Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации (Минобрнауки России)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИНЦ РАН)

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,
эл.адрес: cellbio@incras.ru;

ИНН 7802030531, КПП 780201001
УФК по г. Санкт-Петербургу (Отдел № 3, ИНЦ РАН), л/с
20726Ц41010, Северо-Западное ГУ Банка России
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

УТВЕРЖДАЮ:
Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт цитологии
Российской академии наук, чл.-корр. РАН

[redacted] А.Н.Томилин
[redacted] 2020 г.

09.10.2020 № 12316-662-295
На № от

ОФИЦИАЛЬНЫЙ ОТЗЫВ

Института цитологии РАН о научной и практической ценности диссертации Ульяны Владимировны Шевченко на тему «Актин из запирательных мышц мидии Грея *Crenomytilus grayanus*: особенности очистки и взаимодействия с тропомиозином и миородом», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность исследования

Сокращение мышц основано на взаимодействии двух основных сократительных белков, миозина и актина, и множества актин- и миозин- связывающих белков, которые регулируют организацию и свойства сократительных систем. Свойства основных и состав регуляторных сократительных белков в разных сократительных системах различны, и именно эта вариабельность может определять функциональные свойства систем и их отличие друг от друга. Поэтому одной из важнейших проблем биологической подвижности является изучение состава и свойств сократительных белков и сопоставление этих свойств с физиологическими и структурными особенностями тех мышечных клеток, в которых они синтезируются. Гладкие мышцы обладают специфической способностью находиться в таком состоянии, при котором высокое и длительное механическое напряжение поддерживается при очень низких затратах энергии, определяемом уровнем гидролиза АТФ. Такое состояние известно в гладких мышцах позвоночных как latch, и особенно ярко выражено в гладких мышцах моллюсков (запирательный тонус, или catch). Ранее механизмы этого явления на молекулярном уровне связывали с присутствием в гладких мышцах моллюсков белка

парамиозина. Исследования последних лет выявили ряд других белков гладких мышц моллюсков, свойства которых позволяют предположить участие этих белков в процессе запирательного тонуса. Предполагается также, что регуляторную роль в запирательном тонусе могут играть специфические изоформы сократительных белков, характерные для гладких мышц, в том числе мышц моллюсков. К сожалению, при изучении механизмов сокращения мышц беспозвоночных животных это обстоятельство не всегда учитывается, и исследования проводятся на так называемых *гибридных моделях*, состоящих из собственного миозина данной сократительной системы и актина скелетных поперечно-полосатых мышц позвоночных животных. В первую очередь это связано с отсутствием метода получения актина из гладких мышц беспозвоночных животных, к которым не применимы методы выделения актина из скелетных мышц. Поэтому работа У. В. Шевченко, направленная на разработку метода выделения актина из гладких мышц моллюсков и создания негибридной модели для изучения механизмов запирательного тонуса, актуальна и чрезвычайно важна для понимания молекулярных механизмов работы гладких мышц моллюсков.

В ходе выполнения работы У.В. Шевченко были оптимизированы основные этапы прямого выделения фибриллярного актина (F-актина) из гладких мышц мидии *Crenomytilus grayanus* и разработана оригинальная методика получения нативного глобулярного актина, методов получения которого ранее не существовало. Это позволило впервые сравнить физико-химические и биохимические свойства актина из гладких мышц мидии со свойствами «классического» актина, выделенного из скелетных мышц кролика общепринятым методом. Кроме того, было исследовано взаимодействие F-актина из гладких мышц мидии и скелетных мышц кролика с тропомиозином в гибридных и негибридных комплексах. Полученные препараты актина мидии были также использованы в негибридных белковых комплексах для изучения взаимодействия миорода с актином мидии и определения зависимости взаимодействия от фосфорилирования миорода.

Эти экспериментальные разработки и результаты их применения открывают широкие возможности для систематического исследования механизмов запирателной функции гладких мышц моллюсков на белковом уровне.

Новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Важнейшим результатом диссертационной работы У.В. Шевченко является разработка оригинальной методики получения хроматографически очищенного препарата актина из гладкой мышцы мидии *Crenomytilus grayanus*, что принципиально важно для создания негибридной модели запирательной функции гладких мышц моллюсков и изучения механизмов взаимодействия белков сократительного аппарата, обеспечивающих эту функцию. Разработанная методика выделения актина может оказаться удобным инструментом для выделения актина из мышц другого типа и, немышечных систем.

В ходе работы была подобрана комбинация биохимических процедур, включающих присутствие АТФ и пирофосфата натрия, которые приводили к диссоциации поверхностных белков тонкой нити и получению препарата F-актина мидии, который сохранял способность к деполимеризации и реполимеризации. Эти результаты позволяют в дальнейшем выделить и сравнить физико-химические свойства актина, выделенного как из гладких и скелетных мышц других моллюсков, так и из гладких мышц позвоночных животных. Так как на основании анализа первичной структуры белка актин скелетных мышц позвоночных и актин моллюсков охарактеризованы как разные изоформы актина, сравнение физико-химических свойств выделенных белков и их взаимодействий с другими белками важно для выявления функциональной роли изоформ актина в мышечном сокращении.

Кроме того, в работе впервые выявлен еще один важный аспект неоднозначности взаимодействия сократительных белков, выделенных из разных мышц. Показано, что гладкомышечный тропомиозин мидии, который, по данным соосаждения, взаимодействует со скелетно-мышечным F-актином, не влияет на вязкость этого актина. Эти данные, интересные с точки зрения изучения свойств, характерных для разных изоформ тропомиозина, еще раз подчеркивают необходимость использования негибридных моделей

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа У.В. Шевченко построена по традиционному плану. Работа изложена на 122 страницах текста и содержит 21 рисунок. Диссертация содержит Введение, и следующие главы "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты" и "Обсуждение", а также Выводы, Список сокращений и список цитируемой литературы, включающий 259 ссылок, из них 245 на иностранном языке.

Во введении автор кратко обосновывает актуальность проблемы, описывает современное ее состояние, определяет цели и задачи исследования, определяет научную новизну, теоретическое и практическое значение полученных результатов, описывает методологию и методы исследования, приводит данные о личном вкладе автора, об апробации работы, публикациях, структуре и объеме диссертации. Кроме того, во введении приведены положения, выносимые на защиту, и приводится оценка степени достоверности полученных результатов.

Обзор литературы состоит из 4 разделов, в первом из которых приведена общая информация о мышечной подвижности и обсуждается соответствие теории "скользящих нитей" и предполагаемых механизмов запирательного тонуса, как исключения из неё. Второй раздел «Белки тонких и толстых нитей» включает достаточно подробные данные о белках тонких нитей, актине и тропомиозине, а также о белках толстых нитей, миозине, миороде и твичине. Третий раздел обзора литературы посвящен описанию особенностей функционирования гладких запирательных мышц моллюсков, а существующии в настоящее время гипотезы реализации -механизма запирательного тонуса (catch-сокращения)

подробно описаны в четвертом разделе диссертации. В заключение этого раздела, автор подчеркивает, что способность к запирательной функции может быть интегральным свойством сократительного аппарата мышцы-замыкателя, которое складывается из взаимодействия многих белков сократительного аппарата мышечной клетки. Предполагается, что запирательный тонус может быть результатом совместного эффекта трех независимых систем: твитчин-актиновой, миород-актиновой и кальпонин-актиновой. В этой связи, основная задача диссертационной работы – разработка метода выделения актина из запирательных мышц мидии для исследования его роли в catch-сокращении, представляется принципиально необходимой.

В разделе «Материалы и методы» автор описывает выделение сократительных белков из запирательных мышц мидии и скелетных мышц кролика, а также методику реконструкция моделей, состоящих из основных и регуляторных белков сократительного аппарата мидии. Описаны также биохимические методы (гель-фильтрация, ДСН-электрофорез в полиакриламидном геле, фосфорилирование миорода, определение Mg^{2+}-АТФазной активности миозина) и физико-химические методы (вискозиметрия, высокоскоростное осаждение белковых комплексов, светорассеяние, полимеризация лиофилизированного G-актина мидии и электронная микроскопия)

В разделе «Результаты» подробно описана разработанная автором методика получения глобулярной формы актина из запирательных мышц двустворчатых моллюсков. Оригинальный метод основан на обработке нитей актина растворами 5 мМ АТФ и 5 мМ пирофосфата натрия, что при последующем повышении ионной силы раствора до 0.6 М хлористого калия приводило к полной диссоциации *известных* актин-связанных поверхностных белков. В отличие от исходного F-актина, полученный препарат обратимо деполимеризуется и может быть использован как в комплексах с актин-связанными белками, так и для сравнения его свойств с другими изоформами актина. В разделе «Обсуждение» обсуждается сходство гладкомышечного актина из запирательной мышцы мидии с актином скелетных мышц колика и высказывается предположения о том, что выявленные в работе незначительные различия между этими актинами могут быть связаны с влиянием актин-связывающихся «концевых» белков типа белка CapZ. Кроме того, обсуждаются полученные в работе данные, подтверждающие, что для выявления механизмов запирательного тонуса гладких мышц необходимо использовать только негибридных модели, состоящие из белков исследуемой мышцы. Выводы адекватны полученным результатам и не вызывают сомнений.

Замечания.

Работа выполнена на высоком научном уровне, и замечания связаны не с ее результатами, а с неточностями в обзоре литературы и интерпретации некоторых полученных результатов.

1) Не понятно, почему автор описывает сокращение гладких мышц мидии как исключение из «теории скользящих нитей». Хотя теория скользящих нитей рассматривает взаимодействие толстых (миозиновых) и тонких (актиновых) нитей в саркомере скелетных мышц, такое же взаимодействие обеспечивает сокращение гладких мышц, а запирательный тонус – это состояние, поддерживающее мышцы в сокращенном состоянии.
2) Поскольку темой диссертационной работы является разработка метода получения актина гладкой мускулатуры и исследование его свойств, хотелось бы в литературном обзоре увидеть раздел, посвященный выделению разных изоформ актина и сравнению их физико-химических свойств.
3) Не понятно, почему присутствие концевого фактора не выявлялось при электрофорезе препаратов. Не было ли попыток увеличить концентрацию этих факторов с помощью лиофильной сушки соответствующих препаратов и изменения концентрации геля при электрофорезе?
4) В работе все сравнения гладкомышечного и скелетного актинов проведены в присутствии ионов магния. Интересно, будут ли различаться свойства этих актинов, если в растворе присутствуют только ионы кальция? Были ли такие эксперименты? Если такие эксперименты не проводились, их было бы интересно провести.

Заключение

Диссертационная работа Ульяны Владимировны Шевченко «Актин из запирательных мышц мидии Грея *Crenomytilus grayanus*: особенности очистки и взаимодействия с тропомиоизином и миородом» является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методическом уровне. Полученные результаты оригинальны и представляют значительный интерес для сравнения физико-химических свойств разных, изоформ актина, их взаимодействия с актин-связывающими белками и роли в механизмах биологической подвижности.

Диссертационная работа «Актин из запирательных мышц мидии Грея *Crenomytilus grayanus*: особенности очистки и взаимодействия с тропомиоизином и миородом» соответствует основным квалификационным критериям (пункты 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г №832, а ее автор, Шевченко Ульяна Владимировна, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв подготовлен главным научным сотрудником Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии РАН, профессором Ю.С. Боровиковым и ведущим научным сотрудником Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН С.Ю. Хайтлиной. Отзыв обсужден и утвержден на научном семинаре Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности 8 октября 2020 г., Протокол №20-8.

Боровиков Юрий Сергеевич
доктор биологических наук, профессор
Главный научный сотрудник Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Института цитологии РАН

Хайтлина София Юрьевна,
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Лаборатории цитологии одноклеточных организмов Института цитологии РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии Российской академии наук(ЦИН РАН),
194064 Санкт-Петербург,
Тихорецкий пр., 4
Электронный адрес: cellbio@incras.ru

Хайтлиной С.Ю.
Боровикова Ю.С.
Заверяю 09.10.2020