы» об этом также не говорится ни слова, поэтому оценить адекватность использованной сопряжённой системы практически невозможно.
- В разделе «Глутатионилирование в клеточной культуре и иммунопреципитация» отсутствует важная информация о происхождении культуры эмбриональных клеток мышцы SC1, количестве клеток, использованных в экспериментах. Непонятно, чем был обусловлен выбор именно этих клеток.
- Автор не уделила должного внимания масс-спектрометрическому анализу, особенно в контексте масс-спектрометрической идентификации модифицированных остатков цистеина  $\alpha$ 1-субъединицы Na,K-АТРазы.
- Если исходное глутатионилирование не удаляется даже при неферментативном восстановлении денатурированного фермента, можно ли считать такое глутатионилирование необратимой ковалентной модификацией? Каково биологическое значение такой необратимой модификации?

- В разделе «Заключение» приводится высказанное Митькевичем и соавторами [Mitkevich, V.A., et al., 2016], предположение о котрансляционном глутатионилировании некоторых остатков цистеина  $\alpha 1$ -субъединицы. Может ли это предположение вместе с данными рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования о возможном встраивании в полость с неразрешённой плотностью  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы свидетельствовать о котрансляционном глутатионилировании (стр.102)?
- Автор вольно обращается с математическим термином «корреляция», допускает нарушение согласования (например, «вероятность дополнительного глутатионилирования Na,K-АТРазы в процессе выделения фермента невелик», стр. 78), а также опечатки.
- не очень удачно использование сплошной нумерации рисунков и таблиц в тексте диссертации и приложения.

Однако замечания по сути и оформлению диссертационной работы не являются принципиальными и не снижают научной ценности полученных автором данных.

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Меньшикова М.Ю. (положительный)** содержал следующие вопросы и замечания:

- На рисунке 4 не совсем понятно, на что следует обратить внимание, проводя различие между структурой фермента в E1 и E2 состояниях. В подписи к рисунку 5 объяснение могло быть более пространным
- Текст диссертации содержит некоторые опечатки, присутствующие в основном в обзоре литературы
- Чем обусловлен выбор клеточной модели (рис. 22)? Насколько она уникальна или типична для характеристики наблюдаемого феномена? Какие антитела использовались для типирования фермента из солевых желёз утки и мышинных эмбриональных клеток? Было ли это пан-специфическое (для обоих видов) антитело или они различались?
- Как проводилась нормировка степени глутатионилирования при её количественном представлении?
- В какую конформацию переводили фермент при сопоставлении его активности со степенью глутатионилирования?
- Рисунок 38 – поскольку представленные данные характеризуют влияние (точнее, отсутствие такового) ионной силы на протеолитическую деградацию, об этом желательно указать в начале подписи.

Все изложенные в отзыве замечания носят технический характер и не влияют на общее благоприятное впечатление от диссертационной работы.

**Отзыв ведущей организации - Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов» (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

- В работе имеются определённые недостатки в форме стилистических неточностей и опечаток. Кроме того, обзор литературы несколько перегружен.
- Следует указать на не совсем корректное утверждение, что научно-практическая значимость диссертационной работы связана с вкладом результатов работы, полученных в основном *in vitro*, в понимание физиологической роли регулирования функций Na,K-АТФазы путём модификации глутатионом остатков цистеина её каталитической субъединицы при изменении окислительно-восстановительного статуса организма.

Тем не менее, эти замечания не носят принципиального характера и не снижают научно-практической ценности работы.

**На автореферат поступили положительные отзывы от:**

- начальника лаборатории «Белковая фабрика» Курчатовского Комплекса НБИКС-природоподобных технологий, НИЦ «Курчатовский Институт», кандидата химических наук **Ракитиной Татьяны Викторовны**

В отзыве приведены следующие вопросы:

1) Диссертационная работа была проведена на ферменте из солевых желёз утки, и хотя он имеет высокую гомологию с ферментом из клеток млекопитающих, необходимо учитывать, что свойства Na,K-АТФазы из разных источников могут различаться. Были ли проделаны аналогичные работы на ферменте из клеток млекопитающих?

2) В работе трипсинолиз проводился при соотношении трипсин: Na,K-АТФаза = 1:10. Ставились ли эксперименты при ином соотношении протеаза:белок?

- старшего научного сотрудника, заместителя заведующего лабораторией инженерной энзимологии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, кандидата химических наук **Тихоновой Тамары Викторовны**, замечаний нет;
- заместителя начальника лаборатории «Белковая фабрика» Курчатовского Комплекса НБИКС-природоподобных технологий, НИЦ «Курчатовский Институт», кандидата химических наук **Липкина Алексея Валерьевича**

В отзыве приведены следующие замечания:

«Можно было бы рассмотреть не только действие трипсина, но и других протеаз для получения более полной картины. Так же можно было в экспериментах по изотермической калориметрии титрования взять несколько лигандов или белков-партнёров. Эти данные позволили бы шире взглянуть на проблему. Кроме того, было бы интересно провести масс-спектрометрический анализ протеолитических

фрагментов и установить, являются ли эти фрагменты одинаковыми при трипсинолизе различных конформаций каталитической субъединицы Na,K-АТРазы».

- старшего научного сотрудника ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, кандидата биологических наук **Рулёвой Натальи Юрьевны**  
В отзыве приведены следующие замечания:  
«К замечаниям можно отнести недостаточное освещение физиологической значимости выбранной в качестве объекта исследования изоформы каталитической субъединицы ( $\alpha 1$ ) фермента по сравнению с другими изоформами».
- старшего научного сотрудника лаборатории инженерной энзимологии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, кандидата биологических наук **Кравченко Ирины Валерьевны**, замечаний нет;
- старшего научного сотрудника Курчатовского Комплекса НБИКС-природоподобных технологий, НИЦ «Курчатовский Институт», кандидата биологических наук **Корженевского Дмитрия Андреевича**, замечаний нет.

#### **Вопросы задавали и принимали участие в дискуссии:**

д.б.н. Звягильская Р.А., д.б.н. Крицкий М.С., д.х.н. Савицкий А.П., д.б.н. Шишкин С.С., д.х.н. Дзантиев Б.Б., д.б.н. Капрельянц А.С., чл.-корр. д.б.н. Гусев Н.Б., к.ф.-м.н. Петрушанко И.Ю.

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

- $\alpha 1$ -Субъединица Na,K-АТРазы, выделенной из солевых желёз утки, содержит связанный глутатион (исходное глутатионилирование). Инкубация фермента с окисленным глутатионом (1 мМ) приводит к увеличению степени глутатионилирования  $\alpha 1$ -субъединицы, при этом доступность конформаций к глутатионилированию снижается в ряду: E1, E2, E2P. Связывание убаина с конформацией E2P не влияет на уровень глутатионилирования.
- Глутатионилирование  $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы с помощью окисленного глутатиона ингибирует активность фермента. Преинкубация препарата с АТР защищает фермент от ингибирования концентрационно-зависимым способом с максимальным эффектом при концентрации АТР выше 1 мМ.
- Полного восстановления S-S связей между глутатионом и остатками цистеина  $\alpha 1$ -субъединицы фермента (деглутатионилирования) не удастся достичь даже под действием сильных восстанавливающих агентов (25 мМ трис-2-карбокситилфосфина (ТСЕР) и 3% NaBH<sub>4</sub>) в денатурирующих условиях (6 М мочевины, 2% додецилсульфат натрия (SDS)). По данным масс-спектрометрического

- анализа глутатион не удаляется с остатков Cys513 и 658 и лишь частично удаляется с остатков Cys454, 458 и 459.
- После инкубации препарата Na,K-АТФазы с 25 мМ трис-2-карбок시에тилфосфином и 3% NaBH<sub>4</sub> наблюдается восстановление нитрозилированных SH-групп α1-субъединицы на 20% и 45% соответственно, и восстановление окисленных до -SOH, -SO<sub>2</sub>H и -SO<sub>3</sub>H групп на 60% и 40% соответственно.
  - Частичное деглутатионилирование α1-субъединицы Na,K-АТФазы приводит к уменьшению её устойчивости к протеолизу в E1- и E2-конформациях. Характер трипсинолиза дополнительно глутатионилированного препарата варьирует в зависимости от конформации белка. Связывание убаина ускоряет трипсинолиз по сравнению с таковым, происходящим с E1- и E2-конформациями.
  - Дополнительное глутатионилирование и частичное деглутатионилирование α1-субъединицы Na,K-АТФазы не влияет на термодинамические параметры её связывания с убаином и белком теплового шока Hsp70.

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

полученные в ходе исследований результаты расширяют существующие представления о роли процесса посттрансляционной модификации цистеиновых остатков (и, в частности, глутатионилирования) α1-субъединицы Na,K-АТФазы. Впервые показано, что *in vitro* при использовании сильных химических восстановителей невозможно полностью удалить глутатион, связанный с α1-субъединицей Na,K-АТФазы, как с нативного, так и денатурированного фермента. Частично деглутатионилированный препарат Na,K-АТФазы в большей степени подвержен трипсинолизу, чем фермент, имеющий исходное глутатионилирование, который выделяется из тканей с нормальным окислительно-восстановительным состоянием. Установлено, что трипсинолиз α1-субъединицы Na,K-АТФазы, связанной с кардиотоническим стероидом убаином, осуществляется быстрее, чем трипсинолиз фермента в присутствии ионов Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup>. Впервые показана зависимость степени дополнительного глутатионилирования от конформации фермента. Установлено также, что глутатионилирование α1-субъединицы не влияет на связывание фермента с убаином и белком-партнёром Hsp70. Кроме того, показано, что цистеиновые остатки каталитической субъединицы Na,K-АТФазы могут быть в различной степени окислены и нитрозилированы.

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

настоящая работа вносит вклад в понимание процессов регулирования функций Na,K-АТФазы путем модификации глутатионом остатков цистеина ее каталитической субъединицы и физиологической роли этих процессов при изменении окислительно-восстановительного статуса клетки.

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

- использованные методики исследования и проведённые расчёты корректны;

