

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Чергинцева Дениса Александровича
на тему: «Дополнительные белки, кодируемые генными модулями,
родственными тройному блоку транспортных генов вирусов растений»
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Фундаментальные исследования вирусов растений крайне важны для развития устойчивого сельского хозяйства. Глубокое понимание механизмов взаимодействия вирусов с растением позволяет разрабатывать более эффективные и экономически оправданные стратегии защиты растений, позволяющие избежать потерь урожая и, соответственно, дефицита продовольствия по всему миру. Более того, актуальность проводимых исследований обусловлена наличием большого количества пробелов в современном понимании различных аспектов вирусного патогенеза в растениях, таких как экспрессия генов вирусов, взаимодействие вируса с растением-хозяином, транспорт вируса по растению, формирование защитного ответа растения на инфекцию.

В диссертационной работе Дениса Александровича Чергинцева изучены свойства белка р42 X-вируса шалота и белка vDRB вируса, обнаруженного в транскриптомных контигах бриевого мха *Dicranum scoparium*. Объединяет эти два белка принадлежность к тройному генному блоку (TGB), который распространен среди вирусов растений и белки, необходимые для транспорта вирусов. Гены р42 и vDRB перекрываются с основными генами блока и являются дополнительными к ним, таким образом, образуя модули, состоящие из четырех генов. Вероятной причиной возникновения этих модулей может быть адаптация вируса к определенным растениям-хозяевам, при инфицировании которых изучаемые белки выполняют специфические функции, дополняющие активности белков TGB.

Диссертационная работа Д.А. Чергинцева изложена на 150 страницах, содержит 369 источников литературы, 16 рисунков, 1 таблицу и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждения», «Заключение» и «Список литературы». Структура диссертации соответствует требованиям к оформлению диссертационных работ. В разделе «Введение» автор четко формулирует цели и задачи, выносимые на защиту положения, а также обосновывает актуальность работы, ее научную и практическую значимость, описывает использованные методы, личный вклад в работу, апробацию и

степень достоверности результатов. Положения, выносимые на защиту, опубликованы в трех статьях в рецензируемых международных журналах.

Раздел «Обзор литературы» довольно объемный и состоит из нескольких глав, в которых тщательно и полно представлен анализ современных научных данных, что помогает определить значимость полученных результатов и их положение относительно других исследований, касающейся взаимодействия вируса с растительной клеткой. Первая часть обзора литературы знакомит читателя с транспортными белками вирусов, особенно подробно рассматривается транспортная система TGB и ее вариации у разных групп вирусов. В следующей обширной части приведено описание посттранскрипционного РНК-сайленсинга в растениях, обсуждается роль данного процесса в защите растения от вирусной инфекции, приводятся примеры активности белков вируса, способных подавлять противовирусный ответ. Завершается обзор литературы рассмотрением опубликованных данных о белках vDRB и p42, тем самым делается логичный переход к освещению проблематики, решаемой в работе в рамках поставленных задач.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных методик, реактивов и оборудования. Набор методик соответствует поставленным задачам, а полнота их изложения позволяет при необходимости воспроизвести проведенные эксперименты.

Раздел «Результаты» представлен двумя частями, первая посвящена исследованию p42, вторая – vDRB. Для p42 X-вируса шалота была показана способность транслироваться на тетрацистронной матрице по механизму «leaky scanning», при сравнительном анализе геномных последовательностей близкородственных вирусов было обнаружено, что такой механизм может являться общим для трансляции p42 у представителей рода *Allexivirus*.

Дальнейшие исследования белков p42 и vDRB, результаты которых изложены в двух частях раздела, были проведены по одному алгоритму. Методом конфокальной микроскопии участков ткани листьев *Nicotiana benthamiana*, временно экспрессирующих рекомбинантные варианты p42 и vDRB, слитые с последовательностью GFP, была установлена внутриклеточная локализация двух белков. Показано, что оба белка имеют цитоплазматическую локализацию: p42 при этом формирует нитевидные структуры, расположенные вдоль микротрубочек, а также тельца, которые могут быть связаны с микротрубочками; vDRB образует мелкие тельца, расположенные рядом с мембранами ЭПР и не имеющие гидрофобного содержимого внутри. Для двух белков была показана способность связывать нуклеиновые кислоты в условиях *in vitro*. Обнаружено, что p42 способен эффективно связывать одноцепочечную РНК, а vDRB связывает и

одноцепочечную и двуцепочечную РНК. В случае vDRB автором предполагается, что связывающая активность в отношении двуцепочечной РНК является неспецифической и может быть обусловлена электростатическими взаимодействиями. Путем сайт-направленного мутагенеза было показано, что за взаимодействие с двуцепочечной РНК у vDRB отвечает его РНК-связывающий домен, который был ранее предсказан биоинформатически.

В связи с обнаруженной способностью связывать РНК, далее белки были исследованы на предмет влияния на метаболизм РНК в клетке. В этих экспериментах Д.А. Чергинцевым были использованы общепринятые тестовые системы, позволяющие установить влияние белков на процесс РНК-сайленсинга. Временно экспрессированный в листьях белок p42 оказался способен ингибировать РНК-сайленсинг, вызванный одноцепочечной РНК, но не двуцепочечной РНК. Эти данные согласуются с обнаруженной РНК-связывающей активностью p42. Также p42, однако, оказался неспособен влиять на транспорт сигнала сайленсинга, который происходит благодаря межклеточному перемещению малых интерферирующих РНК. В тестовой системе с использованием рекомбинантного вируса морщинистости турнепса TCV-GFP p42 проявил функции слабого супрессора сайленсинга, частично облегчающего межклеточный транспорт вируса. Белок vDRB также не проявлял активности подавления сайленсинга, вызванного одно- и двуцепочечными РНК и не влиял на межклеточный транспорт сигнала сайленсинга. По сравнению с p42, vDRB проявил себя более сильным супрессором сайленсинга в тестовой системе с использованием TCV-GFP.

Для p42 также была обнаружена способность подавлять нонсенс-опосредованный распад РНК, вызванный длинной 3'-концевой нетранслируемой областью. Полученный результат интересен в контексте наличия у альфа-подобных вирусов характерной особенности кодировать субгеномные РНК, 3'-концевая область которых не транслируется и может таким образом служить активатором разрушения РНК. Показанная активность белка p42 может способствовать увеличению времени жизни таких транскриптов и способствовать развитию вирусной инфекции.

Активность белка vDRB была также исследована в контексте инфекции X-вируса картофеля (ХВК), для чего была создана генно-инженерная конструкция, содержащая полногеномную копию ХВК, модифицированную для экспрессии vDRB. При заражении растений *N. benthamiana* было обнаружено, что рекомбинантный ХВК-vDRB вызывает менее существенные симптомы на растениях, чем ХВК дикого типа. Однако, несмотря на ослабление симптомов, зараженные ХВК-vDRB растения накапливали

существенно больше вируса и содержали меньше свободных от инфекции участков ткани. Эти результаты указывают на довольно необычное функционирование vDRB как белка-супрессора сайленсинга, так как для других вирусных супрессоров, как правило, характерна индукция защитных реакций в растении, что сопровождается развитием более серьезных симптомов, реакцией гиперчувствительности и некрозами.

Таким образом, в работе Д.А. Чергинцева проведен комплекс исследований белков p42 и vDRB, в ходе которых был установлен ряд функций данных белков, позволяющих отнести их к категории вирусных супрессоров РНК-сайленсинга. Следует отметить, что исследования проводились с использованием растений *Nicotiana benthamiana*, стандартного модельного объекта для вирусологии растений, поэтому полученные результаты могут показывать не всю картину функционирования исследованных белков, которую можно проследить только на природных хозяевах вирусов.

В разделе «Обсуждение» диссертационной работы автор подводит итоги результатов исследований и связывает полученные данные с известными материалами из литературы. В разделе выдвигаются предположения о вероятных механизмах функционирования p42 и vDRB, при этом используется информация, приведенная в расширенном виде в разделе обзора литературы.

После внимательного прочтения работы возникло несколько вопросов, замечаний и предложений.

Замечания:

1. В обзоре литературы изложено большое количество актуального и важного материала, однако он не структурирован таким образом, чтобы подчеркнуть необходимость текущего исследования. Автор не подчеркивает пробелы в существующих знаниях о вирусном заражении и обзор оканчивается довольно внезапно, переходя к Материалам и Методам и, далее, к Результатам.
2. В обзоре очень подробно рассмотрено разнообразие супрессоров сайленсинга у разных вирусов (на мой взгляд, этот раздел можно было бы даже сократить), однако мало внимания уделено специфичности противовирусного ответа растения. Насколько разными могут быть такие ответы? Это показало бы, в какой мере появление дополнительных генов может служить цели адаптации вируса к хозяину.
3. Немного удивительно отсутствие ссылок на литературу в Методике. Казалось бы, большинство методов ранее описаны в публикациях, однако автор их просто подробно изложил без отсылки к первоисточнику (кроме последовательностей).

4. Я бы рекомендовала чуть подробнее описать выращивание растений (грунт, полив солями, если был), а также механическую инокуляцию. Зачем листья посыпали диатомитом и как вводили ДНК? Раздел про 5'-RACE следовало бы назвать как-то более понятно, описав кратко принцип метода.
5. На рисунке 7 изображены последовательности р42 у разных вирусов, в том числе, оказывается, у *Rehmannia allexivirus* этого гена нет. Интересно было бы узнать, в чем отличия этого вируса в плане заражения, насколько отсутствие р42 влияет на его активность?
6. Мелкое замечание: в разделе 1.3 Результаты описано изменение соотношения РНК:белок (Рис. 8), а в 2.1 белок:РНК (Рис. 12). Это, скорее всего, случайность, но, может быть, в такой инверсии есть смысл.
7. Страница 89: как было описано ранее – где? – можно наблюдать красную кайму шириной 10-15 клеток – не мог бы автор пояснить, что собой представляет эта полоса?
8. На рисунке 13 изображены тельца, содержащие vDRB-GFP, которые не колокализуются с несколькими маркерами органелл. Весьма любопытно, это за тельца. Вероятно, локализацию в дальнейшем можно было бы изучить с помощью ТЭМ и меченых золотом антител.
9. В Обсуждении автор переходит от одного гена/белка к другому без всякой связи. Сравнения двух изучаемых белков между собой ни в Результаты, ни в Обсуждении нет, а в Заключение появляется сравнение. Мне кажется, здесь есть логическая недоработка: если в работе есть 2 белка, то надо объяснить, почему их выбрали (ведь эти вирусы и последовательности не родственные), и гораздо легче было бы воспринимать данные в виде сравнения двух объектов. Почему от такого построения отказались?

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 Чергинцев Денис Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (биологические науки).

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук,
доцент кафедры физиологии растений Биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова»

Брейгина Мария Александровна

подпись

Дата подписания

26.02.2026

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-12-09, e-mail: breygina@mail.bio.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

1.5.21 - Физиология и биохимия растений (Биологические науки)

Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В.Ломоносова», Биологический факультет

Тел.: +7 (495) 939-10-00; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

Подпись Брейгиной Марии Александровны заверяю

Ученый секретарь биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Е.В. Петрова

