

ОТЗЫВ официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Лапшина Никиты Константиновича на тему: "Роль мембранных стеринов в регуляции активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений" по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений

H^+ -АТФаза является потенциалгенерирующим ферментом растений и ее активность оказывает влияние на все физиологические функции растительных клеток, включая рост растяжением, апикальный рост, деление, синтез вторичных метаболитов, передачу сигнала. Поэтому понимание молекулярных механизмов, определяющих регуляцию этого фермента является важнейшей задачей. Я считаю, что актуальность исследований, приближающих нас к этой цели не вызывает сомнений. Большую важность представляет изучение липидов плазматической мембраны, взаимодействующих с H^+ -АТФазой и влияющих на ее активность. Такие исследования имеют не только академическое, но и прикладное значение. Работа Лапшина Никиты Константиновича направлена на исследование влияния стеринов плазматической мембраны на активность H^+ -АТФазы, и поэтому тема диссертации Лапшина Н.К. представляется весьма интересной и актуальной.

Диссертация Лапшина Н.К. имеет общий объем в 127 страниц, включая 23 рисунка и 5 таблиц и построена по следующей схеме: «Введение» (5 стр.), «Обзор литературы» (40 стр.), «Материалы и методы» (14 стр.), «Результаты и обсуждение» (39 стр.), «Заключение» (3 стр.), «Выводы» (1 стр.). Список литературы содержит 201 источник, из которых 196 международных изданий на английском языке. Результаты работы были представлены на авторитетных отечественных и международных научных конференциях. По теме диссертации Лапшин Н.К. опубликовал 4 статьи из списка рекомендованных ВАК, включая 2 статьи в международных научных журналах, в обеих статьях он является первым автором. Диссертация написана хорошим языком, а в тексте практически отсутствуют опечатки и орфографические ошибки. Материал излагается четко, логично и с интересом читается.

Во введении автор обосновывает актуальность своего исследования, обсуждает степень разработанности темы и использованные методы, а также формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, значимость полученных результатов и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из двух основных частей. В первой части обсуждается литература, посвящённая структуре плазматической мембраны растений, а во второй описаны структура и регуляция протонной АТФазы растений. В обзоре достаточно

подробно представлены современные данные о плазматической мембране растений; подробно проанализировано ее строение и роль фосфолипидов, сфинголипидов и стерина в формировании ее динамичной структуры, а также в регуляции ионного транспорта и передачи сигнала. Очень подробно и хорошо описаны пути биосинтеза фитостерина и их влияние на фазовое состояние липидного бислоя. Прекрасно написана часть, посвященная липидным рафтам. Особенно мне понравилось, что автор уделит большое внимание описанию возможных артефактов при обработке мембран детергентами. Также в этой части обсуждается влияние липидного окружения на активность различных транспортных систем растений. Я читала эту часть литературного обзора диссертации с большим интересом: она информативна, прекрасно написана и имеет прямое отношение к тематике диссертации.

Вторая часть обзора посвящена структуре и регуляции протонной АТФазы растений. Подробно описаны особенности структурной организации H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений и особенности ее каталитического цикла. Часть обзора, посвященная регуляции активности H^+ -АТФазы мне особенно понравилась. Никита Константинович обсудил роль фосфорилирования в регуляции активности H^+ -АТФазы и описал аминокислотные остатки являющиеся мишенями для фосфорилирования в различных сигнальных путях. Подробно описаны протеинкиназы, отвечающие за фосфорилирование этих аминокислотных остатков. Большое внимание в обзоре уделено роли липидного окружения в регуляции активности H^+ -АТФазы и других АТФаз Р-типа. Анализ литературных источников указывает на высокую чувствительность АТФаз Р-типа к содержанию стерина в мембране. Учитывая высокую структурную консервативность АТФаз Р-типа, автор предполагает, что и у H^+ -АТФазы плазмалеммы растений существуют стерин- и липидсвязывающие сайты, влияющие на ее функциональную активность. Эта часть обзора имеет самостоятельную ценность, поскольку на момент написания диссертации в отечественной научной литературе нет обзорных статей такого характера. В целом, литературный обзор диссертации оставляет очень приятное впечатление. Он демонстрирует глубокое понимание диссертантом круга изучаемых проблем.

Достоверность полученных результатов в первую очередь зависит от корректности применения методических подходов. Используемые автором методические подходы адекватны поставленным задачам. В процессе работы над диссертацией автору пришлось овладеть широким спектром современных методик молекулярной

биологии, биохимии, конфокальной микроскопии. Все использованные методики описаны подробно, на основании представленной информации все процедуры могут быть воспроизведены.

В главе “Результаты и обсуждение” последовательно приводятся этапы проведения экспериментов. На первом этапе с помощью метода «Tape Arabidopsis sandwich» была получена суспензия протопластов мезофилла листьев арабидопсиса. Полученные протопласты использовались для анализа влияния экстракции стеринов на размеры и жизнеспособность протопластов, а также на активность H^+ -АТФазы плазмалеммы. Полученные результаты позволяют с уверенностью сказать, что извлечение стеринов в присутствии M β CD не влияет на размер протопластов и их жизнеспособность, при этом вызывая усиление протонного транспорта через плазмалемму, и в данном процессе основную роль играет H^+ -АТФаза плазмалеммы.

Дальнейшая работа проводилась на другой модельной системе – суспензии везикул плазмалеммы, полученной из корней этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L. Фракция плазмалеммы была получена путем разделения микросомальных мембран с использованием двухфазной полимерной системы декстран Т500 – ПЭГ 3500. Полученная суспензия везикул была прекрасно охарактеризована. Было показано, что мембраны верхней фазы по сравнению с микросомальной фракцией обогащены H^+ -АТФазой и меткой плазматической мембраны – фактором АДФ-риболизирования 1, тогда как стерилметилтрансфераза SMT1, присутствующая в ЭПР, в верхней фракции практически не выявлялась. Далее автор исследовал влияние воздействия различных концентраций метил- β -циклодекстрина на содержание стеринов в везикулах плазмалеммы. Как в случае с протопластами арабидопсиса, метил- β -циклодекстрин вызывал концентрационно-зависимое уменьшение количества стеринов в плазматической мембране. При этом размер везикул не менялся.

Для характера распределения H^+ -АТФазы между мембранными доменами с разным липидным составом были получены детергент-устойчивые образцы плазмалеммы с помощью фракционирования в градиенте плотности OptiPrep. Было показано, что H^+ -АТФаза одновременно выявлялся как в детергент-устойчивой, так и в детергент-солюбилизированной фракциях плазмалеммы, а ее содержание выше в детергент-устойчивой фракции. Интересно, что экстракция стеринов не приводила к

выравниванию содержания H^+ -АТФазы между детергент-устойчивой и в детергент-солюбилизируемой фракциями.

Далее были определены кинетические параметры гидролиза АТФ везикулами плазмалеммы в присутствии М β СD и сделаны выводы о влиянии стеролов на гидролитическую активность H^+ -АТФазы плазмалеммы.

Солюбилизация плазмалеммы в присутствии додецил мальтозида позволяет сохранить белок-белковые взаимодействия и не извлекать интегральные липиды. После солюбилизации плазмалеммы с помощью додецил мальтозида при разном соотношении детергент/белок наблюдалось наличие высокомолекулярных комплексов; при этом увеличение содержания ДДМ в пробе влияло на диапазон разделенных BN-PAGE полос, содержащих АТФазу, что указывает на отсутствие жестких взаимодействий между мономерами в мультибелковом комплексе. Интересно, что удаление липидного окружения с помощью ДДМ вызывало усиление гидролитической активности H^+ -АТФазы.

Автор также исследовал АТФ-зависимый протонный транспорт и пассивную протонную проницаемость в везикулах плазмалеммы с разным содержанием стерина. В серии изящных экспериментов было показано, что низкие концентрации (до 5 мМ) М β СD значительно стимулировали протонный транспорт, однако концентрации выше 15 мМ, напротив, ингибировали его. При этом извлечение стерина добавлением в среду М β СD приводило к усилению пассивной проницаемости мембраны для протонов, и эффект усиливался при повышении содержания М β СD. Автор предложил несколько возможных объяснений полученным результатам. Я считаю, что результаты этой диссертационной работы открывают большие возможности для дальнейших исследований роли липидного окружения в регуляции активности H^+ -АТФазы и мембранных транспортных систем плазматической мембраны клеток растений.

В главе «Заключение» на основании результатов проведенного исследования и данных литературы предложена общая схема, объясняющая наиболее вероятные молекулярные механизмы стимуляции АТФ-зависимого и пассивного протонного транспорта в ответ на извлечение стерина из плазмалеммы. Производит особенно приятное впечатление то, что автор подчеркивает и обсуждает различные гипотезы, объясняющие полученные результаты. Выводы сформулированы автором четко и

обоснованно. Автореферат оформлен по правилам, полностью отражает содержание диссертации, в нем охарактеризованы все этапы экспериментальной работы.

Полученные диссертантом новые данные, несомненно, являются приоритетными и имеют большое теоретическое и практическое значение для молекулярной биологии и биохимии растений. Объем представленных в работе экспериментальных данных вполне соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, представляемым на соискание степени кандидата биологических наук по специальности «физиология и биохимия растений».

При прочтении работы у меня возникло несколько вопросов и замечаний.

1. В статье Rochie et al., 2008 (DOI: 10.1096/fj.08-111070.) было показано, что при воздействии метил- β -циклодекстрина на клетки BY2 культуры табака истощение стерина происходит выборочно, что приводит к изменению процентного содержания различных стерина в плазмалемме. Известно, что различные стерины могут как активировать, так и ингибировать H^+ -АТФазу растений. Возможно ли, что показанные Вами изменения активности H^+ -АТФазы при воздействии метил- β -циклодекстрина определяются не только общим снижением количества стерина, но и изменением процентного содержания их различных видов в плазматической мембране? Рекомендую в дальнейшей работе определять не только общее количество выделенных стерина, но и их качественный состав.

2. Для характеристики солюбилизованных Тритоном X-100 фракций плазмалеммы было бы желательно провести иммунолокализацию известных рафт-ассоциированных белков, например, реморина.

Небольшие замечания:

рис. 11б – на графике не показана стандартная ошибка измерений.

рис. 17 – Нет окрашенного Кумасси геля суспензии мембранных везикул, солюбилизованных додецил мальтозидом.

В исследовании использовалось два объекта – арабидопсис и горох. На рисунках не написано, на каком объекте сделаны конкретные эксперименты.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к работам подобного рода и критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней»,

утвержденного Правительством РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее соискатель Лапшин Никита Константинович заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:

Бибикова Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры Физиологии растений

Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова

Контактные данные:

тел.: 7(985)3973186, e-mail: bibikova@mail.bio.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Адрес места работы:

МГУ им. М.В. Ломоносова,
Биологический факультет,
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12,
Москва, 119234
Тел.: 8(495)939-27-76

кандидат биологических наук

Бибикова Татьяна Николаевна

27.10.2023

Подпись к.б.н. Бибиковой Т.Н. удостоверяю:

Заместитель декана
дисп. гр. на МГУ, проф. А.М.Рубин

