



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО  
НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ**

Федеральное государственное  
бюджетное учреждение науки  
Институт теоретической и  
экспериментальной биофизики  
Российской академии наук  
(ИТЭБ РАН)

142290 Пушкино Московской области,  
ул. Институтская, 3  
Тел. (495) 632-78-69 Факс (4967) 33-05-53  
E-mail: office@iteb.ru  
ОКПО 00454592, ОГРН 1025007770920  
ИНН/КПП 5039002070/503901001



УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального государственного  
учреждения науки Института теоретической  
и экспериментальной биофизики РАН,  
доктор биологических наук, профессор

И.П. Белецкий

« 31 » мая 2017 г.

31.05.17 № 12308/2171-02

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) о научно-практической значимости диссертационной работы Матюшенко Александра Михайловича на тему: «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

Диссертационная работа А.М. Матюшенко посвящена исследованию структуры и функциональных свойств двух мышечных изоформ рекомбинантного тропомиозина человека, в том числе несущих точечные аминокислотные замены, вызываемые мультиплексными мутациями в генах тропомиозина. Тропомиозин – это активизирующий белок, играющий ключевую роль в регуляции сокращения скелетных и сердечных мышц. Несмотря на кажущуюся простоту строения его молекулы (это двойная  $\alpha$ -спираль), она имеет целый ряд особенностей (таких, например, как наличие «неканонических» остатков, нарушающих структуру двойной спирали), функциональная роль которых остается до сих пор неясной, как и многие иные особенности функционирования тропомиозина в процессе регуляции мышечного сокращения. Другой важной проблемой является выяснение особенностей функционирования тропомиозина

при различных патологических состояниях мышц, таких как наследственные миопатии. Подобные заболевания зачастую ассоциированы с точечными мутациями в генах тропомиозина (и, соответственно, с точечными аминокислотными заменами в его молекуле) и могут приводить к самым тяжелым последствиям для сердечных и скелетных мышц человека. Механизмы развития таких заболеваний малопонятны, хотя их выяснение привлекает в последнее время все большее внимание исследователей. И, наконец, еще одной важной и активно развивающейся в последнее время проблемой является изучение свойств гетеродимеров тропомиозина, молекулы которых состоят из разных его изоформ. Не исключено, что свойства таких гетеродимеров, которые почти не изучены вследствие большой сложности их получения, могут сильно отличаться от достаточно хорошо изученных свойств гомодимеров тропомиозина. Особую актуальность этому направлению исследований придает тот факт, что зачастую в мышцах количество гетеродимеров тропомиозина может значительно превышать количество его гомодимеров. Попытка решения всех этих проблем и составила главную цель рассматриваемой диссертационной работы, вследствие чего ее важность и актуальность не подлежит никакому сомнению.

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 180 ссылок. Работа изложена на 139 страницах и иллюстрирована 59 рисунками и 8 таблицами.

Глава «Обзор литературы» состоит из 4 разделов. В первом из них подробно рассматриваются современные данные о структуре молекулы тропомиозина и принципах ее формирования (т.е. о принципах формирования двойной спирали, coiled coil, которой и является молекула тропомиозина). Помимо этого, в данном разделе рассматриваются такие вопросы, как многообразие изоформ тропомиозина и их распространение, а также недавно предложенная новая номенклатура этих изоформ. Особое внимание в этом разделе обзора уделено рассмотрению таких важных функциональных свойств тропомиозина, как его взаимодействие с актиновыми филаментами и участие, вместе с тропониновым комплексом, в регуляции сокращения скелетных мышц, в том числе роли тропомиозина в этом процессе как стерического блокатора взаимодействия тонкого филамента с головками молекул миозина. Во втором разделе обзора литературы рассматриваются особенности строения центральной части молекулы тропомиозина и их возможная функциональная роль. Это вполне закономерно, поскольку именно выяснению этих вопросов посвящена значительная часть диссертационной работы. Третий раздел обзора литературы посвящен рассмотрению точечных мутаций в генах тропомиозина (и соответствующих аминокислотных замен в молекуле тропомиозина), наличие которых ассоциировано с развитием тяжелых наследственных заболеваний мышц – миопатий и кардиомиопатий. Здесь подробно рассматриваются те изоформы тропомиозина, в которых встречаются такие аминокислотные замены, и обсуждаются существующие на данный момент модели, объясняющие развитие миопатий. На основе анализа этих данных автор делает вывод о том, что молекулярные механизмы развития таких заболеваний, ассоциированных с мутациями в генах тропомиозина, остаются пока совершенно неясными. Все это логично привело его к постановке еще одной из главных задач исследования – подробному изучению влияния аминокислотных замен в рекомбинантных

препаратах тропомиозина, соответствующих миопатическим и кардиомиопатическим мутациям в его генах, на структурные и функциональные свойства таких препаратов. И, наконец, четвертый раздел обзора литературы посвящен гетеродимерам тропомиозина – одной из важных форм его существования. Здесь рассматриваются виды таких гетеродимеров и их распределение в разных типах мышц, возможные способы получения гетеродимеров из смеси препаратов рекомбинантных гомодимеров, а также имеющиеся в литературе крайне немногочисленные данные о структурно-функциональных особенностях  $\alpha\beta$ -гетеродимеров тропомиозина, отличающих их от  $\alpha\alpha$ - и  $\beta\beta$ -гомодимеров. Представленное описание вполне закономерно, поскольку значительная часть диссертационной работы посвящена именно исследованиям свойств  $\alpha\beta$ -гетеродимеров тропомиозина.

В целом, обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Он написан хорошим языком, четко и логично, содержит ссылки на публикации самых последних лет, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант прекрасно ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам. Помимо этого, обзор полностью исполняет свою главную функцию – он предоставляет читателю всю необходимую информацию для последующего восприятия экспериментального материала.

В главе «Материалы и методы исследования» весьма сжато, но при этом достаточно подробно описаны освоенные автором диссертации многочисленные методы исследования. В ходе выполнения работы им был использован целый арсенал различных методов и подходов: от сайт-направленного мутагенеза для получения рекомбинантных препаратов тропомиозина с различными мутациями и методов классической белковой биохимии до различных методов физико-химического анализа – таких, как дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), круговой дихроизм (КД) и флуоресцентный анализ, а также уникальный метод искусственной подвижной системы (ИПС, *in vitro motility assay*), примененный совместно с партнерами из г. Екатеринбурга для исследования регуляторных свойств тропомиозина. Такое успешное сочетание самых разных методов и подходов является, безусловно, важной особенностью данной работы.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 3 разделов. Следует отметить, что эти разделы четко соответствуют соответствующим трем разделам обзора литературы (разделы 1.2–1.4), в которых обоснована актуальность проведения исследований именно в этих трех направлениях. Первый из этих разделов посвящен исследованиям центральной части молекулы тропомиозина, в частности – выяснению роли двух высококонсервативных «неканонических» остатков (Gly126 и Asp137), нарушающих структуру двойной спирали в этой области. Для этого методом сайт-направленного мутагенеза эти остатки были заменены на канонические остатки Leu или Arg точечными мутациями G126R и D137L, которые присутствовали в молекуле тропомиозина как по отдельности, так и одновременно (путем двойной замены G126R/D137L). В результате многочисленных экспериментов впервые были получены убедительные данные о том, что эти мутации (а в особенности – двойная мутация G126R/D137L) способны стабилизировать не только центральную часть молекулы тропомиозина, что было показано методом ограниченного протеолиза трипсином, но и другие ее части, включая N- и C-концевые домены, что было показано методом ДСК. При помощи целого ряда иных методов и специально

разработанных подходов были получены новые интересные данные о влиянии этих мутаций на функциональные свойства тропомиозина. Так, было показано, что стабилизация молекулы тропомиозина такими мутациями приводит к стабилизации комплекса тропомиозина с актином и к увеличению жесткости тонкого филамента (актинового филамента, содержащего тропомиозин и тропонин); помимо этого, она увеличивает максимальную скорость скольжения тонких филаментов в искусственной подвижной системе при высоких концентрациях  $\text{Ca}^{2+}$ , повышает  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительность взаимодействия миозина с актином, обеспечивающего такое скольжение, и значительно ухудшает релаксационные свойства миофибрилл. Более того, для объяснения этих данных была предложена модель взаимодействия тропомиозина с головкой миозина на поверхности актинового филамента, которая свидетельствует о том, что в определенных условиях головки миозина могут контактировать с центральной частью тропомиозина как раз в той ее области, где располагаются остатки Gly126 и Asp137, и, соответственно, замена этих остатков мутациями G126R и D137L вполне может оказывать влияние на взаимодействие тропомиозина с головками миозина. Эта часть работы производит очень хорошее впечатление, а приводимые в ней результаты заставляют по-новому взглянуть на функциональную значимость центральной части молекулы тропомиозина.

Во втором разделе главы «Результаты и их обсуждение» приводятся данные структурно-функциональных исследований рекомбинантных препаратов тропомиозина с аминокислотными заменами, соответствующими кардиомиопатическим и миопатическим мутациям в генах тропомиозина. Актуальность проведения исследований в этом важном направлении была хорошо обоснована в разделе 1.3 обзора литературы. Для решения поставленных задач диссертант получил целый ряд рекомбинантных препаратов тропомиозина, несущих такие мутации в разных частях молекулы (например, в участках ее контакта с тропонином Т как в центральной части молекулы, так и в области ее N- и C-концов), и исследовал влияние этих мутаций на структуру и функциональные свойства тропомиозина. Важно отметить, что для большинства таких мутаций подобные исследования были проведены впервые. В результате были получены совершенно новые данные, убедительно свидетельствующие о том, что кардиомиопатические мутации могут оказывать очень сильное влияние на функциональные свойства тропомиозина; многие из них нарушают взаимодействие миозина с актином, регулируемое тропонин-тропомиозиновой системой, что может являться причиной гиперчувствительности тонкого филамента к ионам кальция и приводить к неполной релаксации сердечной мышцы. Следует отметить, что многие из этих результатов были получены с использованием нескольких дополняющих друг друга экспериментальных методов, позволяющих уверенно интерпретировать полученные данные. Так, в качестве примера можно привести эксперименты, проведенные на препаратах тропомиозина с кардиомиопатическими мутациями K15N и M8R в N-концевой области (рисунки 47 и 48 на стр. 98–99). Методом вискозиметрии показано, что эти мутации резко снижают вязкость раствора тропомиозина (рис. 48), что свидетельствует о резком ослаблении взаимодействий между N- и C-концами молекул тропомиозина, которое необходимо для формирования тропомиозинового тяжа на поверхности актинового филамента. Это полностью подтверждается в экспериментах по соосаждению тропомиозина с F-актином, в которых показано, что эти мутации резко снижают сродство тропомиозина к актину

(рис. 47). В целом, данные представленные в этом разделе, представляют большой интерес и немалую важность для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе развития различных форм миопатий и кардиомиопатий – тяжелых наследственных заболеваний мышц человека, вызванных мутациями белков сократительного аппарата.

Не менее важен и последний, третий раздел главы «Результаты и их обсуждение», посвященный исследованиям гетеродимеров тропомиозина (а также его гомодимеров с аминокислотными заменами лишь в одной из двух цепей молекулы). Актуальность проведения исследований в этом важном направлении хорошо обоснована в разделе 1.4 обзора литературы. Она обусловлена тем, что свойства гетеродимеров тропомиозина почти не изучены вследствие большой сложности их получения из рекомбинантных препаратов гомодимеров. В то же время известно, что в мышцах количество гетеродимеров тропомиозина может значительно превышать количество гомодимеров и не исключено, что свойства гетеродимеров могут существенно отличаться от свойств гомодимеров. Для проверки этого предположения диссертант наладил методику получения гетеродимеров тропомиозина (в том числе –  $\alpha\beta$ -гетеродимеров, несущих аминокислотные замены в  $\alpha$ - или в  $\beta$ -цепи), а также  $\alpha\alpha$ -гомодимеров с заменами лишь в одной из двух  $\alpha$ -цепей, и исследовал их структурные и функциональные свойства. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что как  $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина, так и  $\alpha\alpha$ -гомодимеры, несущие аминокислотные замены лишь в одной из двух  $\alpha$ -цепей, могут существенно отличаться по своим структурным и функциональным свойствам от гомодимеров, несущих такие замены в обеих цепях молекулы. Нельзя не согласиться с автором диссертации в том, что в дальнейшем использование именно таких препаратов должно служить наиболее адекватной моделью для изучения свойств тропомиозина, несущего различные аминокислотные замены, ассоциированные с мутациями в его генах.

В «Заключении» автор анализирует и сопоставляет данные, описанные в трех главах «Результатов», а также формулирует основные выводы по проделанной работе. В целом, обсуждение полученных в работе результатов наглядно свидетельствует о способности А.М. Матюшенко как к творческому сопоставлению получаемых данных с имеющимися в литературе представлениями о структуре и функциях тропомиозина, так и к критическому анализу собственных результатов.

Небольшие вопросы и замечания по данной диссертационной работе касаются следующего. В некоторых случаях (например, в таблицах 6–8 и на рис. 43), когда проводился статистический анализ большого массива экспериментальных данных, следовало бы указать достоверность наблюдаемых эффектов (к примеру, обозначив звездочками их достоверные отличия от контроля), а также указать, какой именно тест использовался для такого анализа. Кроме того, хотелось бы увидеть в работе более подробное представление о физиологической роли некоторых особенностей тропомиозина. Зачем, например, в центральной части его молекулы присутствуют высококонсервативные «неканонические» остатки, нарушающие структуру молекулы в этой области? Почему в скелетных мышцах присутствуют разные изоформы тропомиозина с разными свойствами? Эти вопросы и замечания не носят принципиального характера, а являются скорее, пожеланиями, не снижающими высокой научной ценности работы.

Завершая анализ диссертационной работы А.М. Матюшенко, можно заключить, что она представляет собой полноценное завершённое научное исследование, посвящённое актуальной и интересной проблеме, выполненное на самом высоком методическом уровне и содержащее целый ряд новых оригинальных экспериментальных данных и методических разработок. В работе получены новые данные, которые заметно расширяют и углубляют представления об особенностях структурной организации и функционирования тропомиозина. К несомненным достоинствам работы следует отнести и то, что она наметила целый ряд перспективных направлений будущих исследований по изучению регуляторных свойств тропомиозина. Многие подходы, разработанные при выполнении данной работы, могут в дальнейшем успешно использоваться для изучения влияния различных миопатических и кардиомиопатических мутаций в молекуле тропомиозина на его структуру и свойства. Результаты исследования в этом направлении имеют также большое практическое значение, поскольку они расширяют представления о влиянии мутаций, ассоциированных с кардиомиопатиями, на сокращение сердечной мышцы и могут быть в дальнейшем использованы для поиска новых препаратов, направленных на лечение этих наследственных заболеваний. Все полученные данные хорошо документированы и их достоверность не вызывает сомнений. Сделанные в работе выводы вполне обоснованы и базируются на комплексном применении разных методов исследования. Высказанные замечания носят полемический характер и несколько не влияют на общее прекрасное впечатление от этой интересной работы. Хорошим свидетельством высокого качества проделанной работы является тот факт, что материалы диссертационной работы А.М. Матюшенко отражены в 8 статьях, опубликованных в рецензируемых международных и отечественных журналах (в том числе, статьи в таких журналах, как «FEBS Journal», «Biochemistry» и «Biophysical Chemistry», в которых А.М. Матюшенко является первым автором). Материалы диссертационной работы неоднократно доложены автором на международных и российских научных конференциях. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основное содержание работы.

Результаты, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы в исследованиях, проводимых в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки – Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институте белка РАН, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ, а также при чтении курсов лекций в биологических и медицинских вузах. Результаты работы могут быть интересны специалистам в области биохимии и биофизики мышечного сокращения, а также медицинским работникам, специализирующимся на диагностике и лечении миопатий и кардиомиопатий.

По актуальности, новизне, научному и методическому уровню, достоверности, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертация Матюшенко Александра Михайловича «Структурно-функциональные исследования мышечных изоформ Trpm1.1 и Trpm2.2 рекомбинантного тропомиозина человека» соответствует требованиям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к работам, представляемым на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальности «03.01.04» – Биохимия, а её автор заслуживает присвоения искомой степени.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на заседании секции «Биологическая подвижность: трансмембранный транспорт, рецепция и сигнализация» 17 мая 2017 г.

И.о. заведующего лабораторией структуры и функций мышечных белков  
Федерального государственного учреждения науки  
Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН,  
доктор биологических наук

Иван Милентьевич Вихлянцев

Адрес: 142290, Пущино, Московская обл., Россия  
тел. (4967) 73-93-34, (495) 623-74-67 (доб. 269);  
Электронная почта: vikhlyantsev@iteb.ru

Подпись д.б.н. И.Ю. Попова заверяю.

Ученый секретарь ИТЭБ РАН  
кандидат биологических наук



И.Ю. Попова

«8/..» мая 2017 года