

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Елены Александровны Дергоусовой «Влияние глутатионилирования α 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 – фермент, поддерживающий трансмембранный градиент ионов Na^+ и K^+ , играет многообразную роль в физиологии организма на системном и клеточном уровне. Прежде всего, это связано с осмотическим изменением объема клетки, а также с обеспечением вторичного переноса катионов, анионов, метаболитов, генерации потенциала возбудимых тканей, и передачей сигнала в клетку. Патологические проявления, являющиеся следствием нарушения каталитических и регуляторных свойств Na,K-АТРаза, свидетельствуют о важной роли этого фермента, представленного различными изоформами в разных тканях, как фактора поддержания клеточного гомеостаза.

Регуляция каталитической активности Na,K-АТРаза может достигаться разными способами, в частности, его взаимодействием с кардиотоническими стероидами (в частности, убаином), белками-партнерами, а также посттрансляционной модификацией фермента.

Диссертационная работа Е.А.Дергоусовой посвящена изучению влияния модификации цистеиновых остатков Na,K-АТРаза глутатионом на каталитические и регуляторные свойства фермента.

Актуальность исследования определяется, прежде всего, тем, что глутатион, естественный модификатор белков, зависимый от метаболического статуса клетки, является регулятором его активности, а также способен защищать SH-группы от окисления, в том числе необратимого. Молекула Na,K-АТРаза (ее α 1-субъединица) характеризуется определенной степенью исходного глутатионилирования. Выявление детальных механизмов регуляции активности фермента при дополнительном глутатионилировании и деглутатионилировании имеет научное и прикладное значение, позволяя выявить конкретные регуляторные цистеиновые остатки, подверженные такой регуляции, а также связать регуляторный потенциал с окислительно-восстановительными свойствами внутриклеточной среды и внеклеточного окружения.

Целью работы было - выявить влияние исходного и дополнительного глутатионилирования α 1-субъединицы на функции Na,K-АТРаза.

Автор поставил перед собой задачи:

1. Получить максимально глутатионилированный и деглутатионилированный препараты Na,K-АТРазы из солевых желёз утки и определить влияние глутатионилирования на активность фермента. 2. Исследовать влияние глутатионилирования на устойчивость $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы к действию трипсина. 3. Исследовать влияние глутатионилирования на связывание Na,K-АТРазы с кардиотоническим стероидом убаином и белком-партнёром Hsp70.

Для решения поставленных задач автор использовал ряд современных физико-химических и биохимических методов, в т.ч. центрифугирование в градиенте сахарозы, иммуноблоттинг, масс-спектрометрию, изотермическое калориметрическое титрование, а также культивирование клеток в стерильных условиях. Методическое оснащение работы позволяет сделать вывод о достоверности полученных результатов.

Основные результаты, полученные автором, следующие:

1. Выявлено драматическому снижению активности фермента при повышении уровня его глутатионилирования. Присутствие АТР (0,3-3 мМ) в среде предотвращало инактивацию Na,K-АТРазы при глутатионилировании независимо от концентрации нуклеотида.
2. Показано, что степень глутатионилирования $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТРазы зависит от ее конформации. В состоянии E1 (присутствие NaCl) степень глутатионилирования максимальна, она несколько ниже в состоянии E2 (присутствие KCl), и минимальна в фосфорилированном ферменте, в конформации E2P. Связывание убаина не влияет на степень глутатионилирования фермента. Показана возможность глутатионилирования Na,K-АТРазы клеточном уровне, - в линии эмбриональных стволовых клеток мышцы,
3. Показано, что при использовании химических восстановителей (в т.ч. с добавкой денатурирующих агентов, повышением температуры), а также в сопряженной ферментной системе глутаредоксин/глутатионредуктаза не удается добиться полного деглутатионилирования $\alpha 1$ -изоформы Na,K-АТРазы, предположительно вследствие наличия недоступных или особо прочных SS связей в молекуле фермента.
4. По данным автора, помимо деглутатионилирования, в присутствии химических восстановителей частично восстанавливают нитрозилированные и окисленные (SOH, SO₂H SO₂H) сульфгидрильные группы фермента.
5. Используя метод тандемной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS), автор идентифицировал остатки цистеина в молекуле $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы,

модифицированные глутатионилированием, нитрозилированием и окислением до сульфеновой и сульфоновой кислоты, до и после обработки фермента в присутствии додецилсульфата натрия и мочевины. В контрольном препарате обнаружено глутатионилирование Cys140, 206, 351, 454, 458, 459, 513 и 658. После восстановления белка в денатурирующих условиях выявлено глутатионилирование Cys454, 458, 459, 513, 658. Обнаружено нитрозилирование остатков Cys351, 454, 458 и 459, а также разная степень окисления большинства остатков цистеина. Максимально и наиболее разнообразно были модифицированы остатки Cys454, 458 и 459, располагающиеся вблизи активного центра фермента.

6. Лимитированный трипсинолиз E2-формы приводит к появлению пептида 40 кДа независимо от степени глутатионилирования; в случае деглутатионилирования, но не дополнительного глутатионилирования, происходит образование фрагмента с молекулярной массой 23 кДа, свидетельствующее об изменении конформации белка при его модификации.
7. В E1 конформации деглутатионилированная Na,K-АТРаза оказалась более подвержена трипсинолизу, чем глутатионилированный фермент, о чем свидетельствовало накопление фрагментов с мол. массами 40 и 23 кДа.
8. В конформации E2-уабаин фермент более подвержен трипсинолизу, чем в состояниях E2 и E1. Глутатионилирование существенно меняет конформацию фермента, о чем свидетельствует увеличение высвобождения пептидов 40 и 35,5 кДа по сравнению с исходным и частично глутатионилированными препаратами.
9. С помощью метода изометрической калориметрии титрования автор изучил влияние глутатионилирования на связывание Na,K-АТРаза с уабаином и белком-партнером, Hsp70.
10. Степень модификации фермента глутатионом не влияет на его сродство к уабаину (K_{дис} около 0,06 мкМ) и шаперону Hsp70 (K_{дис} 0,6 мкМ).

Результаты проведенного автором исследования углубляют представления о регуляции каталитических свойств Na,K-АТРаза в условиях глутатионилирования. Автору удалось провести градацию функциональной значимости различных остатков цистеина в молекуле фермента, а также выявить связь между глутатионилированием, нитрозилированием и окислением цистеиновых остатков. Продемонстрировано различие конформации фермента при его взаимодействии с уабаином, тонами Na⁺ и K⁺, а также отсутствие влияния глутатионилирования на взаимодействие Na,K-АТРаза с уабаином и белком-партнером, Hsp70.

Структура и оформление работы.

Диссертационная работа Е.А. Дергоусовой изложена на 131 странице, содержит 42 рисунка и 3 таблицы. Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы, список литературы (246 источников), и приложение.

Обзор литературы написан достаточно логично, иллюстрирован 17 рисунками и подготавливает читателя к восприятию последующего материала. Автор продемонстрировал хорошее знание литературы, понимание рассматриваемой проблемы, а также аналитические способности.

Замечание может быть адресовано к рисункам 4 (не совсем понятно, на что следует обратить внимание, проводя различие между структурой фермента в E! и E» состояниях), и рисунку 5, объяснение к которому в подписи могло быть более пространным. Кроме того, текст диссертации содержит некоторые опечатки, присутствующие в основном в обзоре литературы.

Материалы и методы с достаточной полнотой описывают комплекс методов, использовавшийся для получения результатов, и подкреплены необходимыми ссылками.

Результаты и их обсуждение описаны подробно, проиллюстрированы рисунками и таблицами, и в целом дают представление о большом объеме работы, проделанной автором. Анализ полученных автором результатов проведен достаточно подробно, с привлечением необходимых ссылок на литературу. Завершается изложение результатов исследования и их обсуждения Заключение, кратко подводящим итог проделанной работе.

На основе полученных результатов автор формулирует 6 выводов, сжато, но с достаточной полнотой отображающих результаты исследования.

Автореферат диссертации адекватно отражает материал, представленный в самой диссертации.

Основные замечания и вопросы по сути работы

Экспериментальный материал диссертации основан на использовании препаратов $\alpha 1$ -субъединицы Na,K-АТРазы, полученных из нескольких животных источников (в основном из солевых желез утки). Для подтверждения физиологической значимости полученных данных автор использовал клеточную модель (рисунок 22). Чем обусловлен выбор клеточной модели? Насколько она уникальна или типична для характеристики наблюдаемого феномена? Какие антитела использовались для типирования фермента из

солевых желез утки и мышинных эмбриональных клеток? Было ли это пан-специфическое (для обоих видов) антитело или они различались?

Как проводилась нормировка степени глутатионилирования при ее 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 было указать в начале подписи.

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

В целом диссертационная работа Е.А.Дергоусовой на тему «Влияние глутатионилирования α 1-субъединицы Na,K-АТФазы на свойства фермента», по актуальности цели и задач проведенного исследования, научной и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» №842, утвержденного правительством РФ 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Ведущий научный сотрудник Лаборатории ангиогенеза
Института экспериментальной кардиологии
Федерального государственного бюджетного учреждения
«Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии
Минздрава России

Доктор биологических наук
(03.00.04 – биохимия)

Меньшиков Михаил Юрьевич

ФГБУ НМИЦ кардиологии МЗ РФ

121552, г. Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15А

Тел. 8-(495)-414-67-13

Е-mail: myumensh@mail.ru

28 сентября 2018 г.

Подпись М.Ю.Меньшикова заверяю

Ученый секретарь ИЭК ФГБУ НМИЦ кардиологии Минздрава РФ

Доктор медицинских наук



О.С.Плеханова