



Министерство здравоохранения
Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное учреждение

**РОССИЙСКИЙ
КАРДИОЛОГИЧЕСКИЙ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ
КОМПЛЕКС**

ОГРН 1037739144640 ИНН 7731243467
121552, г. Москва, 3-я Черепковская ул., 15 а

Тел. 140-93-36, факс 495-414-66-99
www.cardioweb.ru cclibr@comcor.ru

Исх. № 01/06 от 13.01.16.

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор

НИИ экспериментальной кардиологии
Российского кардиологического научно-
производственного комплекса МЗ РФ

д.м.н., профессор

С.Н. Терешенко

января 2016 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации Сиренко Владимира Владимировича «Регуляция актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком мидии Грея», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - «клеточная биология, цитология, гистология»

Актуальность исследования

Проблема регуляции сокращения гладкомышечных клеток, к которым относятся и мышечные клетки моллюсков, еще далека от разрешения на уровне взаимодействия белковых молекул. Запирательные мышцы моллюсков традиционно используют в качестве модели для изучения кэтч-состояния (catch), которое аналогично лэтч-состоянию (latch) гладких мышц высших животных и характеризуется способностью мышцы застывать в сокращенном состоянии при минимальных затратах АТФ. Такое состояние не характерно ни для скелетных миоцитов, ни для кардиомиоцитов. Таким образом, понять его можно только изучая гладкомышечные объекты и составляющие их белковые компоненты. Помимо генерации фундаментальных знаний понимание молекулярных основ гладкомышечного сокращения и особого тонического состояния критически важно для кардиологии, пульмонологии и других разделов медицины, поскольку помогает раскрыть механизмы длительного патологического спазма гладкой мускулатуры коронарных сосудов, бронхов, органов пищеварительного тракта и т.д., и предложить новые молекулярные мишени для создания соответствующих лекарственных препаратов, а также в недалеком будущем использовать методы инженерии гладкомышечных белков для создания бионаноустройств на основе сократительных единиц гладких мышц. Таким образом, актуальность выполненного В.В. Сиренко диссертационного исследования не вызывает сомнений. Дополнительно, следует отметить, что

объект исследования – мидия Грея (*Crenomytilus grayanus*) – имеет практическое значение и используется в пищевой индустрии.

Новизна исследований и полученных результатов

Целью данной диссертационной работы являлось выяснение молекулярных механизмов регуляции актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком мидии *Crenomytilus grayanus*. При этом были поставлены следующие **конкретные задачи**:

- 1) определить влияние кальпониноподобного белка мидии на конформационные изменения головки миозина, происходящие в условиях слабого и сильного связывания между актином и миозином;
- 2) выявить конформационные изменения, происходящие в Ф-актине и субдомене-1 актина в цикле гидролиза АТФ под влиянием кальпониноподобного белка;
- 3) установить механизм ингибирования кальпониноподобным белком АТФазной активности головки миозина в процессе взаимодействия с актином.

Для решения поставленных задач диссертант выделил и очистил из мышечной ткани ряд белков, включая капониноподобный белок, освоил методы специфического мечения белков флуоресцентными зондами, получил глицеринизированные мышечные волокна. Для изучения реконструированных флуоресцентно мечеными белками мышечных волокон автор применил оригинальный метод поляризационной микрофлуориметрии, разработанный его научным руководителем профессором Ю.С. Боровиковым. Кроме этого в работе были использованы методы коседиментации белков, измерения АТФазной активности актомиозина, кинетического анализа взаимодействия актина и субфрагмента 1 миозина. Все использованные методы являются современными и количественными, позволяющими получать достоверные и воспроизводимые результаты.

В результате проведенной работы были получены следующие результаты, отраженные в выводах:

1. Кальпониноподобный белок, связываясь с актиновой нитью скелетных мышц, располагается вдоль нее и имеет только один класс сайтов связывания с актином (константа диссоциации $1,8 \times 10^{-7} \text{ M}$), что соответствует значению для кальпониона гладких мышц. Максимальное значение связывания $V_{\text{max}} = 4,73 \text{ нмоль/мг}$ актина соответствует стехиометрии 1: 5.
2. Кальпониноподобный белок вызывает конформационные изменения в Ф-актине, сопровождающиеся изменением количества «включенных» мономеров актина при прохождении цикла гидролиза АТФ, что также способствует ингибированию. Актиновая нить при этом становится более жесткой.

3. Кальпониноподобный белок переводит головку миозина из состояния, характерного для сильной формы связывания миозина с актином, в состояние слабого взаимодействия, что служит основной причиной ингибирования актомиозиновой АТФазы.
4. Кальпониноподобный белок вызывает максимальное ингибирование АТФазы S1 при соотношении с актином 1 к 2. При таком соотношении ингибирование достигает 80%, таким образом, он действует с такой же эффективностью, как и гладкомышечный кальпонин.
5. Расчет кинетических параметров АТФазной активности акто-S1, в условиях связанного с актином кальпониноподобного белка показал, что последний ингибирует эту активность, преимущественно увеличивая K_{ATPase} и незначительно уменьшая значение V_{max} .
6. Ингибирование АТФазной активности акто-S1 тропомиозином происходит по неконкурентному типу.

По существу проведенных исследований имеется ряд вопросов и замечаний.

1. Анализируя параметры поляризации флуоресценции кальпониноподобного белка, реконструированного в мышечное волокно, диссертант оперирует терминами «перпендикулярное и параллельное» прикрепление белка к волокну или флуоресцентной метки к белку относительно оси волокна (с. 105). На основе чего делаются такие утверждения, когда для изучаемого белка нет еще пространственной структуры атомарного разрешения?
2. Чем объясняется максимальное ингибирование АТФазы S1 при соотношении кальпониноподобного белка к актину 1 к 2, в то время как в экспериментах по связыванию с актином насыщение достигалось при молярном соотношении белков 1:5? Возможно, различной концентрацией соли в буфере в этих экспериментах - 50 мМ NaCl (рис. 20) vs 5 мМ NaCl (рис. 21). В будущем желательно провести сравнительные эксперименты при одинаковой ионной силе.
3. Аналогично, эксперименты по определению механизма ингибирования актин-миозинового взаимодействия белком Cap по значению параметров V_{max} и K_{ATPase} проводили при 5 мМ KCl (рис. 22), создавая насыщающие концентрации Cap, исходя из результатов по связыванию Cap и актина, полученных при 50 мМ NaCl (рис. 20). Насколько это корректно? Даже без этих поправок в максимальной точке по актину 27-28 мкМ насыщение по Cap и тропомиозину не воспроизводилось. В силу высказанных замечаний к результатам по определению механизма ингибирования АТФазы актомиозина белком Cap следует относиться с осторожностью.
4. Несколько удивляет выбор диссертантом метода для определения констант связывания кальпониноподобного белка мидии с актином. Вместо такого трудоемкого пути обычно

анализируют результаты электрофореза связанной и свободной фракций. Впрочем, на конечный результат это никак не влияет.

Научно-практическая значимость результатов

Научная новизна определяется фундаментальностью поставленных задач в области молекулярных основ регуляции актомиозинового взаимодействия в запирающей мышце двустворчатых моллюсков. Диссертант впервые продемонстрировал, что свойства нового кальпониноподобного белка во многом схожи со свойствами кальпонины из гладких мышц позвоночных. Это имеет важное научное значение в плане понимания общих закономерностей регуляции сокращения в различных типах гладких мышц. Практическая значимость работы обусловлена тем, что выяснение механизмов гладкомышечного сокращения имеет большое значение для разработки подходов к лечению различных патологий гладких мышц, в частности, продолжительного вазоспазма, приводящего к ишемии органов и тканей.

Оценка содержания диссертации

Диссертация, изложенная на 174 страницах, имеет стандартную структуру и содержит следующие разделы: введение – 8 стр., обзор литературы – 65 стр., методы исследования – 15 стр., результаты и обсуждение – 38 стр., а также выводы. Результаты представлены на 23 рисунках, в 4 таблицах и 2 схемах. Список цитированной литературы включает 347 источников.

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

Раздел «**Обзор литературы**» представлен 4 главами, где суммированы данные об основных белках, обеспечивающих сократимость гладких мышц, регуляции этого сокращения с помощью актин-связывающих белков и о различных механизмах ингибирования АТФазной активности в мышцах. Обзор литературы основательно иллюстрирован, написан хорошим литературным языком с привлечением большого числа существующих по этому вопросу данных, о чем свидетельствует обширный список цитированных источников. Этот раздел работы логично подводит читателя к необходимости предпринятого исследования, свидетельствует о глубокой теоретической подготовке диссертанта и значительно облегчает восприятие экспериментального материала диссертации. В то же время объем раздела «**Обзор литературы**» можно было бы сократить, удалив информацию о кальдесмоне, эксперименты с которым диссертант не проводил.

Раздел «**Методы исследования**» содержит подробное описание ряда современных биохимических методов, включающих выделение и очистку белков, определение активности АТФазы, а также цитологических манипуляций с одиночными мышечными волокнами. Кроме этого, в работе описан использованный автором чувствительный и мало где освоенный в нашей

стране биофизический метод – флуоресцентная микрофлуориметрия. Все использованные методы адекватны поставленным задачам.

Раздел «**Результаты и обсуждения**» условно можно разделить на две части. В первой части представлены данные, полученные с использованием флуоресцентной микрофлуориметрии. В этой части приводятся и обсуждаются данные, свидетельствующие о характере влияния кальпониноподобного белка на конформационные изменения, как головки миозина, так и мономеров актина в процессе их взаимодействия между собой. Во второй части работы описываются и обсуждаются кинетические характеристики актомиозинового взаимодействия в условиях *in vitro*. Здесь же, на основании анализа кинетических характеристик актомиозинового взаимодействия в присутствии кальпониноподобного белка, обосновывается вывод о его конкурентном характере ингибирования АТФазы.

Имеется несколько замечаний по оформлению работы. Следует отметить, что стиль изложения не вполне свободен от недостатков. Имеются неудачные выражения, встречается калька с английского. Звездочки в таблицах №№ 1-4 обозначают средние значения величин, разность между которыми недостоверна. Обычно маркировку делают наоборот, отмечая звездочками достоверные различия. При этом на графиках достоверность различий между столбцами не приводится. На рис. 21 по абсциссе используется довольно нестандартная размерность «Отношение молекул Саp к 14 молекулам актина».

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные в работе В.В. Сиренко знания стимулируют дальнейшее решение вопроса о молекулярном механизме кэтч-состояния, развиваемого запирающей мышцей двустворчатых моллюсков. Результаты диссертации В. В. Сиренко могут быть использованы при чтении курсов лекций по биохимии и биофизике биологической подвижности для студентов медико-биологических специальностей в университетах и медицинских вузах. Методические разработки диссертанта могут быть применены в профильных научных лабораториях для дальнейшего изучения молекулярных механизмов биологической подвижности, например, на биологическом факультете и факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, в Институте биохимии РАН, в НИИЭК РКНПК МЗ РФ, в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН и др.

Заключение

Диссертационная работа Сиренко Владимира Владимировича является законченным оригинальным исследованием. Полученные результаты представляют большой интерес для клеточной биологии и биохимии гладких мышц. Результаты диссертационной работы достоверны, опубликованы в трех ведущих отечественных научных журналах из перечня ВАК РФ, представлены на международных и российских конференциях. Обсуждение полученных

результатов диссертант рассматривает в свете известных литературных данных. Сделано это достаточно корректно. Выводы, сделанные диссертантом, соответствуют поставленной цели и задачам, и отражают полученные результаты. Диссертация оформлена в соответствии с действующими правилами ВАК. Ссылки на оригинальные исследования приведены по существу. Автореферат соответствует содержанию диссертации. Выказанные в отзыве замечания не носят принципиального характера и не снижают значимость диссертационной работы В.В. Сиренко.

Таким образом, диссертационная работа В. В. Сиренко на тему: «Регуляция актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком мидии Грея» полностью соответствует 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 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 НИИ экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ, протокол № 3 от 29 декабря.2015 г.

Руководитель лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
Российского Кардиологического
Научно-производственного Комплекса
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор биологических наук по специальностям
14.01.05 - кардиология, 03.01.04 - биохимия
профессор

В.П. Ширинский

ФГБУ РКНПК МЗ РФ
ул. 3-я Черепковская д. 15а, Москва 121552, Россия
shirinsky@cardio.ru
тел.: 8495-414-7246
29 декабря 2015 г.

Подпись д.б.н., проф. В.П. Ширинского заверяю:
Ученый секретарь НИИЭК РКНПК МЗ РФ



С.А. Левашова