

ОТЗЫВ официального оппонента

о диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Атабековой Анастасии Константиновны

на тему:

**«Функциональный анализ белков, кодируемых бинарным блоком
транспортных генов фитовирусов»**

по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

В диссертации А.К. Атабековой рассматривается одна из важных проблем фитовирусологии – внутри- и межклеточный транспорт инфекции, сопряженный с формированием вирусных репликационных комплексов (ВРК). Известно, что ВРК вирусов, содержащих тройной блок транспортных генов (Triple gene block, TGB) могут связываться с плазмодесмами (ПД), направляя вновь синтезированные геномные (+)РНК в каналы ПД. В данной работе исследовали бинарный транспортный блок (Binary movement block, BMB) кодируемый вирусом зеленой пятнистости гибискуса (HGSV). Недавно было показано, что белки BMB1 и BMB2 участвуют в образовании мембранных телец, ассоциированных с ПД, и обеспечивают эффективный межклеточный транспорт в растениях *Nicotiana benthamiana*. Изучение механизма функционирования BMB необходимо для лучшего понимания взаимодействий в системе «хозяин-патоген», а также для разработки способов защиты сельскохозяйственных и декоративных растений.

Рецензируемая работа посвящена взаимодействию белков BMB1 и BMB2 с клеточными структурами и друг с другом. Получены данные о ядерной локализации BMB1 и об ультраструктуре периферических

мембранных телец, содержащих ВМВ2. Доказано, что ВМВ1 может индуцировать защитный ответ растения.

Диссертация написана по традиционному плану и содержит следующие основные разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение» и «Выводы». Список литературы включает 271 публикацию на английском языке. Работа содержит 2 таблицы и 25 рисунков. Общий объем текста – 145 страниц.

В литературном обзоре обсуждаются структура растительных плазмодесм и разнообразных мембранных органелл в контексте вирусной инфекции, а также существующие представления об основных механизмах межклеточного транспорта вирусов. Подробный анализ проблемы ремоделирования клеточных мембран эндоплазматического ретикулума, митохондрий, вакуолей, пероксисом и хлоропластов (+)РНК-содержащими вирусами растений (включая потекс-, тобамо-, бромо- и потивирусы) оставляет самое благоприятное впечатление. В отдельной главе разобрана роль вирусных репликационных комплексов в транспорте. Белки бинарного транспортного блока охарактеризованы с необходимой степенью детализации, в то время как информация о тройном блоке генов изложена несколько «пунктирно». В целом, данный раздел хорошо структурирован и демонстрирует достаточный уровень знакомства с темой.

В разделе «Материалы и методы» собраны базовые протоколы, использованные для создания рекомбинантных конструкций в бинарном векторе, в том числе получение компетентных клеток *E. coli* и очистка плазмидной ДНК с ацетатом аммония. Для направленного мутагенеза применяли амплификацию ДНК с частично перекрывающихся праймеров. Последовательности олигонуклеотидов и синтетических генов собраны в двух таблицах. Автор утверждает, что гены ВМВ1 и ВМВ2-QTY были оптимизированы для экспрессии в *E. coli*, но не объясняет, каким образом это было сделано в случае ВМВ1. Помимо генноинженерных методов, в работе

использовали иммуноблоттинг, Far-Western анализ, агроинфильтрацию, количественную ПЦР, конфокальную и электронную микроскопию, FRET-FLIM, выделение мембранной фракции, иммуоцитохимию и другие экспериментальные подходы, подразумевающие высокую квалификацию оператора. Большинство протоколов изложены весьма подробно и могут быть воспроизведены в независимой лаборатории. Заключительная фраза в описании Far-Western звучит следующим образом: «связанный белок детектировали методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител к BMB2-QTY». На мой взгляд, этого недостаточно – в частности, отсутствует информация о разведениях первичных и вторичных антител. Следует упомянуть, что для концентраций, указанных в процентах, отсутствует стандартное уточнение «вес-объем» или «объем-объем».

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из четырех глав, в точности соответствующих сформулированным задачам исследования. Взаимодействие белков BMB1 и BMB2 было продемонстрировано *in vitro* (Far-Western блот) и подтверждено *in vivo* (агроинфильтрация листьев с последующим FRET-FLIM). Мутагенез С-концевой области BMB1 и N-концевого участка BMB2 показал, что данные районы необходимы для корректного взаимодействия белков бинарного блока, включая их «правильную» внутриклеточную локализацию. При анализе, помимо флуоресцентной микроскопии, применяли и другие методы, в том числе комплементацию межклеточного транспорта «деконструированного» вирусного вектора с удаленным транспортным модулем, созданного на основе генома Х-вируса картофеля. Подобный «комплексный» подход к постановке ключевых экспериментов можно только приветствовать. Изучение локализации BMB1 и BMB2 в периферических мембранных тельцах, связанных с плазмодесмами (ПД), проводили с помощью иммунозолотого мечения. Данные электронной микроскопии не позволяют уверенно утверждать, что данные белки эффективно проникают в каналы ПД. Автор предполагает, что использованный в работе протокол приготовления срезов ПД не позволяет в полной мере сохранить нативную

структуру ПД. Со своей стороны, могу рекомендовать вторичные антитела, конъюгированные с частицами золота меньшего размера (6 нм вместо 12 нм). Для исследования ультраструктуры периферических мембранных телец успешно применялись такие методы, как конфокальная микроскопия в режиме сверхвысокого разрешения, трансмиссионная электронная микроскопия и двухосевая электронная томография. Полученные результаты позволили сделать вывод, что мембранные цистерны в составе таких телец плотно контактируют друг с другом и представляют собой мембраны эндоплазматического ретикулума, реорганизованные белком ВМВ2. Также в работе было доказано, что белок ВМВ2 способен к высококооперативной олигомеризации, а белок ВМВ1 может индуцировать защитный ответ в листьях растений *Nicotiana benthamiana*, сходный с гиперчувствительным ответом и связанный с накоплением активных форм кислорода (АФК). Подобный ответ подавляется при совместной экспрессии с ВМВ2. Автор продемонстрировал, что белок ВМВ1, помимо цитоплазмы, выявляется в ядрышке и тельцах Кахаля, что способствует эффективному транспорту вирусной инфекции.

Текст написан хорошим языком, аккуратно оформлен и удачно иллюстрирован. Количество недочетов и опечаток сведено к минимуму. Выводы, сформулированные автором, корректны, обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Работа была апробирована в 2022-2024 годах на трех Всероссийских научно-практических конференциях (все - с международным участием). По результатам опубликованы 5 англоязычных статей в рецензируемых международных журналах, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по соответствующей специальности.

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 (Биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено 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 Атабекова Анастасия Константиновна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии
биологического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»
ИВАНОВ Петр Алексеевич

Контактные данные:

тел.: _____ e-mail: _____
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.06 – Вирусология

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
Биологический факультет МГУ
Тел. (495)9391000; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

21.09.20

