

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01 НА БАЗЕ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **РЫСЕВА НИКИТЫ АЛЕКСАНДРОВИЧА** НА
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 29 января 2016 № 203/382

О присуждении **РЫСЕВУ НИКИТЕ АЛЕКСАНДРОВИЧУ** (Россия)
учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация «**МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ РАБОТЫ
АКТОМИОЗИНОВОГО МОТОРА В МЫШЕЧНОМ ВОЛОКНЕ
МУТАЦИЯМИ ТРОПОМИОЗИНА**»

по специальности 03.03.04. – «Клеточная биология, цитология, гистология»

принята к защите 16.10.2015 г., протокол № 200/379^в

Диссертационным советом Д 002.230.01, созданный на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий проспект, д.4, Санкт-Петербург 194064, Россия, утверждён приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Рысев Никита Александрович, 1988 года рождения, в 2011 г. окончил Факультет медицинской физики и биоинженерии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета по направлению Прикладные математика и физика (специализация «Физико-химическая биология и биотехнология»), с присвоением степени магистра. С 04.10.2011 по 03.10.2014 гг – очная аспирантура в Институте цитологии РАН. Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.

Работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2007 года в Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности, где выполнял исследования для бакалаврской и магистерской работ. В 2008 – лаборант-исследователь. С 2009 по 2014 – старший лаборант-исследователь с в/о. С 2014 по настоящее время – младший научный сотрудник.

Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор, **БОРОВИКОВ ЮРИЙ СЕРГЕЕВИЧ**, заведующий Лабораторией молекулярных основ клеточной подвижности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии РАН, доктор биологических наук (специальность клеточная биология, цитология, гистология)

Официальные оппоненты:

1. **КУЛЁВА НАДЕЖДА ВЛАДИМИРОВНА**, доктор биологических наук, профессор Кафедры биохимии Федерального государственного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, доктор биологических наук (специальность биохимия).
 2. **ВОРОТНИКОВ АЛЕКСАНДР ВЯЧЕСЛАВОВИЧ**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории молекулярной эндокринологии Института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ, Москва, кандидат биологических наук (специальность биохимия).
- дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук в своём положительном заключении, (заключение составлено главным научным сотрудником Лаборатории эмбриологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, доктором биологических наук (специальность клеточная биология, цитология, гистология), Дроздовым Анатолием Леонидовичем и утверждено директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, академиком, Адриановым Андреем Владимировичем), указала, что диссертационная работа является законченным и оригинальным исследованием, соответствующим указанной научной специальности, полученные результаты достоверны и представляют большой интерес для понимания механизмов патогенеза миопатий, связанных с мутациями генов тропомиозина, а соискатель заслуживает присуждения искомой степени, и

– дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет **19** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации **18** публикаций, из них 5 статей опубликованы в рецензируемых научных изданиях, входящих в рекомендованный перечень ВАК.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Borovikov YS, Avrova SV, **Rysev NA**, Sirenko VV, Simonyan AO, Chernev AA, Karpicheva OE, Piers A, Redwood CS. Aberrant movement of β -tropomyosin associated with congenital myopathy causes defective response of myosin heads and actin during the ATPase cycle. Arch Biochem Biophys. 2015; 577-578: 11-23. В работе исследовано влияние аминокислотных замен E41K, R91G и делеции E139del в бета-тропомиозине (ТМ), которые вызывают наследственные миопатии, на положение тяжей ТМ и на ориентацию мономеров актина и головок миозина при моделировании различных промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в теневых мышечных волокнах без тропонина с помощью поляризационной флуориметрии. Показано, что замена R91G сдвигает тяжи ТМ к внутреннему домену актина при моделировании сильных форм связывания, а при моделировании слабых форм связывания – к внешнему. Делеция E139del смещает ТМ к внутреннему домену, в то время как замена E41K приводит к смещению его тяжей к внешнему домену актина. Замены E41K и R91G могут приводить к образованию головками миозина сильных форм связывания с актином при расположении тяжей ТМ рядом с внешним доменом актина. Делеция E139del снижает количество головок миозина, образующих сильную форму связывания с актином на всех стадиях моделируемых стадиях цикла гидролиза АТФ.

2. **Rysev NA**, Nevzorov IA, Avrova SV, Karpicheva OE, Redwood CS, Levitsky DI, Borovikov YS. Gly126Arg substitution causes anomalous behaviour of α -skeletal and β -smooth tropomyosins during the ATPase cycle. Arch Biochem Biophys. 2014; 543:57-66. В работе исследовалось влияние замены Gly126Arg в альфа- и бета- тропомиозине на гибкость молекулы тропомиозина в тонких нитях мышечного волокна и на способность мутантного тропомиозина осуществлять регуляцию актин-миозинового взаимодействия в АТФазном цикле. Показано, что мутация сдвигает тропомиозин к центру нити и усиливает формирование существенных для генерации силы поперечными мостиками сильной формы связывания миозина с актином и уменьшает гибкость тропомиозиновых тяжей.

3. Ю.С. Боровиков, О.Е. Карпичева, **Н.А. Рысев**, Ч.С. Рэдвуд. Аномальное поведение тропомиозина в АТФазном цикле при дилатационной и гипертрофической кардиомиопатии. Российский физиологический журнал

им. И.М. Сеченова. 2013; 99(1): 73-80. В работе исследовалось влияние замен Glu180Gly, Asp175Asn и Glu40Lys, Glu54Lys в сердечном тропомиозине (ТМ), связанные с гипертрофической (ГКМ) и дилатационной (ДКМ) кардиомиопатиями, на работу сократительной системы мышечного волокна. Показано, что замены, связанные с ГКМ, приводят к смещению тяжей ТМ к центру тонкой нити и увеличивают амплитуду движения и сродство этого белка к актину в АТФазном цикле. Замены, связанные с ДКМ, смещают этот белок к периферии тонкой нити, уменьшают амплитуду движения ТМ и его сродство к актину.

4. **Rysev NA**, Karpicheva OE, Redwood CS, Borovikov YS. The effect of the Asp175Asn and Glu180Gly TPM1 mutations on actin-myosin interaction during the ATPase cycle. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1824(2):366-73. В работе исследовалось влияние мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в генах альфа-тропомиозина (ТМ), связанных с гипертрофической кардиомиопатией, на актин-миозиновое взаимодействие в цикле гидролиза АТФ. Показано, что обе мутации приводят к увеличению количества головок миозина, образующих сильную форму связывания с актином.

5. Borovikov YS, **Rysev NA**, Karpicheva OE, Redwood CS. Hypertrophic cardiomyopathy-causing Asp175asn and Glu180gly Tpm1 mutations shift tropomyosin strands further towards the open position during the ATPase cycle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 407(1):197-201. В работе исследовалось влияние мутаций Glu180Gly и Asp175Asn в генах альфа-тропомиозина (ТМ) на его ориентацию и подвижность на разных стадиях цикла гидролиза АТФ. Показано, что обе мутации сдвигают тяжи ТМ в открытую позицию и меняют сродство ТМ к актину.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Заведующей кафедрой биофизики ФГБОУ ВПО СПбГУ, доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика», профессора **Крутецкой Зои Иринарховны**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

2. И.о. заведующего Лаборатории структуры и функции мышечных белков ФГБУН Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика», **Вихлянцев Иван Милентьевич**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

3. Профессора кафедры биохимии ФГБОУ ВПО МГУ им. М.В. Ломоносова, доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия», **Гусева Николая Борисовича**. Отзыв положительный, имеются вопросы.

«...Основные замечания касаются следующего. 1. Несмотря на отсутствие сомнений в достоверности полученных результатов, я бы поостерегся делать столь категоричные выводы. Во-первых, вся работа была выполнена с использованием только одного, хотя и свершено уникального метода. В работе отсутствуют данные о влиянии мутантов тропомиозина на АТФазную активность актомиозина или данные о прямом взаимодействии тропомиозина с актином (данные ультрацентрифугирования) или данные о взаимодействии тропомиозина с субфрагментом миозина. Во-вторых, вся работа проводилась при не физиологически низкой ионной силе и в отсутствие тропонина, белкового комплекса, оказывающего существенное влияние на перемещение тропомиозина по нити актина. Без этих сведений, как мне кажется, невозможно делать столь категоричные выводы и тем более экстраполировать их на различные формы мышечных патологий. 2. Мне кажется, что первый вывод не оригинален. Заключение о перемещении тропомиозина по нити актина и о роли этого перемещения в регуляции мышечного сокращения уже достаточно давно принято в литературе. 3. Мне кажется не очень понятным, почему мутация Glu139del, приводящая к смещению тропомиозина к центру актиновой нити, приводит к «выключению» мономеров актина, если в других случаях такое же перемещение тропомиозина сопровождается «включением» мономеров актина. 4. Мне кажется, что автору стоило более подробно объяснить, почему и зачем в работе использовались AMP-PNP и тем более АТФ- γ -S (рис.2). В большинстве случаев эффект AMP-PNP был аналогичен эффекту АТФ, тем не менее, на рис.7Б добавление АТФ и AMP-PNP вызывают сильно различающиеся эффекты. 5. Мне кажется не вполне оправданным вывод о том, что мутация G126R скелетного тропомиозина приводит к увеличению его жесткости. Данные поляризационной микрофлуориметрии не позволяют судить о жесткости изолированной молекулы тропомиозина, а в лучшем случае говорят о поведении тропомиозина в составе актинового филамента и могут отражать влияние мономеров актина на свойства тропомиозина, а не собственно свойства мутированного тропомиозина».

4. Ведущего научного сотрудника Лаборатории биологической подвижности ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО, доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология», **Никитиной Ларисы Валерьевны**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

5. Главного научного сотрудника Лаборатории структурной биохимии белка ФГБУН «Института биохимии им. А.Н. Баха» Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, лауреата Государственной премии СССР, заслуженного деятеля науки РФ, доктора химических наук по специальности 02.00.15 – «Кинетика и катализ

(по химическим наукам)», **Курганова Бориса Ивановича**. Отзыв положительный, без критических замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук С.Ю. Хайтлина, член Совета
2. Академик, Н.Н. Никольский, член Совета
3. Доктор физико-математических наук А.Л. Тимковский, член Совета
4. Профессор М.И. Мосевичкий, член Совета.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области биохимии и изучения механизмов актомиозинового взаимодействия для более объективной оценки полученных результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция молекулярных механизмов регуляции тропомиозином работы актомиозиновой системы в АТФазном цикле;

предложена оригинальная научная гипотеза, объясняющая механизмы мышечной дисфункции при точечных мутациях в генах тропомиозина, связанных с дилатационной, гипертрофической кардиомиопатией, немалиновой миопатией, «кэп»-миопатией и дистальным артрогрипозом.

доказана взаимосвязь между положением и гибкостью α - и β -тропомиозина на поверхности актиновой нити и структурным состоянием актиновых мономеров и головок миозина в АТФазном цикле;

введены новые представления о роли позиции тропомиозина в усилении и ослаблении сократительной функции мышц при врожденных миопатиях человека.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие современные представления о механизмах регуляции тропомиозином актин-миозинового взаимодействия;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных биохимических, биофизических и цитологических методов, включающих выделение одиночных мышечных волокон, получение теневых мышечных волокон, получение и очистка мышечных белков из мышц кролика, электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле, измерение поляризованной флуоресценции зондов, связанных с белками в мышечном волокне, а также методы математического анализа и статистической обработки данных;

изложены новые экспериментальные факты о позиции и гибкости тропомиозиновых тяжей на актиновых нитях, позиции и подвижности

моторного домена миозина, актинового мономера и его субдомена 1 при моделировании промежуточных стадий цикла гидролиза АТФ в реконструированных мышечных волокнах, не содержащих тропонин, в отсутствие и в присутствии аминокислотных замен в α - и β -изоформах тропомиозина Glu180Gly, Asp175Asn, Glu41Lys, Arg91Gly, Glu139del, связанных с врожденными миопатиями человека;

раскрыты особенности работы актомиозиновой системы в присутствии точечных мутаций в генах тропомиозина, приводящих к ослаблению и усилению сократительной функции мышц;

изучено влияние аминокислотной замены Gly126Arg в α - и β -тропомиозине, вызывающей стабилизацию структуры его центральной области, на позицию и гибкость тропомиозина и на конформационное состояние актиновых мономеров в АТФазном цикле;

проведена оценка характера и расположения точечных аминокислотных замен в тропомиозине и их влияния на сократительную функцию мышцы.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены в практику научного исследования способы получения модельных мышечных волокон, содержащих мутантные формы рекомбинантного тропомиозина;

определены перспективы возможного практического применения результатов исследования при разработке тестов для диагностики заболеваний мышц человека;

представлены новые данные, показывающие важную роль позиции тропомиозина и согласованных конформационных перестроек актомиозиновой системы в регуляции мышечного сокращения; материалы диссертации используются в курсе лекций «Биофизика мышечного сокращения», разработанном для кафедры биофизики биологического факультета Санкт-Петербургского государственного университета.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены методом поляризационной микрофлуориметрии, характеризующимся высокой точностью данных и возможностью воспроизведения, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и поставленными в работе задачами, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных;

теория о важной роли позиции тропомиозина на актиновых нитях и согласованных конформационных перестройках актина и миозина,

предложенная в диссертационной работе, построена на известных и проверенных литературных данных и современных представлениях о механизмах регуляции мышечного сокращения и согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе современных литературных данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным;

использованы современные экспериментальные подходы (измерение поляризованной флуоресценции, электрофоретическое разделение белков, получение модельных мышечных волокон) и адекватные методы статистической обработки результатов (Microsoft Excel, Sigma Plot).

Личный вклад соискателя состоит в:

непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации экспериментальных данных, полученных с помощью современных молекулярно-биологических методов. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и зарубежных научных конференциях, в подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации.

Диссертация Н.А. Рысева «Механизмы нарушения работы актомиозинового мотора в мышечном волокне мутациями тропомиозина» посвящена изучению молекулярных механизмов нарушения работы актомиозинового мотора точечными мутациями в генах тропомиозина и является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной биологии, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология.

На заседании 29 января 2016 г. Диссертационный совет принял решение присудить **РЫСЕВУ Никите Александровичу** учёную степень кандидата биологических наук по специальности «Клеточная биология, цитология, гистология» (03.03.04).

Доктор биологических наук, профессор

Кандидат биологических наук

230.01

[Signature]

«01» февраля 2016