

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

Вирусная инфекция на сегодняшний день является одной из самых серьезных угроз для сельского хозяйства, которая приводит к масштабному снижению урожайности. При этом эффективных таргетных способов защиты сельскохозяйственных растений от вирусных инфекций на сегодняшний день не существует. Диссертация Наталии Михайловны Ершовой посвящена актуальной проблеме взаимодействий вирусов и растений и выполнена на модельном лабораторном объекте, представителе семейства Пасленовые, *Nicotiana benthamiana*. В своей работе автор исследует функции гена, кодирующего белок класса Kunitz peptidase inhibitor-like protein (KPILP), и роль этого белка в патогенезе при инфекциях несколькими РНК-содержащими вирусами (Х вирус картофеля, вирус табачной мозаики и вирус табачной мозаики крестоцветных).

Актуальность и новизна темы

Вопросы, связанные с механизмами противовирусной защиты у растений, занимают одно из центральных мест в современной молекулярной биологии. Известно, что растения развили многоуровневую иммунную систему, включающую врожденный иммунитет (PTI/ETI), РНК-интерференцию и ряд белков, потенциально блокирующих вирусный цикл или, наоборот, способствующих ему. Однако многие аспекты участия конкретных клеточных компонентов, необходимых вирусам для собственной репликации или распространения, остаются не до конца изученными. Исследование таких факторов расширяет представления о механизмах вирусного патогенеза, открывая новые возможности для разработки подходов, позволяющих повышать устойчивость растений к фитовирусам, ингибируя их репродукцию.

В представленной работе впервые подробно исследован белок KPILP у *N. benthamiana*, сходный с ингибиторами пептидаз Кунитца, но не обладающий ингибирующей активностью в отношении сериновых протеаз. Автор связывает повышенную экспрессию этого гена с некоторыми ключевыми физиологическими изменениями клеток в ходе инфицирования, а также демонстрирует, как данный ген влияет на репродукцию и транспорт важнейших фитопатогенных вирусов. Тема отличается значительной научной новизной: фактические данные о мультифункциональных свойствах таких «кандидатов на провирусные факторы» до сих пор были весьма скудны.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа структурирована традиционным образом и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Библиографический список».

Во **Введении** даны краткое описание темы и структуры работы, аргументация актуальности и значимости, цель, задачи и методология исследования, обоснование достоверности результатов и защищаемые соискателем положения. Раздел **«Обзор литературы»** демонстрирует хорошее понимание автором современного состояния науки в области исследования. Данный раздел посвящен общим принципам развития вирусной инфекции в клетках растений, включая (+)РНК-вирусы, защитным стратегиям растения (иммунная система РТИ/ЕТІ, РНК-интерференция, деградация белков через убиквитин-протеасомную систему), роли различных клеточных факторов (цитоскелетные белки, компоненты мембранных контактных сайтов, факторы, содержащие анкириновые повторы, шапероны и т.п.) в патогенезе, механизмам каллоза-зависимого ограничения межклеточного транспорта и функциональной перестройке хлоропластов, которые играют важную роль в ответе на инфекцию. Обзор отличается высокой насыщенностью актуальными научными источниками, отражающими как фундаментальные данные о модели иммунитета, так и современные работы

по взаимодействию вирусных белков с белками-хозяевами. В целом, можно заключить, что обзор литературы является современным и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме работы. Список использованной литературы включает 377 источников.

В разделе **Материалы и методы** изложены экспериментальные подходы, использованные автором для выполнения работы, подробно описаны методы и статистический анализ. Примененные подходы соответствуют поставленным задачам. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных подходов. Описание примененных методов позволяет их воспроизведение, является достаточным и корректным.

В разделах «**Результаты**» и «**Обсуждение**» Н.М. Ершовой описаны экспериментальные результаты, полученные в ходе выполнения работы и их детальный анализ. Н.М. Ершовой была реализована серия экспериментов, спланированных на высоком профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Достоверно и статистически значимо показаны уровни накопления мРНК исследуемых генов, что убедительно доказывает, что экспрессия исследуемого гена *NbKPILP* новышается в ответ на системные инфекции ХВК, ВТМ и крВТМ. Далее приводится описание создания модельной системы для анализа свойств *NbKPILP* на фоне вирусной инфекции. Подход, основанный на использовании вирус-индуцируемого сайленсинга, позволил эффективно подавить экспрессию *NbKPILP*. На фоне сниженной экспрессии *NbKPILP* проанализирован физиологический статус модельных растений и показано, что *NbKPILP* участвует в следующих физиологических процессах на фоне вирусного патогенеза: (i) в регуляции передачи ретроградных сигналов от хлоропластов в ядро; (ii) в регуляции углеродного метаболизма; (iii) в регуляции отложений каллозы в районе плазмодесм. На следующем этапе исследования приводятся доказательства того, что *NbKPILP* является

позитивным регулятором межклеточного транспорта тобамовирусов ВТМ и крВТМ. Эксперименты выполнены с применением двух подходов. Результаты показывают, что NbKPILP стимулирует как ближний транспорт тобамовирусов, так и их репродукцию. На заключительном этапе исследования Ершова Н.М. проанализировала выживаемость и время жизни растений, зараженных тобамовирусами, в условиях подавленной и повышенной экспрессии *NbKPILP*. Результаты этих экспериментов показали, что сайленсинг *NbKPILP* продлевает время жизни модельных растений и снижает степень выраженности симптомов. На основании проведенного исследования Н.М. Ершова предлагает модель функционирования NbKPILP как вирус-индуцируемого провирусного клеточного фактора, необходимого для развития продуктивной инфекции тобамовирусов. Доказательства, приведенные в пользу гипотезы, выглядят весьма убедительными.

В разделе «Заключение» автор суммирует полученные результаты и высказывает предположение о том, в каких направлениях исследование может быть продолжено.

Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным в работе задачам. Новизна полученных результатов и их научное значение не вызывает сомнений.

Тем не менее, к представленной работе может быть высказан ряд замечаний.

1. Автор показывает, что повышение уровня экспрессии KPILP, которое происходит при инфекции ХВК, коррелирует со снижением уровня мРНК четырех ядерных генов, кодирующих белки хлоропластов. На основании этих данных сделан вывод о том, что «NbKPILP принимает участие в негативной регуляции экспрессии генов LHCB1, LHCB2, RBCS1A и NEMA1 и, таким образом, участвует в регуляции передачи ретроградных сигналов от пластид в ядро» (стр. 67). Действительно, KPILP неизвестным способом

снижает уровень экспрессии этих генов, однако непонятно, почему автор связывает это с сигналингом от хлоропластов к ядру. Изменение уровня экспрессии указанных генов, которые кодируют компоненты антенных комплексов (LHCB1, LHCB2), малую субъединицу RUBISCO (RBCS1A) и фермент биосинтеза хлорофилла (HEMA1), не обязательно должно происходить в результате сигналинга от хлоропластов к ядру, а может быть результатом другого рода регуляции. Поскольку в диссертации не приведено экспериментальных данных, прямо показывающих роль KPILP в передаче сигнала от хлоропластов к ядру, вывод о том, что белок KPILP играет такую роль, представляется преждевременным.

2. Автор приводит данные о том, что инфекция ХВК приводит к снижению уровня отложений каллозы. Это противоречит данным литературы. Существует несколько опубликованных работ из разных лабораторий, в которых показано, что инфекция ХВК приводит не к снижению, а к повышению уровня отложений каллозы. Более того, исследован задействованный в этом молекулярный механизм. Показано, что капсидный белок ХВК и белок ТБГ1 активируют определенную протеин-киназу, которая фосфорилирует белок Remorin 1.3, в результате чего последний перемещается в район плазмодесм и индуцирует отложение каллозы (Perraki et al., PLoS Pathog. 14, e1007378, 2018). Вероятно, при проведении описанных в диссертации экспериментов по окраске каллозы произошла некая методическая ошибка. В любом случае, включение в диссертацию результатов, очевидно противоречащих данным литературы, представляется неоправданным, поскольку ставит под сомнение все результаты, полученные в экспериментах, в которых проводилось окрашивание каллозы.

3. Ранее было показано, что кодирующая последовательность NbKPILP содержит вложенную рамку трансляции, которая кодирует полипептид длиной 53 аминокислотных остатка. Этот полипептид транслируется в растениях и имеет выраженный биологический эффект; в частности, его

суперэкспрессия приводит к развитию гиперчувствительного ответа. В диссертационной работе при рассмотрении эффекта повышения уровня экспрессии NbKPILP на уровне мРНК ряда белков хлоропластов не проанализирован вклад полипептида, кодируемого вложенной рамкой трансляции, в наблюдаемые эффекты. Такого рода анализ мог быть проведен, например, при временной экспрессии конструкции 35S-NbKPILP, несущей мутацию, блокирующую трансляцию вложенной рамки.

4. Эксперименты по анализу роль PKILP в системной инфекции тобамовирусов выглядят незавершенными. Показано, что повышение уровня PKILP на фоне инфекции ХБК приводит к более ранней, в сравнении с незараженными растениями, некротизации системно инфицированных листьев, приводящей к гибели растений. В этих экспериментах регистрировали только время жизни растений от момента инфекции тобамовирусами до гибели и не проводили каких-либо исследований этих растений. Таким образом, остается неясным, что является причиной наблюдаемого эффекта PKILP, - повышение уровня репликации тобамовирусов, ускорение их системного транспорта или активнее развивающаяся некротизация (программируемая клеточная смерть) верхних листьев растений. Исследование возможного влияния повышения уровня мРНК PKILP на развитие гиперчувствительного ответа растений и скорость транспорта вируса по флоэме могло бы быть полезно для понимания функций данного белка.

5. Обсуждение результатов сконцентрировано на объекте данной работы, белке NbKPILP, и не рассматривает большой массив данных, накопленных при экспериментальном изучении свойств и функций других ингибиторов пептидаз Кунитца в растениях. В частности, вне рассмотрения оказалось существенное число публикаций, показывающих, что ингибиторы пептидаз Кунитца принимают участие в защитном ответе растений на патогены, играя роль в ограничении/подавлении патогенов. В данной работе показано, что

NbKPIPR является про-вирусным фактором, способствуя развитию вирусной инфекции. Эти данные следовало обсудить в контексте имеющейся информации о роли ингибиторов пептидаз Кунитца у растений; такое обсуждение было бы весьма уместно в данном разделе диссертации.

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, профессор ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, заведующий отделом биохимии вирусов растений

Соловьев Андрей Геннадьевич

«20» марта 2025 г.

Контактные данные:

тел.: +7(495)939-31-98, e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 03.00.06 – Вирусология

Адрес места работы:

119992, Россия, г. Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО
«Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Тел.: +7 (495) 939-31-98; e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника НИИ физико-химической биологии имени А.Н.

Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова» Соловьева А.Г. удостоверяю: