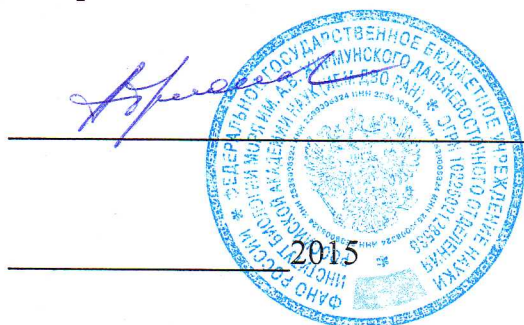




«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
биологии моря им. А.В. Жирмунского
Дальневосточного отделения
Российской
академии наук академик
А.В. Адрианов



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Рысева Никиты Александровича «Механизмы нарушения работы актомиозинового мотора в мышечном волокне мутациями тропомиозина», представленную к защите в Диссертационный совет по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 002.230.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - «Клеточная биология, цитология, гистология».

Общая характеристика работы. Диссертация, изложенная на 142 страницах, имеет стандартную структуру и содержит следующие разделы: введение – 7 стр., обзор литературы – 34 стр., методы исследования – 10 стр., результаты и обсуждение – 60 стр., а также выводы. Результаты представлены на 22 рисунках и в 10 таблицах. Список цитированной литературы включает 259

источников. Название работы, вынесенное на титульную страницу, полностью отражает тему и содержание исследования.

В разделе **«Введение»** Н.А. Рысев вводит читателя в проблему, изучению которой посвящена диссертационная работа, характеризует актуальность и цель работы, формулирует конкретные задачи исследования.

В разделе **«Обзор литературы»** суммированы данные об основных белках, обеспечивающих сократимость мышц, областях взаимодействия этих белков между собой и мутациях в генах мышечного тропомиозина, приводящих к патологиям. Этот раздел работы подводит читателя к необходимости предпринятого исследования, свидетельствует о глубокой теоретической подготовке диссертанта и значительно облегчает восприятие экспериментального материала диссертации.

Раздел **«Методы исследования»** содержит подробное описание основного метода в данной работе, редко используемого в нашей стране – поляризационной микрофлуориметрии. Все другие вспомогательные методы вполне адекватны поставленным задачам.

Целью данной диссертационной работы являлось изучении механизма нарушений регуляции тропомиозином взаимодействия актина и миозина, вызванных точечными мутациями в генах TPM1 и TPM2 тропомиозина человека. При этом были поставлены следующие конкретные задачи: Исследовать конформационные перестройки, происходящие в F-актине, субфрагменте 1 миозина, α -тропомиозине сердечных мышц и β -тропомиозинах скелетных и гладких мышц, при моделировании ряда последовательных стадий цикла гидролиза АТФ в мышечном волокне. Изучить влияние точечных мутаций Glu180Gly или Asp175Asn α -тропомиозина, ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией, на изменение позиции тропомиозина и на конформационные изменения актина и субфрагмента 1 миозина, происходящие в мышечном волокне в цикле гидролиза АТФ. Исследовать характер движения β -тропомиозина скелетных мышц с мутациями Arg91Gly или Glu139del, которые вызывают дистальный артрогрипоз и «кэп»-миопатию, и β -тропомиозина скелетных мышц с мутацией Glu41Lys, которая ассоциирована с немалиновой миопатией, на конформационные изменения актина и

субфрагмента 1 миозина в АТФазном цикле. Изучить влияние точечной мутации Gly126Arg, вызывающей стабилизацию структуры центральной области α -тропомиозина скелетных и β -тропомиозина гладких мышц, на движение тропомиозина и конформационные изменения актина в цикле гидролиза АТФ.

Актуальность диссертационного исследования

Выяснение молекулярных механизмов мышечного сокращения является одной из фундаментальных проблем клеточной биологии. Мышечное сокращение есть результат циклических взаимодействий миозиновых мостиков с актином, которые регулируются тропомиозином и кальций-чувствительным белком тропонином. Согласно стерической гипотезе регуляции считается, что при низкой концентрации ионов Ca^{2+} тропомиозин занимает блокирующую позицию на периферии тонкой нити, закрывая те участки актина, с которыми миозин способен взаимодействовать.

Нарушение этого взаимодействия точечными мутациями мышечных белков приводит к структурным и функциональным нарушениям в мышечной клетке. Так, в генах тропомиозина идентифицировано значительное количество мутаций, вызывающих такие наследственные заболевания, как гипертрофическая и дилатационная кардиомиопатии, немалиновая миопатия, «кэп»миопатия, и дистальный артрогрипоз. Молекулярные механизмы нарушения регуляции сократительной функции мутациями в тропомиозине при этих заболеваниях изучены недостаточно.

Новизна исследования и полученных результатов

Полученные в данной работе новые данные о влиянии точечных мутаций в тропомиозине на его регуляторную функцию позволяют понять какие конформационные перестройки сократительных белков могут лежать в основе различных наследственных заболеваний мышечной ткани человека.

Впервые показано для α -тропомиозина сердечных мышц человека и подтверждено для β -тропомиозина скелетных и гладких мышц человека, что в АТФазном цикле каждому положению тропомиозина на поверхности актиновой нити соответствует определенное структурное состояние актомиозиновой системы.

Впервые показано, что точечные мутации тропомиозина, связанные с миопатиями человека, приводят к тому, что движения тропомиозина становятся аномальными и изменяется характер конформационных изменений миозина и актина в цикле гидролиза АТФ.

Обнаружено, что мутации Glu180Gly и Asp175Asn в сердечном α -тропомиозине, и мутация Arg91Gly в β -тропомиозине скелетных мышц приводят к смещению тропомиозина к центру актиновой нити, что может вызывать гиперсократимость мышечного волокна.

Установлено, что замена Glu139del, связанная с «кэп»-миопатией, приводит к смещению тропомиозина к центру актиновой нити, что уменьшает относительное количества миозиновых мостиков на всех стадиях цикла гидролиза АТФ.

Показано, что мутация Glu41Lys в β -тропомиозине скелетных мышц, ассоциированная с немалиновой миопатией, фиксирует тропомиозин в положении ближе к периферии актиновой нити на всех стадиях цикла гидролиза АТФ. Эти нарушения в работе актомиозина могут быть причиной ослабления сократительной функции мышечного волокна.

Обнаружено, что замена Gly126Arg в α -тропомиозине скелетных и β -тропомиозине гладких мышц, приводящая к стабилизации центральной области молекулы, вызывает смещение тропомиозина к периферии нити в большинстве стадий АТФазного цикла и существенно увеличивает кооперативность включения мономеров актина.

Значимость для науки и практики полученных результатов

Полученные результаты расширяют и углубляют представления о молекулярных механизмах регуляции клеточной подвижности. Кроме того, на основании этих результатов могут быть разработаны тесты для диагностики заболеваний мышц человека и развиты подходы к лечению различных патологий сердечной и скелетной мышечной тканей. Полученные в работе результаты могут также быть использованы при чтении лекций и написании методических пособий при обучении студентов биологических специальностей профильных вузов.

Обоснованность и достоверность научных выводов и заключений

Достоверность результатов не вызывает сомнений. Обсуждение полученных результатов диссертант рассматривает в свете известных литературных данных. Сделано это достаточно корректно. Выводы, сделанные Рысевым Никитой Александровичем, соответствуют поставленной цели и задачам, и сделаны строго в соответствии с полученными результатами.

Заключение

Аннотация диссертационной работы Н.А. Рысева соответствует содержанию диссертации, а опубликованные статьи в достаточной степени отражают содержание диссертационной работы. Диссертационная работа является законченным и оригинальным исследованием, соответствующим указанной научной специальности.

Полученные результаты представляют большой интерес для понимания механизмов патогенеза миопатий, связанных с мутациями генов тропомиозина. Результаты работы достоверны, опубликованы в пяти рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ и были представлены на девяти международных и российских конференциях. Диссертация оформлена в соответствии с действующими правилами ВАК. Компьютерная печать четкая, текст хорошо выверен. Ссылки на оригинальные исследования приведены по существу.

Однако имеется несколько замечаний по оформлению работы. Следует отметить, что стиль изложения не вполне свободен от недостатков. Имеются неудачные выражения, встречается калька с английского. Высказанные замечания не носят принципиального характера и не снижают значимость диссертационной работы Н.А. Рысева.

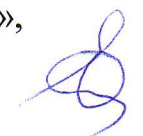
Таким образом, диссертационная работа Никиты Александровича Рысева на тему: «Механизмы нарушения работы актомиозинового мотора в мышечном волокне мутациями тропомиозина» полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» от 24 сентября 2013 года, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - «клеточная биология, цитология, гистология».

Отзыв заслушан и утвержден на заседании Объединенного семинара профильных лабораторий Института биологии моря им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, протокол № 5 от 12 декабря 2015 г.

Председатель семинара: Заведующий лабораторией биофизики клетки, доктор биологических наук по специальности 03.03.04 - «клеточная биология, цитология, гистология», Шелудько Николай Семенович



Отзыв составил: Главный научный сотрудник лаборатории эмбриологии, профессор, доктор биологических наук по специальности 03.03.04 - «клеточная биология, цитология, гистология», Дроздов Анатолий Леонидович



СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

по кандидатской диссертации Рысева Никитина Александровича **«Механизмы нарушения работы актомиозинового мотора в мышечном волокне мутациями тропомиозина»** по специальности 03.03.04

Полное наименование организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им.А.В. Жирмунского Дальневосточное отделение Российской академии наук
Сокращенное название организации	ФГБУН ИБМ ДВО РАН
Руководитель организации	Академик Андрей Владимирович Адрианов
Адрес организации	690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17
Телефон	(423) 2310905
Адрес эл.почты	inmarbio@mail.primorye.ru
Веб- сайт	http://www.imb.dvo.ru/

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ

сотрудников ведущей организации

ФГБУН ИБМ ДВО РАН, относящихся к проблеме рассматриваемой диссертации за 2011-2015 гг.

1. Shelud'ko N.S., Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Shevchenko U. V. Hybrid and non-hybrid actomyosins reconstituted with actin, myosin and tropomyosin from skeletal and catch muscles. // Biochemical and biophysical research communications. 2015. V. 464, № 2. P. 611-615.
2. Matusovsky O.S., Shevchenko U.V., Matusovskaya G.G., Sobieszek A., Dobrzanskaya A.V., Shelud'ko N.S. Catch muscle myorod modulates ATPase activity of Myosin in a phosphorylation-dependent way // PLoS ONE. 2015. Vol. 10(4). P. e0125379. doi: 10.1371/journal.pone.0125379.
3. Vyatchin I.G., Shevchenko U.V., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S. Troponin-like regulation in muscle thin filaments of the mussel *Crenomytilus grayanus* (Bivalvia: Mytiloidea) // Biochimica et Biophysica Acta: Proteins & Proteomics. // 2015. Vol. 1854(10 Pt A). P. 1444-1450.
4. Drozdov AL, Vinnikova VV. Morphology of gametes in sea urchins from Peter the Great Bay, Sea of Japan. // Ontogenez. 2010 41(1):47-57.
5. Ijpma G., Kachmar L., Matusovsky O.S., Bates J., Martin J., Lauzon A.M. Human Trachealis and Main Bronchi Smooth Muscle Are Normo-Responsive in Asthma. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. // 2015. Vol. 191(8). P. 884-893.
6. Anakina RP, Drozdov A.L. Characteristics of oogenesis in the Barents sea sponge *Leucosolenia complicata*. // Tsitologiya 2000; 42(2), P.128-35.
7. Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S., Permyakova T.V., Zukowska M., Sobieszek A. Catch muscle of bivalve molluscs contains myosin- and twitchin-associated protein kinase phosphorylating myorod // Biochim Biophys Acta (Protein and Proteomics). 2010. Vol. 1804. № 4. P. 884-890.
8. Matusovsky, O. S., Matusovskaya, G. G., Dyachuk, V. A., Shelud'ko, N. S. Molluscan catch muscle myorod and its N-terminal peptide bind to F-actin and myosin in a phosphorylation-dependent manner. // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2011. Vol. 509. P. 59-65.

9. Dobrzhanskaya A.V., Vyatchin I.G., Lazarev S.S., Matusovsky O.S., Shelud'ko N.S. Molluscan smooth catch muscle contains calponin but not caldesmon. // Journal Muscle Research and Cell Motility 2013. V. 34, № 1. P. 23-33.

10. Drozdov A.L, Karpenko A.A. Triboluminescence of spicules of hexactinellid sponges. // Dokl Biol Sci. 2010. V. 434, 325-327.

Ученый секретарь ФГБУН ИБМ ДВО РАН кандидат биологических наук
Жуков Владимир Евгеньевич



15.12.15