

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу А. М. Матюшенко  
«Структурно-функциональные исследования мышечных изоформ Тpm1.1 и  
Тpm2.2 рекомбинантного тропомиозина человека»  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.04 – биохимия

Тропомиозин, открытый в скелетных мышцах и до недавнего времени рассматриваемый как белок актомиозиновой сократительной системы, является также обязательным компонентом цитоскелета, в том числе и в тех случаях, когда подвижность основана не на взаимодействии миозина с актином, а на полимеризации актина. В клетках существует более 40 изоформ тропомиозина, локализация которых специфична, а предполагаемая функция состоит в модуляции взаимодействия актина с белками, регулирующими динамику актина. Многие патологические процессы, в том числе, опухолевая трансформация клеток и миопатии мышц, при которых наблюдаются мутации тропомиозина или изменение состава его изоформ, сопровождаются нарушениями сократительного аппарата или цитоскелета. Понимание этих процессов невозможно без изучения структурно-функциональных связей в молекуле тропомиозина и, в частности, тех особенностей структуры тропомиозина, которые определяют его взаимодействие с актином и регуляторную роль в мышцах и цитоскелете. Тем не менее, молекулярные аспекты этих взаимодействий остаются мало изученными. Поэтому диссертационная работа А. М. Матюшенко, направленная на выявление структурных и функциональных свойств тропомиозина при введении в молекулу точечных мутаций, актуальна и важна для понимания его роли в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц как в нормальном состоянии, так и при наследственных миопатиях и кардиомиопатиях, вызванных мутациями в генах тропомиозина.

Диссертация А. М. Матюшенко изложена на 139 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, включающего выводы, и списка цитируемой литературы, содержащего 180 наименований. Иллюстративный материал представлен 59 рисунками и 8 таблицами.

Во введении автор обосновывает актуальность проблемы, кратко описывает современное состояние исследований в этой области и определяет

научную новизну и практическое значение полученных результатов. Хотелось особенно отметить *Актуальность темы*, хорошо описанную во Введении диссертации как с профессиональной, так и с литературной точки зрения. К сожалению, этот раздел подвергся значительному сокращению в автореферате. Также, к сожалению, во введении отсутствуют (и появляются только в обзоре литературы) ссылки на упоминаемые автором опубликованные работы.

Обзор литературы состоит из 4 разделов. Это данные о структуре и свойствах тропомиозина и его комплексов с актином; подробный анализ особенностей центральной части молекулы тропомиозина, исследованию которой посвящена значительная часть диссертации; описание наследственных заболеваний, ассоциированных с точечными мутациями в генах тропомиозина, а также подробное обсуждение особенностей гетеродимеров тропомиозина как одной из важных форм его существования. В частности, подробно рассматриваются особенности экспрессии генов тропомиозина, структуры и распространения его изоформ, обсуждаются данные о природе взаимодействия тропомиозина с актином и гипотезы, связывающие взаимодействие тропомиозина с актином с конформационной подвижностью тропомиозина или с его формой, обеспечивающей комплементарность поверхности тропомиозина конфигурации нити актина. Кроме того, четко описаны существующие модели участия тропомиозина в регуляции мышечного сокращения.

В целом, обзор литературы содержит большое количество современной информации и свидетельствует о том, что автор хорошо знает литературу и свободно ориентируется в проблеме. Хотелось особенно отметить раздел, посвященный наследственным заболеваниям человека, связанным с мутациями в генах тропомиозина. Он информативен, хорошо написан и, по моему, был бы полезен и интересен в виде публикации в журнале.

Экспериментальная часть работы А. М. Матюшенко открывается большим и подробным описанием материалов и методов, использованных в работе, в том числе, описанием получения рекомбинантного тропомиозина и его мутантов. Кроме того, подробно описаны физические методы исследования структуры полученных препаратов тропомиозина и их взаимодействия с актином, а также эксперименты в системе анализа подвижности *in vitro* (motility

assay). Достаточное представление для понимания результатов дает также описание эксперимента в оптической ловушке.

Результаты работы А. М. Матюшенко представляют собой три отдельных исследования структурных и функциональных свойств тропомиозина, объединенные общими методическими подходами. Во-первых, это анализ структурных и функциональных особенностей центральной части молекулы тропомиозина, которая является наименее стабильной частью молекулы. Предполагается, что нестабильность связана с присутствием неканонических (по определению, дестабилизирующих) аминокислотных остатков. Для проверки этого предположения были получены рекомбинантные формы тропомиозина, содержащие замены G126R и D137L, а также двойную замену G126R/D137L. По техническим соображениям эти замены были произведены не в тропомиозине дикого типа, а в тропомиозине, в котором цистеин190 был заменен на аланин, что, по данным тщательной проверки, не сильно влияло на его свойства. Сравнение рекомбинантных Tpm G126R/C90A, Tpm D137L/C90A и Tpm G126R/D137L/C90A методами ограниченного протеолиза трипсином, кругового дихроизма, дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и эксимерной флуоресценции пиренил-меченого тропомиозина подтвердило стабилизирующий эффект произведенных замен, который был особенно ярко выражен в двойном мутанте Tpm G126R/D137L/C90A. Кроме того, эти эксперименты показали, что замены неканонических остатков Asp137 и Gly126 в центральной части молекулы тропомиозина на канонические остатки Leu или Arg (а особенно обоих этих остатков двойной заменой G126R/D137L) стабилизируют не только центральную часть молекулы, но и другие ее части, включая N- и C-концевые домены. Эти изменения влияют на взаимодействие тропомиозина с Ф-актином и изменяют свойства комплексов Ф-актина с тропомиозином и тропонином (тонких нитей), увеличивают изгибную жесткость актинового филамента, содержащего тропомиозин и тропонин, увеличивают максимальную скорость скольжения тонких филаментов в motility assay при высоких концентрациях ионов Ca и Ca-чувствительность актин-миозинового взаимодействия, обеспечивающего такое скольжение. Помимо этого, показано, что стабилизация ухудшает релаксационные свойства миофибрилл.

Используя методические подходы, отработанные в первой части работы, А. М. Матюшенко получил препараты рекомбинантного тропомиозина с аминокислотными заменами, соответствующими кардиомиопатическим и

миопатическим мутациям в генах тропомиозина и исследовал их свойства. Показано, что в сердечном тропомиозине замены Trp E180G, Trp E180V, Trp L185R и Trp I172T оказывают заметное влияние на свойства тропомиозина и его взаимодействие с актином. При анализе скольжения тонких нитей выявлены нарушения взаимодействия миозина с актином, регулируемого тропонин-тропомиозиновой системой, что может быть причиной гиперчувствительности тонкого филамента к ионам Ca и приводить к неполной релаксации сердечной мышцы.

В результате проведенных экспериментов обнаружены также различия в свойствах рекомбинантных тропомиозинов с аминокислотными заменами R133W и N202K. Мутации, приводящие к заменам этих остатков, связаны с двумя разными заболеваниями мышц: дистальным артрогриппозом 2B типа (N202K) и «кэповым заболеванием» (R133W). Обнаружены различия этих тропомиозинов во взаимодействии с Ф-актином и функциональных свойствах.

В заключительной части диссертации А. М. Матюшенко исследованы гетеродимеры и гомодимеры двух изоформ тропомиозина, Trp 1.1 ( $\alpha$ -Trp) и Trp 2.2 ( $\beta$ -Trp), с аминокислотными заменами в одной из двух цепей молекулы. Кроме научной стороны, эти исследования интересны тем, что образование  $\alpha\beta$ -гетеродимеров и  $\alpha\alpha$ -гомодимеров тропомиозина с аминокислотными заменами лишь в одной из цепей наблюдается в мышечной ткани. Кроме того,  $\alpha\beta$ -гетеродимеры составляют значительную часть тропомиозина в мышце, а образование  $\alpha\alpha$ -гомодимеров с аминокислотными заменами в одной из цепей вполне может наблюдаться при патологиях в сердечной мышце. Выявлены различия во взаимодействии  $\alpha\alpha$ - и  $\alpha\beta$ -димеров с актином и подтверждена нестабильность  $\beta\beta$ -гомодимеров. Показано также, что как  $\alpha\beta$ -гетеродимеры, так и  $\alpha\alpha$ -гомодимеры тропомиозина, несущие аминокислотные замены только в одной из двух цепей, отличаются по структурным и функциональным свойствам от гомодимеров, несущих такие замены в обеих цепях молекулы.

Таким образом, в работе А. М. Матюшенко получен ряд приоритетных данных о структурных особенностях молекулы тропомиозина и его взаимодействии с актином в растворе и при моделировании процесса взаимодействия тонких нитей с миозином. Полученные данные указывают на то, что природная нестабильность центральной части молекулы тропомиозина необходима для тонкой регуляции мышечного сокращения, т.к. ее стабилизация

приводит к значительному усилению сократительных свойств, что по некоторым параметрам превосходит эффекты многих миопатий и может быть пагубным для функционирования мышц.

В порядке дискуссии мне бы хотелось задать вопросы по поводу экспериментов по изучению стабилизации взаимодействия рекомбинантных тропомиозинов с актином. и высказать некоторые соображения.

1) Во всех экспериментах по взаимодействию тропомиозина с актином актин был стабилизирован фаллоидином. Известно, что тропомиозин влияет на динамику Ф-актина примерно так же, как фаллоидин, и аддитивности эффектов не наблюдается. Как влияет фаллоидин на взаимодействие тропомиозина с актином?

2) О влиянии мутаций на стабильность комплексов актина с Трм судили по изменению светорассеяния при повышении температуры. Известно, что тропомиозин теплоустойчив, а Ф-актин полностью инактивируется при  $T > 55^{\circ}$ . Повышает ли фаллоидин теплоустойчивость Ф-актина? Что в условиях эксперимента происходит со светорассеянием Ф-актина? Инактивируется ли актин в комплексе? Что такое нормализованная температурная зависимость? Является ли разница в 1-2 градуса достоверным критерием различий?

3) Хотя обсуждение взаимодействия тропомиозина с головкой миозина не является принципиальным для обсуждения результатов работы, мне бы хотелось уточнить, что данные работы [95] – Eaton, B. L. 1976. Troponin binding to F-actin induced by myosin heads. Science 192: 1337-1339 – не свидетельствуют в пользу взаимодействия тропомиозина с головкой миозина. Эти эксперименты проведены при низкой концентрации АТФ и интерпретируются автором как влияние «ригорной» связи головки миозина на изменение конформации актина, что стабилизирует связывание тропомиозина. В литературе описан и противоположный эффект: присутствие тропомиозина усиливает аффинность нити актина к миозину (Eaton et al., 1975; Tobacman and Butters, 2000). Мне кажется, что исследование кооперативности этих взаимовлияний было бы интересно продолжить, используя мутанты тропомиозина, полученные А. М. Матюшенко

В целом, работа А. М. Матюшенко представляет собой законченное исследование, в котором предложены оригинальные подходы для

исследования структуры и функциональных свойств тропомиозина и получены приоритетные результаты. Было бы интересно продолжить исследование взаимодействия тропомиозина с актином, используя полученные А. М. Матюшенко рекомбинантные тропомиозины и модифицированные формы или изоформы актина.

Диссертация А. М. Матюшенко очень хорошо написана, не содержит жаргона и опечаток и оформлена с вниманием к читателю.

Результаты диссертации достаточно полно изложены в 8 статьях в российских и международных рецензируемых журналах и более чем в 20 тезисах в материалах отечественных и международных конференций. Содержание автореферата соответствует основным разделам диссертации.

Таким образом, диссертационная работа А. М. Матюшенко «Структурно-функциональные исследования мышечных изоформ Trm1.1 и Trm2.2 рекомбинантного тропомиозина человека» по актуальности, объему выполненных исследований, методическому уровню проделанной работы, научной новизне и значимости полученных результатов полностью соответствует основным квалификационным критериям п. 9 «Положения ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842, а ее автор, Александр Михайлович Матюшенко заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Ведущий научный сотрудник  
Отдел клеточных культур  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии Российской академии наук,  
доктор биологических наук

С.Ю. Хайтлина

Контактная информация: ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург 194064, Тихорецкий пр., 4. Тел. 8-812-297 29 18, E.mail: Sofia Khaitlina [skhspb@gmail.com]

