

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации В.В. Сиренко «Регуляция актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком мидии Грея», представленной на соискание ученой степени кандидат биологических наук по специальности 03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в понимании молекулярных механизмов регуляции мышечного сокращения, многие вопросы, касающиеся регуляции сократительной активности гладких мышц или мышц беспозвоночных остаются мало изученными. Поэтому актуальность исследования В.В. Сиренко, посвященного изучению механизма функционирования кальпониноподобного белка мидии, не вызывает сомнения. В литературе до сих пор довольно остро дискутируется вопрос о том, насколько кальпонины (или кальпониноподобные белки) вовлечены в регуляцию сокращения. По этой причине тщательное и подробное исследование одного из таких белков представляется важным и своевременным.

Приступая к своему исследованию, автор овладел методами выделения основных сократительных и регуляторных белков, таких как актин, миозин и его протеолитические фрагменты, тропомиозин и кальпониноподобный белок мидии. Затем, используя описанные в литературе методы, диссертант пометил все исследуемые белки различными флуоресцентными красителями. При этом некоторые белки (такие как актин) были помечены двумя различными красителями. Не вызывает сомнения, что диссертант проводил модификацию в строго контролируемых условиях, однако было бы крайне желательным привести сведения о том, какой уровень модификации был достигнут в каждом конкретном случае и насколько специфичным было проведенное мечение. Вероятно, этого можно было не делать для миозина и актина, условия которых достаточно подробно описаны, однако, насколько я понимаю, автор первым осуществил модификацию кальпониноподобного белка акрилоданом и в этом случае подробное описание модифицированного белка представляется крайне желательным.

Получив модифицированные белки, диссертант обратился к методу поляризационной микрофлуориметрии, уникальному методу разработанному руководителем работы профессором Ю.С. Боровиковым. С помощью этого метода было проведено подробное исследование влияния кальпониноподобного белка мидии на параметры взаимодействия головок миозина с актином. Используя флуоресцентно меченый субфрагмент S1 миозина, В.В. Сиренко показал, что кальпониноподобный белок в основном влияет на формирование комплексов актина и миозина, образующихся в отсутствие нуклеотидов или в присутствии АДФ, и мало влияет на формирование слабых форм связывания головок миозина с актином.

Далее автор использовал препараты теневых мышечных волокон, содержащих флуоресцентно меченый актин. В ходе этих исследований было показано, что кальпониноподобный белок влияет на гибкость (а не на упругость, как это сказано в автореферате) нитей актина. Помимо этого оказалось, что кальпониноподобный белок уменьшает амплитуду перемещения субдомена 1 актина и каким-то образом уменьшает количество «включенных» мономеров актина.

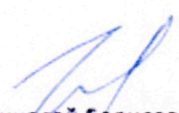
В следующем разделе работы было проведено исследование взаимодействия кальпониноподобного белка с актином в присутствии и в отсутствие S1 фрагмента миозина и в присутствии различных нуклеотидов. Исследование параметров флуоресценции позволило В.В. Сиренко высказать предположение о том, что либо исследуемый белок связывается с актиновыми филаментами в перпендикулярной ориентации и тогда его флуорофоры располагаются параллельно нити актина, либо этот белок связывается параллельно оси волокна, но тогда его флуорофоры располагаются перпендикулярно оси волокна. Мне не очень понятно, как можно говорить о параллельной или перпендикулярной ориентации кальпониноподобного белка, не обсуждая его форму, и утверждать, что данные коседиментации свидетельствуют о том, что исследуемый белок располагается параллельно оси актинового филамента. Вероятно, этот раздел следовало изложить более подробно и ясно. Продолжая свое исследование, диссертант определил стехиометрию связывания кальпониноподобного белка с актином и константу связывания. Оказалось, что на моль исследуемого белка приходится около 5 молекул актина и константа диссоциации находится в микромолярной области. Насколько я понял, эти параметры

были получены для меченого акрилоданом кальпониноподобного белка. Вероятно, в будущем представляется целесообразным использовать метод коседиментации для определения параметров связывания немодифицированного белка с актином. Вполне оправданно автор проводит сравнение свойств исследуемого белка с кальпонином гладких мышц. Однако, известно, что параметры связывания кальпонины с актином сильно зависят от ионной силы. Кроме того, при низкой ионной силе гладкомышечный кальпонин вызывает пучкование актиновых филаментов и это явление будет существенно сказываться на параметрах взаимодействия двух белков. Вероятно, имело смысл привести подробные условия связывания кальпониноподобного белка с актином и в будущем проанализировать возможное влияние исследуемого белка на пучкование нитей актина.

Последняя часть работы касается анализа влияния кальпониноподобного белка на АТРазную активность актомиозина. В этой серии экспериментов диссертант измерял АТРазную активность актомиозина при фиксированной концентрации S1, фиксированной и как он считает насыщающей концентрации тропомиозина и исследуемого белка и при варьирующей концентрации актина. Мне кажется, что нельзя признать полностью приемлемой такую постановку опыта. Как было показано ранее в работе, максимальное ингибирование АТРазной активности достигается при соотношении актин/кальпониноподобный белок, равном 2. В описываемых опытах концентрация исследуемого белка была фиксированной и составляла 4 мкМ, а концентрация актина варьировала от 0 до 30 мкМ. Вследствие этого в разных точках графиков, представленных на рис. 7 и 8 автореферата, соотношение актин/исследуемый белок варьировало и только для первой точки рис. 7 было близко к насыщающей. В силу этого условия проведения опыта при фиксированной концентрации кальпониноподобного белка и варьирующей концентрации актина были существенно различными, что делает крайне затруднительным их корректное сравнение. Кроме того, кривые, представленные для Сар и тропомиозина на рис. 7, различаются только в одной точке и полностью совпадают для трех других экспериментальных точек. Все это делает крайне сомнительным утверждение о том, что механизм ингибирующего действия тропомиозина отличается от механизма ингибирующего действия кальпониноподобного белка.

Завершая анализ работы В.В.Сиренко, можно заключить, что это исследование посвящено интересной и важной проблеме, выполнено с использованием современных методов и содержит оригинальные новые сведения о механизме функционирования кальпониноподобного белка. Анализируя автореферат диссертации, можно прийти к выводу, что, несмотря на высказанные замечания, работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени.

Доктор биологических наук,
профессор кафедры биохимии
биологического факультета МГУ
специальность 03.01.04 –
«Биохимия»


Николай Борисович Гусев

Почтовый адрес: Москва 119991, Ленинские Горы дом 1 корп 12.
Телефон 7-495-939-2747
E-mail: NBGusev@mail.ru

ПОДПИСЬ РУКОЙ
ЗАВЕРЯЮ

Документовед биологического факультета МГУ

