

**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**

Диссертационная работа Д.А.Чергинцева посвящена изучению двух белков вирусов растений, р42 и vDRB, которые кодируются генами модулей, родственных тройному блоку транспортных генов (TGB). TGB характерен для ряда вирусов растений и три белка, кодируемые им, необходимы для транспорта вируса. Наличие белка р42 является отличительной чертой представителей рода *Allexivirus*, его открытая рамка трансляции расположена после рамок других генов TGB и перекрывается с 3'-концевым участком третьего гена TGB. Открытая рамка трансляции белка vDRB расположена перед TGB, перекрывается с 5'-концевой областью первого гена TGB. Новизна исследования заключается в том, что в настоящей работе свойства и функции р42 и vDRB были изучены впервые.

Изучение свойств белков вирусов является важным как с фундаментальной точки зрения для исследования процессов патогенеза, так, потенциально, и с практической, - новые полученные данные могут быть использованы при разработке способов защиты растений от инфекций.

Диссертационная работа изложена на 150 страницах и включает разделы: введение, список сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение и список литературы, представленный 369 источниками. Работа иллюстрирована 16 рисунками и включает одну таблицу.

Во введении диссертации указаны цель и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, а также отражены актуальность работы и ее значимость, описаны объект исследования,

использованные методы, вклад автора, приведены сведения о степени достоверности выносимых на защиту положений, материал которых опубликован в трех статьях, в журналах, входящих в Q1 и Q2 по базам WoS/Scopus.

Обзор литературы довольно обширный, начинается подразделами, содержащими краткое описание транспортных белков вирусов растений и более детализованное – для белков TGB. Затем следует раздел, раскрывающий представления о разнообразии и эволюции TGB-содержащих вирусов. Основная часть обзора литературы представляет собой подробное описание процессов, лежащих в основе РНК-сайленсинга в растениях, механизмов противодействия растений вирусной инфекции с использованием РНК-сайленсинга, а также приведен обзор известных белков-супрессоров сайленсинга вирусов растений с характеристикой способов подавления ими противовирусной защиты. Завершается обзор литературы изложением ранее полученных данных о непосредственных объектах исследования, аллексивирусах и, в частности, X-вирусе лука-шалота, а также о тетрацистронном транспортном блоке и кодируемом им белке vDRB.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробный перечень методик, связанных с получением использованных в работе генно-инженерных конструкций, и о работе с ними. Также приведены данные об использованных способах выделения белков и постановке связывания белков с нуклеиновыми кислотами. Разнообразие методов довольно широкое и включает трансформацию растений агробактериями для временной экспрессии генов, заражение растений вирусами с помощью инокуляции и агроинфильтрации, работу с векторами, несущими инфекционные копии вирусов, конфокальную и эпифлуоресцентную микроскопию, количественную ПЦР, амплификацию 5'-концевых участков с помощью 5'-

RACE, Вестерн-блот, использование биоинформатического анализа. Помимо этого, раздел содержит подробный список использованных реагентов, ферментов, олигонуклеотидов и коммерческих наборов для работы с нуклеиновыми кислотами.

Раздел результатов состоит из двух частей. В первом приводятся данные по работе с р42 ShVX, во втором – про белок vDRB из предполагаемого вируса, идентифицированного в транскриптомных контигах растений *Dicranum scoparium* и *Colobanthus quitensis*.

В ходе работы Чергинцевым Д.А. были картированы 5'-концевые нуклеотиды двух субгеномных РНК X-вируса лука-шалота и было установлено, что белок р42 способен синтезироваться на матрице РНК, имитирующей субгеномную РНК вируса, используя механизм «leaky scanning» для инициации трансляции. Основываясь на транскриптомных данных вирусов рода *Allexivirus* было также показано, что механизм «leaky scanning» может быть общим у представителей рода для инициации трансляции четвертой открытой рамки субгеномной РНК, кодирующей белок р42. В ряде общепринятых модельных экспериментов соискателем было показано, что р42 способен супрессировать РНК-сайленсинг, вызванный одноцепочечной РНК, но не проявляет активности в отношении сайленсинга, иницируемого двухцепочечной РНК, что согласуется с полученными данными о способности р42 связывать одноцепочечную РНК в условиях *in vitro*. Было установлено, что р42 способен проявлять слабую активность супрессора сайленсинга в контексте инфекции вируса морщинистости турнепса. В экспериментальной системе с использованием репортерной конструкции, содержащей кодирующую последовательность GFP с длинной 3'-нетранслируемым участком, было показано, что р42 способен подавлять в растении нонсенс-опосредованный распад РНК, вызываемый длинными 3'-нетранслируемыми областями мРНК. Для белка vDRB была обнаружена

способность связывать различные варианты нуклеиновых кислот: одно- и двухцепочечную РНК, а также ДНК. Путем сайт-направленного мутагенеза было показано, что за специфичность связывания двухцепочечной РНК отвечает домен белка vDRB, имеющий определенное сходство с РНК-связывающими доменами клеточных белков, участвующих в процессах РНК-сайленсинга. Несмотря на то, что vDRB также был неспособен супрессировать сайленсинг, вызываемый двухцепочечными РНК, а также и одноцепочечными, в отличие от p42, было обнаружено, что vDRB проявлял значительную активность в качестве супрессора РНК-сайленсинга в контексте вирусных инфекций. При экспрессии vDRB в составе X-вируса картофеля зараженные растения проявляли более слабые симптомы инфекции, но накапливали больше РНК вируса по сравнению с растениями, зараженными вирусом, не экспрессирующим vDRB. Также с использованием рекомбинантных белков, слитых с GFP, была показана локализация p42 и vDRB внутри клеток, однако причина наблюдаемой локализации и ее роль в функционировании белка не была рассмотрена в рамках данной работы.

Раздел обсуждений содержит резюме полученных результатов и их обобщение с привлечением данных, известных из литературы. Автор выдвигает предположения относительно возможных стратегий, используемых белками p42 и vDRB для подавления противовирусного ответа в растении, приводятся известные аналогичные механизмы функционирования белков других вирусов.

Несмотря на общую положительную оценку работы, к ней есть несколько замечаний и вопросов.

Описание некоторых стандартных процедур, например, «Выделение и очистка плазмиды из бактериальных клеток», «Аmplификация с помощью полимеразной цепной реакции», «Электрофорез в агарозном геле», «Реакция

рестрикции» и ряда других приведено с ненужными подробностями, что неуместно в кандидатской диссертации.

В разделе 1.2 в эксперименте по картированию 5' концов РНК с помощью 5'-RACE (Рисунок 5) идентифицированы субгеномные РНК вируса ShVX только для TGB1 и CP. Однако, сигнал для CP намного слабее, чем для TGB1, хотя CP вероятно синтезируется в больших количествах, чем белки TGB и можно было бы ожидать обратное. Было бы полезно это отметить и прокомментировать.

В разделе 1.5 на страницах 89-90 представлены результаты анализа способности белка p42 супрессировать сайленсинг, индуцированный оцРНК. Для этого проводили два эксперимента – растения *N. benthamiana* дикого типа или трансгенные растения – продуценты GFP инфильтрировали векторами для ко-экспрессии GFP с p42 или с пустым вектором. При этом результаты были разными. В случае трансгенных растений p42 не оказывал влияния на РНК-сайленсинг, а в нетрансгенных примерно в 2 раза повышал экспрессию GFP, что диссертант интерпретирует как супрессию сайленсинга. Остается неясным, зачем была использована первая система и с чем связаны наблюдаемые различия.

В разделе 1.6 исследуется влияние белка p42 на нонсенс-опосредованный распад РНК, при этом все эксперименты проводили в условиях подавления РНК-сайленсинга (коэкспрессия совместно с супрессором p14). Для чего это делалось? Вполне возможно, что наблюдаемое повышение свечения GFP-LUTR в присутствии p42 может быть обусловлено не подавлением NMD, а совместным влиянием белков p14 и p42 на сайленсинг. Вполне можно было бы экспрессировать GFP и GFP-LUTR и без супрессора p14, по крайней мере, флуоресценцию GFP обычно видно и так.

В разделе 2.1 исследуется способность vDRB связывать одноцепочечную РНК, двухцепочечную РНК и двухцепочечную ДНК, при

это все субстраты с той или иной эффективностью связывались. Почему не проверили одноцепочечную ДНК?

В разделе 2.4 исследуется влияние vDRB на межклеточный транспорт TCV-GFP и показано, что vDRB способствует транспорту TCV-GFP из клетки в клетку и значительно увеличивает размер инфицированных локусов. Но почему из этого делается вывод о том, что vDRB супрессирует именно сайленсинг, а не как-то влияет именно на межклеточный транспорт? Аналогичный вопрос и в отношении экспериментов с белком p42.

В разделе 2.5 при исследовании влияния vDRB на инфекцию PVX показано, что симптомы, вызванные PVX-vDRB, были менее выраженными и менее сильными, чем те, которые были вызваны PVX. Но при этом уровень РНК вируса в случае PVX-vDRB был выше, чем для PVX. Эти данные выглядят противоречивыми и неясно, почему диссертант делает заключение о том, что экспрессия vDRB в контексте инфекции PVX вызывала ингибирование развития РНК-сайленсинга.

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, профессор,
заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией систем
молекулярного клонирования федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы
биотехнологии" Российской академии наук»

Равин Николай Викторович

24.02.2026

Контактные данные:

тел.: +7 (499) 783-32-64, e-mail: nravin@biengi.ac.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.02.02 – Вирусология (Биологические науки)

Адрес места работы:

119071, Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский
центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии
наук»
Тел.: +7 (495) 954-52-83; e-mail: info@fbras.ru

Подпись Равина Николая Викторовича заверяю
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН
к.б.н. А.Ф. Орловский

24.02.2026