



«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по науке и инновациям

ИИУ им. Н.И. Лобачевского"

М.Ю. Грязнов

«29» сентября 2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского"

на диссертационную работу *Лапина Никиты Константиновича* «Роль мембранных стериннов в регуляции активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21. – физиология и биохимия растений.

Актуальность темы

Протонная АТФаза плазматических мембран находится в «центре физиологии растения (in the Center of Plant Physiology)», как обозначил один из ведущих исследователей ее структуры и функций Майкл Палмгрен. Этот фермент, выкачивая протоны из клетки во внешнюю среду и формируя электрический мембранный потенциал, обеспечивает энергизацию плазмалеммы. Созданный АТФазой протонный градиент является универсальной энергетической валютой клетки, наряду с макроэргическими соединениями. Энергия градиента электрохимического потенциала протонов – его химическая и электрическая составляющие – обеспечивает мембранный транспорт ионов и метаболитов. Среди процессов, протекающих как в отдельной клетке, так и на уровне целого растения, трудно обозначить те из них, в которые в той или иной степени не вовлечена H^+ -АТФаза плазматических мембран. Ее физиологическая роль включает энергизацию вторичного активного транспорта, обеспечивая как упомянутый выше трансмембранный перенос соединений, так и дальний транспорт метаболитов в растении. Поддержание и регуляция тургора, а также процессы водного обмена напрямую зависят от активности этого фермента. Вынос протонов из цитозоля во внеклеточную среду лежит в основе регуляции внутриклеточного рН, являясь важнейшим компонентом биофизического рН-стата. Закисление внеклеточной среды, вызванное активацией протонной АТФазы стимулирует рост клетки растяжением, механизм, получивший название – теория кислого роста.

В связи важностью работы H^+ -АТФазы для жизни растения, изучению структуры, механизма функционирования и путей регуляции этого фермента посвящено огромное

количество работ. Методы и подходы, используемые в таких работах очень разнообразны. Они включают идентификацию генов, кодирующих фермент, оценку уровня их экспрессии в различных органах и тканях, а также при действии разнообразных стрессовых факторов, экспрессию в гетерологичных системах для изучения свойств этого протонного насоса, традиционные для изучения мембран методы потенциометрического и флуоресцентного анализа и целый ряд других. Особое внимание исследователи уделяют изучению механизмов регуляции активности H^+ -АТФазы плазматических мембран. На сегодняшний день установлены молекулярные механизмы реализации эффектов многих факторов, оказывающих влияние на активность протонной помпы. Важная роль в них принадлежит белку 14-3-3 и фосфорилированию фермента, которое потенциально может осуществляться по различным сайтам. Большое влияние на активность H^+ -АТФазы, являющуюся интегральным мембранным белком, оказывает природа и состояние липидного окружения. Оценка влияния липидного окружения на активность фермента явилась одной из первых задач, на решение которой были направлены усилия исследователей. Сегодня эта задача вновь стала очень актуальной, в том числе, вследствие установления гетерогенности клеточных мембран, установлению связи элементов плазматической мембраны с внутриклеточными компонентами. В связи с вышесказанным, не вызывают сомнения высокая значимость и актуальность диссертационной работы Лапшина Никиты Константиновича «Роль мембранных стеринов в регуляции активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений».

Новизна исследования, полученных результатов и выводов

Выполненное исследование обладает существенной новизной. В частности, можно отметить, выполненное на первом этапе, изучение распределения H^+ -АТФазы между доменами плазматической мембраны с высоким и низким содержанием стеринов. Существенной новизной обладает сам предложенный в работе подход к оценке влияния стеринов на работу протонной АТФазы – происходило извлечение части стеринов из состава биологической мембраны, а не традиционное встраивание извлеченного из мембраны фермента в комплексе с детергентами в состав искусственно сформированных везикул (или БЛМ) различного липидного состава. Установлено, что извлечение части стеринов из состава плазмалеммы вызывает увеличение как гидролитической, так и транспортной активности H^+ -АТФазы. Автором сформулирована гипотеза, которая отражает пути влияния входящих в состав мембраны стеринов на активность H^+ -АТФазы. Предложенная гипотеза и сформулированные выводы базируются на оригинальных результатах, полученных при выполнении работы.

Анализ содержания диссертации

Диссертационная работа структурно построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка используемых сокращений и списка цитированной литературы, включающего 201 ссылку. Работа изложена на 127 страницах, содержит 23 рисунка и 5 таблиц.

Во **введении** автором убедительно и аргументировано обоснована актуальность проблемы, которой посвящена диссертационная работа.

В **обзоре литературы** представлен анализ имеющихся на сегодняшний день данных литературы по структуре мембран клеток растений с фокусированием на гетерогенности мембраны, ее причинах и значении для функционирования клетки. Также приведены сведения о структуре и механизме работы H^+ -АТФазы, детально рассмотрены пути регуляции ее активности.

Раздел **«Материалы и методы»** написан достаточно подробно. Оценивая методы и подходы, использованные при выполнении диссертационного исследования, нельзя не отметить, что проведение исследований на такой модельной системе, как изолированные мембраны, в состав которых входит изучаемый фермент, требует выполнения большого объема работ как по получению модельной системы, так и по ее характеристике. В диссертации Лапшина Н.К. использован целый ряд современных методов анализа, совокупность которых позволила корректно оценивать гидролитическую и транспортную активность протонной АТФазы. В число таких методов входит оценка специфичности АТФазной активности с применением специфических ингибиторов, определение транспортной активности с применением чувствительных флуориметрических и спектрофотометрических методов анализа, электрофорез белков дискретных мембранных фракций и вестерн-блот анализ и др.

Глава **«Результаты и их обсуждение»** разбита на несколько подразделов. В них последовательно и логично излагаются этапы исследования от установления эффекта стерина на активность H^+ -АТФазы до обоснования возможных механизмов, обуславливающих эффект. Первым шагом работ стала демонстрация влияния обработки М β CD, экстрагирующего стерина из мембран, на активность протонной АТФазы. Такое исследование было выполнено как на протопластах, изолированных из листа арабидопсиса, так и на фракции везикул плазмалеммы, изолированной из корней гороха. Была установлена универсальность эффекта в отношении исследуемых объектов. Необходимо отметить то большое внимание, которое было уделено автором контролю структурной целостности модельных объектов. Показано, что использованные обработки М β CD не вызывали нарушения структуры и значительных изменений размеров исследуемых структур. Принимая во внимание структурную гетерогенность плазмалеммы, было изучено влияние М β CD на содержание H^+ -АТФазы в детергент-устойчивых и детергент-солубилизуемых фракциях плазмалеммы. Обнаружено, что экстракция стерина не влияет на характер распределения протонной АТФазы между фракциями.

Установлено, что М β CD, удаляющий стерина из состава мембран, вызывает активацию H^+ -АТФазы. Большой интерес представляют выявленные автором различия в концентрационной зависимости эффектов М β CD на гидролитическую и транспортную активность H^+ -АТФазы плазматической мембраны. В дальнейшем внимание было сосредоточено на анализе потенциальных механизмов, обуславливающих как активирующее влияние М β CD в целом, так и выявленные различия в концентрационных зависимостях. Предположено, что эффект экстракции части стерина из состава мембран на транспортную активность H^+ -АТФазы может быть обусловлен влиянием на транспортеры плазматической мембраны, работа которых связана с электрохимическим градиентом протонов.

В **Заключении** автором предложена схема, интерпретирующая основные результаты и отражающая выдвинутую гипотезу о механизмах влияния стерина на транспорт протонов.

Вопросы и замечания

Оценивая, в целом, положительно рассматриваемую работу необходимо остановиться на следующих вопросах и замечаниях:

1. При внесении 2 мМ М β CD гидролитическая активность Н⁺-АТФазы практически не повышалась, а транспортная возрастала в 3 раза. Это свидетельствует о том, что в контроле было низкое сопряжение между гидролизом АТФ и транспортом протонов?
2. В работе выявлены различия в зависимости от концентрации внесенного М β CD для гидролитической активности Н⁺-АТФазы, скорости АТФ-зависимого транспорта Н⁺ и скорости пассивного транспорта Н⁺. Скорость АТФ-зависимого транспорта протонов оценивалась по накоплению протонов в везикулах и величине создаваемого в присутствии АТФ градиента Н⁺. Очевидно, что градиент является результирующей возникающего вследствие работы АТФазы потока протонов и обратной утечки (по любому механизму). Усиление пассивной утечки приведет к кажущемуся снижению потока за счет работы Н⁺-АТФазы. В таблице 5 (автореферат, диссертация) приведены количественные значения обсуждаемых величин (в единицах $\Delta A 10^3 \text{ мин}^{-1}$). Их сумма (отражающая именно скорость переноса протонов АТФазой) практически не изменяется в диапазоне от 2 до 10 мМ М β CD. Означает ли это, что транспортная активность имеет крутую сигмоидную зависимость от концентрации М β CD, уже достигая максимума при 2 мМ? А в исследуемом диапазоне концентраций (2-10 мМ М β CD) растет только гидролитическая активность фермента?
3. Методом динамического светорассеивания продемонстрировано образование крупных агрегатов во фракции везикул изолированной плазмалеммы под влиянием М β CD. Радиус крупных агрегатов в 200 раз превышает радиус везикул, а их доля от общего числа частиц составляет 10%. Действительно ли эти агрегаты представляют только комплексы М β CD с экстрагированными стеринами, как предположено в работе? Суммарный объем крупных частиц значительно превышает суммарный объем дискретных везикул. Или же крупные комплексы могут быть представлены и агрегированными под влиянием М β CD везикулами и фрагментами плазмалеммы?
4. Полагаю, что представление зависимости активности протонной АТФазы от концентрации субстрата (рис. 18 диссертации) в линейной форме, например, в двойных обратных координатах, более наглядно позволило бы отразить эффект исследуемых обработок именно на V_{max} , но не K_m .

Указанные выше вопросы и замечания не умаляют достоинств рецензируемой работы. Результаты исследований прошли апробацию на международных и всероссийских конференциях. По результатам диссертационного исследования Лапшина Н.К. опубликовано 4 статьи в ведущих международных и российских журналах, профиль которых полностью соответствует специальности диссертации – физиология и биохимия растений. Опубликованные статьи в изданиях, входящих в перечень ВАК полно отражают основные результаты, представленные в диссертации.

Анализ представленного материала свидетельствует об обоснованности и достоверности полученных автором результатов. Выводы аргументированы и базируются на полученных результатах. Текст автореферата отражает основные результаты и выводы диссертационной работы.

Результаты диссертационного исследования могут послужить теоретической основой для разработки новых методов селекции и направленного повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к действию неблагоприятных факторов. Таковые должны учитывать ключевую роль протонной АТФазы плазмалеммы в функционировании клеток растений как в благоприятных условиях, так и в состоянии стресса. Также результаты исследования могут быть использованы при разработке и модернизации курсов, направленных на подготовку специалистов в области физиологии растений в высших учебных заведениях.

Заключение

Диссертационная работа Лапшина Никиты Константиновича «Роль мембранных стериннов в регуляции активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений» является завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. По своей актуальности, уровню экспериментальных исследований, анализу полученных данных, научной новизне и практической значимости работа соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – Физиология и биохимия растений.

Лапшина Никиты Константиновича «Роль мембранных стериннов в регуляции активности H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений» обсуждена на заседании кафедры биофизики ИББМ (протокол № 3 от «19» сентября 2023 года).

Заведующий кафедрой биофизики
Института биологии и биомедицины
ФГАОУ ВО «Национальный
исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И.
Лобачевского»
доктор биологических наук, доцент

Федеральное государственное
автономное
образовательное учреждение
высшего образования «Национальный
исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И.
Лобачевского»
603022, Россия г. Нижний Новгород, пр.
Гагарина, 23
Тел.: (831) 462-32-15
E-mail: v.vodeneev@mail.ru

Воденеев Владимир Анатольевич

