

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Владимира Владимировича Сиренко на тему «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 темы диссертации

Изучение молекулярных механизмов, лежащих в основе мышечного сокращения и его регуляции, является одним из актуальных направлений современной физико-химической и клеточной биологии. Детальное исследование таких процессов на молекулярном уровне имеет не только сугубо фундаментальное значение, но и представляет собой важную практическую задачу, поскольку позволяет вырабатывать новые подходы к диагностике и профилактике целого ряда тяжелых заболеваний мышц. Любая новая информация об особенностях молекулярного механизма и регуляции мышечного сокращения представляет собой несомненную ценность, и актуальность этого направления исследований не вызывает сомнений. В связи с этим, к числу важных задач относится выяснение роли одного из актин-связывающих белков гладких мышц – кальпонины, а также кальпониноподобных белков, в процессах регуляции мышечного сокращения. К настоящему времени эта задача еще не решена, и роль этих белков в регуляции сокращения гладких мышц, основанного на взаимодействии миозина с актином, остается пока до конца неясной. Поэтому бесспорно актуальна работа В.В. Сиренко, которой проведено исследование влияния на актин-миозиновое взаимодействие кальпониноподобного белка, полученного из гладких мышц мидии Грея.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

Важной особенностью работы является то, что для решения поставленных задач в ней применен метод поляризационной микрофлуориметрии, позволяющий с высокой чувствительностью регистрировать конформационные перестройки, происходящие в главных белках мышечных волокон – актине и миозине при моделировании различных стадий их АТР-зависимого взаимодействия. Применение этого эффективного подхода в сочетании с традиционными методами позволило автору диссертации получить новые данные о той роли, которую играют кальпонин и кальпониноподобные белки в регуляции взаимодействия миозина с актином в гладких мышцах. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. На основании этих результатов автором работы было сделано 6 основных выводов, которые достаточно адекватно отражают главные достижения диссертанта. Среди главных достижений следует отметить следующее: кальпониноподобный белок, связываясь с актиновой нитью, переводит головку миозина из состояния, характерного для сильной формы связывания миозина с актином, в состояние слабого взаимодействия и, возможно, даже конкурирует с миозиновой головкой за участок ее сильного связывания на актине, что и служит, по-видимому, основной причиной обнаруженного автором ингибирования актомиозиновой АТРаза этим белком.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 347 ссылок. Работа изложена на 173 страницах и иллюстрирована 23 рисунками, 4 таблицами и 2 схемами.

В **обзоре литературы** (глава 1) подробно рассматриваются современные данные о главных мышечных белках – актине, миозине и тропомиозине, а также о регуляторных белках гладких мышц – и кальдесмоне и кальпонине; при этом особое внимание уделяется анализу имеющихся в литературе данных о роли этих белков в регуляции сокращения гладких мышц, в частности – о механизмах ингибирования этими белками АТР-зависимой активности актомиозина. Отдельный раздел обзора посвящен анализу имеющихся данных о структурно-функциональных особенностях известных к настоящему времени немногочисленных кальпониноподобных белков беспозвоночных животных (их всего 5), в том числе – белка, недавно идентифицированного в составе тонких нитей запирающей мышцы мидии Грея (*Crenomytilus grayanus*), который являлся главным объектом исследований в данной работе. В целом, обзор литературы производит хорошее впечатление. Он написан достаточно четко и логично, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант хорошо ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам.

К **недостаткам обзора литературы** я отнес бы в первую очередь его слишком большой объем (он занимает 65 страниц, т.е. более половины всей диссертации без учета списка цитированной литературы и вводной части, занимающей первые 15 страниц). На мой взгляд, некоторые части обзора пересыщены излишней информацией (основывающейся к тому же на многочисленных ранних работах 1980-х – 1990-х годов), которая вовсе не является необходимой для последующего восприятия полученных автором результатов и их обсуждения. Понятно, что автору хотелось продемонстрировать свою эрудицию в рассматриваемых вопросах, но стоило ли это делать в диссертационной работе ограниченного объема? С другой стороны, в обзоре явно не хватает специального раздела, посвященного применению метода поляризационной микрофлуориметрии для изучения тех структурных перестроек, которые происходят в белках мышечных волокон в процессе мышечного сокращения. В некоторых местах обзора приводятся данные, полученные этим методом; следовало, однако, более подробно описать особенности, возможности и преимущества этого совсем не тривиального метода, при помощи которого была получена основная часть представленных в работе результатов.

К общим замечаниям по обзору литературы следует отнести следующее. При рассмотрении принципов регуляции ионами кальция актин-миозинового взаимодействия в гладких мышцах следовало все-таки более четко указать, что ключевую роль в такой регуляции запуска сокращения гладких мышц играет фосфорилирование легких цепей миозина, а не кальдесмон и кальпонин, способные регулировать (скорее – модулировать) некоторые параметры взаимодействия миозина с актином.

Имеется еще ряд небольших замечаний по поводу ряда стилистических погрешностей в обзоре литературы. Некоторые из них касаются не совсем корректных

переводов фамилий авторов – "Рэйман" (Rayment) (стр. 25), "Холмс" (Holmes) (стр. 64) и др. На стр. 27 написано: "Конец SH1-спирали формирует «рукоятку» рычага." Здесь не совсем корректно переведен термин "lever arm", не имеющий, пожалуй, точного русского перевода. Речь здесь идет, скорее всего, о регуляторном домене миозиновой головки, который действительно выполняет функцию "рычага", поворачивающегося в результате глобальных конформационных перестроек в моторном домене. Кстати, и сама эта фраза некорректна, поскольку SH1-спираль – это часть моторного (а не регуляторного) домена головки, не входящая в состав "lever arm". На стр. 69 фразу: "Механизм ингибирования актином активируемой миозиновой АТФазы с участием кальдесмона был изучен *in vitro* в деталях" можно понимать так, что актин ингибирует миозиновую АТФазу, что полностью лишено смысла. В действительности, здесь имеется в виду актин-активируемая миозиновая АТФаза. Не слишком корректной представляется и фраза в начале введения (на стр. 6): "Сильносвязанное состояние между миозиновой головкой и мономерами актина существует в отсутствие адениновых нуклеотидов". Это не так, поскольку сильное связывание миозиновой головки с актином наблюдается и в присутствии ADP.

В методической части достаточно подробно описаны методы получения «теневых» мышечных волокон и исследуемых белков – актина, субфрагмента I миозина, тропомиозина и кальпониноподобного белка, а также способы их мечения флуоресцентными метками, условия измерений актин-активируемой АТФазной активности миозина и определение кинетических параметров актин-миозинового взаимодействия на основании этих измерений. Особое внимание уделено описанию метода поляризационной микрофлуориметрии, что вполне закономерно, поскольку именно этим методом были получены главные результаты рассматриваемой работы.

При анализе методической части работы у меня возникли следующие вопросы и замечания. В разделе 2.10 (стр. 91), посвященном коседиментации (соосаждению) кальпониноподобного белка (Cap) с актином, мне не совсем понятно, почему концентрацию меченого флуоресцентным зондом Cap в супернатантах и осадках измеряли спектрофотометрически, по весьма низкому поглощению зонда, т.е. на пределе чувствительности метода, а не по его флуоресценции. На стр. 95, при описании метода поляризационной микрофлуориметрии (раздел 2.16.) написано "В рамках описываемой модели.....параметр $\Theta_{1/2}$ отражает упругость тонкой нити на изгиб." Нигде при этом не указывается, что это за параметр, как он определяется и почему именно он "отражает упругость тонкой нити на изгиб".

Главу «Результаты и их обсуждение» (глава 3 диссертации), состоящую из 6 разделов (3.1–3.6), можно условно разделить на две части. В первой из них, включающей разделы 3.1–3.3, приводятся результаты многочисленных экспериментов, в которых методом поляризационной микрофлуориметрии подробно исследованы те изменения поляризованной флуоресценции меток, избирательно присоединенных к мышечным белкам (субфрагмент I миозина, актин, кальпониноподобный белок – Cap), которые происходили при моделировании разных состояний актомиозиновой системы (таких, например, как состояния «сильного» и «слабого» связывания изолированных головок миозина (субфрагмент I миозина, S1) с актином) и при переходах системы из одного состояния в другое. Результаты этих исследований позволили получить новую

информацию о влиянии Сар на взаимодействие миозиновых головок с F-актином. Именно на основании этих результатов автором диссертации при использовании флуоресцентно меченого F-актина были сделаны важные выводы о том, что Сар вызывает заметные конформационные изменения в актиновых нитях, сопровождающиеся изменением количества «включенных» мономеров актина при прохождении цикла гидролиза АТФ, что отражается в ингибировании АТФазы акто-S1. При использовании флуоресцентно меченого S1 был сделан не менее важный вывод о том, что Сар способен переводить головку миозина (S1) из состояния, характерного для сильной формы ее связывания с актином, в состояние слабого взаимодействия, что, видимо, и служит основной причиной ингибирования актомиозиновой АТФазы. Ценность этих данных для более глубокого понимания функций кальпонины и кальпониноподобных белков в регуляции сокращения гладких мышц не подлежит никакому сомнению.

Немалый интерес вызывает и следующая часть главы «Результаты и их обсуждение» (разделы (3.4–3.6). Здесь приведены результаты экспериментов, проведенных *in vitro*, в которых автор исследовал связывание Сар с F-актином (методом соосаждения) и влияние Сар на АТФазную активность акто-S1, а также определял кинетические параметры вызываемого этим белком ингибирования АТФазы акто-S1. На основании этих результатов автором диссертации были сделаны важные выводы о том, что Сар ингибирует АТФазу акто-S1 преимущественно по конкурентному типу, т.е. конкурирует с S1 за связывание с F-актином, и в этом отношении он отличается от тропомиозина, который также ингибирует АТФазу акто-S1, но по неконкурентному типу.

У меня имеются некоторые вопросы и замечания к главе «Результаты исследования и их обсуждение». Так, на рис. 15 (стр. 98) на дорожке 4 приводится снятая в ультрафиолетовом свете электрофореграмма теневого мышечного волокна, декорированного S1 и содержащих кальпониноподобный белок (Сар), флуоресцентно меченный акрилоданом. На этой электрофореграмме виден лишь Сар – и ничего более. Судя по подписи к рисунку, в эксперименте использовался S1, флуоресцентно меченный 1,5-IAEDANS. Тогда почему его не видно в ультрафиолетовом свете? Но даже если использовался немеченый S1, то почему на этой электрофореграмме не видно ни S1, ни актина? Ведь в обоих этих белках много остатков триптофана, флуоресценция которого должна бы быть хорошо заметной в ультрафиолетовом свете.

Анализируя раздел 3.2 "Результатов", озаглавленный "Подвижность и расположение Сар на тонких нитях теневого мышечного волокна при моделировании различных стадий цикла гидролиза АТФ" (стр. 104–108), я не совсем понял, почему на основании приведенных данных автор делает вывод о том, что "кальпониноподобный белок, связываясь с актиновой нитью, располагается вдоль нее". Приведенные в таблице 2 (стр. 106) значения $P_{||}$ и $P_{\perp}$ (степени поляризации флуоресценции присоединенной к Сар метки (акрилодана) при ориентации волокон параллельно и перпендикулярно плоскости поляризации возбуждающего света, соответственно) мало различаются между собой (по крайней мере, гораздо меньше, чем в случае S1, как показано в таблице 1). Кроме того, присоединенная к Сар флуоресцентная метка очень плохо упорядочена (параметр N, отражающий количество хаотически расположенных флуорофоров, составляет более

60%), как это следует из рис. 17Б на стр. 105. Стоило ли с учетом всего этого делать вывод о том, что Сар располагается вдоль актиновой нити?

На рис. 19Б (стр. 115) приводятся данные о влиянии Сар на "гибкость" F-актина, меченого ФИТЦ-фаллоидином, и делается вывод о том, что Сар делает актиновую нить менее гибкой (т.е. более жесткой). Этот вывод делается на основании того, что в присутствии Сар параметр $\Theta_{1/2}$ актиновой нити, декоированной S1, снижается на 1.5-2 градуса. Однако, как уже указывалось выше при анализе методической части, нигде в диссертации не объясняется, что это за параметр, как он определяется и почему именно он "отражает упругость тонкой нити на изгиб". Судя по всему, снижение этого параметра отражает уменьшение угла отклонения актиновой нити от оси мышечного волокна. Однако отражает ли такое уменьшение угла реальное (динамическое) увеличение изгибной жесткости актиновой нити? И как соотносятся изменения параметра $\Theta_{1/2}$ с изменениями параметра N (степень "разболтанности" флуоресцентной метки), который использовался во всех предыдущих экспериментах? Определяли ли параметр N в данном случае? Хотелось бы услышать мнение автора по этим вопросам.

В разделе 3.4 "Результатов", в котором методом соосаждения *in vitro* автор определял параметры связывания Сар с F-актином, ему удалось определить максимальное значение такого связывания, составляющее 4.73 нмоль Сар на мг актина, и рассчитать, что это соответствует молярному соотношению Сар/актин, равному 1/5. Остается непонятным лишь одно: почему исходно параметры связывания определялись таким экзотическим образом (нмоль Сар на мг актина), а не приводились сразу как молярное отношение этих белков? Аналогично, в разделе 3.5. ("Ингибирующее влияние Сар на АТФазную активность акто-S1") на рис. 21 (стр. 123), где показано ингибирование белком Сар АТФазы акто-S1, на оси "х" приводится "Отношение молекул Сар к 14 молекулам актина". Почему так странно? Почему бы просто не отложить на этой оси молярную концентрацию Сар (или, например, молярное отношение Сар/актин), особенно если учесть, что молярная концентрация F-актина была постоянной и равной 14 мкМ?

Видно, что все высказанные вопросы и замечания либо касаются оформления диссертации, либо носят сугубо полемический характер, нисколько не влияя при этом на общую высокую оценку выполненной В.В. Сиренко диссертационной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати

Материалы диссертации достаточно полно отражены в 7 публикациях. Основные результаты опубликованы в 3 статьях – 2 статьи в журнале "Биохимия" и статья в журнале «Цитология» (важно при этом отметить, что во всех этих статьях В.В. Сиренко является первым автором), а также доложены на международных и отечественных съездах, симпозиумах и конференциях.

Заключение

Подводя итоги, следует сказать, что В.В. Сиренко провел большое интересное исследование, в результате которого накоплен обширный экспериментальный материал и получены новые данные о той роли, которую играют кальпонин и кальпониноподобные белки в регуляции взаимодействия миозина с актином в гладких мышцах. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, с использованием уникального метода

поляризационной микрофлуориметрии. Высказанные замечания носят преимущественно полемический характер и несколько не снижают общего хорошего впечатления от этой диссертационной работы. Полученные данные имеют большое теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований молекулярного механизма и регуляции мышечного сокращения; достоверность этих данных сомнений не вызывает. Выводы, сделанные в диссертации, достаточно хорошо обоснованы. Представленный автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации.

На основании изложенного считаю, что диссертационная работа В.В. Сиренко «Регуляция актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком мидии Грея» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Владимир Владимирович Сиренко заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Заведующий лабораторией структурной биохимии белка
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»
(Института биохимии им. А.Н. Баха)
доктор биологических наук, профессор
СПЕЦИАЛЬНОСТЬ 03.01.04 – «Биохимия»

Дмитрий Иванович Левицкий

Адрес: 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
Институт биохимии им. А.Н. Баха (ИНБИ РАН) при Федеральном государственном
учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»
Телефон: (495)952-13-84; Факс: (495)954-27-32
e-mail: Levitsky@inbi.ras.ru
Сайт института: <http://fbras.ru> и <http://www.inbi.ras.ru>

Подпись д.б.н., проф. Д.И. Левицкого заверяю

Ученый секретарь ФИЦ биотехнологии РАН
кандидат биологических наук




А. Ф. Орловский

11 января 2016 г.