

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Елены Александровны Дергоусовой** «Влияние глутатионилирования  $\alpha$ 1-субъединицы Na, K-АТРаза на свойства фермента», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Na,K-АТРаза является одним из полифункциональных белков клетки. Исследования этого фермента проводятся уже много лет, однако далеко не все его свойства в полной мере изучены. Сравнительно недавно было установлено, что помимо выполнения роли ионного насоса Na,K-АТРаза может выступать в качестве рецептора кардиотонических стероидов и запускать ряд сигнальных каскадов клетки.

Na,K-АТРаза может модифицироваться по некоторым из своих аминокислотных остаткам, в частности, по SH-группам цистеиновых остатков, которые могут нитрозилироваться, окисляться или глутатионилироваться. Глутатионилирование – это модификация цистеиновой группы трипептидом глутатионом, который содержится в клетках в высоких концентрациях (до 10 мМ в зависимости от компартмента) и является важной частью антиоксидантной системы. Несмотря на значимость этой модификации и её широкое распространение среди белков, глутатионилирование начали более глубоко изучать сравнительно недавно. Таким образом, диссертационная работа Дергоусовой Е.А. нова и актуальна. Учитывая участие глутатиона в антиоксидантной системе, более глубокое понимание влияния глутатионилирования на свойства белков в целом и на Na,K-АТРаза в частности может в дальнейшем помочь в разработке новых лекарственных препаратов для лечения заболеваний, возникающих как следствие нарушения редокс-баланса в организме.

В своей работе Дергоусова Е.А. анализировала влияние степени глутатионилирования каталитической субъединицы Na,K-АТРаза на такие свойства фермента, как активность, устойчивость к трипсинолизу и связывание с лигандами и белками-партнёрами. Для этого автором были получены препараты Na,K-АТРаза, имеющие разную степень глутатионилирования, путём инкубации фермента либо с восстанавливающими агентами, либо с окисленным глутатионом. Свойства полученных препаратов были проанализированы при помощи таких биохимических методов, как определение активности по неорганическому фосфату, иммуноблоттинг (Вестерн-блот), электрофоретическое разделение белков, изотермическая калориметрия титрования.

Пожалуй, наиболее интересным наблюдением оказалась невозможность полного деглутатионилирования фермента даже в денатурирующих условиях. Кроме того, в работе было показано, что глутатионилирование некоторых цистеиновых остатков, располагающихся вблизи активного центра каталитической субъединицы, способно

ингибировать активность Na,K-АТФазы, в то время как модификация других влияет на стабильность белка, в частности, на его устойчивость к трипсинолизу. В ходе работы не было обнаружено существенного различия в связывании фермента, имеющего разную степень глутатионилирования, с кардиотоническим стероидом убаином и белком-партнёром Hsp70, что может свидетельствовать об отсутствии модифицируемых цистеиновых остатков вблизи областей связывания каталитической субъединицы Na,K-АТФазы с этими соединениями.

По результатам работы можно задать 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?

Несмотря на высказанные вопросы и замечания диссертационная работа Е.А. Дергоусовой выполнена на современном научном уровне и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук (пункт 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а автор диссертации заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Ракитина Татьяна Владимировна  
к.х.н. по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия  
Начальник лаборатории «Белковая фабрика» Курчатовского Комплекса  
НБИКС-природоподобных технологий,  
НИЦ «Курчатовский Институт»  
e-mail: rakitina\_tv@nrcki.ru  
Телефон: 8-(499)-196-71-00(31-17)

01.10.18

Подпись сотрудника НИЦ «Курчатовский институт» Ракитиной Т.В. заверяю

Главный учёный секретарь  
НИЦ «Курчатовский институт» К.Ф.М.В.

С.Ю. Стремоухов

Адрес:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»)

123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

Телефон: +7 (499) 196-95-39

e-mail: nrcki@nrcki.ru

