

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Рысева Н.А. «Механизмы нарушения работы актомиозинового мотора в мышечном волокне мутациями тропомиозина», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность и новизна диссертационного исследования.

Тропомиозин – это мышечный белок, который был открыт знаменитым английским учёным Бейли ещё в 1946 году и который впоследствии оказался необходимым элементом структуры актиновых нитей, как в мышцах, так и в немышечных клетках. Более 30 лет назад для объяснения механизма кальциевой регуляции сократительной активности мышц была предложена гипотеза «стерического блокирования», согласно которой тропомиозин играет одну из главных ролей в регуляции мышечного сокращения. С тех пор представления о регуляции сокращения претерпели значительные уточнения и изменения, но тропомиозин по-прежнему находится в центре событий, происходящих с регуляторными белками миофибрилл в мышечном волокне при изменении концентрации кальция. По современным представлениям, при низкой концентрации кальция (10^{-7} М) тропомиозин занимает блокирующую позицию на периферии тонкой нити и закрывает участки на мономерах Ф-актина, с которыми моторный домен миозина может связываться, образуя «сильные» формы связывания (в отсутствие АТФ) и «слабые» (в присутствии АТФ и продуктов его гидролиза АДФ и неорганического фосфата). Когда моторный домен миозина смещает тропомиозин к внутреннему домену мономера актина в Ф-актине, на Ф-актине открываются участки связывания с миозином и могут образовываться «сильные» формы связывания, необходимые для генерации силы.

Согласно данным изучения подвижности актиновых нитей *in vitro*, именно конформационная подвижность тропомиозина в составе актиновых нитей является фактором, определяющим способность нитей Ф-актина перемещаться по головкам миозиновых молекул в присутствии АТФ.

В связи с вышеизложенным, работа Н.А. Рысева, посвящённая механизмам нарушения регуляции взаимодействия миозина с актином при точечных мутациях в генах тропомиозина, представляется исключительно актуальным исследованием. Его актуальность определяется ещё и тем, что такие мутации в тропомиозиновых генах обнаружены при наследственных заболеваниях человека, таких как гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатии, немалиновая миопатия и дистальный артрогрипоз. При этом молекулярные механизмы нарушения сократительной функции при мутациях в тропомиозиновых генах изучены недостаточно.

В то же время, в Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии РАН (зав. Ю.С. Боровиков) в течение многих лет используется оригинальный метод поляризационной микрофлуориметрии, позволяющий получать совершенно новую информацию о структурных перестройках, которые происходят в актиновых филаментах «теневого» мышечного волокна при взаимодействии миозина с актином и белками, регулирующими это взаимодействие. И не случайно, что именно этот

метод позволил диссертанту получить новую, уникальную информацию о молекулярных механизмах влияния вызванных мутациями в генах тропомиозина аминокислотных замен в белке на уровне элементарной модели мышечного сокращения – взаимодействия моторного домена миозина, Ф-актина и АТФ.

Действительно, в представленной диссертационной работе показано, что каждому положению тропомиозина на поверхности актиновой нити (α -ТМ скелетных мышц; β -ТМ гладких мышц) соответствует определённое состояние актомиозиновой системы, характеризующееся определённой подвижностью и позицией моторного домена, актинового мономера в нити Ф-актина (и его субдомена 1).

Впервые показано, что точечные мутации, приводящие к одиночным аминокислотным заменам в тропомиозине, вызывают аномальные движения тропомиозина и изменяют характер конформационных изменений моторного домена миозина и нитей актина в цикле гидролиза АТФ. Более конкретно, замены Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном тропомиозине, связанные с гипертрофической кардиомиопатией, и замена Arg91Gly в β -тропомиозине скелетных мышц, связанная с дистальным артрогрипозом, приводят к смещению тропомиозина к центру актиновой нити и активируют образование сильной формы связывания головки миозина с Ф-актином при моделировании большинства стадий цикла гидролиза АТФ, что может вызывать гиперсократимость мышечного волокна.

Диссертант также обнаружил, что замена Glu41Lys в β -тропомиозине скелетных мышц, связанная с немалиновой миопатией, фиксирует тропомиозин в положении, близком к периферии актиновой нити независимо от стадии гидролиза АТФ. Такое расположение тропомиозина вызывает ингибирование образования сильной формы связывания головок миозина с актином при связывании головкой АДФ, и активирует образование сильной формы связывания в условиях, моделирующих слабую форму связывания. Отмеченные нарушения в работе актомиозина могут быть причиной ослабления сократительной функции мышечного волокна.

Таким образом, Н.А. Рысев в своей работе впервые показал, что определённые замены аминокислот в тропомиозине, вызванные мутациями в генах сердечного, скелетного и гладкомышечного тропомиозина, влияют на структурное состояние актина и миозина в элементарном акте мышечного сокращения и могут быть причиной нарушений в функционировании мышц при их наследственных заболеваниях.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа Н.А. Рысева, изложенная на 142 страницах, построена традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения (60 стр.), выводов и списка литературы, состоящего из 259 источников цитирования. Работа содержит 22 рисунка и 10 таблиц.

В обзоре литературы (34 стр.) подробно рассмотрены вопросы, касающиеся структуры и функции основных сократительных белков миозина и актина, а также тропомиозина и в отдельной главе – области их первичной структуры, участвующие во

взаимодействии этих белков, представляющие необходимую информацию для анализа полученных в диссертационной работе результатов. Значительная часть обзора литературы посвящена мутациям генов тропомиозина, связанным с наследственными заболеваниями мышечной ткани человека.

В главе «Материалы и методы» (10 стр.) представлено описание препаративных и аналитических методов биохимии и клеточной биологии, позволяющих получить рекомбинантные α - и β -тропомиозины и реконструировать сократительную и регуляторную системы в теневом мышечном волокне, чтобы иметь возможность применить для изучения молекулярных перестроек в белках метод поляризационной микрофлуориметрии.

Глава «Результаты и обсуждение» (60 стр.) состоит из трёх разделов. В первом разделе было изучено влияние замены Gly126Arg в α -скелетном и β -гладкомышечном тропомиозине на структурное состояние актина и тропомиозина в теневом мышечном волокне при моделировании цикла гидролиза АТФ. Во втором рассмотрено влияние замен Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном α -тропомиозине, связанных с кардиомиопатией, на структурное состояние актина, тропомиозина и головки миозина при моделировании различных стадий гидролиза АТФ. В третьем аналогичное исследование представлено для β -скелетного тропомиозина с заменами Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del, вызывающими, соответственно, немалиновую миопатию, дистальный артрогрипоз и «кэп»-миопатию.

Анализ данных по изменению углов между диполями излучения флуоресцентных зондов, введённых в тропомиозин, субфрагмент 1, С-концевой домен актина, и осью актиновой нити позволил диссертанту прийти к заключению о том, что точечные мутации Glu180Gly и Asp175Asn в α -тропомиозине сердечных мышц, Glu41Lys, Arg91Gly и Glu139del в β -тропомиозине скелетных мышц и Gly126Arg в α -тропомиозине скелетных мышц и β -тропомиозине гладких мышц изменяют характер движения тропомиозина в цикле гидролиза АТФ, что нарушает согласованность конформационных изменений в актине, и моторном домене миозиновой молекулы. Конкретные показатели этого рассогласования сформулированы в 6 выводах диссертационной работы, которые вполне соответствуют представленным экспериментальным данным. В каждом из разделов экспериментальной части автор проводит сравнение полученных результатов с известными из литературы данными, что убедительно демонстрирует достижения диссертанта и его умение интерпретировать полученные данные.

Тем не менее, хотелось бы попросить диссертанта прокомментировать вывод 4 относительно замены Glu41Lys в β -тропомиозине и показать, существует ли соответствие между изменениями, обнаруженными на молекулярном уровне и изменениями в физиологии и морфологии мышечного волокна при соответствующей мутации β -тропомиозина. Как известно, при немалиновой миопатии мутации обнаруживаются также в гене актина. Может быть немалиновая миопатия связана с мутациями в генах нескольких мышечных белков?

Выводы работы вполне обоснованы и вполне соответствуют представленным результатам, достоверность которых не вызывает сомнений. Результаты работы полностью отражены в автореферате.

Материалы диссертации изложены в 5 статьях в рецензируемых журналах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа **Рысева Никиты Александровича «Механизмы нарушения работы актомиозинового мотора в мышечном волокне мутациями тропомиозина»** содержит новые приоритетные данные фундаментального плана, касающиеся молекулярных механизмов нарушения регуляции мышечного сокращения при точечных мутациях тропомиозиновых генов. Диссертация представляет собой законченное научное исследование, выполненное на высоком современном методическом уровне. Диссертация решает актуальные задачи общепроизводственной значимости и по своей новизне, научной ценности, возможному применению в медицине, объёму выполненных исследований и достоверности полученных результатов полностью соответствует основным квалификационным критериям «Положения о присуждении учёных степеней» от 24 сентября 2013 г. №842, а её автор, Рысев Никита Александрович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

Профессор кафедры биохимии
Санкт-Петербургского государственного
университета,
доктор биологических наук
по специальности
03.01.04 – «биохимия»



Надежда Владимировна Кулёва

«29» декабря 2015 г.

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, www.spbu.ru
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
Кафедра биохимии биологического факультета СПбГУ
199004, Средний пр. В.О., д. 41,
тел. (812)328-21-82
e-mail: nadezhda.kuleva@gmail.com

Подпись руки Н.В. Кулевой
Удостоверено
Зам. пр. Управления



Корреспондент
12.01.2016.

Сведения об официальном оппоненте
по диссертационной работе Рысева Никиты Александровича
«Механизмы нарушения работы актомиозинового мотора в мышечном волокне
мутациями тропомиозина»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Надежда Владимировна Кулева – доктор биологических наук по специальности 03.01.04 - «Биохимия», профессор кафедры биохимии Санкт-Петербургского государственного университета, г. Санкт-Петербург.

Н.В. Кулева – высококвалифицированный специалист в области биохимии и биофизики мышечного сокращения, молекулярных механизмов функционирования моторных белков мышечных и немышечных клеток. Докторская диссертация на эту тему защищена в 2000 г. Читает курс лекций для студентов кафедры биохимии «Молекулярные основы подвижности», «Протеомный подход в экотоксикологии». Научные интересы Н.В. Кулевой в настоящее время лежат в области влияния факторов окружающей среды на функционирование актина и применения методов протеомики для исследования этих вопросов. Н.В. Кулева является автором более 20 научных публикаций, проиндексированных в базе данных Scopus.

Звание, должность, основное место работы	Доцент по специальности, профессор кафедры биохимии Санкт-Петербургского государственного университета
Ученая степень	Доктор биологических наук
Отрасль наук	Биологические науки
Научная специальность, по которой защищена диссертация	03.01.04 - «Биохимия» 03.01.02 – «Биофизика»
Список основных публикаций за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	Кулева Н.В. Красовская И.Е. Роль гемосодержащих глобинов в NO-сигнализации в клетках позвоночных при гипоксии. Цитология. 2015. Т.57, №8, 563-571 Кулева Н.В., Красовская И.Е., Шумилова Т.Е. Влияние малых доз экзогенного нитрита на окислительные модификации водорастворимых белков сердечной и скелетной мышц крыс. Биофизика. 2014. Т.59, №5: 848-853 (N.V. Kuleva, I.E. Krasovskaya, T.E. Shumiliva. The influence of small doses of exogenic nitrite on oxidative modifications of water-soluble proteins of rat cardiac and skeletal muscle. Biophysics. 59 (5): 689-693) Fedorova M, Kuleva N., Hoffmann R. Identification of cysteine, methionine and tryptophan residues of actin oxidized in vivo during oxidative stress. J Proteome Res. 2010. 9(3): 1598-609.

	Fedorova M., Todorovsky T., Kuleva N., Hoffmann R. Quantitative evaluation of tryptophan oxidation in actin and troponin I from skeletal muscles using a rat model of acute oxidative stress. Proteomics. 2010; 10(14): 2692-700
--	--

Согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых на основании нормативных документов Правительства, Минобрнауки и ВАК, на размещение их, в том числе, в сети Интернет на сайте ФГБУН ИНЦ РАН, на сайтах ВАК, в единой информационной системе.

Профессор кафедры биохимии
Санкт-Петербургского государственного
Университета
по специальности
03.01.04 - «Биохимия»

Надежда Владимировна Кулева

29 декабря 2015 г.

Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9,
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»
Кафедра биохимии биологического факультета СПбГУ
199004, Средний пр. В.О., д. 41,
тел. (812)328-21-82
сайт: www.spbu.ru
e-mail: nadezhda.kuleva@gmail.com

Ис. № 14.01.2016

Специальность по биохимии

М.В. Кулева