

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу 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

Актуальность и общая характеристика работы

Диссертационная работа Рысева Н.А. посвящена выяснению молекулярного механизма нарушения цикла работы актомиозинового мотора поперечнополосатых мышц вследствие природных мутаций в тропомиозине, ассоциированных с миопатиями и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Актуальность такого исследования определяется тем, что патологические изменения сократительной активности миокарда и скелетных мышц прямо связаны с нарушениями структуры мышечных волокон и их функции на уровне актин-миозинового мотора. В настоящее время эти исследования активно ведутся в мировой науке и уже достигнут значительный прогресс в понимании нарушений, связанных с мутациями в актине и миозине, а также в белках, регулирующих их взаимодействие и активность. Есть понимание, что мутации в тропомиозине имеют большое значение, однако, связанные с ними нарушения изучены явно недостаточно. Поэтому данная работа актуальна не только с фундаментальной, но и с биомедицинской точки зрения и может рассматриваться как важный этап трансляционных исследований.

Стандартные методы исследования, такие как реконструкция актомиозина и анализ его активности *in vitro* не всегда дают полную картину, а структурные исследования требуют дорогостоящих аппаратных средств и пробоподготовки. Однако такой метод как поляризационная флуориметрия находится на стыке структурно-функциональных исследований. Он достаточно прост в исполнении и может быть с успехом использован для поточного анализа разных состояний актин-миозинового мотора. Учитывая богатый опыт использования этого метода в лаборатории, где выполнялась данная работа, его глубокое понимание, и наличие модели работы актомиозинового

мотора, используемой для интерпретации получаемых данных, применение поляризационной флуориметрии весьма актуально и своевременно для выяснения молекулярных механизмов проявления мутаций в сократительных белках.

В работе преимущественно использован метод поляризационной микрофлуориметрии для оценки микроположения сократительных белков при моделировании отдельных фаз цикла работы актомиозинового мотора (АТФ-азного цикла) в теневых мышечных волокнах. Теневые волокна получали путем экстракции растворимых компонентов и миозина, оставляя исходную структуру закрепленных актиновых нитей. Белки интереса (актин, тропомиозин и моторная часть миозина) метили флуоресцентными зондами по определенным остаткам и вводили в теневые волокна, добиваясь их встраивания в волокно. Благодаря тому, что сократительный аппарат сохраняет упорядоченность, флуоресцентные метки ориентировались под определенным углом относительно оси волокна и флуоресцировали после возбуждения поляризованным светом. Используя поляризованный свет для возбуждения и изменяя плоскость его поляризации, а также регистрируя поляризованную флуоресценцию зондов в разных проекциях, можно было определять угол наклона и ориентацию зонда по отношению к филаменту. Разные стадии АТФ-азного цикла имитировали с помощью аналогов АТФ, которые связываются с миозином и определяют разные формы актин-миозинового взаимодействия. Определив как ориентация зондов меняется на разных стадиях АТФ-азного цикла для нормальных белков, автор исследовал те же изменения в присутствии рекомбинантных мутантов тропомиозина. Эти мутанты были экспрессированы в бактериальной системе другими исследователями и предоставлены для данной работы.

Работа имеет значительный объем и выполнена с большой тщательностью. Полученные данные оформлены по единому плану, что позволяет легко усваивать их большой объем и следить за интерпретацией. Кратко, первичные экспериментальные данные показаны в таблицах, где приведен подробный состав проб и результат статистической обработки. Далее эти данные представлены в виде диаграмм, дающих возможность их наглядного сравнения. После этого в тексте дана интерпретация

данных и, в завершении, подробное обсуждение их соответствия модели конформационных изменений белков в АТФ-азном цикле, и данным других авторов, полученных, в том числе, другими методами. Такой подход весьма информативен и показывает самодостаточность метода поляризационной флуориметрии для выполнения поставленных задач. Тем не менее хочется пожелать, чтобы в дальнейшем флуориметрические исследования дополнялись измерениями АТФ-азной активности в растворе и взаимодействия белков в составе волокон. Поскольку взаимодействие миозина с актином меняется на разных стадиях АТФ-азного цикла, этот параметр можно использовать для дополнительной оценки состояния системы. Следует отметить, что в данной работе такой подход был использован на отдельных этапах, но первичные результаты не проиллюстрированы и приведены в тексте уже в обработанном виде. Представляется, что дополнительные методы, например, предложенные выше, могут сделать результаты более самостоятельными и повысить импакт публикаций.

Структура работы

Диссертация Рысева Н.А. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, глав, посвященных описанию материалов и методов, единой главы результатов и обсуждения, и выводов и и списка цитированной литературы, содержащего 259 источников. Диссертация изложена на 142 страницах, содержит 22 рисунка и 10 таблиц.

Введение формулирует актуальность, цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, новизну и практическую значимость работы. Автор немного отступает от традиционного соответствия числа задач числу выводов, формулируя 6 положений и 6 выводов при 4-х поставленных задачах. Мне показалось, что можно было бы не разбивать по трем выводам (3, 4 и 5) результаты, полученные по задаче 3 и, может быть, не формулировать отдельно вывод 2. Хотя следует заметить, что это формальное замечание и сделанные в работе выводы четко отвечают поставленным задачам.

Обзор литературы отлично структурирован и написан. Он состоит из 5 разделов, логично посвященных актину, миозину, тропомиозину, их взаимодействию в миофибрилле и мутациям тропомиозина, которые были исследованы в работе. Представленная информация полностью отвечает теме работы и раскрывает ее. Можно лишь было бы пожелать немного более глубокого анализа данных о том, каким образом мутации именно тропомиозина могут вызывать указанные изменения морфологии мышечных волокон, и обсудить, могут ли указанные патологии являться результатом других мутаций, сочетанных с мутациями в тропомиозине.

Методы исследования описаны как рабочие протоколы, а не даны просто ссылками на публикации. Это позволяет детально понять экспериментальные подходы, но и дает почву для вопросов и обсуждений. Во-первых, в работе отмечено, что автор не получал рекомбинантные белки сам, а использовал готовые препараты, предоставленные д-ром Редвудом. Поэтому в данном случае можно было бы дать ссылку на соответствующую публикацию и не приводить подробное описание способа получения этих белков. Во-вторых, ни в этом, ни в следующем разделе не сказано, как в теньевые волокна вводили G-актин, меченный IAEDANS, и как контролировали равномерность и правильность его встраивания в волокно. В-третьих, по сравнению с другими методами, поляризационная флуориметрия описана поверхностно. Возможно, это результат ее рутинного применения в лаборатории, но у желающих этот метод воспроизвести могут возникнуть сложности. Например, длина волны возбуждения флуоресценции указана как 365+5 нм. Значит ли это +/- 5 нм и ширину щели 10 нм? Концентрация нуклеотидов в буфере инкубации волокон составляла 2,5 mM ADP, 15 mM AMPPNP, 25 mM ATPgS или 5 mM ATP. При этом концентрация фосфатного буфера составляла 6,7 mM, а MgCl₂ – 1 mM. Таким образом непонятно, были ли нуклеотиды заранее комплексованы с Mg или использовались в свободном виде, и как тогда контролировали pH среды? При описании измеряемых параметров поляризации не сказано как рассчитывается параметр N, отражающий подвижность флуорофоров. Это важно, потому что по величине N судили о жесткости содержащего зонд полимера (актина или тропомиозина).

Результаты и их обсуждение представлены очень подробно и полно. 2. Эта глава состоит из 3-х разделов, выделенных сообразно исследуемым мутациям. Каждый из разделов структурирован по общему плану, приведенному выше, и содержит свое обсуждение и заключение. Возможно, подписи к рисункам несколько лаконичны и не всегда полностью поясняют все элементы диаграмм. Например, на рис. 9 приведены гистологические окрашивания срезов мышечных волокон, полученных от пациентов с мутациями тропомиозина. Для панелей D и E сказано, что медленные волокна (темный цвет) преобладают, хотя панель E демонстрирует прямо противоположную картину. Гистологический срез на панели D подписана как "Мутация L100M в TPM3" и что автор имел этим в виду неочевидно. Аналогично обозначены и нижние панели G-J. Экспериментальные диаграммы не всегда полностью расшифрованы и не сказано, что они являются графическим отражением данных, представленных в таблицах, показанных в той же последовательности. Поэтому из самих диаграмм иногда сложно понять, что означают прочерки и каков белковый состав анализируемых препаратов, хотя это показано в таблицах.

Заключение

Диссертационная работа Н.А. Рысева является целостным и завершенным исследованием, обладающим научной новизной и практической ценностью. Результаты диссертационной работы убедительные, достоверны и заслуживают внимания кардиологов и специалистов, занимающихся миопатиями. Они имеют существенное значение для развития биологических наук и фундаментальной медицины. Выводы и заключения по работе полностью обоснованы. Автореферат полно и корректно передает содержание диссертационной работы и оформлен надлежащим образом. Принципиальные возражения по работе отсутствуют. Высказанные замечания носят дискуссионный и стилистический характер.

Результаты диссертации отражены в 18 публикациях, в том числе, в 5 статьях и 13 тезисных сообщениях. Результаты работы многократно доложены на российских и международных конференциях и симпозиумах.

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

Александр Вячеславович Воротников, кандидат биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения "Российский кардиологический научно-производственный комплекс" Министерства здравоохранения Российской Федерации и Факультета Фундаментальной Медицины Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

А.В. Воротников – высококвалифицированный специалист по внутриклеточной сигнализации, биохимии и физиологии мышечного сокращения, клеточной подвижности и регуляции метаболизма клетки. В 1990 г. защитил кандидатскую диссертацию по теме "Фосфорилирование сократительных и регуляторных белков поперечнополосатых и гладких мышц". Под его руководством защищено 9 кандидатских работ. Соавтор курсов лекций "Молекулярные моторы" и "Молекулярная эндокринология" для студентов кафедры биохимии и молекулярной медицины. Автор около 50 научных публикаций, индексируемых в международных системах цитирования.

Звание, должность, основное место работы	Доцент, ведущий научный сотрудник Института экспериментальной кардиологии ФГБУ РКНПК МЗ РФ
Ученая степень	Кандидат биологических наук
Отрасль наук	Биологические науки
Научная специальность, по которой защищена диссертация	03.01.04 - Биохимия
Основные публикации за последние 5 лет	<p>Vorotnikov AV, Tyurin-Kuzmin PA (2014) Chemotactic signaling in mesenchymal cells compared to amoeboid cells. <i>Genes & Diseases</i>, 1: 162-173.</p> <p>Ткачук ВА, Воротников АВ (2014) Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину. <i>Сахарный Диабет</i> 2/2014: 29-41,</p> <p>Puzdrova VA, Kudryashova TV, Gaynullina DK, Mochalov SV, Aalkjaer C, Nilsson H, Vorotnikov AV, Schubert R, Tarasova OS (2014) Trophic action of sympathetic nerves reduces arterial smooth muscle Ca²⁺-sensitivity during early post-natal development in rats. <i>Acta Physiol (Oxf)</i> 212 (2): 128-141.</p> <p>Tyurin-Kuzmin PA, Vorotnikov AV, Tkachuk VA (2014) Molecular Mechanisms of the Selection of Movement Direction by Mesenchymal Cells. <i>Neurosci and Behavior Physiol</i>, 45(1): 104-115.</p> <p>Kapustin A., Stepanova V., Aniol N., Cines D., Poliakov A., Yarovoi S.,</p>

Lebedeva T., Wait R., Ryzhakov G., Parfyonova Y., Gursky Y., Yanagisawa H., Minashkin M., Beabealashvilli R., Vorotnikov A., Bobik A., Tkachuk V. (2012) Fibulin-5 binds urokinase type plasminogen activator and mediates urokinase-stimulated cell migration. *Biochem. J.*, 443 (2), 491-503.

Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В. (2012) Пероксид водорода как новый вторичный посредник. *Биол. Мембраны* 29 (1-2), 1-17.

Vorotnikov A.V. (2011) Chemotaxis: movement, direction, control. *Biochemistry (Moscow)* 76 (13), 611-639.

Mishina N, Tyurin-Kuzmin P, Markvicheva K, Vorotnikov A, Tkachuk V, Laketa V, Schultz C, Lukyanov S, Belousov V. (2011) Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid. Redox Signal.* 14 (1): 1-7.

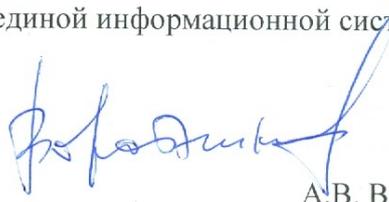
Тюрин-Кузьмин П.А., Агаронян К.М., Морозов Я.И., Мишина Н.М., Белоусов В.В., Воротников А.В. (2010) НАД(Ф)Н оксидаза регулирует EGF-зависимую пролиферацию клеток по механизму, отличному от активации ERK1/2 MAP-киназ. *Биофизика* 55 (6), 1048-1056.

Shcherbakova O., Serebryanaya D., Postnikov A., Schroeter M.M., Zittrich S., Noegel A.A., Shirinsky V., Vorotnikov A., Pfitzer G. (2010) Kinase Related Protein/telokin inhibits microcystin-induced Ca^{2+} -independent contraction in triton skinned guinea pig taenia coli. *Biochem. J.* 429 (2): 291-302

Воротников А.В., Кубасова Н.А., Цатурян А.К. (2010) Молекулярный мотор мышц. *Природа* № 12: 29-36.

Согласен 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.

Ведущий научный сотрудник
ИЭК ФГБУ РКНПК МЗ РФ
кандидат биологических наук
по специальности: 03.01.04 – Биохимия


А.В. Воротников

12 января 2016 г.

Адрес: 121552 Москва, ул. Черепковская 15а, ФГБУ РКНПК МЗ РФ, тел +7(495)414-67-13

Подпись ведущего научного сотрудника, кандидата биологических наук, А.В. Воротникова, заверяю,

Ученый секретарь Института Экспериментальной Кардиологии Российского кардиологического Научно-производственного комплекса МЗ РФ




Левашова С.А.