

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Лапашиной Анны Сергеевны
на тему: «Особенности и физиологическая роль ингибирования
АТФазной активности протонной АТФ-синтазы магниевым комплексом
АДФ»
по специальности 03.01.04 – «Биохимия»

Актуальность. Диссертационная работа А.С. Лапашиной посвящена изучению протонной F_0F_1 -АТФ-синтазы, одного из ключевых компонентов, обеспечивающих энергетический гомеостаз как прокариотических, так и эукариотических клеток. Основная работа АТФ-синтазы заключается в катализе преобразования АДФ в АТФ за счет разности электрохимического потенциала протонов (а иногда – ионов Na^+) на мембранах митохондрий, хлоропластов или цитоплазматической мембране бактерий. Кроме того, АТФ-синтаза способна самостоятельно генерировать электрохимический потенциал за счет энергии гидролиза АТФ, работая, таким образом, в обратном направлении.

В зависимости от образа жизни организма основная роль АТФ-синтазы заключается либо в АТФ-зависимом поддержании электрохимического потенциала (анаэробные микроорганизмы), либо в потенциалзависимом синтезе АТФ (аэробные микроорганизмы, митохондрии, хлоропласты). Способность белка с высокой эффективностью катализировать эти противоположные процессы подразумевает тонкую систему регуляции его активности, учитывающую особенности метаболизма клетки. Наиболее распространенным является неконкурентное ингибирование АТФазной активности комплексом Mg -АДФ. В работе А.С. Лапашиной подробно исследуются молекулярные механизмы, физиологическая роль такой системы регуляции активности АТФ-синтазы, структурные особенности

АТФ-синтазы, приводящие к адаптации организмов к разным условиям существования.

Структура работы. Диссертация А.С. Лапашиной изложена на 153 страницах и имеет традиционную структуру, включающую Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список публикаций по теме диссертации, Список цитируемой литературы, состоящий из 375 ссылок на оригинальные источники. Работа написана грамотным научным языком, проиллюстрирована 37 рисунками и содержит 6 таблиц.

В разделе «Введение» рассмотрены актуальность и степень разработанности темы исследования, сформулированы цели и задачи работы, приведена необходимая информация относительно научной новизны и практической значимости результатов исследования, представлены положения, выносимые на защиту, приведены прочие необходимые сведения.

Обзор литературы производит очень благоприятное впечатление. Автором подробно описано современное состояние проблематики, относящейся к теме диссертационного исследования, включая как общие данные о строении и принципах работы АТФ-синтаз в разных организмах, так и глубокую проработку известных способов регуляции этого фермента. Обзор литературы довольно объемный (63 страницы), отлично структурирован, не вызывает сколь-либо существенных замечаний и позволяет оценить вклад диссертанта в проблематику, связанную с АДФ-ингибированием.

Раздел «Материалы и методы» содержит комплекс современных биоинформатических подходов и широкий спектр применяемых методов генной инженерии, микробиологии и биохимии. Набор методов полностью соответствует поставленным задачам. Огромным преимуществом является выбор адекватных модельных микроорганизмов, и применение нескольких независимых методов измерения АТФазной активности. К незначительным

замечаниям можно отнести недостаточно четкое описание методики электропорации бактерий *E. coli* и *B. subtilis*.

В разделе «Результаты и обсуждение» автором представлены и разобраны полученные им экспериментальные данные, включающие создание выборки и поиск аминокислотных остатков, потенциально ответственных за различия в регуляции АТФазной активности АТФ-синтазы в разных микроорганизмах, последовательное исследование находок и глубокое исследование роли и механизма работы аминокислотного остатка β L249, участие которого в АДФ-ингибировании экспериментально подтвердилось. Раздел информативен и отлично проиллюстрирован. Следует отметить, что автором не только убедительно доказано ключевое значение найденного аминокислотного остатка в определении механизма, по которому происходит АДФ-ингибирование АТФазной активности АТФ-синтазы, но и получены разные мутанты одного организма с принципиально разной стратегией АДФ-ингибирования, а также обоснована физиологическая роль существования таких стратегий.

В разделе «Заключение» обобщены основные результаты исследования, обозначена значимость проведенной работы для понимания механизмов регуляции АТФ-синтазы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций. 3 положения, выносимых на защиту и 3 вывода полностью обоснованы, лаконичны и отражают суть полученных результатов.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. В работе применялись современные методы. Аналитические подходы предварительно валидировались в модельных системах, что подробно описано в диссертации, а все измерения проводились в многократной повторности.

Научная новизна исследования состоит прежде всего в выявлении аминокислотного остатка, кардинально влияющего на стратегию АДФ-ингибирования АТФазной активности АТФ-синтазы, а также в том, что

впервые была доказана его роль и сам принцип выбора стратегии ингибирования АТФ-синтазы для микроорганизмов с разной организацией метаболизма.

Практическая значимость. Поскольку множество паразитических микроорганизмов приспособлено к анаэробным условиям среды, их роторные АТФ-синтазы, по-видимому, кардинально отличаются от АТФ-синтаз человека и животных, что делает эти белки перспективной мишенью для антибактериальной терапии. Данная работа объясняет одно из таких кардинальных отличий, которое наверняка может быть использовано при разработке лекарственных средств.

Замечания к работе.

В Рис. 6.4 (сравнение АТФазной активности мембранных частиц *E. coli* с АТФ-синтазой дикого типа и β F139Y) не хватает оценки значимости различия в относительной скорости гидролиза АТФ при добавлении смеси 750 мкМ АТФ + 250 мкМ АДФ к мембранным частицам. Для графика без доп. добавок скорости гидролиза отличаются незначительно.

Рисунок 6.11 (измерение скорости синтеза АТФ мембранными частицами *E. coli*), по-видимому, имеет неправильную подпись оси ординат, и измерялась не интенсивность люминесценции, а общее количество света, испускаемого в течение опыта.

В качестве калибровочных добавок на рис. 6.11, по-видимому, добавляли АДФ, а не АТФ, поскольку иначе добавки сами по себе вызывали бы люминесценцию.

Для опытов, отраженных на рис. 6.20 (Смешанное выращивание разных штаммов *B. subtilis*) стоило сделать контроль с мутантом, имеющим точечную замену, не приводящую к изменениям в степени АДФ-ингибирования АТФазной активности АТФ-синтазы, чтобы оценить эффект генноинженерных манипуляций на выживаемость культуры.

Вопросы к работе.

Насколько оправданным является использование в опытах по закислению среды АДФ в концентрациях 250 и 600 мкМ? встречаются ли в микроорганизмах такие концентрации в природе?

Является ли линейной зависимость скорости гидролиза АТФ от количества добавленных F_1 -частиц или протеолипосом, нормированных на общий белок?

Различались ли условия в экспериментах, отраженных на рис. 6.3 и 6.14?

Вместе с тем, указанные замечания являются незначительными и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 – «Биохимия» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лапашина Анна Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

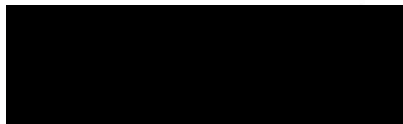
Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
научный сотрудник лаборатории биоэнергетики
Федерального государственного учреждения «Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»

РОГОВ Антон Геннадьевич

10 июня 2021 г.

Контактные данные:



Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.04 – Биохимия

Адрес места работы:

119071, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2,
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии
наук», лаборатория биоэнергетики
тел.: +7 (495) 954-52-83
e-mail: info@fbras.ru

Подпись к.б.н. А.Г. Рогова удостоверяю:

