

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации А.М.Матюшенко «Структурно-функциональные исследования мышечных изоформ Trm1.1 и Trm2.2 рекомбинантного тропомиозина человека», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Тропомиозин является вездесущим актин-связывающим белком. Несмотря на то, что этот белок был открыт в середине прошлого века и давно стал излюбленным объектом исследования специалистов, работающих в разных областях биологии и медицины, многие свойства и механизм его функционирования все еще остаются недостаточно исследованными. Нет сомнения в том, что тропомиозин играет ключевую роль в регуляции сократительной активности скелетных и сердечных мышц, участвует в регуляции процессов немышечной подвижности. Помимо этого тропомиозин играет исключительно важную роль в формировании цитоскелета и, может быть, каким-то образом участвует в процессах клеточной подвижности и метастазирования. Все это делает подробное исследование тропомиозина в высшей степени актуальным и свидетельствует о важности и своевременности исследования, проведенного А.М. Матюшенко и посвященного изучению структуры и механизма функционирования двух изоформ тропомиозина.

Диссертационная работа состоит из трех взаимосвязанных, но вполне автономных частей. Первая часть диссертационной работы касается исследования точечных мутаций в центральной части молекулы тропомиозина. Автор получил точечные мутанты G126R и D137L и двойной мутант с двумя соответствующими заменами. Выбор этих мутантов был связан с тем, что в указанных позициях в белке дикого типа располагаются т.н. «неканонические» аминокислотные остатки, которые должны дестабилизировать структуру димера тропомиозина. Замена неканонических на канонические остатки должна была привести к стабилизации структуры тропомиозина, при этом согласно рабочей гипотезе можно было предполагать, что двойная мутация будет приводить к наиболее значительному увеличению стабильности белка. В диссертационной работе было убедительно показано, что обе мутации (и особенно двойная мутация), действительно, приводят к уменьшению скорости ограниченного протеолиза тропомиозина и увеличению его термостабильности, измеренной методом сканирующей микрокалориметрии. В изящных опытах, проведенных с использованием цистеиновых мутантов, содержащих единственный остаток цистеина либо в N-, либо в C-концевом домене белка, было показано, что замена неканонических на канонические аминокислотные остатки приводит к стабилизации не только центральной части молекулы тропомиозина, но распространяется как на N-, так и на C-концевой домены белка. Было установлено, что анализируемые мутации не влияют на сродство тропомиозина к актину, однако оказывают существенное влияние на вызванную нагреванием диссоциацию тропомиозина от нитей актина. Кроме этого, исследуемые мутанты увеличивали изгибную жесткость нити актина в большей степени, чем белок дикого типа. Оказалось, что мутанты тропомиозина с заменами в центральном домене увеличивают чувствительность к ионам кальция у реконструированных миофибрилл и влияют на скорость скольжения нитей актина в системе *in vitro motility assay*. Пытаясь дать объяснение полученным экспериментальным результатам, А.М. Матюшенко промоделировал область контакта головки миозина с тропомиозином и получил свидетельства того, что в определенных условиях головки миозина могут контактировать с центральной частью тропомиозина в области, в которой располагались мутированные аминокислотные остатки. Эта часть работы производит очень хорошее впечатление. Все результаты тщательно документированы и очень часто получены с использованием нескольких дополняющих друг друга экспериментальных методов. Вопрос к этой части работы касается следующего. Все проанализированные формы тропомиозина обладали двумя калориметрическими доменами. В то же время на термограмме тройного мутанта C190A/G126R/D137L удается обнаружить три таких домена. С чем это может быть связано?

Вторая часть диссертационной работы была посвящена характеристике нескольких мутантов тропомиозина, экспрессия которых коррелирует с развитием различных видов кардиомиопатий. Основное внимание было направлено на изучение участков молекулы тропомиозина, вовлеченных во взаимодействие с тропонином Т. Было обнаружено, что мутации вблизи Cys180 тропомиозина могут сопровождаться изменением термической стабильности и влиять на прочность комплекса, образованного тропомиозином и актином. Мелкое замечание по этой части работы касается того, что на рис.12 и 13 автореферата одни и те же мутанты тропомиозина обозначены кривыми разного цвета, что затрудняет сопоставление полученных результатов.

Интересные результаты были получены при исследовании мутантов тропомиозина с точечными заменами в C- и N-концевой частях молекулы. Оказалось, что точечная мутация M8R драматически влияет как на ассоциацию молекул тропомиозина (измеренную методом вискозиметрии) так и на способность тропомиозина связываться с актином. Помимо этого, было установлено, что точечные мутации тропомиозина, расположенные как в N-, так и в C-концевой области молекулы белка, приводят к

существенным изменениям зависимости скорости перемещения нитей актина в системе *in vitro motility assay*. При этом оказалось, что анализируемые мутации могут влиять как на абсолютную скорость перемещения нитей актина, так и на кооперативную зависимость скорости перемещения от концентрации ионов кальция. Мне кажется, что полученные данные представляют большой интерес для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе развития различных форм кардиомиопатий, вызванных мутациями белков сократительного аппарата.

Третий раздел диссертационной работы А.М. Матюшенко касается исследования свойств гетеродимеров тропомиозина. Автор разработал изящную оригинальную методику получения высокоочищенных препаратов гетеродимеров тропомиозина. Это позволило провести анализ влияния точечных мутаций, ведущих к стабилизации гомодимеров α -тропомиозина, на структуру и свойства гетеродимеров, состоящих из мутантной α -цепи и β -цепи дикого типа. Оказалось, что свойства таких гетеродимеров достаточно существенно отличаются от свойств гомодимеров, подробно исследованных в первом разделе диссертационной работы. Автор вполне обоснованно считает, что этот важный факт следует учитывать в дальнейших исследованиях структуры и свойств тропомиозина

Завершая анализ диссертационной работы А.М. Матюшенко, можно заключить, что это исследование посвящено интересной и важной проблеме, выполнено на очень высоком методическом уровне и содержит новые оригинальные результаты. Об очень высоком уровне проведенных исследований свидетельствует тот факт, что полученные результаты были опубликованы в самых высоко престижных научных журналах. Анализ автореферата диссертации позволяет заключить, что рецензируемая работа соответствует требованиям к кандидатским диссертациям, выдвигаемым "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. №748), а ее автор, Александр Михайлович Матюшенко, несомненно, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Член-корреспондент РАН,
профессор кафедры биохимии
биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук
по специальности 03.01.04 биохимия

Николай Борисович Гусев

Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234
Контактный телефон: 7-495-939-2747
E-mail: NBGusev@mail.ru

Биологический факультет Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ленинские Горы дом 1 корп. 12, Москва, 119234
Телефон: 8-495-939-27-76, Факс: 8-495-939-43-09
e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Почтовый адрес: Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234

