

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.247.01 ПО ЗАЩИТЕ  
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА  
СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 22 июня 2017 г. № 7 о присуждении  
Матюшенко Александру Михайловичу, гражданство Российская Федерация, учёной  
степени кандидата биологических наук

Диссертация «Структурно-функциональные исследования мышечных изоформ  
Тpm 1.1 и Тpm 2.2 рекомбинантного тропомиозина человека» по специальности 03.01.04  
Биохимия принята к защите 13 апреля 2017 г. (протокол № 4) диссертационным советом  
Д 002.247.01 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской  
академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. Совет утверждён  
Рособрнадзором Министерства образования и науки РФ, приказ № 2249-1602 от  
16.11.2007 г. с учётом изменений в составе Совета в соответствии с приказом  
Минобрнауки России от 13.02.2013г. № 74/нк и от 10.02.2014г. № 55/нк и с учётом  
переименования Совета от 30.09.2015г. № 1166/нк.

Соискатель Матюшенко Александр Михайлович, 1991 года рождения, в июне  
2013 г. окончил с красным дипломом Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский  
государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет,  
кафедру биохимии по специальности «Биохимия», и в октябре 2013 г. поступил в очную  
аспирантуру на этой кафедре. Одновременно он был зачислен на должность н.о. младшего  
научного сотрудника (по совместительству) Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, а с  
1 апреля 2015 г. работает в должности младшего научного сотрудника лаборатории  
структурной биохимии белка Федерального государственного учреждения «Федеральный  
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской  
академии наук».

Диссертационную работу соискатель Матюшенко А.М. выполнял в лаборатории структурной биохимии белка Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Научный руководитель – Левицкий Дмитрий Иванович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией структурной биохимии белка Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

Ширинский Владимир Павлович, доктор биологических наук, профессор, Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ, заведующий лабораторией клеточной подвижности;

Хайтлина София Юрьевна, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии клетки в культуре, дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) в своем положительном заключении, подписанном заведующим лабораторией структуры и функции мышечных белков доктором биологических наук Вихлянцевым И.М. и утвержденным директором ИТЭБ РАН Белецким И.П., указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, которое соответствует требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а её автор Матюшенко А.М. заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что доктор биологических наук, профессор Ширинский Владимир Павлович является известным специалистом в области исследования молекулярных механизмов и регуляции процессов клеточной подвижности и мышечного сокращения, осуществляемых актомиозиновыми системами, а доктор биологических наук Хайтлина София Юрьевна является признанным специалистом в области структурно-функциональных исследований мышечных белков, в том числе актина и тропомиозина. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа публикаций в высоко цитируемых российских и международных журналах. Выбор

ведущей организации связан с тем, что в лаборатории структуры и функции мышечных белков Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН на протяжении многих лет проводятся структурно-функциональные исследования мышечных белков и сотрудники лаборатории являются высококвалифицированными специалистами в данной области исследований, связанной с тематикой представленной диссертационной работы, что подтверждается наличием соответствующих публикаций. Высокая квалификация оппонентов и сотрудников ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 8 статьях в рецензируемых научных изданиях, публикации в которых удовлетворяют требованиям п. 11 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842:

1. Щепкин Д.В., Матюшенко А.М., Копылова Г.В., Артемова Н.В., Бершицкий С.Ю., Цатурян А.К., Левицкий Д.И. «Стабилизация центральной части Тм изменяет чувствительность актин-миозинового взаимодействия к ионам кальция». *Acta Naturae*, 2013, Т. 5, № 3(18), С. 130–133.
2. **Matyushenko A.M.**, Artemova N.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Bershitsky S.Y., Tsaturyan A.K., Sluchanko N.N., Levitsky D.I. “Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of  $\alpha$ -tropomyosin molecule”. *FEBS Journal*, 2014, v. 281, p. 2004–2016.
3. **Matyushenko A.M.**, Artemova N.V., Sluchanko N.N., Levitsky D.I. “Effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of  $\alpha$ -tropomyosin on the domain structure of its molecule”. *Biophysical Chemistry*, 2015, v. 196, № 1, p. 77–85.
4. Nabiev S.R., Ovsyannikov D.A., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., **Matyushenko A.M.**, Koubassova N.A., Levitsky D.I., Tsaturyan A.K., Bershitsky S.Y. “Stabilizing the central part of tropomyosin increases the bending stiffness of the thin filament”. *Biophysical Journal*, 2015, v.109, p.373–379.
5. **Матюшенко А.М.**, Артемова Н.В., Щепкин Д.В., Копылова Г.В., Левицкий Д.И. «Влияние стабилизирующих мутаций в центральной части  $\alpha$ -цепи Тм на структурные и функциональные свойства его  $\alpha\beta$ -гетеродимеров». *Биофизика*, 2016, том 61, № 5, с. 844–851.
6. Копылова Г.В., Щепкин Д.В., Боровков Д.И., **Матюшенко А.М.** «Влияние кардиомиопатических мутаций Тм на кальциевую регуляцию актин-миозинового взаимодействия в скелетной мышце». *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2016, том 162, № 7, с. 50–53.
7. **Matyushenko A.M.**, Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Popruga K.E., Artemova N.V., Pivovarova A.V., Bershitsky S.Y., Levitsky D.I. “Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in troponin T-binding region of cardiac tropomyosin”. *Biochemistry*, 2017, v. 56, p. 250–259.

8. Scellini B., Piroddi N., Matyushenko A.M., Levitsky D.I., Poggesi C., Lehrer S.S., Tesi C. "Relaxation properties of myofibrils are compromised by amino acids that stabilize  $\alpha$ -tropomyosin". *Biophysical Journal*, 2017, v. 112, p. 376–387.

Результаты работы также были представлены на 6 отечественных и 3 международных конференциях:

В публикациях отражены результаты экспериментальной работы, проведенной в рамках выполнения диссертации.

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Ширинского В.П. (положительный).** Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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 Trp S36C/C190A/ и Trp 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 Trp G126R/D137L все показатели выше, чем в контроле (АТФаза-подвижность-сила), а для одиночных мутантов согласуется АТФаза и подвижность, но не сила. Почему?
- 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.

- 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.

**Отзыв официального оппонента доктора биологических наук Хайтглишой С.Ю. (положительный).** Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- 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 взаимодействий было бы интересно продолжить, используя мутанты тропомиозина, полученные А. М. Матюшенко.

**Отзыв ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (положительный).** Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

- В некоторых случаях (например, в таблицах 6–8 и на рис. 43), когда проводился статистический анализ большого массива экспериментальных данных, следовало 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 несколько подробнее узнать мнение автора о физиологической роли некоторых особенностей тропомиозина. Зачем, например, в центральной части его молекулы присутствуют высоко-консервативные «неканонические» остатки, нарушающих структуру молекулы в этой области? Почему в скелетных мышцах присутствуют разные изоформы тропомиозина с разными свойствами? Эти вопросы и замечания не носят, однако, принципиального характера и являются, скорее, пожеланиями для проведения дальнейших исследований.

**На автореферат поступили положительные отзывы от:**

- заведующего лабораторией структурной динамики, стабильности и фолдинга белков ФГБУН Института цитологии Российской академии наук, доктора физико-математических наук, профессора Туроверова Константина Константиновича.

В отзыве приведено следующее замечание:

«Автореферат хорошо оформлен. Странным показалось лишь несимметричное введение использованных экспериментальных методов и подходов: для первых двух методов в подзаголовке, как это обычно делается, дано название метода (Круговой дихроизм, Дифференциальная сканирующая калориметрия), однако затем в подзаголовки вынесено, что было исследовано, а не название метода».

- заведующего лабораторией биофизики клетки Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Национального научного центра морской биологии Дальневосточного отделения Российской академии наук, доктора биологических наук Шелудько Николая Семеновича, замечаний нет;
- заведующего лабораторией молекулярных основ клеточной подвижности ФГБУН Института цитологии Российской академии наук, доктора биологических наук, профессора Боровикова Юрия Сергеевича, замечаний нет;
- ведущего научного сотрудника лаборатории биомеханики Научно-исследовательского Института механики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктора физико-математических наук Цатуряна Андрея Кимовича, замечаний нет;
- члена-корреспондента РАН, заведующего кафедрой биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктора биологических наук, профессора Гусева Николая Борисовича.

В отзыве приведены следующие вопросы и замечания:

- 1). «Все проанализированные формы тропомиозина обладали двумя калориметрическими доменами. В то же время на термограмме тройного мутанта C190A/G126R/D137L удастся обнаружить три таких домена. С чем это может быть связано?»
  - 2). «...на рис. 12 и 13 автореферата одни и те же мутанты тропомиозина обозначены кривыми разного цвета, что затрудняет сопоставление полученных результатов».
- заведующего лабораторией биологической подвижности ФГБУН Института иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, доктора биологических наук Бершицкого Сергея Юрьевича, замечаний нет.

**В дискуссии приняли участие:**

член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор Николай Борисович Гусев;  
 доктор биологических наук, профессор Арсений Сумбатович Капрельянц;  
 доктор биологических наук, профессор Сергей Сергеевич Шишкин;  
 доктор биологических наук, профессор Владимир Петрович Вейко.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований получены следующие **основные результаты**:

- Показано, что замены неканонических остатков Asp137 и Gly126 в центральной части молекулы тропомиозина на канонические остатки Leu или Arg (а в особенности – обоих этих остатков двойной заменой G126R/D137L) способны стабилизировать не только эту часть молекулы, но и другие ее части, включая N- и C-концевые домены.
- Стабилизация молекулы тропомиозина существенно увеличивает изгибную жесткость тонкого филамента (актинового филамента, содержащего тропомиозин и тропонин).
- Стабилизация молекулы тропомиозина увеличивает максимальную скорость скольжения тонких филаментов в искусственной подвижной системе при высоких концентрациях  $Ca^{2+}$  и повышает  $Ca^{2+}$ -чувствительность актин-миозинового взаимодействия, обеспечивающего такое скольжение. Помимо этого, она значительно ухудшает релаксационные свойства миофибрилл.
- Показано, что большинство исследованных кардиомиопатических мутаций в генах тропомиозина оказывают заметное влияние на функциональные свойства рекомбинантных препаратов тропомиозина, несущих соответствующие аминокислотные замены в различных частях молекулы. Для многих из них были выявлены нарушения взаимодействия миозина с актином, регулируемого тропонин-тропомиозиновой системой, что может являться причиной гиперчувствительности тонкого филамента к  $Ca^{2+}$  и приводить к неполной релаксации сердечной мышцы.
- Показано, что как  $\alpha\beta$ -гетеродимеры тропомиозина, так и  $\alpha\alpha$ -гомодимеры, 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.

**Теоретическая значимость исследования заключается в том, что:**

В работе впервые были получены доказательства того, что внесение аминокислотных замен G126R и D137L в центральную часть молекулы тропомиозина стабилизирует не только эту часть молекулы, но и всю молекулу в целом. Эти изменения в структуре молекулы тропомиозина приводят к стабилизации его комплекса с актином и увеличению жесткости тонкого филамента (актинового филамента, содержащего тропомиозин и тропонин). В ходе работы впервые были получены данные о изменениях функциональных



свойств тропомиозина, вызванных подобной стабилизацией. Так, было показано, что она влияет на чувствительность тонкого филамента к ионам кальция, снижает скорость и степень релаксации миофибрилл, а также изменяет параметры взаимодействия миозина с актиновым филаментом. Помимо этого, была предложена модель взаимодействия тропомиозина с головкой миозина на поверхности актинового филамента. Получены новые данные о влиянии кардиомиопатических мутаций в генах тропомиозина на структуру и функциональные свойства рекомбинантных препаратов тропомиозина, несущих соответствующие аминокислотные замены в различных частях молекулы.

**Практическая значимость работы заключается в том, что:**

Представленные в работе данные расширяют представления о функционировании тропомиозина и о его роли в регуляции мышечного сокращения. В частности, становится понятно, 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 являться пагубным для функционирования мышц. Данные, полученные в ходе изучения препаратов тропомиозина с аминокислотными заменами, ассоциированными с кардиомиопатиями, расширяют представления о их влиянии на сокращение сердечной мышцы и могут быть в дальнейшем использованы для поиска новых препаратов, направленных на лечение этих наследственных заболеваний.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила, что:**

- использованные методики исследования и проведенные расчёты корректны;
- достоверность полученных данных не вызывает сомнений;
- выводы диссертационной работы четко сформулированы и отражают наиболее значимые результаты работы.

**Личный вклад соискателя состоит в:**

- получении основных результатов работы либо лично автором, либо при его непосредственном участии, включая планирование и проведение экспериментов;
- обработке, интерпретации и анализе экспериментальных данных;
- подготовке публикаций по выполненной работе.

---

Диссертация Матюшенко А.М. является законченной научно-квалификационной работой, что подтверждается наличием логичного плана исследования, использованием большого

арсенала современных методов, взаимосвязанностью выводов и результатов, а также большим количеством публикаций в рецензируемых журналах (8 статей).

На заседании 22 июня 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Матюшенко Александру Михайловичу учёную степень кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 12 докторов биологических наук, 6 докторов химических наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали:


«За» присуждение ученой степени – 19 ,

«Против» – нет ,

Недействительных бюллетеней – нет .

Заместитель председателя диссертационного  
совета ФИЦ биотехнологии РАН  
доктор химических наук, профессор



 Б.Б. Дзантиев

Ученый секретарь диссертационного совета  
ФИЦ биотехнологии РАН  
кандидат биологических наук

 А.Ф. Орловский

«22» июня 2017 г.