

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **СИРЕНКО ВЛАДИМИРА ВЛАДИМИРОВИЧА**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 29 января 2016 года, № 202/381

О присуждении **СИРЕНКО ВЛАДИМИРУ ВЛАДИМИРОВИЧУ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация «**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИН-МИОЗИНОВОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАЛЬПОНИНОПОДОБНЫМ БЕЛКОМ МИДИИ ГРЕЯ**»

По специальности 03.03.04 - "Клеточная биология, цитология, гистология"

Принята к защите 16.10.15г., протокол № 200/379^б Диссертационным советом

Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, адрес: Тихорецкий пр., д.4, Санкт-Петербург 194064, Россия, утвержден приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012г.

Соискатель Сиренко Владимир Владимирович, 1961 года рождения, в 1990 году окончил биологический факультет Ленинградского Государственного Университета им. А. А. Жданова по специальности «биология» по профилю специализации «биолог-биохимик». Диссертация выполнена в порядке прохождения соискательства с 27.04.2012 г. по 31.03.2013 г. в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН.

Работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2010 года в Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности, с июля 2015 года и по настоящее время Владимир Владимирович является научным сотрудником.

Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярных основ клеточной подвижности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Научный руководитель:

Боровиков Юрий Сергеевич, доктор биологических наук (специальность 03.03.04 - «Клеточная биология, цитология, гистология»), профессор, заведующий Лабораторией молекулярных основ клеточной подвижности Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. Кулева Надежда Владимировна, доктор биологических наук (по специальности 03.01.04 – «Биохимия» и 03.01.02 – «Биофизика»), профессор кафедры биохимии Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург.

2. Левицкий Дмитрий Иванович, доктор биологических наук (по специальности 03.01.04 – «Биохимия»), профессор, заведующий Лабораторией структурной биохимии белка Института биохимии им. А. Н. Баха РАН при Федеральном исследовательском центре "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук, г. Москва.

- дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва) в своем положительном отзыве (заключение составлено руководителем лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктором биологических наук В.П.

Ширинским и утверждено директором Института экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ д.м.н., С.Н. Терещенко) **указала, что** диссертационная работа полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 - «клеточная биология, цитология, гистология», и

- дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ по теме диссертации, из них 4 статьи (2 п.л.) в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 5 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1.Сиренко В.В., Симонян А.О., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. 2012. 40 кДа-белок тонких нитей мидии ингибирует формирование сильных форм связывания миозина с актином в цикле гидролиза АТФ. Биохимия. 77 (8): 1080–1088. Статья посвящена исследованию мобильности и пространственной ориентации 40 кДа-белка тонких нитей мидии, введенного в скелетно-мышечное теневое волокно и влиянию этого белка на ориентацию и подвижность головки миозина (SH1-спирали миозина) на разных стадиях АТФазного цикла, которые моделировали с помощью нуклеотидов MgADP и MgATP. Установлено, что 40 кДа актин-связывающий белок мидии, по-видимому, располагаясь ближе к центру тонких нитей, подавляет формирование в мышечном волокне существенных для генерации силы так называемых сильных форм связывания головки миозина с актином.

2.Сиренко В.В., Симонян А.О., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. 2013. 40 кДа-белок тонких нитей мидии изменяет конформацию Ф-актина в АТФазном цикле. Биохимия 78 (3): 364–374.

Статья посвящена исследованию влияния 40 кДа-белка тонких нитей мидии на те конформационные изменения Ф-актина, модифицированного флуоресцентными зондами 1,5-IAEDANS и FITC-фаллоидином, которые происходят при связывании субфрагмента-1миозина (S1) как в отсутствие нуклеотидов, так и в присутствии MgADP или MgATP. Установлено, что при моделировании различных промежуточных состояний актомиозина, ориентация и подвижность осцилляторов красителя изменяются дискретно, указывая на многоступенчатое изменение конформации актина в цикле гидролиза АТФ. Установлено, что 40 кДа-белок оказывает влияние на ориентацию и подвижность флуоресцентных зондов, заметно подавляя изменения их ориентации в отсутствие нуклеотида и в присутствии MgADP, но усиливая эти изменения в присутствии MgATP. Предполагается, что 40 кДа-белок препятствует формированию сильной формы связывания миозина с актином в отсутствие нуклеотидов и в присутствии MgADP, но пытается усилить это связывание в присутствии MgATP.

3. Сиренко В.В., Симонян А.О., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. 2014. Модуляция конформации субфрагмента-1 миозина (S-1) и ингибирование S-1-АТФазы кальпонином мидии. Цитология 56 (10): 763–769.

Статья посвящена исследованию недавно идентифицированного кальпонины мидии *Crenomytilus grayanus* на ингибирование актин-активируемой АТФазы и изучено его влияние на конформационные изменения головки миозина при моделировании различных стадий АТФазного цикла. Установлено, что кальпонин мидии ингибирует АТФазу субфрагмента-1 миозина (S1) кролика. Ингибирование достигает 80 % в случае соотношения кальпонины к актину 1 : 2. Также было установлено, что кальпонин модулирует конформацию S1 таким образом, что ингибирует формирование сильных форм связывания (стадия А• М и А• М•АДФ) между S1 и актином, переводя их в слабую форму связывания, и не оказывает влияния на слабосвязанное состояние (стадия А• М•АДФ • Фн) в глицеринизированных одиночных мышечных волокнах.

4. Сиренко В.В., Добржанская А.В., Шелудько Н.С., Боровиков Ю.С. 2016. Кальпониноподобный белок мидии является конкурентным ингибитором для актомиозиновой АТФазы. Биохимия 81 (1): 85–91.

Статья посвящена исследованию механизма ингибирования кальпониноподобным белком мидии (Cap) актин-активируемой АТФазы субфрагмента-1 миозина (S1). Были определены кинетические параметры V_{\max} и K_{ATPase} актомиозиновой АТФазы в отсутствие и в присутствии Cap. Показано, что Cap вызывает увеличение значения K_{ATPase} и не изменяет значения параметра V_{\max} , т.е. является конкурентным ингибитором актомиозиновой АТФазы. Анализ параметров V_{\max} и K_{ATPase} в присутствии тропомиозина, показал, что последний ингибирует актомиозиновую АТФазу по неконкурентному типу.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Главного научного сотрудника Лаборатории структурной биохимии белка ФГБУН «Институт биохимии им. А.Н. Баха» ФИЦ «ФОБ» РАН, Лауреата Государственной премии СССР, Заслуженного деятеля науки РФ, профессора, доктора химических наук по специальности 02.00.15 – «Кинетика и катализ» **Курганова Бориса Ивановича**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Старшего научного сотрудника Лаборатории физиологии и патофизиологии плода ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта", доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия» **Прокопенко Валентины Михайловны**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Ведущего научного сотрудника Лаборатории нейроэндокринологии, заместителя директора по науке ФГБУН «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН, доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология» **Рыбниковой Елены Александровны**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. И.о. заведующего Лаборатории структуры и функций мышечных белков ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» РАН, доктора биологических наук по специальности 03.01.02 – «Биофизика» **Вихлянцева Ивана Милентьевича**. Отзыв положительный, без замечаний.
5. Ведущего научного сотрудника Лаборатории биологической подвижности ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, доктора биологических наук по специальности 03.03.01 – «Физиология» **Никитиной Ларисы Валерьевны**. Отзыв положительный, без замечаний.

6. Ведущего научного сотрудника Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия» **Мандельштама Михаила Юрьевича**. Отзыв положительный, без замечаний.
7. Заведующей отделом лабораторной диагностики, главного научного сотрудника ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А. М. Никифорова» МЧС России, доктора биологических наук по специальности 14.03.10 – «Клиническая лабораторная диагностика» **Зыбиной Натальи Николаевны**. Отзыв положительный, без замечаний.
8. Профессора кафедры биохимии биологического факультета МГУ, доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия» **Гусева Николая Борисовича**. Отзыв положительный, имеются вопросы, пожелания и замечания.

«...было бы крайне желательным привести сведения о том, какой уровень модификации был достигнут в каждом конкретном случае и насколько специфичным было проведенное мечение. Мне не очень понятно, как можно говорить о параллельной или перпендикулярно ориентации кальпониноподобного белка, не обсуждая его форму, и утверждать, что данные коседиментации свидетельствуют о том, что исследуемый белок располагается параллельно оси актинового филамента. Вероятно, этот раздел следовало изложить более подробно и ясно. Вероятно, в будущем представляется целесообразным использовать метод коседиментации для определения параметров связывания немодифицированного белка с актином. Вероятно, имело смысл привести подробные условия связывания кальпониноподобного белка с актином и в будущем проанализировать возможное влияние исследуемого белка на пучкование нитей актина. Мне кажется, что нельзя признать полностью приемлемой такую постановку опыта. В описываемых опытах концентрация исследуемого белка была фиксированной и составляла 4 мкМ, а концентрация актина варьировала от 0 до 30 мкМ. Вследствие этого в разных точках графиков, представленных на рис.7 и 8 автореферата, соотношение актин/исследуемый белок варьировало и только для первой точки рис.7 было близко к насыщающей. В силу этого условия проведения опыта были существенно различными, что делает крайне затруднительным их корректное сравнение. Кроме того, кривые, представленные для Сар и тропомиозина на рис.7, различаются только в одной точке и полностью совпадают для трех других экспериментальных точек.

Все это делает крайне сомнительным утверждение о том, что механизм ингибирующего действия тропомиозина отличается от механизма ингибирующего действия кальпониноподобного белка. Анализируя автореферат диссертации, можно прийти к выводу, что, несмотря на высказанные замечания, работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присвоения искомой степени».

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук **С.Ю. Хайтлина**, член Совета

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается

высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной биологии, в частности исследования структурно-функциональных особенностей мышечных белков и регуляторных механизмов мышечного сокращения, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана научная концепция молекулярного механизма ингибирования кальпониноподобным белком мидии актин-миозинового взаимодействия в мышце;

предложены оригинальные суждения о том, что кальпониноподобный белок мидии Грея участвует в регуляции актин-миозинового взаимодействия;

доказано, что молекулярный механизм ингибирования актин-миозинового взаимодействия в гладкой мышце изменился в процессе эволюции от беспозвоночных к позвоночным животным;

введены новые представления о вкладе тропомиозина в регуляцию актин-миозинового взаимодействия: он не блокирует это взаимодействие механически, а подавляет способность актина активировать АТФазу миозина.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказан молекулярный механизм ингибирования актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком мидии, заключающийся в ослаблении сильной формы связывания между актином и миозином из-за стерического блокирования кальпониноподобным белком этого взаимодействия;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных методов биохимии, биофизики и цитологии, включающих выделение одиночного мышечного волокна, очистку белков, коседиментацию, электрофорез, измерение АТФазной активности, поляризационную микрофлуориметрию, а также методы статистической обработки данных;

изложены новые экспериментальные факты, раскрывающие конформационные изменения, претерпеваемые головками миозина и актиновой нитью под действием кальпониноподобного белка в процессе моделирования основных стадий АТФазного цикла;

раскрыты особенности ингибирования актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком, состоящие в том, что кальпониноподобный белок при связывании с Φ -актином делает актиновую нить более жесткой, уменьшает амплитуду вращения субдомена-1 актина при переходе от слабого к сильному связыванию между актином и миозином и конкурирует с субфрагментом-1 миозина за участок сильного связывания головки миозина на актине. Показано, что ингибирование кальпониноподобным белком АТФазной активности головки миозина связано с ослаблением сильных форм связывания миозина с актином ($A \cdot M$ и $A \cdot M \cdot AДФ$).

изучен тип ингибирования кальпониноподобным белком актин-миозинового взаимодействия. Расчет кинетических параметров АТФазной активности актомиозина в условиях связанного с актином кальпониноподобного белка в насыщающей концентрации показал, что последний ингибирует эту активность, увеличивая значение $K_{АТФase}$ и незначительно уменьшая V_{max} , что указывает на конкурентный тип ингибирования;

проведено сравнение типов ингибирования актин-миозинового взаимодействия, осуществляемых кальпониноподобным белком и тропомиозином. У последнего, в отличие от кальпониноподобного белка, тип ингибирования оказался неконкурентным. Сравнение ингибирующих свойств гладкомышечного кальпониона и кальпониноподобного белка показало, что кальпонин не влияет на актомиозиновое взаимодействие, а тормозит изомеризацию головки миозина, тогда как кальпониноподобный белок существенно увеличивает $K_{АТФase}$ и незначительно уменьшает значение V_{max} . Это свидетельствует о том, что в процессе эволюции

изменился тип ингибирования актин-миозинового взаимодействия кальпониноподобным белком.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработаны и внедрены в практику научного исследования способы определения типа ингибирования АТФазной активности с использованием кинетических параметров V_{\max} и K_{ATPase} ;

определены перспективы возможного практического применения результатов исследования: знание механизма, которым кальпониноподобный белок мидии ингибирует актомиозиновую АТФазу, облегчит на практике решение вопроса о молекулярном механизме кэтч-состояния, развиваемого запирающей мышцей двустворчатых моллюсков.

создана модель эффективного применения знаний и методик из разных областей биохимии и биофизики для решения задач по выяснению молекулярных механизмов регуляции актин-миозинового взаимодействия;

представлены методические рекомендации на примере метода коседиментации, позволяющие обходиться без сканера для гелей, простым измерением на спектрофотометре;

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ результаты, полученные методом поляризованной флуоресценции, характеризуются особой точностью и воспроизводимостью, выбор использованных методов сочетает подходы, обоснованные спецификой работы в духе современной тенденции изучения традиционных объектов клеточной биологии на молекулярном уровне и соответствуют поставленным в работе задачами, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных;

теория о том, что ингибирование актин-миозинового взаимодействия затрагивает сильную форму связывания между головками миозина и актиновой нитью, подтвердилась и на примере кальпониноподобного белка мидии;

идея базируется на прочно установленном факте, что именно с сильносвязанной формой актин-миозина связана силу продуцирующая фаза в сокращающейся мышце;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике, но нужно подчеркнуть, что механизм ингибирования у кальпониноподобного белка был исследован впервые, поэтому сравнение возможно только с гомологом этого белка у позвоночных;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике и расширяют круг представлений, относящийся к теме диссертации;

использованы адекватные, порой нестандартные экспериментальные подходы и общепринятые методы статистической обработки результатов (с использованием компьютерных программ Microsoft Excel и Graph Pad Prism).

Личный вклад соискателя состоит в:

непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации экспериментальных данных, полученных с помощью современных методов. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и зарубежных научных конференциях и во всех опубликованных по теме диссертации статьях стоит первым автором.

Диссертация посвящена выявлению молекулярных механизмов ингибирования кальпониноподобным белком мидии Грея актин-миозинового взаимодействия в мышечном волокне – классическом объекте мышечной биологии – и является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной биологии, полностью отвечающим требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

На заседании 29 января 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить **СИРЕНКО Владимиру Владимировичу** ученую степень кандидата биологических наук по специальности «Клеточная биология, цитология, гистология» (03.03.04).

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 19 человека, из них 11 по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, проголосовали:

«ЗА» 19, «ПРОТИВ» НЕТ, недействительных бюллетеней НЕТ.

Председатель

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

доктор биологических наук, профессор



А. Л. Юдин

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

кандидат биологических наук

Е. В. Каминская

« 01 » февраля 2016 г.