

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Матюшенко А.М. «Структурно-функциональные исследования мышечных изоформ Тpm 1.1 и Тpm 2.2 рекомбинантного тропомиозина человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.01.04 биохимия.

Тропомиозины – консервативные белки, обнаруженные у большинства эукариот от дрожжей до человека. Тропомиозин входит в состав молекулярного комплекса, обеспечивающего двигательную активность клеток, где он расположен вдоль актинового филамента, фактически формируя второй белковый филамент, за счет взаимодействия С-концевой части с N-концом следующей молекулы тропомиозина. Основной функциональной ролью тропомиозина в поперечнополосатых мышцах считается регуляция взаимодействия актина с молекулярным мотором миозином. В этом процессе тропомиозин выступает ингибитором: он препятствует связыванию моторного домена миозина с актином и развитию сокращения, пока не произойдет выброс Ca^{2+} в саркоплазму и не активируется тропониновый комплекс, также связанный с тропомиозином. С принятием модели регулируемого Ca^{2+} -зависимого «перекачивания» филамента тропомиозина по поверхности филамента актина с открытием/закрытием участков связывания для миозина роль тропомиозина стала понятной, и казалось, что активная фаза его исследований миновала. Однако возник новый импульс для исследований, когда стало понятно, что мутации в этом весьма консервативном структурном белке лежат в основе тяжелых заболеваний сердца и скелетных мышц (ряда вариантов наследственной гипертрофической и дилатационной кардиомиопатии, артрогрипозов, т.н. «кэпового» заболевания – cap disease, немалиновой миопатии). Для исследователей фундаментального уровня эти данные сфокусировались в проблему выяснения молекулярных основ мышечных патологий, связанных с мутациями в тропомиозинах. В этом ключе и построена диссертационная работа А.М. Матюшенко. Она имеет высокую актуальность, поскольку направлена не только на выяснение тонких механизмов регуляции нормального сократительного цикла поперечнополосатых мышц, но и на детальный структурно-функциональный анализ нарушений сократительного комплекса на уровне белок-белковых взаимодействий. Это базовый уровень понимания таких нарушений, все

остальные более высокие уровни (тканевой, органной, организменный) являются производными от молекулярного уровня.

Диссертант сформулировал следующие задачи в своем исследовании.

1. Установить роль центральной части молекулы тропомиозина в регуляции мышечного сокращения.
2. Исследовать структурно-функциональные свойства мутантных тропомиозинов, экспрессирующихся при ряде миопатий и кардиомиопатий у человека.
3. Изучить структурные и функциональные проявления мутаций в тропомиозинах, если эти мутации присутствуют в одной либо в обеих полипептидных цепях тропомиозинового димера.

Для решения поставленных задач автор использовал набор методов генной инженерии, физико-химических и биохимических методов исследования белков. Им были созданы, экспрессированы в бактериальной системе и очищены различные мутантные формы α - и β -тропомиозинов (по современной классификации Trpm1 и Trpm2). Помимо «технологических» мутаций тропомиозина по цистеиновому остатку, введенных для оптимизации процесса измерений, автор создал девять патологических мутаций, известных из литературы, и ряд аминокислотных замен, изменяющих стабильность центральной части молекулы тропомиозина. Им был налажен метод создания *in vitro* гетеродимеров тропомиозина, в которых только одна полипептидная цепь несла мутацию. Уместно отметить, что лаборатория, в которой выполнялась работа, является экспертом мирового уровня по использованию метода дифференциальной сканирующей микрокалориметрии для изучения структурных характеристик мышечных и других белков. Этот метод явился одним из основных в структурных исследованиях, представленных в работе. Наконец, диссертант имел возможность воспользоваться в своих исследованиях такими современными подходами как оптическая ловушка и искусственная актомиозиновая подвижная система (*in vitro* motility assay). Эти редкие для российской науки методы налажены в лаборатории проф. С.Ю Бершицкого в Институте иммунологии и физиологии УрО РАН в г. Екатеринбурге. Все использованные экспериментальные подходы адекватны для решения поставленных задач и являются современными и стандартными в мировой научной практике в данной области исследований. Они позволяют получать достоверные воспроизводимые результаты.

При выполнении работы были получены следующие основные результаты.

1. Дано объяснение присутствию т.н. неканонических аминокислотных остатков в центральной части молекулы нормального тропомиозина, которые вызывают определенную дестабилизацию его структуры. Автор заменил два неканонических остатка Asp137 и Gly126 на канонические остатки Leu или Arg, а также сделал двойную замену G126R/D137L и показал, что при этом происходит стабилизация не только центральной части молекулы, но и N- и C-концевых доменов. Повышение стабильности тропомиозина приводит к повышению жесткости актинового филамента, с которым взаимодействует такой тропомиозин. Более того, стабилизация молекулы тропомиозина приводит к увеличению скорости скольжения актиновых филаментов в искусственной подвижной системе и повышает Ca^{2+} -чувствительность этого процесса. Помимо этого значительно ухудшаются релаксационные свойства миофибрилл, содержащих стабилизированный тропомиозин. Таким образом, частичная дестабилизация центральной части тропомиозина играет важную роль в тонкой регуляции нормального мышечного сокращения, без такой опции, как следует из экспериментов, повышается сократимость мышцы и нарушается расслабление, т.е. мышца выходит из физиологического оптимума функционирования.
2. Показано, что большинство исследованных (кардио)миопатических мутаций в генах тропомиозина оказывают заметное влияние на функциональные свойства тропомиозина *in vitro*. Как правило, это нарушение взаимодействия миозина с актином, гиперчувствительность тонкого филамента к Ca^{2+} , повышенная скорость движения филаментов и, как следствие, неполная релаксация мышцы. Эти результаты дают молекулярное обоснование наблюдаемых в клинике фенотипов у больных–носителей данных мутаций в тропомиозине.
3. Показано, что $\alpha\beta$ -гетеродимеры и $\alpha\alpha$ -гомодимеры тропомиозина, несущие аминокислотные замены лишь в одной из двух цепей, отличаются по своим структурным и функциональным свойствам от гомодимеров, несущих такие замены в обеих цепях молекулы. Наличие мутации лишь в одной цепи тропомиозина является «доминантным» и такие молекулы также снижают актомиозиновую двигательную активность, как и двуцепочечные мутанты. Это важное знание, указывающее на то, что патологическая мутация в тропомиозине будет проявляться в любом случае.

Интересные данные получены автором при воспроизведении стабилизирующих замен G126R/D137L только в одной цепи тропомиозина. При этом скорость движения филаментов не увеличивалась, как в случае гомодимеров тропомиозина с заменой в обеих цепях, а, наоборот, существенно падала, вероятно, по причине того, как считает автор, что жесткость двух цепей становится разной и молекула тропомиозина в целом менее согласованно выполняет перемещения на актине, что затрудняет актомиозиновое взаимодействие.

Полученные диссертантом результаты во многом являются новыми и существенно углубляют понимание механизмов регуляции сокращения поперечнополосатых мышц в норме и при мышечных патологиях. Вместе с тем ознакомление с работой А.М. Матюшенко поднимает ряд вопросов и дискуссионных моментов:

1. Рис. 27 (стр. 74). Как можно объяснить, что пик эксимерной флуоресценции совпадает с пиком плавления калориметрического домена 2 при исследованиях методом ДСК препаратов тропомиозина Trpm S36C/C190A/ и Trpm C126R/S36C/C190A?
2. Из рис. 27 (стр. 74) также следует, что при плавлении С-концевого домена (2), N-концевые части тропомиозина лучше взаимодействуют между собой – повышается эксимерная флуоресценция. Как это можно объяснить?
3. Рис. 31 (стр. 78). Что происходит с актином при нагревании до 45–55 °С?
4. Рис. 32, 33, 35 (стр. 81, 82, 84). Для двойного мутанта Trpm G126R/D137L все показатели выше, чем в контроле (АТФаза-подвижность-сила), а для одиночных мутантов согласуется АТФаза и подвижность, но не сила. Почему?

Диссертационная работа А.М. Матюшенко построена по классическому варианту и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (180 источников). Работа изложена хорошим языком на 139 страницах и содержит 59 рисунков и 8 таблиц. Обзор литературы написан четко без перегрузки лишними деталями, снабжен достаточным количеством иллюстраций, которые помогают читателю вникнуть в суть разбираемых вопросов. Обзор имеет выраженный аналитический уклон: изложив состояние проблемы, диссертант делает промежуточные заключения и выделяет области неизвестного, где он собирается провести свои собственные сфокусированные исследования. В целом, обзор

литературы хорошо выполняет свои функции в плане ознакомления читателя-неспециалиста в проблеме с ее современным состоянием и обосновывает выбранные автором направления дальнейших исследований.

Методическая часть работы содержит достаточно подробное описание использованных подходов и свидетельствует о том, что автор пользовался современными, надежными методами исследования, адекватными поставленным задачам. При этом, однако, в разделе «Материалы и методы исследования» отсутствует описание статистических методов, использованных при обработке результатов, нет их и в подписях под рисунками в разделе «Результаты и обсуждение». Лишь в отдельных случаях указан вариант представления величин (среднее $\pm$ стандартное отклонение) и количество опытов, но нигде, кроме рис. 35, не приведена достоверность различий и не указан использованный диссертантом доверительный интервал (1%, 5%). Например, это было бы уместно в таблицах 5–8. Разумеется, все это есть в статьях автора, опубликованных в высокорейтинговых журналах, но должно находить отражение и в диссертационной работе. В подписях под некоторыми рисунками (Рис. 38, 39 и др.) дается интерпретация данных, в других же только описание условий и обозначений. В диссертационной работе желательно придерживаться единого формата и лучше описательного, давая интерпретацию результатов в тексте.

Обсуждение результатов проведено корректно с привлечением литературных источников, иногда, пожалуй, слишком осторожно. С заключениями автора в большинстве случаев можно согласиться и принять его точку зрения.

В работе сформулировано 5 выводов, из которых выводы 2 и 3, на мой взгляд, можно было бы объединить, поскольку они оба отражают структурно-функциональные последствия стабилизации молекулы тропомиозина.

При написании работы автор не избежал англицизмов: «раунд ПЦР» (Рис. 13-14) вместо «цикл ПЦР»; «плот» (стр. 76) вместо «график», и некоторых опечаток. Вместе с тем, сделанные замечания не являются принципиальными и не снижают общего хорошего впечатления от диссертационной работы.

В целом, диссертационная работа А.М. Матюшенко представляет собой завершенное исследование фундаментального характера, в котором на высоком методическом уровне систематически изучены структурно-функциональные аспекты тонкой регуляции сокращения в поперечнополосатых мышцах, связанные с

тропомиозином, и нарушения этого процесса вследствие патологических мутаций в тропомиозинах. Автор получил новые важные результаты и дал молекулярное обоснование нарушений, наблюдаемых при ряде наследственных кардиомиопатий и миопатий, ассоциированных с мутациями в тропомиозинах.

Результаты работы доложены на международных и российских конференциях и опубликованы в научных журналах. По теме диссертации опубликовано 8 научных статей, из них 5 в рейтинговых международных журналах. Это замечательный результат для кандидатской диссертации. Выводы корректно отражают полученные диссертантом результаты. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Александра Михайловича Матюшенко «Структурно-функциональные исследования мышечных изоформ Тpm 1.1 и Тpm 2.2 рекомбинантного тропомиозина человека» является высококачественной научно-квалификационной работой, полностью соответствующей критериям, установленным «Положением о порядке присуждения учёных степеней» от 24 сентября 2013г. № 842 (пункт 9), а ее автор А.М. Матюшенко заслуживает присуждения ему искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Руководитель лаборатории клеточной подвижности
Института экспериментальной кардиологии
Российского Кардиологического Научно-производственного Комплекса
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор биологических наук, профессор



В.П. Ширинский

Владимир Павлович Ширинский
Адрес: ФГБУ РКНПК МЗ РФ,
ул. 3-я Черепковская, д. 15а, Москва 121552, Россия
E-mail: shirinsky@gmail.com; тел.: 8-495-414-7246

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

06.06.2017



С.А. Левашова