

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Сиренко В.В.
«Регуляция актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком
мидии Грея», представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология,
гистология**

Актуальность и новизна диссертационного исследования.

Диссертационная работа В.В. Сиренко представляет собой фундаментальное исследование молекулярных механизмов регуляции сокращения гладких мышц, что является актуальной проблемой клеточной биологии. Ценная особенность этого исследования состоит в том, что в нем присутствует сравнительный аспект, касающийся поиска различий в функционировании регуляторного белка кальпониона у позвоночных и беспозвоночных животных.

Актуальность проведения такого исследования обусловлена следующими причинами. Если в гладких мышцах позвоночных основная система регуляции сокращения, связанная с регуляторными легкими цепями миозина, дополняется кальдесмоном, то у беспозвоночных (мидий) кальдесмон не обнаружен, а обнаружена регуляция тропонин-тропомиозинового типа (Вятчин и др., 2014). И, возможно, последняя участвует в осуществлении запирающей функции мышц моллюсков. Действительно, с помощью метода поляризационной микрофлуориметрии в лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии было показано, что белок мидии Грея твитчин, введенный в теневое скелетно-мышечное волокно, ингибирует переход миозинового мостика из слабосвязанной с актиновой нитью формы в сильносвязанную, и при этом «замораживает» тропомиозин в блокирующей связывание с головкой миозина позиции на поверхности этих нитей (Avrova et al, 2010). И в то же время в мышцах мидии Грея в составе тонких нитей обнаружен в большом количестве актин-связывающий белок с м.м. 40 кДа, гомологичный гладкомышечному кальпониону. Поэтому, кажется, вполне актуальным и логичным провести подобное исследование влияния кальпониноподобного белка мидии Грея методом поляризационной микрофлуориметрии на применяемой в лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности модельной скелетно-мышечной системе.

В связи с вышеизложенным перед диссертантом стояли следующие задачи:

1. Определить влияние кальпониноподобного белка мидии Грея (Cap) на конформационные изменения головки миозина (C1) в условиях слабого и сильного связывания с актиновыми нитями.
2. Сравнить конформационные изменения, происходящие в актиновых нитях в цикле гидролиза АТФ в отсутствие и в присутствии Cap.
3. Охарактеризовать влияние Cap на АТФазную активность актомиозина в растворе.

В ходе выполнения диссертационной работы В.В. Сиренко удалось показать, что Cap, связываясь с актиновой нитью скелетных мышц, располагается вдоль нее и имеет один класс сайтов связывания с актином. Максимально связывается 1 молекула Cap на 5 мономеров актина.

Кальпониноподобный белок вызывает конформационные изменения в Ф-актине, сопровождающиеся изменением количества «включенных» мономеров актина при прохождении цикла гидролиза АТФ, что способствует ингибированию гидролиза.

Приоритетным является вывод диссертанта о том, что Cap переводит головку миозина из состояния, характерного для сильной формы связывания с актином, в состояние слабого взаимодействия, что служит основной причиной ингибирования актомиозиновой АТФазы. Этот механизм ингибирования отличает кальпониноподобный белок моллюсков (мидий) от кальпонины h1 позвоночных животных, который замедляет изомеризацию головки миозина в цикле актомиозиновой АТФазы. Автор полагает, что существенное различие в механизмах ингибирования актомиозиновой АТФазы связано с отсутствием последовательности VKYAEK в полипептидной цепи Cap.

Сравнение Cap с кальпонином h1 по влиянию на поведение связанных с актином и S1 флуоресцентных зондов в условиях моделирования АТФазного цикла также выявило различия между ними, хотя оба белка снижают подвижность С-конца аминокислотной последовательности актина и увеличивают мобильность SH₁-группы головки миозина.

Общая характеристика работы.

Диссертационная работа В.В. Сиренко, изложенная на 174 стр., построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, состоящего из 347 источников цитирования. Работа содержит 23 рисунка и 4 таблицы.

В обзоре литературы подробно рассматриваются основные белки, обеспечивающие сократимость гладких мышц (27 стр.), разные варианты регуляции сокращения гладких мышц (23 стр.), механизмы ингибирования АТФазной активности в мышцах (9 стр.) и

кальпониноподобные белки, собственно предмет изучения данной работы. Обзор включает самые современные данные, очень хорошо оформлен, иллюстрирован цветными рисунками и предоставляет всю информацию по изучаемым вопросам, необходимую для последующего анализа результатов и оценки роли кальпонина и кальпониноподобных белков в регуляции сокращения гладких мышц позвоночных и беспозвоночных животных.

В главе «Методы исследования» представлен широкий набор препаративных и аналитических методов, использованных автором диссертации при выполнении работы. При этом следует отметить оригинальный метод поляризационной флуоресцентной микроскопии, позволяющий получить новую (и уникальную) информацию о структурных перестройках, происходящих в актиновых филаментах теневых мышечных волокон при моделировании различных стадий взаимодействия актина с миозином в присутствии и отсутствии АТФ («слабые» и «сильные» формы связывания головки с актиновой нитью).

Результаты исследования описаны в 5 разделах. В первом разделе было исследовано влияние Са²⁺ на циклическую работу головки миозина, помеченной флуоресцентным зондом по Cys-707, в АТФазном цикле. Было показано, что Са²⁺ воздействует на «сильные» формы связывания миозина с актином («ригор» и АМ•АДФ), ослабляя связь между миозиновой головкой и актиновой нитью.

Во втором разделе были исследованы подвижность и расположение Са²⁺ на тонких нитях в условиях «сильного» и «слабого» связывания головки миозина тонкими нитями теневого мышечного волокна. На основании экспериментальных данных автор приходит к выводу, что при связывании с актиновой нитью Са²⁺ располагается вдоль нее и, возможно, конкурирует с головкой миозина за участок «сильного» связывания.

В третьем разделе исследовано влияние Са²⁺ на конформационные изменения в мономерах актина и гибкость актиновой нити. Были использованы теневые мышечные волокна, содержащие Ф-актин, помеченный флуоресцентным зондом ФИТЦ-фаллоидином, или реконструированный из G-актина, помеченного 1,5-IAEDANS по остатку Cys-374. Полученные результаты показывают, что Са²⁺ может модулировать структуру актиновых нитей, изменяя соотношение «включенных» и «выключенных» мономеров актина. При этом уменьшается амплитуда вращения субдомена 1 актина при переходе актиновой нити от «слабой» формы связывания к «сильной».

Таким образом, применение поляризационной микрофлуориметрии позволило диссертанту провести сравнение влияния Са²⁺ с кальпонином гладких мышц позвоночных и выявить отличия для Са²⁺.

В четвертом разделе были определены параметры связывания Са²⁺ с Ф-актином in

vitro. При использовании Cap, меченного флуоресцентным зондом, было показано, что существует только один класс связывающих центров для Cap на актине с константой диссоциации равной $1,8 \cdot 10^{-7} \text{M}$, что практически не отличается от гладкомышечного кальпонины позвоночных.

Характерной чертой кальпонины является ингибирование актин-активируемой Mg^{2+} -АТФазной активности миозина. В следующем разделе диссертант исследовал влияние Cap на АТФазную активность миозина скелетных мышц, чтобы сравнить с полученными ранее данными (Winder et al, 1992) по влиянию кальпонины позвоночных на АТФазную активность миозина из скелетных мышц. Диссертантом было показано, что по степени ингибирования Mg^{2+} -АТФазы различия отсутствуют. Проведенный В.В. Сиренко анализ кинетических параметров ингибирования показал, что Cap существенно увеличивает $K_{\text{АТФазы}}$, то есть ту концентрацию актина, при которой достигается 50%-ая скорость гидролиза АТФ, но в меньшей степени влияет на скорость гидролиза.

Если принять, что актин, взаимодействуя с миозином, ускоряет диссоциацию продуктов гидролиза АТФ – АДФ и неорганического фосфата – из активного центра миозиновой АТФазы, то, по-видимому, в присутствии Cap происходят такие перестройки в активном центре миозина, которые уменьшают скорость диссоциации продуктов гидролиза. Поэтому я предлагаю рассматривать Cap не как конкурентный ингибитор, а как аллостерический эффектор миозиновой АТФазы. Так как актин также является аллостерическим эффектором миозиновой АТФазы, то Cap может быть эффектором второго порядка, действующим на структуру актина. Что касается индуцируемых Cap конформационных перестроек в актине, то информация о них представлена в трех первых разделах «Результатов исследования».

В связи с недавним открытием в тонких нитях моллюска мидии Грея элементов системы тропони-тропомиозиновой регуляции мышечного сокращения (Вятчин и др., 2014), кажется перспективным применить метод поляризационной микрофлуориметрии для получения данных о взаимодействии Cap с этой системой.

В главе «Обсуждение результатов» проводится сопоставление полученных данных по кальпониноподобному белку с известными данными по кальпонины позвоночных. Этот раздел убедительно демонстрирует основные достижения диссертанта и его умение интерпретировать полученные данные.

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

Материалы диссертации изложены в 7 публикациях, в том числе в 3 статьях в

рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Диссертационная работа **Сиренко Владимира Владимировича «Регуляция актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком мидии Грея»** содержит новые, приоритетные данные фундаментального плана, касающиеся механизмов регуляции мышечного сокращения в гладких запирательных мышцах моллюсков (на примере мидии Грея) посредством актин-связывающего кальпониноподобного белка. Диссертация решает актуальные задачи общебиологической значимости и по своей новизне, научной ценности, объему выполненных исследований и достоверности полученных результатов полностью соответствует основным квалификационным критериям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор Сиренко Владимир Владимирович 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 Кулева

«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 Кулевы
Удостоверено
Зам. нач. Управления



Корешков
12.01.2016