

**ОТЗЫВ официального оппонента на диссертацию на соискание
ученой степени кандидата биологических наук Панкратенко Анны
Владимировны на тему: “Изучение свойств и функций белка табака,
эволюционно родственного белку VAR31 человека” по
специальности 03.01.03 - «молекулярная биология»**

Вирусные инфекции растений вызывают существенные потери урожая, поэтому исследование молекулярных механизмов, определяющих развитие вирусов растений, является важнейшей сельскохозяйственной задачей. Вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, их жизненный цикл тесно связан с организмом растения хозяина, что значительно осложняет поиск путей их подавления, которые не отразилось бы губительно на клетках растения. Поэтому актуальность исследований, приближающих нас к пониманию клеточных механизмов, которые запускаются вирусами и приводят к распространению инфекции не вызывает сомнений. Большую важность представляет изучение белков растений, взаимодействующих с вирусами и определяющих их передвижение по растению. Такие исследования имеют не только прикладное, но и академическое значение. Исследование транспорта вирионов является прекрасной моделью для изучения межклеточного транспорта белков и РНК в растениях. Белок *Nicotiana tabacum* Nt-4/1 взаимодействует с транспортным белком тосповируса кольцевой гнилости томатов в условиях дрожжевой двугибридной системы. Кроме того, у растений с пониженной экспрессией Nt-4/1 повышена эффективность дальнего транспорта вирионов в молодые листья. Эти данные указывают на роль белка Nt-4/1 в ограничении системного передвижения вирусов по

растению. Однако как осуществляется Nt-4/1-зависимое ингибирование транспорта вирусов, какие ещё белки участвуют в этом процессе, на настоящий момент неизвестно. Идентификация и характеристика белков, взаимодействующих с Nt-4/1, может помочь прояснить этот вопрос и описать новый молекулярный механизм, ограничивающий передвижение вирусов. Работа Панкратенко А.В. направлена на идентификацию белков, взаимодействующих с белком Nt-4/1 в условиях дрожжевой двугибридной системы; и на всесторонний анализ одного из выявленных белков – PBL (plant VAP-like). Поэтому тема диссертации Панкратенко А.В. представляется весьма интересной и актуальной.

Диссертация А.В. Панкратенко имеет общий объем в 96 страниц, включая 21 рисунок и 1 таблицу и построена по следующей схеме: «Введение» (5 стр.), «Обзор литературы» (27 стр.), «Материалы и методы» (12 стр.), «Результаты и обсуждение» (24 стр.), «Заключение» (1 стр.), «выводы» (1 стр.). Список литературы содержит 186 источников, все в международных изданиях на английском языке. Результаты работы были представлены на авторитетных отечественных и международных научных конференциях. По теме диссертации А.В. Панкратенко опубликовала 3 статьи в международных научных журналах, в одной из которых она является первым автором. Диссертация написана хорошим языком, в тексте практически отсутствуют опечатки и орфографические ошибки. Материал излагается четко, логично и с интересом читается.

Во введении автор обосновывает актуальность своего исследования, обсуждает степень разработанности темы и использованные методы, а также формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, значимость полученных результатов и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из двух больших глав. В первой главе обсуждается литература, посвящённая исследованиям белков, эволюционно родственных белку PBL: белку VAR31 млекопитающих и его гомологов у дрожжей Yet3p и Yet1p. В этой главе достаточно подробно представлены современные данные о белке VAR31 млекопитающих; подробно проанализировано его строение и роль в метаболизме и транспорте мембранных белков, а также в регуляции клеточного цикла и апоптозе. Я читала эту часть литературного обзора диссертации с большим интересом: она информативна, прекрасно написана и имеет прямое отношение к тематике диссертации. Вторая глава обзора посвящена плазмодесмам растительных клеток. Подробно описаны белковые компоненты плазмодесм, роль цитоскелета, липидов и клеточной стенки в функционировании плазмодесм. Эта часть обзора имеет самостоятельную ценность, поскольку на момент написания диссертации в отечественной научной литературе не было обзорных статей такого характера. В целом, литературный обзор диссертации оставляет очень приятное впечатление. Он демонстрирует глубокое понимание диссертантом круга изучаемых проблем.

Достоверность полученных результатов в первую очередь зависит от корректности применения методических подходов. Используемые автором методические подходы адекватны поставленным задачам. В процессе работы над диссертацией автору пришлось овладеть широким спектром современных методик молекулярной биологии, биохимии, конфокальной микроскопии, биоинформатики. Все использованные методики описаны подробно, на основании представленной информации все процедуры могут быть воспроизведены.

В главе “Результаты и обсуждение” последовательно приводятся этапы проведения экспериментов. На первом этапе с помощью дрожжевой двугибридной системы был изолирован партнёр белка 4/1 - белок PBL. При выполнении этой части работы диссертант столкнулся с тем, что использование полноразмерного белка 4/1 в качестве приманки было невозможно, поскольку он вызывал авто-активацию HIS3. Для решения этой проблемы диссертант провёл дополнительные эксперименты и установил регион белка 4/1, вызывающий активацию HIS3. Интересно, что этот же участок белка определяет мембранную локализацию 4/1, что, возможно, связано с наличием амфипатических α -спиралей. Далее для поиска партнеров белка 4/1 использовался его укорочённый вариант без активационного домена. Из 15 партнёров белка 4/1 для дальнейшего анализа был выбран белок PBL. С помощью метода поверхностного плазмонного резонанса были определены параметры взаимодействия этих белков *in vitro*. В ходе выполнения работы диссертант получила несколько новых значимых результатов о структуре и функциях PBL. Было показано, что NtPBL и HsBAP31 обладают схожими структурными особенностями, что позволило автору выдвинуть гипотезу о локализации PBL в мембране ЭПР. Локализация белка NtPBL-mRFP в эпидермальных клетках листьев *N. benthamiana* с помощью ко- экспрессии NtPBL-mRFP и маркера ЭПР m-GFP5-ER подтвердила эту гипотезу. Более того, полученные диссертантом данные о влиянии сверхэкспрессии NtPBL на локализацию белка Nt-4/1d90-GFP, говорят о возможном внутриклеточном взаимодействии белков PBL и 4/1.

Но наиболее интересными мне представляются эксперименты, указывающие на то, что, в отличие от HsBAP31, NtPBL-C обладает

двойной РНК-связывающей активностью и способен с высокой степенью аффинности связываться с предшественниками miRNA. Эти данные говорят о уникальных свойствах NtPBL-C, и они позволили автору выдвинуть гипотезу о роли NtPBL-C в функционировании микроРНК. Для проверки этой гипотезы гидрофильная области NtPBL была экспрессирована в растениях табака. Фенотип полученных трансгенных растений был сходен с фенотипом растений, в которых нарушены сигнальные пути микро РНК. Результаты диссертационной работы открывают большие возможности для дальнейших исследований роли белков 4/1 и PBL в развитии и жизнедеятельности растений.

В главе «Заключение» на основании результатов проведённого исследования и данных литературы предложена общая схема, объясняющая роль белков 4/1 и PBL в жизнедеятельности растений. Производит особенно приятное впечатление то, что автор подчеркивает и обсуждает альтернативные гипотезы, объясняющие полученные результаты, а также указывает на возможные пути дальнейшего продолжения этой работы. Выводы сформулированы автором четко и обоснованно. Автореферат оформлен по правилам, полностью отражает содержание диссертации, в нем охарактеризованы все этапы экспериментальной работы.

Полученные диссертантом новые данные, несомненно, являются приоритетными и имеют большое теоретическое и практическое значение для молекулярной биологии, биохимии и вирусологии растений. Объём представленных в работе экспериментальных данных вполне соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам, представляемым на соискание степени кандидата биологических наук по специальности «молекулярная биология».

При прочтении работы возникло несколько незначительных замечаний:

1. С моей точки зрения, в работе недостаточно обсуждена научная литература, посвящённая свойствам белка 4/1.

2. Рис.9. «Субклеточная локализация Nt-4/1d90-GFP в эпидермальных клетках листа *N. bentamiana*.» Хотелось бы увидеть локализацию ЭПР в той же клетке.

3. В главе результаты написано, что при ко-экспрессии NtPBL-mRFP с Nt-4/1-GFP, Nt-4/1 был локализован во множестве малых флуоресцирующих телец, которые визуальнo превосходили своим числом аналогичные Nt-4/1 тельца, наблюдаемые при одиночной экспрессии Nt-4/1-GFP. Поскольку в работе не представлены изображения Nt-4/1 телец, наблюдаемых при одиночной экспрессии Nt-4/1-GFP, нужна ссылка на соответствующую работу.

4. Результаты, часть 6. “При этом Nt-4/1-GFP локализовывался во множестве малых флуоресцирующих телец (рис. 12 a-f)”. Должно быть рис 12 a,c,d,f.

5. Структура и образование про-апоптической производной VAR31 P20VAR31 описаны в разделе 1.3.3, тогда как первый раз она упоминается в разделе 1.3.1 без объяснений.

6. Не сказано, при какой температуре проводили индукцию экспрессии белков в бактериальной суспензии *E. coli*.

7. В методах не указано, какой камерой фотографировались гели.

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 паспорту специальности 03.01.03 – «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 она оформлена согласно приложениям No 5, 6 «Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова».

Таким образом, соискатель Панкратенко Анна Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

Ст. науч. сотр. кафедры Физиологии Растений

Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Бибикова Татьяна Николаевна

Контактные данные:

тел.: 7(985)3973186, e-mail: bibikova@mail.bio.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена

диссертация: 03.01.05 Физиология Растений

Адрес места работы:

МГУ имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет,

ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119192

Тел.: 84959395542

27 августа 2020