

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию 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**

Актуальность темы исследования

Актуальность диссертационной работы обусловлена фундаментальной проблемой фитовирусологии — необходимостью понимания молекулярных механизмов, позволяющих вирусам координировать процессы репликации и межклеточного транспорта для успешной инфекции. Растительные вирусы, в отличие от вирусов животных, вынуждены преодолевать барьер клеточной стенки, используя специализированные каналы — плазмодесмы. Для активного транспорта своих геномов через плазмодесмы вирусы кодируют транспортные белки. Ранее был открыт блок генов, кодирующий два транспортных белка, названный бинарным транспортным блоком.

Установление точных механизмов, с помощью которых транспортные белки генного модуля обеспечивают перемещение вирусных геномов, детальное изучение ультраструктуры ассоциированных с плазмодесмами мембранных телец (PAMBs), а также идентификация ключевых белок-белковых взаимодействий являются актуальными задачами. Их решение не только расширит фундаментальные представления о молекулярных механизмах транспорта вирусов растений, но и создаст теоретическую основу для разработки новых эффективных методов противовирусной защиты.

Научная новизна, обоснованность и достоверность выносимых на защиту положений, научных выводов и рекомендаций исследования

В исследовании Атабековой А.К. объектом служили транспортные белки BMB1 и BMB2 бинарного транспортного блока вируса зеленой пятнистости гибискуса (HGSV). Научная новизна работы заключается в следующем. Впервые продемонстрировано, что взаимодействие между BMB1

и VMB2 является необходимым условием для реализации их транспортной функции; определены конкретные белковые регионы, ответственные за это взаимодействие. С использованием электронной томографии впервые охарактеризована ультраструктура вирус-индуцированных периферических мембранных телец, формируемых белком VMB2, и построена их трехмерная модель. В составе этих телец обнаружены специфические межмембранные контакты, не описанные ранее в литературе, и предложена модель их возникновения. Дополнительно выявлена способность VMB2 к олигомеризации. В работе впервые охарактеризован защитный ответ растения, инициируемый транспортным белком VMB1, а также установлена супрессивная активность VMB2 в отношении этого ответа.

Работа носит исключительно фундаментальный характер. Она дополняет существующие представления о механизмах функционирования транспортных белков вирусов растений и их взаимодействии с растением-хозяином. Полученные данные об ультраструктуре вирус-индуцированных мембранных компартментов, о взаимодействии транспортных белков и необходимости этого взаимодействия для межклеточного транспорта вируса выявляют важные подробности механизмов вирус-индуцированного ремоделирования клеточных мембран и транспорта вирусов. Кроме того, в работе раскрыты механизмы индукции и подавления вирусными белками защитных ответов растения, определяющих возможность межклеточного транспорта вируса, а также установлена важность ядерной локализации одного из вирусных белков для обеспечения эффективного вирусного транспорта. Полученные результаты способствуют лучшему пониманию фундаментальных принципов взаимодействия в системе вирус-хозяин.

Результаты получены с использованием современных методов, молекулярной биологии, генной инженерии, вирусологии, микроскопии. Для оценки достоверности полученных данных автором применены адекватные статистические модели. Обоснованность и достоверность выдвигаемых на защиту положений не вызывает сомнений.

Достоверность полученных результатов подтверждается 5 публикациями в высокорейтинговых международных журналах и выступлениями на конференциях.

Структура и общая характеристика диссертационной работы

Материалы диссертации Атабековой А.К. изложены на 145 страницах машинописного текста и включают 25 рисунков и 2 таблицы. Диссертация построена по классической схеме и состоит из разделов: “Оглавление”, “Список сокращений”, “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Список литературы”. Список публикаций по теме диссертации содержит 271 источник.

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, отражены научная новизна и практическая значимость работы.

В главе «Обзор литературы» описываются механизмы транспорта вирусов растений. В данном разделе диссертации подробно и последовательно описываются современные представления о строении, функциях и механизмах регуляции плазмодесм как уникальных структур растительной клетки, обеспечивающих симпластический транспорт. В разделе представлена общая модель межклеточного транспорта вирусов. Описана связь репликации и транспорта вирусов растений. Отдельный раздел посвящен мембранным органеллам клетки. Представлены актуальные данные о структурной перестройке клеточных мембран, индуцируемой различными представителями (+)РНК-содержащих вирусов растений при биогенезе вирусных репликационных комплексов. Также рассматриваются механизмы внутри- и межклеточного транспорта вирусных геномов от мест репликации. Представленная информация дает комплексное представление о текущем состоянии исследований в области симпластического транспорта вирусов растений.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые в работе методы. Описаны стандартные методы молекулярной биологии получения генно-инженерных конструкций, методы трансформации бактериальных клеток и растений, методы экспрессии, выделения, очистки и анализа белков.

Изложены процедуры конфокальной микроскопии, FRET-FLIM (измерение сверхблизкого расстояния между молекулами по времени их свечения), подготовки образцов листьев *N. benthamiana* для ультраструктурного анализа и иммуноэлектронной микроскопии, трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и томографии. Все методы, в том числе и статистические, являются современными и адекватными поставленным задачам.

В главе «Результаты и обсуждение» отражены все полученные результаты и проведен их анализ.

На первом этапе диссертационной работы Атабековой А.К. было изучено взаимодействие белков BMB1 и BMB2 бинарного транспортного блока вируса зеленой пятнистости гибискуса.

Для анализа взаимодействия *in vitro* белки BMB1 и BMB2 были экспрессированы в клетках *E. coli* и проанализированы методом Far-Western-блоттинга. Для успешной экспрессии BMB2 в бактериях его последовательность была оптимизирована. Модификация проводилась в соответствии с «QTY-кодом» таким образом, чтобы заменить интегрированные в мембрану спирали на гидрофильные районы. Подобная модификация не нарушила белок-белковые взаимодействия. В результате было подтверждено взаимодействие белков BMB1 и BMB2.

Для подтверждения взаимодействия белков BMB1 и BMB2 *in vivo* был использован метод FRET-FLIM, основанный на безызлучательном переносе энергии между донорным флуорофором GFP и акцепторным mRFP при их сближении менее 10 нм. В листьях *N. benthamiana* коэкспрессировали GFP-BMB1 и BMB2-mRFP. Было обнаружено, что время жизни флуоресценции

GFP значительно падало при коэкспрессии GFP-BMB1 и BMB2-mRFP, что подтвердило взаимодействие BMB1 и BMB2 в клетках *N. benthamiana*.

На следующем этапе автор проводил эксперименты, позволяющие определить, какие именно части белков участвуют во взаимодействии друг с другом. Был получен мутант BMB1 с делецией 22 аминокислотных остатков с С-конца. In vivo было показано, что данной делеции достаточно для потери способности белка направляться в периферические тельца белком BMB2, что подтверждает вовлеченность С-концевого района BMB1 во взаимодействие с BMB2.

Для идентификации районов белка BMB2, участвующих во взаимодействии с BMB1, методом сайт-направленного мутагенеза был создан набор из трех мутантов BMB2. Результаты показали, что во взаимодействии с BMB1 задействован N-концевой район белка BMB2.

Также в работе было продемонстрировано, что помимо комплекса BMB1-BMB2 для обеспечения межклеточного транспорта требуется дополнительно экспрессированный BMB2, но не BMB1.

На следующем этапе работы проводилось исследование структуры PAMBs.

Проведенные иммуноцитохимические исследования подтвердили локализацию обоих белков в мембранных тельцах (PAMBs), а также в области устьев плазмодесм.

Неоспоримым преимуществом данной работы является детализация структуры PAMBs. Для этого листья растений *N. benthamiana*, агроинфильтрированные для экспрессии BMB2-mRFP, были проанализированы с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии в режиме сверхвысокого разрешения. Было установлено, что формируемые BMB2 PAMBs представляют собой высококонденсированные структуры с сетчатой морфологией.

Далее для определения архитектуры PAMBs использовали метод двухосевой электронной томографии, на основе которого была сгенерирована

3D-модель участка РАМВ. Полученная 3D-реконструкция продемонстрировала, что мембранный компартмент, образованный белком ВМВ2 из мембран ЭПР, представляет собой извилистую непрерывную мембранную систему. При этом трубочки составляют меньшую часть структур РАМВ, тогда как подавляющее большинство представлено извилистыми цистернами разных форм и размеров.

По полученным результатам высказано предположение, что молекулы ВМВ2 располагаются на краях двух цистерн и взаимодействуя, отвечают за образование специфических для РАМВс межмембранных контактов. На основании полученных данных автором был предложен двухэтапный механизм формирования РАМВс: сначала ВМВ2 интегрируется в мембрану ЭПР, вызывая сужение трубочек, а затем его олигомеризация приводит к реорганизации трубочек в цистерны, где ВМВ2 локализуется на участках с высокой кривизной мембраны.

Полученные данные о детальной структуре РАМВс, образование которых стимулируется белком ВМВ2, в совокупности дают новое понимание того, как вирусные белки реорганизуют клеточные мембраны.

В диссертационной работе было показано, что экспрессия белка ВМВ1 в растениях *N. benthamiana* индуцирует защитный ответ, который сопровождается накоплением активных форм кислорода, отложением каллозы в клеточных стенках и повышением экспрессии гена 9-липоксигеназы. Также в работе была изучена супрессия ВМВ1-индуцированного защитного ответа растения белком ВМВ2, включая подавление некротизации и отложения каллозы в клеточных стенках. В финальной части работы проводились эксперименты по определению локализации ВМВ1 белка.

В заключении автор четко и лаконично суммирует основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

Отдельного внимания заслуживает высокий методический уровень диссертационной работы. Автором продемонстрировано грамотное планирование экспериментов, использование адекватных отрицательных и

положительных контролей, а также применение взаимодополняющих методов, что обеспечивает достоверность полученных результатов. Все полученные результаты подвергнуты корректной статистической обработке.

Текст диссертации изложен последовательно, структурированно и логично. Иллюстративный материал представлен в высоком качестве. Работа практически не содержит опечаток и неточностей. Выносимые на защиту положения и выводы в полной мере соответствуют поставленным задачам и полученным результатам. Диссертационная работа производит благоприятное впечатление и не имеет серьезных недостатков. Вместе с тем, при общей положительной оценке работы, следует указать на отдельные неточности текста работы.

1. Формулировка задачи 4 («Изучить ядерную локализацию белка ВМВ1») недостаточно ясна, при этом вывод 7 («Белок ВМВ1 локализуется в цитоплазме, а также в ядре в составе ядрышка и телец Кахаля») логичен и понятен. Заголовок текста диссертации «Изучение субклеточной локализации ВМВ1» в большей степени отражает исследования.
2. При описании генома вируса зеленой пятнистости гибискуса (стр. 58 – 61) целесообразно было бы представить схему организации генома, что упростило бы восприятие этой информации.
3. В работе отсутствует описание векторов, использованных для экспрессии белков в растениях; в разделе «Материалы и методы» (стр. 64) приведены лишь ссылки, а в разделе «Результаты» описание векторов не представлено. В работе представлено лишь текстовое описание экспрессионных конструкций. Целесообразно было бы дополнить рукопись схематическими рисунками, отображающими структуру использованных векторов и генетических конструкций.
4. В разделе «Материалы и методы» и в обсуждении результатов местами отсутствуют пояснения о том, как условия эксперимента (например, денатурация при очистке, использование мутаций только в определенных районах) могли повлиять на интерпретацию результатов.

5. Утверждение о том, что выявление общих закономерностей координации процессов репликации и транспорта может способствовать созданию новых методов борьбы с патогенами, не подкреплено обсуждением конкретных примеров или указанием на то, какие из этих знаний уже находят (или могут найти) практическое применение.
6. При изучении взаимодействия белков BMB1 и BMB2 определены участки на концах самих белков (С-концевой район BMB1 и N-концевой район BMB2), необходимые для этого взаимодействия, однако более детального исследования, включая картирование минимальных необходимых мотивов или анализ конформационных изменений, не проведено и не обсуждено.
7. В экспериментах со слитным белком BMB1-BMB2 коэкспрессия дополнительного BMB2 восстанавливает функцию, однако остается неясным, почему этого не происходит в отсутствие дополнительной копии BMB2. Автор предполагает, что BMB2 может взаимодействовать со слитным белком и направлять его в PAMBs, но не обсуждает ни природу такого взаимодействия, ни функциональную необходимость присутствия дополнительной копии BMB2.

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. 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:

доктор биологических наук, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории систем молекулярного клонирования

Марданова Евгения Сергеевна

14.05.2026

Контактные данные: 

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
1.5.3 – молекулярная биология (биологические науки)

Адрес места работы: 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Тел: +7 (495) 954-52-83

Факс: +7 (495) 954-27-32

e-mail: info@fbras.ru

Подпись сотрудника Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» Мардановой Е.С. удостоверяю:

Ученый секретарь
кандидат биологических наук 

Орловский А.Ф.