

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу
Дергоусовой Елены Александровны
«Влияние глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРаза на свойства фермента»,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.01.04 - биохимия

Na,K-АТРаза – гетероолигомерный фермент плазматической мембраны, ответственный за трансмембранный перенос ионов Na^+ и K^+ – относится к числу критически важных для жизнедеятельности клетки белков, которые, помимо выполнения «своих непосредственных функций» оказываются вовлеченными в сигнальные каскады, взаимодействуя с разного рода регуляторными молекулами, и служат привлекательными мишенями для фармакологических препаратов. В контексте собственно Na,K-АТРаза недавно показано, что $\alpha 1$ -субъединица подвергается глутатионилированию, которое влияет на функциональное состояние этого фермента. Однако, ряд важных моментов, связанных с эффектом глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы на свойства Na,K-АТРаза, нуждается в существенном уточнении. Все это и определяет актуальность диссертационной работы Дергоусовой Е. А.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», главы «Результаты и обсуждение», заключения и выводов. Список цитированной литературы включает 246 работ, которые охватывают период с 1951 по 2017 г.

Обзор литературы, изложенный на 51 странице, разбит на 2 больших раздела, каждый из которых включает от 6 (раздел 2) до 8 (раздел 1) подразделов, в которых автор последовательно рассматривает структуру и функции Na,K-АТРаза, включая молекулярную организацию Na,K-АТРаза, ее изоформы, каталитический цикл, механизм работы, регуляцию т.н. кардиотоническими стероидами, взаимодействие с белками-партнерами. Поскольку диссертационная работа Дергоусовой Е.А. сфокусирована на изучении глутатионилирования $\alpha 1$ -субъединицы и влиянии этой модификации на свойства исследуемого фермента, понятен интерес автора к глутатионилированию как к процессу модификации SH-групп белков вообще, так и регуляции работы Na,K-АТРаза в частности.

Положительно оценивая обширный обзор литературы, логически подводящий читателя к целям и задачам диссертации, глубокие знания Дергоусовой Е.А. по теме работы, не могу не отметить определенную избыточность приведенного литературного материала, который далее оказывается невостребованным. Сказанное, в первую очередь, относится к белкам цитоскелета, а также мелиттину, Src-киназе, кавеолинам. С моей точки зрения, такое подробное рассмотрение этих важных вопросов функционирования Na,K-АТФазы, 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 трех страницах и в нем 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). Хотя справедливости ради следует отметить, что вопросы глутатионилирования субъединиц Na,K-АТФазы и влияние этой модификации на ряд свойств этого фермента рассмотрены в отдельном разделе (1.2.6) довольно подробно.

Из других недостатков обзора литературы отмечу тот факт, что 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 (рис. 14), фрагменты объяснения которой оказались рассеянными по нескольким страницам.

Глава 2 «Материалы и методы исследования» изложена на 9 страницах. Методический арсенал работы современен и полностью адекватен поставленным задачам. В данной главе наиболее подробно рассмотрены: получение очищенного препарата Na,K-АТФазы, определение его активности, электрофорез в полиакриламидном геле, иммуноблоттинг, глутатионилирование и деглутатионилирование α 1-субъединицы Na,K-АТФазы, изотермическая калориметрия титрования (ИКТ). Хотя большинство разделов этой главы написано в виде протоколов, которые легко могут быть воспроизведены практически в любой лаборатории, не могу не отметить тот факт, что в ряде случаев отсутствует важная методическая информация. Например, в разделе «2.7.2. Деглутатионилирование α 1-субъединицы Na,K-АТФазы с использованием ферментативной системы» автор приводит состав инкубационной смеси, ограничившись упоминанием количества

используемых для деглутатионирования 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 сопряженной ферментной системы практически невозможно. Между тем, это очень важно в связи с заявлением автора о том, что «ферментативная система не способна полностью устранить исходное глутатионирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы» (стр: 79).

В разделе глутатионирование в клеточной культуре и иммунопреципитация отсутствует важная информация о происхождении культуры эмбриональных клеток мыши SC1, количестве клеток, использованных в экспериментах. Непонятно, чем был обусловлен выбор именно этих клеток. Не уделила должного внимания автор и масс-спектрометрическому анализу особенно в контексте масс-спектрометрической идентификации модифицированных остатков цистеина α 1-субъединицы Na,K-АТРазы, фактически отослав читателя к Р.Х. Зиганшину (ИБХ), который собственно выполнял масс-спектрометрический анализ подготовленных диссертантом препаратов. С моей точки зрения, это важное упущение, поскольку именно масс-спектрометрический анализ является решающим в контексте обоснованности выводов работы.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких логически взаимосвязанных подразделов, в которых последовательно рассмотрены: характеристика препарата Na,K-АТРазы из солевых желёз утки, глутатионирование и деглутатионирование α 1-субъединицы Na,K-АТРазы, другие модификации SH-групп этой субъединицы и их восстановление химическими восстановителями, а также ограниченный трипсинолиз α 1-субъединицы Na,K-АТРазы и влияние степени глутатионирования Na,K-АТРазы на ее связывание с лигандами.

В данной главе автор убедительно показывает, что выделенная из солевых желёз утки α 1-субъединица Na,K-АТРазы содержит связанный глутатион, а ее инкубация с окисленным глутатионом увеличивает глутатионирование и торможение активности фермента. При этом полностью деглутатионировать α 1-субъединицу Na,K-АТРазы не удается даже под действием сильных восстанавливающих агентов в денатурирующих условиях (6 М мочевины, 2% додецилсульфата натрия). Полученные в сотрудничестве со специалистом в области масс-спектрометрического анализа Р.Х.

Зиганшиным данные позволили выявить особенно устойчивые к дегутатионированию остатки цистеина (Cys513 и Cys 658), в то время как остатки Cys454, Cys 458 и Cys459, а также Cys351, Cys206 и Cys140 в денатурирующих условиях были чувствительны к восстановлению боргидридом натрия. При этом остатки именно цистеина, расположенные вблизи активного центра (Cys454, 458 и 459), помимо глутатионирования подвергаются и другим (окислительным) модификациям.

Со сделанными выше оговорками о недостаточно охарактеризованных методических аспектах масс-спектрометрического анализа данных, которые подробно описаны в более ранних работах Р.Х. Зиганшина на эту тему (например (Petrushanko et al., (2012) J. Biol. Chem., 287: 32195–32205), полученные результаты следует признать вполне обоснованными.

Положительно оценивая эту работу и ее итоги, при чтении диссертации возник ряд замечаний и вопросов.

(1) *Если исходное глутатионирование, не удаляется даже при неферментативном восстановлении денатурированного фермента, можно ли считать такое глутатионирование необратимой ковалентной модификацией? Каково биологическое значение такой необратимой модификации?*

(2) *В разделе «Заключение» приводится высказанное Митькевичем и соавторами [Mitkevich, V.A., et al., 2016], предположение о котрансляционном глутатионировании некоторых остатков цистеина α 1-субъединицы.*

Может ли это предположение вместе с данными рентгеноструктурного анализа и компьютерного моделирования о возможном встраивании в полость с неразрешённой плотностью α 1-субъединицы Na,K-АТФазы свидетельствовать о котрансляционном глутатионировании (стр. 102)?

Из замечаний литературно-оформительского свойства, в дополнение к уже упомянутому выше (см. стр. 2 настоящего отзыва) отмечу вольное обращение автора с математическим термином «корреляция», нарушение согласования (например, «вероятность дополнительного глутатионирования Na,K-АТФазы в процессе выделения фермента невелик», стр. 78), а также опечатки, которые начинают встречаться уже в оглавлении (Глава 3), но не превышают среднестатистического уровня. Не очень удачно и использование сплошной нумерации рисунков и таблиц в тексте диссертации и приложении.

Заключение: По актуальности проблемы, методическому уровню, объему и новизне полученных результатов, их фундаментальной и научно-практической значимости диссертация Дергоусовой Елены Александровны «Влияние глутатионилирования α 1-Субъединицы Na,K-АТРазы на свойства фермента», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия, является законченной научно-квалификационной работой и соответствует критериям п.9 положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 с внесенными изменениями от 21 апреля 2016 г. №335 и от 02.08.2016 №748, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

Автореферат и опубликованные работы полностью отражают материалы диссертации.

Медведев Алексей Евгеньевич,
Д. б. н. по специальности 03.01.04 (биохимия), профессор,
Зав. лаборатории фармакопротеомики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Научно-исследовательского института биомедицинской химии
Имени В.Н.Ореховича,
119121, Москва, Погодинская улица 10,
Эл. почта: professor57@yandex.ru

27.09.2018

Подпись

заверяю

Ученый секретарь ИБМХ г.н. Карлова Е.А.