

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Ершовой Наталии Михайловны, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Роль гомолога ингибитора пептидаз Кунитца *Nicotiana benthamiana* в системе взаимодействий вирус-растение», по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

### Актуальность темы диссертационной работы

Механизмы контроля живых организмов как для поддержания гомеостаза в нормальных условиях жизнедеятельности, так и при действии различных стрессовых факторов является предметом исследования во многих странах. Современные данные свидетельствуют о сложности механизмов ответных реакций растений на стрессовые воздействия, в целом, и в ответ на действие вирусов. Определенный успех в этой области исследований, достигнут с использованием совокупности классических и современных методов молекулярной биологии, биохимии и генетики, которые позволили идентифицировать и оценить изменение экспрессии многих генов. Понимание молекулярных механизмов биологических процессов требует поиска генов, дифференциально экспрессирующихся в ходе этих процессов, и изучения физиологической роли их белковых продуктов. Несмотря на успехи, наше познание механизмов контроля на уровне организмов еще весьма ограничено. Так, идентификация белков с провирусной или антивирусной активностью, изучение факторов, вовлеченных в систему взаимодействий вирус-растение, понимание молекулярных основ такого взаимодействия, остаются первоочередными научными задачами. Такие исследования важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической.

Диссертационная работа Наталии Михайловны Ершовой посвящена выяснению механизмов функционирования гена, кодирующей гомолог ингибитора пептидазы Кунитца (NbKPIIP) растений табака, и оценки его роли в развитии вирусной инфекции и противовирусных защитных реакциях. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

## Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает широкий круг проблем и включает несколько частей, в которых рассматриваются вопросы: (i) развития вирусной инфекции и внутриклеточные изменения, которые происходят в растительной клетке; (ii) основываясь на современных работах, суммирует стратегии защиты растения при вирусной инфекции, которые включают врожденный иммунитет растения, вирусный ETI, вирусный PTI, протеасомную деградацию, рецессивную устойчивость, РНК интерференцию, вирусные супрессоры РНКи, а также (iii) клеточные факторы, которые вовлечены в систему взаимодействий вирус-растение, такие как белки цитоскелета, белки мембранных контактных сайтов, специфические белки растений табака - белок с анкириновыми повторами, шапероны и шаперон-подобные белки, киназы, пектинметилэстеразы, и другие, (iv) особое внимание уделено роли хлоропластов в регуляции межклеточного транспорта.

В целом, обзор литературы написан хорошим языком, современен и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем детально изложены методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал современных методов, применяемых в мировой практике молекулярного

клонирования, анализа экспрессии генов, методов оценки физиологического статуса растений, и методы статистической обработки экспериментальных данных. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: соискателем была предпринята серия экспериментов, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Эта часть диссертационной работы включает несколько разделов.

Прежде всего, хотелось подчеркнуть, что проведенные Наталией Михайловной исследования базируются как на результатах, полученных в лаборатории ранее, так и на гипотезе о том, что клеточный фактор - гомолог ингибитора пептидазы Кунитца (*NbKPILP*) растений табака - принимает участие в регуляции ряда физиологических процессов растений в условиях вирусного патогенеза. В связи с этим, соискатель выбирает стратегию исследования, основанную на разработке и использовании модельной системы для оценки физиологической роли *NbKPILP* при взаимодействии вирус-растение.

Первая часть работы связана с созданием модельной системы для последующего анализа функций *NbKPILP* при взаимодействии вирус-растение. Для этого, Наталия Михайловна первоначально проводит исследования, направленные на анализ уровня транскрипции гена *NbKPILP* в условиях системной инфекции X вируса картофеля и тобамовирусов (ВТМ и крВТМ). Результаты позволили соискателю сделать следующие обоснованные заключение о значительной активации уровня транскрипции в условиях системной инфекции X вируса картофеля или тобамовирусов ВТМ и крВТМ. Эти результаты стали основой разработки модельной системы, основанной на индукции РНК-интерференции, которая приведет к подавлению транскрипции целевого гена. Апробация модельной системы в условиях вирусной инфекции, позволила диссертанту убедиться, что количественные показатели мРНК гена

*NbKPILP* у модельных растений табака в условиях вирусной инфекции сравнимы с интактными растениями того же возраста.

Поскольку диссертант выяснила, что модельная система, основанная на РНК-интерференции эффективна, это послужило отправной точкой для оценки влияния повышенной экспрессии гена *NbKPILP* на физиологический статус растения *N. benthamiana* в условиях системной инфекции ХВК. Первоначально, рассмотрен вопрос о потенциальной роли *NbKPILP* в регуляции передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро. Для этого оценен уровень транскрипции ряда хлоропластных генов, ассоциированных с фотосинтезом, на трех моделях растений (1) с системной инфекцией ХВК и повышенной экспрессией целевого гена *NbKPILP*, за счет транзientной экспрессии сконструированного соискателем вектора pPVX, (2) с системной инфекцией ХВК и подавленной экспрессией гена *NbKPILP*, за счет транзientной экспрессии вектора pPVX:frKPILP, также сконструированного в этом исследовании и (3) контрольных, интактных растений табака того же возраста. Полученные результаты позволили Наталии Михайловне высказать заключение о том, что *NbKPILP* может принимать участие в негативной регуляции экспрессии генов *LHCB1*, *LHCB2*, *RBCS1A* и *HEMA1* и, таким образом, может быть потенциальным участником регуляции передачи ретроградных сигналов от пластид в ядро.

Вполне логичными видятся и следующие серии экспериментов, направленных на оценку участия *NbKPILP* в регуляции углеродного метаболизма, поскольку из литературных данных известно, что вирусная инфекция негативно влияет на фотосинтез и приводит к дисфункции хлоропластов и истощению ресурсов. Полученные результаты продемонстрировали, что *NbKPILP* потенциально участвует в регуляции накопления и распределения фотоассимилятов во время инфекции ХВК, а снижение уровня глюкозы, вероятно, связано с активацией экспрессии *NbKPILP*, вызванной ХВК.

Согласно, имеющийся в научной литературе гипотезе, биогенез и функционирование плазмодесмы (ПД) во много зависят от физиологического статуса пластид, которые посредством ретроградных сигналов регулируют

межклеточный транспорт, а механизмом регуляции пропускной способности ПД является модуляция отложений каллозы вокруг канала. На основании этой гипотезы соискателем высказано предположение о том, что данная регуляция на фоне вирусной инфекции может происходить при участии NbKPILP. В результате проведенного исследования показано, что NbKPILP, по всей видимости, может быть задействован в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм во время вирусной инфекции, способствуя ее деградации.

Поскольку выявлена деградация каллозы вокруг ПД, которая коррелирует с модуляцией транскрипции гена *NbKPILP*, Наталия Михайловна, делает предположение, что ген *NbKPILP* может быть позитивным регулятором межклеточного транспорта, в том числе и при вирусной инфекции. Серия проведенных экспериментов с использованием позволили соискателю получить приоритетные данные, которые убедительно показали, что NbKPILP также вносит существенный вклад в регуляцию ближнего транспорта и репродукции ВТМ и крВТМ. Дополнительно, продемонстрировано влияние NbKPILP на развитие системной инфекции ВТМ и крВТМ.

Совокупность проведенных исследования и полученных результатов послужили основой для формулирования заключения, что NbKPILP является провирусным фактором, который принимает активную роль в развитии тобамовирусной инфекции в модельном растении *N. benthamiana*.

#### **Степень новизны результатов научных исследований.**

Соискателем получено экспериментальное подтверждение, что ген, кодирующий NbKPILP, у растений семейства пасленовых является новым провирусным фактором, который принимает активную роль в развитии тобамовирусной инфекции.

#### **Научная и практическая значимость результатов**

Диссертационная работа Наталии Михайловны Ершовой совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о

молекулярно-генетических механизмах, с помощью которых растение противостоит влиянию факторов окружающей среды, и расширяют представления о системе взаимодействий вирус-растение. С практической точки данная работа интересна тем, что замедление вирусного патогенеза, вызванное подавлением экспрессии нового провирусного клеточного фактора NbKPILP, дает основу для разработки подходов создания растений, устойчивых к вирусной инфекции, в том числе и с использованием технологии геномного редактирования.

### **Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации**

Использование для исследований классических и современных молекулярно-биологических и генетических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Наталии Михайловны, а также выносимых на защиту положений и выводов.

### **Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Основные положения и результаты исследований по диссертации Наталии Михайловны Ершовой опубликованы в 4 работах, в том числе в статьях в журналах, рекомендованных ВАК. Результаты исследований апробированы на российских и международных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникло ряд вопросов:

1. Соискатель делает заключение, что NbKPILP - гомолог ингибитора пептидазы Кунитца - участвует в регуляции физиологического статуса растения *N. benthamiana* на фоне вирусного патогенеза, в частности,

участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро, в регуляции углеродного метаболизма и в регуляции отложений каллозы вокруг плазмодесм. Интересно было бы узнать мнение соискателя, за счет какого механизма или своей активности ингибитор пептидазы участвует в этих процессах - есть ли какие-нибудь предположения или литературные данные?

2. Почему в разделе Обзор литературы не представлена информация об ингибиторе пептидаз Кунитца - что было известно об этих белках на момент исследования, о их роли в процессах жизнедеятельности растений?
3. Как рассчитан относительный уровень экспрессии исследуемых генов: - это значения  $\Delta C_T$  или  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ? Почему относительные уровни NbKPIIP в ответ на системную инфекцию не выражали в значениях  $\log FC$ , например?
4. Несколько смущают количества праймеров и мРНК, использованных для количественной ПЦР в реальном времени - Синтез первой цепи был выполнен следующим образом: 0.1 мг случайных гексамерных праймеров и 0.1 мг праймеров oligo-dT добавляли к 2 мг тотальной РНК. Как правило, в этом методе использует значительно меньшие количества и матрицы, и праймеров.
5. С какой биологической и аналитической повторностью выполнены эксперименты?

Это осталось в работе без пояснения или обсуждения.

По разделам диссертационной работе Наталии Михайловны Ершовой имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя:

Ко всем разделам диссертационной работы:

- в отношении написания эндонуклеаз рестрикции – они отмечаются курсивом – например, *NruI-SaII*;
- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не профессиональное

использование некоторых терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы использовать обозначения: «промотор 35S РНК СаMV» вместо «35S вируса мозаики цветной капусты»; термин «эндонуклеазы рестрикции» вместо «рестриктазы», использовать термин «замолкание» вместо «умолкание» или «сайленсинг» и т.д.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя, а также, безусловно, свидетельствует о высоком уровне исследований научного подразделения, в котором выполнялась данная работа.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

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:

Доктор биологических наук, доцент,

заведующая Лабораторией функциональной геномики

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

\_\_\_\_\_ Ирина Васильевна Голденкова-Павлова

Контактные данные:

тел.: +7(499)678-53-56, e-mail: irengold58@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.02.07 - Генетика

Адрес места работы:

127276, Москва, Ботаническая улица, д. 35

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Лаборатория функциональной геномики

Тел.: +7(499)678-53-56; e-mail: [irengold58@gmail.com](mailto:irengold58@gmail.com)

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Ирины Васильевны Голденковой-Павловой удостоверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института физиологии растений им К.А. Тимирязева

Российской академии наук, к.б.н.

\_\_\_\_\_ Николай Васильевич Лобус

«18» марта 2025 года