

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 выбранной темы:

Анна Сергеевна выбрала темой своей диссертационной работы исследование бактериальной АТФ-синтазы – важнейшего фермента биоэнергетики клетки. Для многих бактерий, среди которых есть и клинически важные патогенные виды, данный фермент является жизненно необходимым. В связи с распространением в последние десятилетия патогенных штаммов бактерий, резистентных к имеющимся антибиотикам, исследования по поиску мишеней для новых антибиотиков является одной из актуальнейших задач современной биологии. АТФ-синтаза является одним из перспективных вариантов такой мишени, т.к. между ферментами патогенных бактерий и митохондриальной АТФ-синтазой человека есть ряд структурных и функциональных отличий. Исследование этих отличий – один из шагов на пути к разработке новых специфических ингибиторов бактериальных АТФ-синтаз; в дальнейшем такие ингибиторы могут стать действующими веществами новых антибиотиков. Один такой пример уже существует – в ходе исследований АТФ-синтазы туберкулезной палочки был найден специфический ингибитор фермента, который затем был введен в клиническую практику как противотуберкулезный препарат бедаквилин.

Помимо прикладных аспектов, выбранная тема актуальна и в плане фундаментальной науки: прояснение механизмов регуляции АТФ-синтазы

бактерий важно для понимания биологии микроорганизмов, их взаимоотношений в живой природе и реакций на различные изменения окружающей среды.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Эксперименты, описанные в диссертации, грамотно спланированы и выполнены, а их результаты корректно проанализированы. Степень обоснованности полученных результатов и выводов не вызывает каких-либо сомнений.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Работа выполнена на высоком профессиональном уровне, с использованием современных методов биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии и микробиологии. До выполнения исследований, описанных в диссертации, было неизвестно, какие структурные особенности АТФ-синтазы кишечной палочки отвечают за подавление АТФазной активности фермента фосфатом; также автором впервые продемонстрирована роль АДФ-ингибирующая АТФ-синтазы *in vivo*. Помимо этого, данная работа выявила аминокислотный остаток в каталитической субъединице АТФ-синтазы, который в значительной степени определяет выраженность АДФ-ингибирования.

На основе обширного экспериментального материала автором были сформулированы три вывода, которые полностью отражают результаты работы и соответствуют поставленным задачам. Достоверность выводов сомнений не вызывает.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации.

Как было сказано выше, в разделе об актуальности работы, результаты, описанные в диссертации, имеют значение, как в научном, так и в практическом плане. Полученные автором данные открывают новые особенности регуляции АТФ-синтазы бактерий, а также показывают участие конкретных аминокислотных остатков в этой регуляции. Эта информация является важной для дальнейших работ в области поиска и дизайна новых специфических ингибиторов бактериальных АТФ-синтаз. Кроме того, более глубокое понимание механизма регуляции этого фермента может оказаться полезным в биотехнологии для получения новых штаммов микроорганизмов-продуцентов с более эффективным энергообменом, чем у бактерий дикого типа.

Содержание диссертации, ее завершенность.

Диссертационная работа изложена на 153 страницах, содержит разделы Введение, Обзор литературы; Материалы и методы; Результаты и обсуждение; Заключение; Выводы; список литературы содержит 375 работ. Диссертация хорошо проиллюстрирована и содержит 37 рисунков. Диссертация имеет завершенный характер и обладает внутренним единством.

Введение кратко, но информативно описывает историю вопроса и обоснование актуальности работы.

В Обзоре литературы изложены подробные сведения о структуре и функции АТФ-синтаз бактерий, хлоропластов и митохондрий. Обзор написан хорошим языком и читается с интересом. Обширный фактический материал грамотно подкреплён ссылками на литературу и проиллюстрирован различными схемами. В качестве минорного замечания

можно отметить, что приведение экспериментов по вращению *c*-кольца при гидролизе АТФ бактериальным ферментом в экспериментах на единичных молекулах (стр.36) не совсем корректно приводить как доказательство ротационного механизма ионного транспорта, т.к. в этих экспериментах нет никаких данных о том, что такой транспорт происходит (мембрана отсутствует).

Материалы и методы изложены достаточно подробно для того, чтобы повторить любой из представленных экспериментов. Методический арсенал современен и широк.

В разделе Результаты и обсуждение автор начинает с объяснения логики выбора аминокислотных остатков, которые затем подвергались мутагенезу с целью прояснения механизма АДФ-ингибирования. На рис. 6.1 приведено множественное выравнивание последовательностей каталитических субъединиц бета из разных организмов; в некоторых позициях в этом выравнивании («полуконсервативные позиции») стоят аминокислотные остатки двух типов, и эти позиции автор выбирает как потенциальных кандидатов на регуляторную роль. Однако непонятно, чем обусловлен выбор именно этих организмов для построения выравнивания.

Затем автор переходит к исследованию роли остатков F139, F189 и V319 субъединицы β в АДФ-ингибировании (их роль оказалась невелика), после чего идет наиболее важный раздел диссертации, посвященный роли остатка β L249 в АДФ-ингибировании и его модуляции фосфатом. В заключительной части работы автор описывает эксперименты по исследованию роли этого остатка в клетках сенной палочки; на основании того, что штамм с мутацией, ослабляющей АДФ-ингибирование, уступает при конкурентном выращивании штамму дикого типа, делается вывод о роли АДФ-ингибирования *in vivo*. Однако следует отметить, что нельзя исключить, что введенная мутация имела еще какие-то другие побочные эффекты, не обнаруженные автором, и именно они, а не ослабление АДФ-

ингибирования, привели к снижению приспособленности мутантного штамма.

В целом, данный раздел написан хорошо и подробно, с логичным, уместным и информативным обсуждением результатов, которое подкрепляется многочисленными ссылками на литературные источники.

Работу завершает Заключение, которое в краткой и доступной форме суммирует результаты.

Выводы диссертации и положения, выносимые на защиту, основаны на результатах работы, обоснованы и достоверны.

В целом, диссертационная работа представляет собой завершённое научное исследование, имеющее важное научное и практическое значение. Работа написана в хорошем научном стиле, практически не содержит опечаток, оформлена аккуратно.

Указанные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. А.С. Лапашиной проделана большая и трудоемкая работа, и 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:

Доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории нанофотоники
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н.
Семенова Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН)

ЧЕРЕПАНОВ Дмитрий Александрович



11 июня 2021 г.

Контактные данные:



Специальность, по которой официальным оппонентом
защита диссертация:

03.01.02 – Биофизика

Адрес места работы:

119991, Москва, ул. Косыгина, д. 4
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный
исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова
Российской академии наук (ФИЦ ХФ РАН)
лаборатория нанофотоники
Тел.: +7 499 137-66-76; e-mail: icp@chph.ras.ru

Подпись д.ф.-м.н. Д.А. Черепанова удостоверяю .'



*защитил кандидатка отдела кадров
Семенова Е.Н. С.Ф.
11.06.2021*