

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Лапшина Никиты Константиновича «Роль мембранных стеринов в регуляции активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений

53 года назад Сингером и Никольсоном была предложена модель строения биологических мембран. По их представлениям мембрана представляла собой жидкокристаллический двойной слой липидов, в который погружены или находятся на его поверхностях белки, обладающие при этом достаточно высокой латеральной подвижностью. Эта модель была подтверждена экспериментально и продержалась более 25 лет до тех пор, пока не было показано, что биологические мембраны по своему строению гетерогенны и имеют в своем составе структурированные островки-рафты, обогащенные сфинголипидами и стеринами и содержащие разнообразные по функциям белки.  $H^+$ -АТФаза Р-типа - ключевой фермент, создающий источник энергии для транспорта ионов и метаболитов через плазмалемму, была обнаружена как в рафтах, так и в ее жидкокристаллической области. Регуляция ее активности играет колоссальную роль в жизнедеятельности растений и поэтому исследование ее регуляции актуально, поскольку от нее зависит рост и развитие растений, равно как и их устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу.

Диссертационная работа Н.К. Лапшина написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, методической части, описания научных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, состоящим из 201 источников. Материал диссертации изложен на 127 страницах и иллюстрирован 5 таблицами и 23 рисунками. Рецензируемая работа представляет собой экспериментальное исследование, отличающееся актуальностью поставленной проблемы и четкой логикой экспериментальных подходов.

Во введении рассмотрена актуальность темы и сформулированы цели и задачи исследования. Литературный обзор фактически разбит на две части. В первой части литературного обзора рассмотрены особенности строения плазматической мембраны, механизмы биосинтеза сфинголипидов и стеринов. Особое внимание уделено зависимости фазового состояния липидного бислоя от присутствия в нем стеринов. Вся вторая часть литературного обзора посвящена структуре и функциям  $H^+$ -АТФаз Р-типа, к которым относится  $H^+$ -АТФаза плазматической мембраны. Очень подробно рассмотрен механизм регуляции этого фермента путем фосфорилирования его С-концевого домена с

последующим присоединением к нему белков 14-3-3. Диссертантом дан обобщенный анализ данных по влиянию липидного окружения на регуляцию активности  $H^+$ -АТФаз, полученных главным образом на реконструированных протеолипосомах и справедливо отмечается о некорректности переноса результатов этих работ на нативные мембраны. Обзор написан хорошим литературным языком и дает ясное представление о цели и сложности предстоящего исследования. С моей точки зрения диссертационная работа выиграла бы, если бы автор больше внимания уделил различию (если таковые имеются) в свойствах мембранных белков в зависимости от их локализации: в рафтах или в жидкокристаллической части. Кроме этого, основываясь на литературном обзоре в заключительной его части следовало бы подробно изложить цели работы, а не ограничился только перечислением их во введении.

Диссертантом использовано в своей работе 17 методов. Все методы описаны полно и в той же мере достаточно кратко. Замечаний к разделу «Материалы и Методы» не имею и при этом считаю нужным отметить, что такое разнообразие методик, владеющих Н.К. Лапшиным указывает на его хорошие способности как экспериментатора и будут безусловно полезны ему для будущих научных исследований.

Центральная часть диссертационной работы «Результаты и обсуждение». Объекта исследования два: протопласты, выделяемые из листьев растения *Arabidopsis thaliana* и везикулы плазмалеммы, выделенные из корней этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L. На обоих объектах получен практически одинаковый результат: активация  $H^+$ -транспорта при частичной экстракции стеринов при обработке протопластов и везикул метил-бета-циклодекстрином (МВCD). Показанное автором в своей работе отсутствие изменения размера протопластов и везикул при их обработке МВCD свидетельствует в пользу того, что наблюдаемый эффект активации  $H^+$ -АТФазы действительно связан с изменением ее липидного окружения, а не с изменением геометрии объектов. Основываясь на отсутствие эффекта от действия додецил мальтозида на максимальную скорость гидролиза АТФ везикулами плазмалеммы, предварительно обработанными МВCD, диссертант делает вывод о том, что стерины непосредственно контактируют с  $H^+$ -АТФазой в плазмалемме. Однако на мой взгляд такой вывод пока носит предварительный характер и чтобы он стал окончательным, требуются дополнительные исследования.

Одними из наиболее существенных результатов диссертационной работы Н.К. Лапшина по моему мнению является, во-первых, обнаружение им  $H^+$ -АТФазы в сравнительных количествах в детергент-устойчивой (рафт) и солюбилизированной (жидкокристаллической) фракциях плазмалеммы, и во-вторых, отсутствие



перераспределения  $H^+$ -АТФазы между этими двумя фракциями после экстракции из плазмалеммы стерина. Первый указывает на вероятные различия в механизмах регуляции  $H^+$ -АТФазы в зависимости от ее локализации в мембране. Второй - на жесткость структуры рафтов, в которых локализована  $H^+$ -АТФазы. В результате возникает вопрос о влиянии липидного окружения на какую  $H^+$ -АТФазу идет речь, локализованную в рафтах или в жидкокристаллической области мембраны или на обе. Полагаю, что прочность структуры рафтов вместе с наблюдаемой диссертантом отсутствием прямой связи между активацией протонного транспорта на везикулярных препаратах плазмалеммы и возрастанием гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы свидетельствует в пользу того, что действие липидного окружения в большей мере относится к  $H^+$ -АТФазе, локализованной в жидкокристаллической области бислоя.

Очень интересным представляется также результат об олигомеризации  $H^+$ -АТФазы в плазмалемме, полученный с помощью Вестерн-блота белковых полос после нативного электрофореза в присутствии голубого декстрана (BN-PAGE) солюбилизата плазмалеммы, предварительно обработанной додецил мальтозидом (ДДМ). Следует отметить, что этот результат выглядел бы гораздо более выигрышным, если бы диссертантом в соавторстве со специалистами по MS был бы произведен анализ белковых полос. Вероятнее всего наблюдаемые высокомолекулярные полосы на фореze при соотношении детергент белок 5:1 на рис. 17 обусловлены комплексом с другими белками и в таком случае с помощью MS можно было бы определить их природу и в результате установить те из них, которые непосредственно контактируют с  $H^+$ -АТФазой в рафтах. Также полагаю, было бы полезно исследовать методом BN-PAGE обе фракции плазмалеммы по отдельности. В результате можно было бы судить о том, к каким фракциям плазмалеммы относятся димер и тетрамер  $H^+$ -АТФазы.

В диссертации приведены убедительные данные о влиянии стерина на АТФ-зависимый протонный транспорт в везикулах плазмалеммы, что проявляется как в ускорении возникновения разности электрического потенциала на мембранах везикул, так и  $\Delta pH$  при экстракции стерина метил-бета-циклодестрином. Диссертантом также показано, что помимо этого удаление стерина из плазматической мембраны приводит к возрастанию пассивной протонной проницаемости везикул, сопряженной с изменением активности как катионных, так и анионных транспортеров. Обращает на себя внимание различие в концентрационных зависимостях влияния МВCD на скорость АТФ-зависимого и пассивного  $H^+$ -транспорта в везикулах плазмалеммы, с максимумом при 2 мМ МВCD для первой и монотонном росте для второй. Такое расхождение может быть обусловлено

разными причинами, в том числе и различием в локализации  $H^+$ -АТФазы и ионных транспортеров в рафтах и жидкокристаллической фазе плазматической мембраны.

Таким образом, на основе анализа литературных данных и результатов диссертационной работы Н.К. Лапшина можно сделать предварительный вывод о существовании в плазматических мембранах растительной клетки двух систем регуляции активности  $H^+$ -АТФазы: одной, базирующейся на фосфорилировании ее С-концевого домена и другой – на изменении ее липидного окружения. Первая относится вероятнее всего к  $H^+$ -АТФазе в рафтах и быстро отвечает на стрессовые воздействия на растения, вторая более медленная и реагирует на изменение окружающей среды, например, на длительность светового дня, и видимо относится к функционированию  $H^+$ -АТФазы, локализованной в жидкокристаллической области плазмалеммы. Именно этот главный вывод определяет новизну и теоретическую значимость данной диссертационной работы. Полученные данные Лапшина Н.К. представляют и практическую ценность, поскольку могут быть полезны в селекционной работе при получении культурных растений с повышенной устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Материалы диссертации опубликованы в 9 печатных работах, из которых 4 – статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК. Автореферат адекватно отражает содержание диссертации.

Все сказанное выше позволяет мне заключить, что по актуальности, по методическому решению поставленных задач, по объему выполненной работы, по научной новизне и практической значимости диссертационная работа Лапшина Никиты Константиновича отвечает высоким требованиям, предъявляемым кандидатским диссертациям и соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений

#### **Сведения об оппоненте**

Бабаков Алексей Владимирович, доктор биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, профессор

Главный научный сотрудник лаборатории стрессоустойчивости растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийский научно-

исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии Российской академии наук (ВНИИСБ РАН)

Адрес: 127550, Москва, ул. Тимирязевская 42,

Телефон: 8(499) 976-65-44 E-mail: [avb@iab.ac.ru](mailto:avb@iab.ac.ru)

доктор биологических наук,  
профессор

Бабаков Алексей Владимирович

Подпись д.б.н. Бабакова А.В. удостоверяю  
Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ  
к.б.н. Федина Е.И.

М.П.



*Od. 10. 2023*