

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Ершовой Натальи Михайловны
на тему: «Роль гомолога ингибитора пептидаз Кунитца *Nicotiana*
***benthiana* в системе взаимодействий вирус-растение» по**
специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Диссертационная работа Натальи Михайловны Ершовой посвящена исследованию активности гомолога ингибитора пептидаз Кунитца *Nicotiana benthamiana* NbKPIIP при инфекции различных растительных вирусов.

Известно, что вирусные белки способны взаимодействовать с различными клеточными факторами, часто играя роль как в иммунных ответах растения, так и являясь участником иных ответов в системе взаимодействий вирус-растение. Эти клеточные факторы способны проявлять провирусную и антивирусную активность. Актуальными остаются вопросы понимания процессов взаимодействия таких факторов с вирусными белками авирулентности и их влияния на различные этапы вирусной инфекции: от первично зараженных клеток до развития системной инфекции. В данной работе дана характеристика клеточного фактора NbKPIIP, описаны его свойства и функции. Для этого была создана модельная система, позволившая проанализировать уровень экспрессии NbKPIIP в условиях системной инфекции X вируса картофеля (ХВК) и тобамовирусов, ВТМ дикого типа и ВТМ крестоцветных. Используя модельные растения *N. benthamiana*, было показано, что NbKPIIP участвует в регуляции ретроградных сигналов хлоропластов и углеводного метаболизма, а его экспрессия активируется на фоне развития вирусной инфекции. NbKPIIP стимулирует репродукцию и межклеточный транспорт ВТМ и крВТМ, а также способствует развитию системной тобамовирусной инфекции. Используя механизм РНК интерференции для подавления экспрессии NbKPIIP, удалось повысить

выживаемость растений при тобамовирусной инфекции, что дает основание для разработки перспективного направления сельского хозяйства, такого как безвирусное растениеводство.

Поставленная в данной диссертационной работе научная задача, является четкой и ясной, она основана на тщательном анализе литературных данных и разумных гипотезах, сформулированных на их основе.

Общая характеристика диссертационной работы

Представленная диссертационная работа Н.М. Ершовой изложена на 118 страницах и содержит 17 рисунков и 2 таблицы. Она построена в основном классическим образом. Текст диссертации состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, состоящего из 377 наименований.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Во «Введении» изложены актуальность проблемы, степень разработанности темы, поставлены цель и задачи, определена научная новизна с теоретической и прикладной значимостью, даны основные положения, выносимые на защиту, приведена информация об апробации работы, количестве публикации и личном вкладе автора.

Раздел «Обзор Литературы» занимает 45 страниц. Первая часть его посвящена анализу имеющихся данных о развитии вирусной инфекции и внутриклеточных изменениях, а также стратегиях защиты растения при вирусной инфекции, вирусных супрессорах РНК интерференции; вторая часть содержит информацию о клеточных факторах в системе взаимодействий вирус-растение; в заключительной третьей части подробно изложена информация о роли хлоропластов в регуляции межклеточного транспорта. К сожалению, этот раздел содержит всего четыре рисунка-схемы, что сильно затрудняет восприятие столь обширного и разнообразного материала. Подпись к рисунку 4 не содержит ссылки на статью, из которой был взят

материал, а также некорректно указаны ранняя и поздняя стадии инфекции. В подразделе, посвященном иммунитету растений, который является интенсивно развивающимся направлением в последние пять лет и претерпевшими революционные изменения в понимании механизмов устойчивости, определения иммунных сигнальных путей, передачи сигналов путем формирования резистосом (о которых автор не говорит ни слова), отсутствуют актуальные ссылки. Модели распознавания Avr белков NB-LRR подробно рассмотрены в обзорной статье Mailys *et al.*, 2023, а подробные схемы защитных реакций в ответ на вирусную инфекцию представлены в статьях Sett *et al.*, 2022 и Ivanov *et al.*, 2023. В описание стратегий защиты растений при вирусной инфекции стоило добавить и раскрыть такой важный аспект, как запрограммированная клеточная смерть, одним из проявлений которой является гиперчувствительный ответ.

Раздел “Материалы и методы” изложен всего на пяти страницах при использовании в диссертационной работе большого объема разнообразных методов. Автор использует широкий спектр биохимических, физических, молекулярно-биологических и биоинформатических методик и подходов, которые, к сожалению, описаны недостаточно подробно, не содержат карт плазмид и вирусных векторов, используемых в работе. Также в разделе отсутствует подраздел “Материалы”, не дано описание использованных реактивов и приборов с указанием фирм производителей. Исходя из выше сказанного, нельзя быть до конца уверенным, что все представленные методики позволяют их воспроизводить и использовать в лабораторных протоколах.

Раздел «Результаты» занимает значительный объем диссертационной работы и посвящен выявлению и анализу ряда новых свойств клеточного фактора NbKPIIP. Для которого было показано повышение его экспрессии в ответ на заражение таксономически разными вирусами (на тобамовирусы в тысячи раз и приблизительно в десять раз - при потексвирусной инфекции). В процессе

исследования было выявлено участие NbKPILP в регуляции многих жизненно важных процессов, таких как метаболизм каллозы, межклеточного транспорта, углеродного метаболизма, изменение профиля генов, ассоциированных с фотосинтезом, и ретроградного сигналинга. Подтверждена провирусная роль NbKPILP в развитии тобамовирусных инфекций, в отличие от потексвирусной инфекции, которая такого влияния не оказывает. Хотя NbKPILP локализуется в апопласте, была выявлена четкая обратная корреляция между фотосинтезом и экспрессией NbKPILP при тобамовирусной инфекции. Полученные результаты позволяют автору рассматривать NbKPILP как провирусный клеточный фактор и одну из генетических детерминант восприимчивости, активируемую вирусной инфекцией.

“Обсуждение результатов” выделено в отдельный раздел, в котором подробно обсуждаются вопросы регуляции клеточного метаболизма, роли стресс-индуцируемого клеточного фактора NbKPILP в системе взаимодействий вирус-растение, участия в регуляции ретроградных сигналов хлоропластов на фоне развивающейся инфекции, влияния NbKPILP на накопление фотоассимилятов при вирусной инфекции и изменения экспрессии ядерных генов, участвующих в фотосинтезе. Отдельное внимание автор уделяет созданию модели, описывающей функции NbKPILP на фоне подавления антивирусной защиты клетки приводящей к активной вирусной репродукции и распространению инфекции по всему растению.

В “Заключении” автор критически рассматривает полученные результаты в свете имеющихся литературных данных по изучаемой проблеме, что позволяет ему предложить ряд оригинальных гипотез и возможностей для решения различных фундаментальных и прикладных задач.

Раздел “Выводы” содержит пять пунктов, которые сформулированы четко и ясно и дают представление о масштабе проделанной работы, а также новизне и актуальности полученных данных.

Следует отметить, что результаты диссертационной работы Ершовой Н.М. были представлены на российских и международных конференциях, а также были опубликованы в ведущих научных журналах с высокими импакт-факторами. Автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

Однако, несмотря на высокий уровень данного научного труда, к нему есть целый ряд вопросов как с научной точки зрения, так и замечания технического характера, касающиеся оформления работы:

- Во Введении автор указывает, что гомолог ингибитора пептидаз Кунитца (*KPILP, Kunitz peptidase inhibitor-like protein*), который является основным объектом исследования, “имеет все структурные элементы, присущие ингибиторам пептидаз Кунитца (KPI), но в отличие от KPI *Arabidosis thaliana*, KPILP не ингибирует сериновые пептидазы (Li *et al.*, 2008a; Sheshukova *et al.*, 2017)”. Но ничего не сказано о том ингибитором каких протеаз является KPILP и где локализуется в клетке? Например, в работах Jiang *et al.*, 2000 и Ohkura *et al.*, 2018 показано, что KPILP, в больших количествах содержится в семенах, где он является ингибитором трипсиновых протеаз животных, которые расщепляют запасные белки семян, таким образом не давая усвоить растительный белок. При этом секретируется в клеточную стенку.
- В разделе “Результаты” приводится анализ уровня экспрессии NbKPILP в условиях системной инфекции X вируса картофеля и тобамовирусов, ВТМ и крВТМ. Но ни в одном разделе диссертации не обозначено почему автор сделал выбор в пользу именно этих вирусных векторов? В чем заключаются различия между ВТМ и крВТМ?
- Можно ли корректно сравнивать заражение инокулятом и суспензией агробактерии, содержащей вирусный вектор? [“заражение растений проводили частицами ВТМ через поранение абразивом поверхностных

тканей листа; для инфицирования ХВК или крВТМ были использованы векторы, созданные на основе геномов этих вирусов”]

- Как можно объяснить значительную разницу в подвижности белков оболочек ВТМ и крВТМ, приведенную на фотографии ПААГ рисунка 5А? Есть ли данные, подтверждающие отсутствие изменения уровня экспрессии NbKPIIP при МОСК инокуляции?
- Чем был обусловлен выбор участка NbKPIIP длиной 183 нт именно с 70 по 253 нуклеотид кодирующей области для клонирования в вектор рPVX, а не иной фрагмент гена (который представлен на рис. 6В, а не 6А)? Данное клонирование фрагмента NbKPIIP производилось не под дублированный промотор гена БО, а просто под одиночный. В каком положении (прямом или обратном) производили клонирование фрагмента NbKPIIP, было ли проведено последующее секвенирование для подтверждения наличия целевого фрагмента и отсутствия мутаций?
- Что автор может сказать о сайтах протеолиза, которые могут присутствовать в вирусных белках для NbKPIIP?
- Почему белок 25К PVX, относящийся к тройному блоку генов и являющийся антисайленсинговым, не мешал индуцировать сайленсинг целевого гена?
- Автор утверждает, “было показано, что NbKPIIP принимает участие в негативной регуляции экспрессии генов *LHCB1*, *LHCB2*, *RBCS1A* и *HEMA1* и, таким образом, участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от пластид в ядро”. Почему не было поставлено внутреннего контроля в виде любого другого растительного белка, экспрессируемого из-под 35S промотора? Каким образом можно наблюдать ретроградный транспорт *in vivo* от хлоропластов в ядро?
- Диссертант пишет, что “для оценки эффективности ближнего транспорта и репродукции тобамовирусов была количественно определена площадь фокусов, содержащих GFP, и интенсивность флуоресценции в каждой экспериментальной группе. Количество более

крупных очагов (100-300 пикселей) является самым высоким у растений с повышенной экспрессией NbKPIIP, в то время как количество мелких очагов (2-49 пикселей) является самым низким в этой группе, то есть наиболее эффективный межклеточный транспорт исследуемых тобамовирусов связан с повышенной экспрессией NbKPIIP". Но вирусный межклеточный транспорт – это распространение вируса из первично зараженной клетки в соседние с образованием локуса или группы клеток. Чем он больше, тем транспорт эффективнее. В работе дана только оценка интенсивности свечения GFP, что характеризует уровень экспрессии, а не транспорт. Количество клеток в локусе легко оценить и посчитать с помощью флуоресцентного микроскопа. Почему это не было сделано?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова, к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Ершова Наталия Михайловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник кафедры вирусологии Биологического
факультета Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»

ГАСАНОВА Татьяна Владимировна

11.03.2025

Контактные данные:

тел.: 8 (495) 939-53-67,

e-mail: tv.gasanova@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:

03.00.06 – Вирусология (биологические науки)

Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический
факультет Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»

Тел.: 8 (495) 939-53-67, e-mail: tv.gasanova@belozersky.msu.ru

Подпись старшего научного сотрудника
кафедры вирусологии Биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
имени М.В.Ломоносова»

Т.В. Гасановой удостоверяю:
Ученый секретарь



Е.В. Петрова