

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Чергинцев Денис Александрович

**Дополнительные белки, кодируемые генными модулями,
родственными тройному блоку транспортных генов вирусов
растений**

1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре вирусологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель

Соловьев Андрей Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты

Равин Николай Викторович, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией систем молекулярного клонирования Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Брейгина Мария Александровна, доктор биологических наук, доцент кафедры физиологии растений биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Спеченкова Надежда Андреевна, кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и протеомики растений Государственного научного центра Российской Федерации «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «12» марта 2026 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.015.4.dissovet@org.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3789>

Автореферат разослан «__» февраля 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Для вирулентности вирусов растений важными являются вирусные белки-супрессоры РНК-сайленсинга (ВСП) и транспортные белки (ТБ) (García, Pallás, 2015). Геномы ряда (+)РНК-вирусов растений содержат тройной блок генов (triple gene block, TGB), кодирующий белки TGB1, TGB2 и TGB3; белки TGB являются ТБ, а у некоторых вирусов также имеют активность ВСП (Morozov, Solovyev, 2003; Senshu et al., 2009). Открытые рамки трансляции (ОРТ) трех белков TGB частично перекрываются и транслируются по механизму «leaky scanning» на одной субгеномной РНК (Fujimoto et al., 2022). Считается, что TGB эволюционировал как единый генный модуль (Solovyev, Morozov, 2017). Одним из направлений эволюции TGB могло быть приобретение дополнительных генов, кодирующих белки, функции которых связаны с функциями белков TGB (Morozov, Solovyev, 2022).

Для вирусов рода *Allexivirus* (сем. *Alphaflexiviridae*), в том числе для X-вируса лука-шалота (shallot virus X, ShVX), характерно наличие гена, кодирующего белок p42 и расположенного с 5'-дистальной стороны от TGB (Kanyuka et al., 1992). Белки, имеющие сходство с p42, не обнаружены ни у других вирусов, ни среди клеточных белков; функции белка p42 ShVX остаются неизвестными.

Другой схожий с TGB модуль генов, названный тетрацистронным транспортным блоком (tetra-cistron movement block, TCMB), был найден в транскриптомных контигах *Dicranum scoparium* и *Colobanthus quitensis*. Эти контиги соответствовали геномному сегменту РНК2 вирусов, которые были отнесены к группе, родственной семейству *Benyviridae* (Morozov, Solovyev, 2022). Отличительной чертой TCMB является ген, частично перекрывающийся с 5'-концевым районом гена TGB1 и кодирующий vDRB – маленький белок, который содержит предсказываемый трансмембранный домен и участок, имеющий сходство с дцРНК-связывающим доменом, найденным у клеточных белков, таких, как DRB4 и HYL1, которые способны связывать дцРНК и участвуют в РНК-сайленсинге и противовирусной защите (Eamens et al., 2012; Morozov, Solovyev, 2022; Rahman et al., 2021).

До настоящего времени белки DRB и p42 не были охарактеризованы экспериментально.

Цели и задачи исследования

Целью работы являлось изучение свойств белков, кодируемых дополнительными генами TGB-содержащих геномных модулей вирусов растений, а именно неохарактеризованного белка vDRB вируса *D. scoparium* и консервативного для вирусов рода *Allexivirus* белка p42.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Изучить способность vDRB и p42 ShVX связывать различные типы нуклеиновых кислот в условиях *in vitro*.
- 2) Исследовать внутриклеточную локализацию vDRB и p42 ShVX при временной экспрессии в листьях *N. benthamiana*.
- 3) Оценить способность vDRB и p42 ShVX супрессировать сайленсинг в различных экспериментальных системах.
- 4) Установить механизм экспрессии гена p42 ShVX.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования были белки геномных модулей, родственных TGB: белок p42 X-вируса шалота (ShVX) и кодирующая его область генома вируса, а также белок vDRB вируса мха *Dicranum scoparium*. Предметом исследования было выявление функций p42 и vDRB в различных экспериментальных системах.

Научная новизна исследования

Научная новизна заключается в установлении свойств ранее экспериментально не изученных белков, кодируемых дополнительными генами геномных модулей, родственных тройному генному блоку транспортных белков вирусов растений. Были впервые показаны активности белков p42 ShVX и vDRB в качестве вирусных супрессоров РНК-сайленсинга в ряде экспериментальных систем.

Теоретическая и практическая значимость работы

Значимость работы заключается в обнаружении способности супрессировать РНК-сайленсинг у неродственных белков, гены которых являются дополнительными к генам TGB. Полученные данные позволяют расширить представление об эволюции транспортных систем вирусов растений и тесной связи вирусного транспорта и подавления противовирусной защиты растения. Поскольку TGB широко представлен у вирусов растений, имеющих экономически важное значение, дальнейшее изучение деталей молекулярных механизмов активностей белков, которые были охарактеризованы в данной работе, в будущем может внести вклад в развитие безвирусного растениеводства.

Личный вклад соискателя

Д.А. Чергинцев принимал непосредственное участие в изучении литературных данных, планировании и проведении исследований, статистической обработке и анализе

полученных результатов, а также в обсуждении и написании текстов статей и подготовке материалов к ним. Участие соавторов в отдельных этапах исследования надлежащим образом отражено в публикациях.

Методология и методы диссертационного исследования

В исследовании применялись современные методы геномной инженерии и молекулярной биологии, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, количественная ПЦР с обратной транскрипцией. Все работы выполнены с использованием современного оборудования.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок p42 ShVX способен синтезироваться на функционально тетрацистронной РНК по механизму «leaky scanning»; с точки зрения трансляции, TGB и ген p42 составляют единый геномный модуль.
2. Белок p42 ко-локализуется с микротрубочками.
3. Белок p42 ShVX способен связывать *in vitro* оцРНК, но не дцРНК.
4. Белок p42 ShVX способен супрессировать сайленсинг, вызванный оцРНК, и подавлять NMD, а также проявлять активность ВСП в контексте инфекции TCV.
5. Белок vDRB способен связывать оцРНК и дцРНК, проявляя в случае дцРНК большую эффективность связывания.
6. vDRB выступает в качестве супрессора сайленсинга в контексте вирусной инфекции.

Степень достоверности и апробация результатов

Результаты были получены с использованием современного научного оборудования и общепризнанных актуальных методик. Достоверность полученных результатов обусловлена необходимым количеством проведенных экспериментальных исследований, воспроизводимостью данных в повторных экспериментах и статистической обработкой результатов. По теме диссертационной работы были опубликованы три статьи в рецензируемых международных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 150 печатных страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Список литературы. Рукопись содержит 1 таблицу и 16 рисунков. Список литературы включает 369 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Исследование механизма экспрессии гена p42 и функций белка p42

1.1. Экспрессия гена p42 ShVX

Экспрессия 5'-дистальных генов генома ShVX (Рис. 1А) может происходить с сгРНК, как это было показано для других представителей *Alphaflexiviridae* (Fujimoto et al., 2022). Для поиска сгРНК ShVX была использована методика амплификации 5'-концов кДНК (5'-RACE) со специфическими праймерами (Рис. 1А). В зараженных ShVX растениях *Allium cepa* var. *aggregatum* были выявлены продукты амплификации только для генов TGB1 и CP (Рис. 1Б), после их секвенирования было обнаружено, что 5'-концевые нуклеотиды субгеномных РНК для TGB1 и CP соответствуют остаткам гуанозина в позициях 5319 и 7605 генома ShVX, соответственно (Рис. 1В).

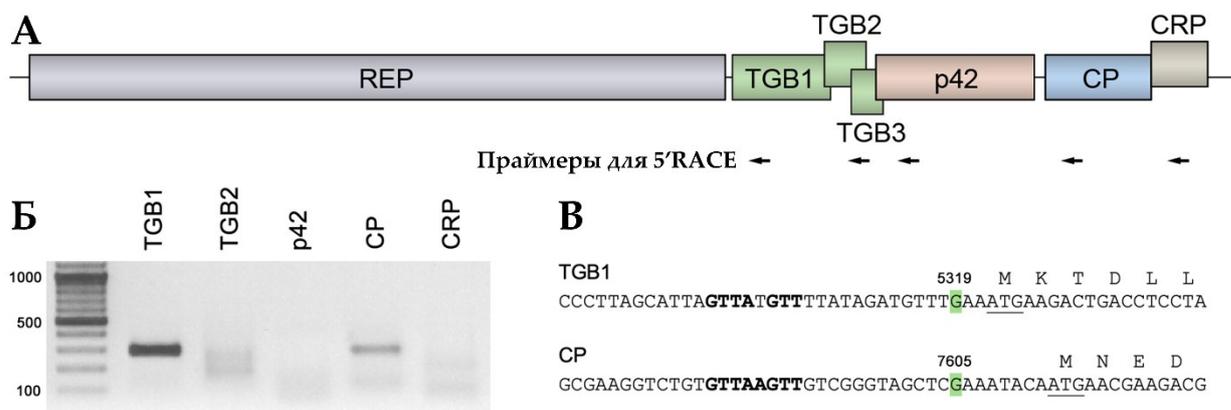


Рисунок 1. Анализ сгРНК ShVX с помощью 5'-RACE. (А) Схематическое изображение генома ShVX с позициями праймеров, использованных для 5'-RACE, показанными стрелками. (Б) Изображение агарозного геля с нанесенными продуктами 5'-RACE. Слева указаны маркеры длин ДНК (в парах оснований). (В) Картированные 5'-концы сгРНК TGB1 и CP. 5'-концевые нуклеотиды сгРНК показаны зеленым цветом. Подчеркнуты инициаторные кодоны TGB1 и CP. Жирным шрифтом выделена последовательность GTTAAGTT, которая является консервативным элементом промоторов сгРНК вирусов семейства *Alphaflexiviridae*.

Поскольку при постановке 5'-RACE не было обнаружено продукта амплификации с праймерами, специфическими для p42, можно было предположить, что экспрессия p42 не требует наличия отдельной сгРНК, и трансляция p42 может происходить по механизму «leaky scanning» на более длинной сгРНК, такой как сгРНК TGB1. При анализе участка генома ShVX, включающего TGB и p42, было выявлено, что: (1) ген p42 перекрывается с геном TGB3; (2) инициаторный кодон TGB2 является слабым, так как находится в неоптимальном контексте, согласно Козак (Kozak, 1983; Kozak, 1989); (3) инициаторный кодон AUG OPT TGB2 является единственным триплетом AUG в области от начала OPT TGB1 до инициаторного кодона OPT p42; и (4) инициаторный кодон AUG OPT p42

находится в контексте, оптимальном для инициации трансляции (Рис. 2). Эти наблюдения согласуются с гипотезой о том, что трансляция р42 происходит на матрице сгРНК TGB1 с помощью механизма «leaky scanning».

Чтобы проверить эту гипотезу, участок генома ShVX, включающий TGB и ген р42, был клонирован в бинарный вектор под контролем 35S-промотора. В ходе клонирования в одной рамке с ОПТ р42 была слита последовательность эпитопа FLAG. Полученная конструкция, имитирующая сгРНК TGB1 и названная TGB-p42-FLAG (Рис. 2), была использована для трансформации клеток *Agrobacterium tumefaciens* для последующей агроинфильтрации листьев растений *Nicotiana benthamiana*. Анализ листьев методом Вестерн-блот, проведенный через 3 дня после инфильтрации (дпи), выявил основную полосу размером около 43 кДа, соответствующего ожидаемому для р42-FLAG, и полосу размером около 85 кДа, которая, вероятно, представляет собой димер р42 (Рис. 3А). Таким образом, показано, что р42 может транслироваться на матрице тетрацистронной мРНК.

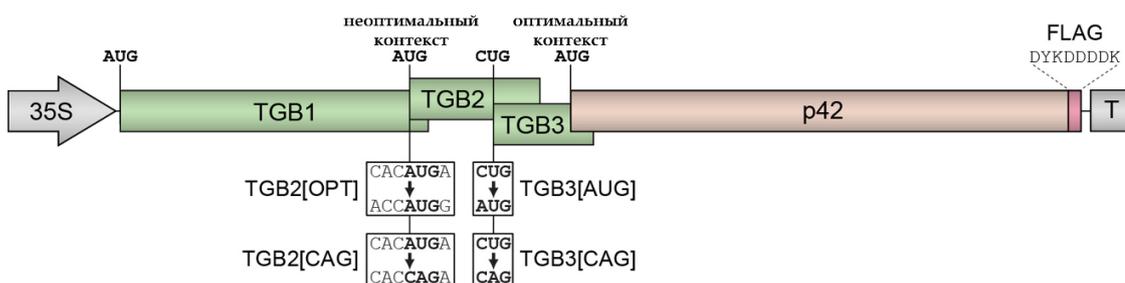


Рисунок 2. Схематическое изображение конструкции TGB-p42-FLAG. Гены показаны прямоугольниками. Показаны положения 35S промотора и 35S терминатора (Т). Под схемой показаны мутации, внесенные в TGB-p42-FLAG.

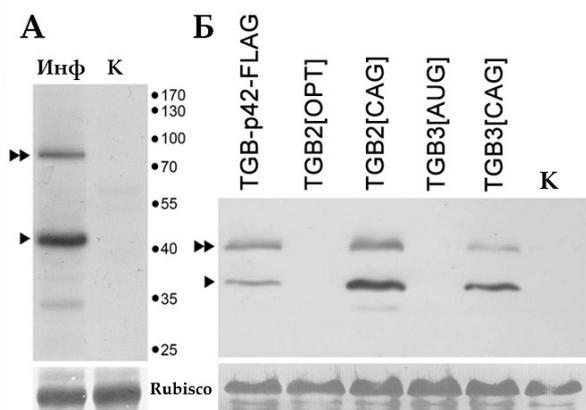


Рисунок 3. Анализ механизма экспрессии р42. (А) Детекция р42 в листьях *N. benthamiana*, экспрессирующих TGB-p42-FLAG, методом Вестерн-блота с антителами к FLAG. Инф – агроинфильтрированный лист. (Б) Влияние внесенных мутаций на трансляцию р42. К – контроль, инокулированный буфером лист. Позиции р42 и его предполагаемого димера обозначены одинарным и двойным треугольником, соответственно. Показано положение маркеров молекулярной массы (кДа).

Чтобы определить, происходит ли трансляция р42 на матрице тетрацистронной мРНК с помощью механизма «leaky scanning», была получена серия мутантов TGB-p42-FLAG, включающая следующие мутантные конструкции: TGB2[OPT], в которой контекст AUG TGB2 был приведен к оптимальному согласно Козак; TGB2[CAG], в которой AUG

TGB2 был заменен на неинициаторный триплет CAG; TGB3[AUG], в которой альтернативный инициаторный кодон CUG TGB3 был заменен на AUG; и TGB3[CAG], в которой инициаторный кодон TGB3 был заменен на CAG (Рис. 3А). Культурами агробактерий, несущих полученные конструкции, инфильтрировали листья *N. benthamiana*. Вестерн-блот анализ показал, что мутации, внесенные для получения TGB2[OPT] и TGB3[AUG], ведущие к увеличению эффективности инициации трансляции TGB2 и TGB3, соответственно, блокировали синтез р42 (Рис. 3Б). Блокирование трансляции TGB2 и TGB3 в мутантах TGB2[CAG] и TGB3[CAG] приводило к повышению уровня р42 (Рис. 3Б). Полученные данные показывают, что трансляция р42 на мРНК, имитирующей сгРНК TGB1, зависит от инициации трансляции двух предыдущих ОПТ, что исключает инициацию трансляции на внутреннем сайте посадки рибосомы в качестве механизма трансляции р42 и свидетельствует о том, что трансляция р42 осуществляется на матрице тетрацистронной РНК TGB-p42-FLAG по механизму «leaky scanning». Исходя из этого, можно выдвинуть предположение, что сгРНК TGB1 является матрицей для трансляции р42 и при инфекции ShVX.

1.2. РНК-связывающие свойства р42

Чтобы проанализировать способность р42 связывать РНК, был накоплен рекомбинантный белок р42, слитый с последовательностью 6xHis. Способность р42 связывать РНК изучали в экспериментах, в которых определенное количество рекомбинантного р42 инкубировали с возрастающим количеством РНК; образцы после инкубации анализировали в агарозном геле.

Инкубация р42 с оцРНК, представляющей собой фрагмент кодирующей последовательности GFP, привела к образованию РНК-белковых комплексов с пониженной подвижностью в геле (Рис. 4А). Впервые эти комплексы появлялись при молярном соотношении РНК:белок, равном 1:2. По мере увеличения этого соотношения подвижность комплексов снижалась, и при соотношении РНК:белок, равном 1:10 и выше, наблюдались комплексы, которые были неспособны войти в гель (Рис. 4А). После инкубации р42 с GFP-специфической дцРНК не было выявлено связывания РНК даже при соотношении РНК:белок, равном 1:140 (Рис. 4Б). Эти данные показывают, что р42 связывается с оцРНК и что это связывание не может быть обусловлено исключительно электростатическими взаимодействиями с нуклеиновыми кислотами.

Далее была проанализирована способность р42 связывать одноцепочечный транскрипт РНК, соответствующий 682 5'-концевым остаткам геномной РНК ShVX (Рис. 4В). Характер связывания GFP- и ShVX-специфических транскриптов был в целом

сходным. Комплексы, образованные р42, обнаруживались при молярном соотношении РНК:белок, равном 1:2, для обоих вариантов РНК (Рис. 4А, 4В). Таким образом, эти эксперименты не выявляют заметной специфичности белка р42 по отношению к используемому фрагменту генома ShVX. На основании имеющихся данных следует заключить, что р42 связывается с оцРНК, но не с дцРНК.

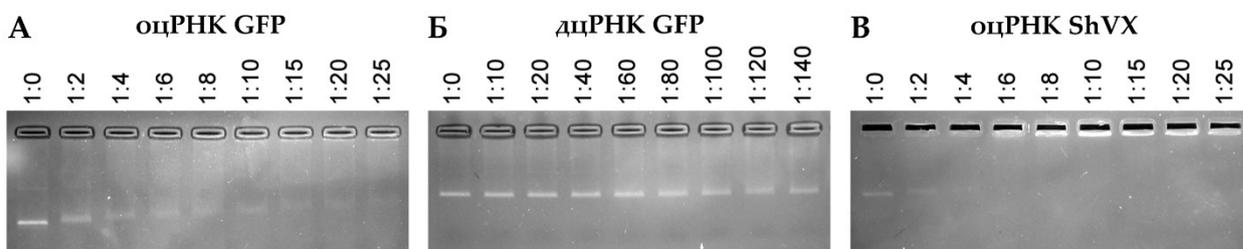


Рисунок 4. Анализ способности белка р42 связывать РНК. Показано связывание р42 с GFP-специфической оцРНК (А), GFP-специфической дцРНК (Б), ShVX-специфической оцРНК (В). Молярные соотношения РНК:белок показаны над каждой дорожкой геля.

1.3. Внутриклеточная локализация белка р42

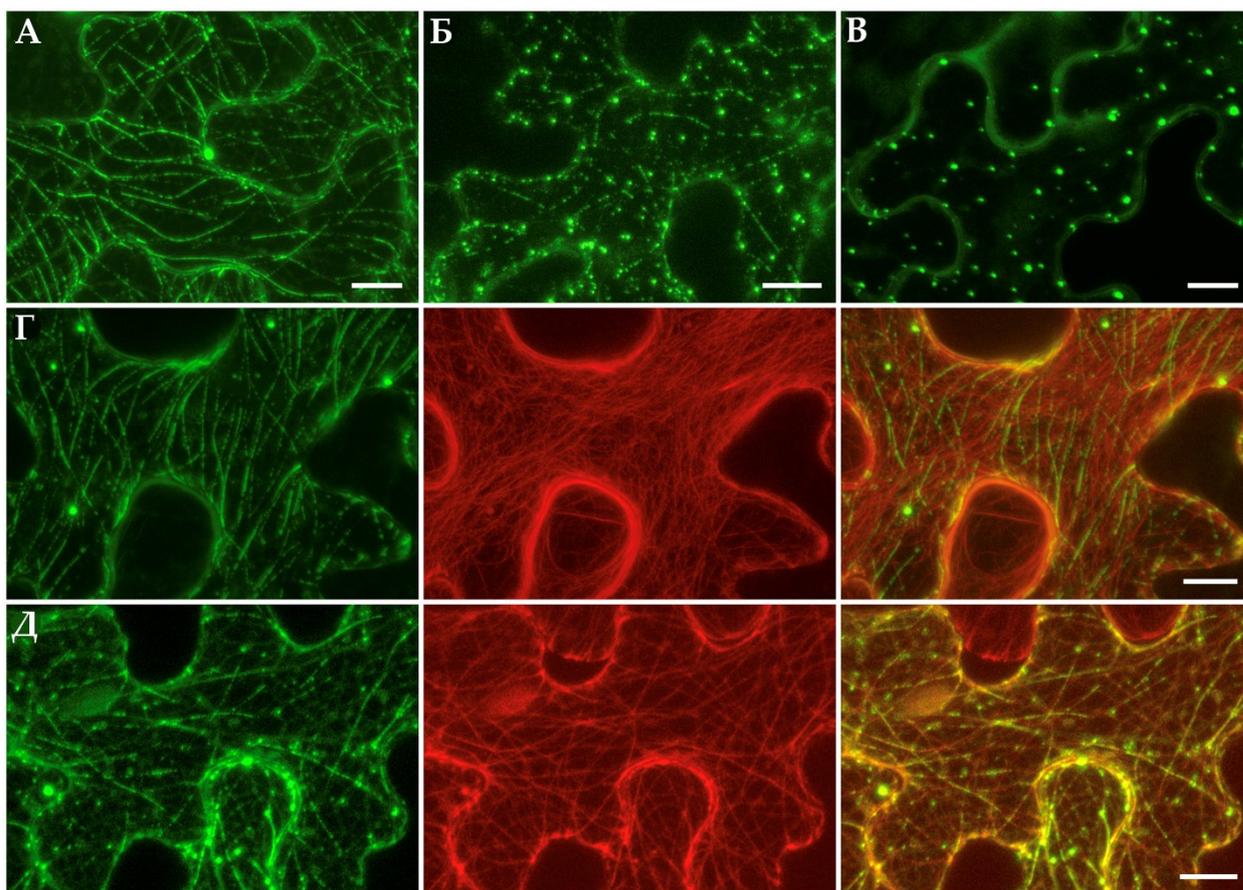


Рисунок 5. Внутриклеточная локализация белка р42. (А-В) Варианты локализации р42-GFP в разных клетках. (Г) Ко-экспрессия р42-GFP с белком-маркером актина, слитым с mRFP. (Д) Ко-экспрессия р42-GFP со слитым с mRFP белком-маркером микротрубочек. Левые изображения (Г) и (Д) сделаны в зеленом канале, центральные – в красном, правые изображения получены путем наложения изображений в зеленом и красном каналах. Все фотографии были получены путем реконструкции из Z-серии оптических срезов. Размер шкалы – 10 мкм.

Для анализа внутриклеточной локализации p42 ShVX была получена конструкция p42-GFP, кодирующая рекомбинантный белок p42, С-конец которого слит с GFP. Было обнаружено, что на 3 дни белок локализовался диффузно в цитоплазме, в небольших цитоплазматических тельцах, а также в виде нитевидных структур в цитоплазме. Эти три типа локализации были представлены в разной степени в каждой конкретной клетке (Рис. 5А-В).

Когда p42-GFP ко-экспрессировали со слитым с mRFP актин-связывающим доменом мышинного талина (Lazareva et al., 2017), ко-локализации сигналов GFP и mRFP не наблюдалось (Рис. 5Г). При ко-экспрессии p42-GFP со слитым с mRFP микротрубочки-связывающим доменом мышинного белка MAP4 (MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 4) (Shemyakina et al., 2011), нитевидные структуры и небольшие тельца, содержащие p42-GFP, отчетливо ко-локализовались с микротрубочками (Рис. 5Д). Таким образом, исследования внутриклеточной локализации показывают, что ShVX p42 может связываться с микротрубочками в растительных клетках.

1.4. Анализ способности белка p42 супрессировать РНК-сайленсинг

Способность p42 супрессировать сайленсинг, вызванный дцРНК, изучали в экспериментальной системе, основанной на временной ко-экспрессии GFP и dsGF. Конструкция dsGF кодирует транскрипт, содержащий длинную GFP-специфическую шпилечную структуру дцРНК, которая индуцирует сайленсинг GFP (Yelina et al., 2005). В этом эксперименте листья *N. benthamiana* были инфильтрированы для (1) экспрессии GFP, (2) совместной экспрессии GFP с конструкцией dsGF, (3) ко-экспрессии GFP, dsGF и p42 ShVX, а также (4) ко-экспрессии GFP, dsGF и белка p19 вируса кустистой карликовости томатов, который является хорошо известным ВСП (положительный контроль) (Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). На 4 дни инфильтрированные для экспрессии GFP участки листьев демонстрировали умеренный уровень флуоресценции GFP; ко-экспрессия GFP с dsGF, приводила к отсутствию флуоресценции GFP (Рис. 6А). При совместной экспрессии GFP с dsGF и p19 наблюдался высокий уровень флуоресценции GFP вследствие подавления сайленсинга, вызванного dsGF, тогда как ко-экспрессия p42 с GFP и dsGF приводила к отсутствию флуоресценции GFP (Рис. 6А). Таким образом, p42 не способен супрессировать сайленсинг, индуцированный дцРНК.

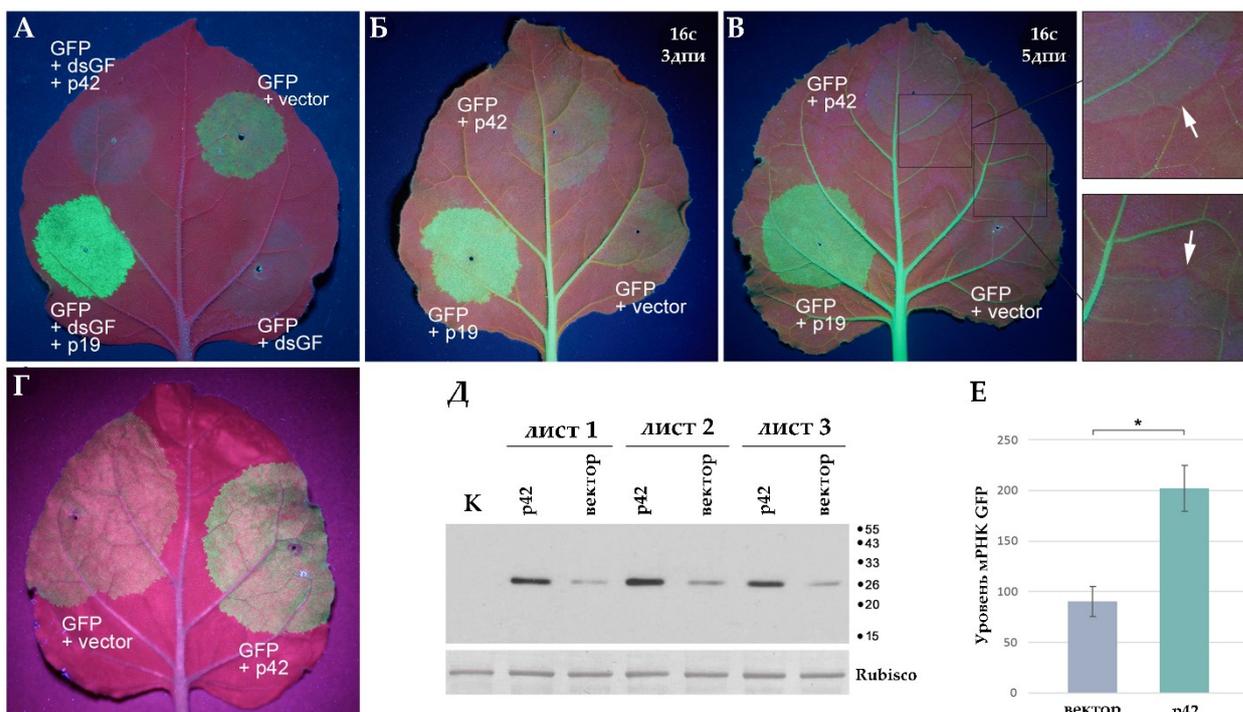


Рисунок 6. Анализ способности p42 супрессировать РНК-сайленсинг. (А) Анализ способности p42 супрессировать сайленсинг, индуцированный дцРНК. (Б и В) Анализ способности p42 подавлять оцРНК-индуцированный сайленсинг в трансгенных растениях линии 16с. Стрелки указывают на красную кайму, окружающую инфильтрированные участки. (Г-Е) Анализ способности p42 подавлять индуцированный оцРНК сайленсинг в нетрансгенных растениях *N. benthamiana*. (Г) Фотография агроинфильтрированного листа. (Д) Вестерн-блот-анализ накопления GFP в участках листьев, агроинфильтрированных для ко-экспрессии GFP с p42 или с пустым вектором. К – контроль, инокулированный буфером лист. Положение маркеров молекулярных масс показано справа. (Е) Накопление мРНК GFP в листьях, агроинфильтрированных для ко-экспрессии GFP с p42 или пустым вектором. Показаны средние уровни экспрессии, определенные методом кПЦР; планки погрешностей здесь и далее указывают на стандартную ошибку. Для расчета каждого приведенного значения использовали четыре биологические повторности. Звездочка указывает на статистически значимые различия (*, $p < 0,05$) согласно парному двухвыборочному двухстороннему t-тесту Стьюдента (здесь и далее).

Для анализа способности p42 супрессировать сайленсинг, индуцированный оцРНК, были использованы трансгенные растения *N. benthamiana* линии 16с, экспрессирующие GFP (Ruiz et al., 1998). Листья растений 16с были агроинфильтрированы для ко-экспрессии GFP с p42, p19, или пустым вектором. На 3 дни GFP, ко-экспрессированный с пустым вектором (отрицательный контроль), давал слабый сигнал GFP в инфильтрированных областях. При этом ко-экспрессия GFP с p19 (положительный контроль) приводила к яркой флуоресценции GFP (Рис. 6Б). Ко-экспрессия GFP с p42 не привела к значительному усилению флуоресценции GFP по сравнению с отрицательным контролем (Рис. 6Б). В условиях данного эксперимента транспорт сигналов сайленсинга можно наблюдать по появлению узкой красной каймы шириной 10-15 клеток вокруг областей инфильтрации, образующейся вследствие сайленсинга эндогенного трансгена GFP в клетках участков листа, куда распространился сигнал сайленсинга из инфильтрированной области (Himber et

al., 2003). Было обнаружено, что на 5 дни появилась красная кайма вокруг инфильтрированных участков в случае ко-экспрессии GFP с пустым вектором и с p42, но не в случае ко-экспрессии GFP с p19, для которого известна функция ингибирования межклеточного транспорта сигналов сайленсинга (Рис. 6В) (Himber et al., 2003). Эти данные показывают, что p42 не оказывает очевидного влияния на РНК-сайленсинг, инициированный оцРНК в трансгенных растениях, а также не влияет на распространение сайленсинга.

Для идентификации способности p42 подавлять сайленсинг, индуцированный оцРНК, листья растений *N. benthamiana* дикого типа агроинфильтрировали для ко-экспрессии GFP с p42 или с пустым вектором. На 3 дни было обнаружено, что участки, экспрессирующие p42, имели более яркую флуоресценцию GFP, чем контрольные участки (Рис. 6Г). Вестерн-блот анализ подтвердил более высокий уровень накопления GFP при ко-экспрессии с p42 (Рис. 6Д). Анализ данных количественной ПЦР (кПЦР) показал, что уровень мРНК GFP был в 2,2 раза выше по сравнению с контролем (Рис. 6Е). Таким образом, наблюдаемое усиление экспрессии GFP, вызванное белком p42, обусловлено повышенным уровнем мРНК GFP, что позволяет предположить, что p42 может выполнять функцию супрессора РНК-сайленсинга, индуцированного оцРНК.

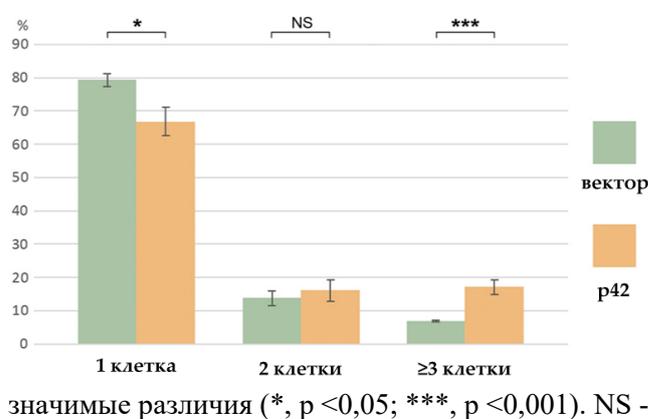


Рисунок 7. Анализ способности p42 супрессировать РНК-сайленсинг в контексте инфекции TCV-GFP. На графике представлен процент флуоресцентных локусов, состоящих из одной, двух, трех и более клеток, наблюдаемых при совместной экспрессии TCV-GFP с p42 или пустым вектором. Количество посчитанных локусов составляло 513 для p42 и 486 для контроля (пустой вектор). Звездочками отмечены статистически значимые различия (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$). NS - несущественные различия.

Далее функцию ВСР белка p42 анализировали в контексте инфекции вируса морщинистости турнепса (turnip crinkle virus, TCV) (Powers et al., 2008a; Powers et al., 2008b). В данном эксперименте использовали TCV, несущий ген GFP вместо гена белка оболочки TCV, выполняющего также функцию ВСР. Известно, что при экспрессии в отсутствие ВСР, конструкция TCV-GFP не транспортируется из клетки в клетку, однако эта способность восстанавливается при ко-экспрессии TCV-GFP с гомологичным или гетерологичным ВСР, приводя к образованию многоклеточных локусов инфекции (Powers et al., 2008a; Powers et al., 2008b). Листья инфильтрировали культурой агробактерий, несущей TCV-GFP, сильно разбавленной для достижения экспрессии TCV-GFP в

отдельных отстоящих друг от друга клетках, либо в смеси с культурой, несущей ген р42 ShVX, либо с культурой, несущей пустой вектор. Флуоресцентная микроскопия листьев на 5 дни выявила статистически значимое увеличение в 2,5 раза процента инфекционных локусов, состоящих из трех и более клеток, в случае р42 в сравнении с пустым вектором (Рис. 7). Однако процент многоклеточных локусов, наблюдаемый для р42, был все же низким (17,1%) по сравнению со значением 76,6%, ранее полученным в аналогичном эксперименте для р19 (Lazareva et al., 2015). Таким образом, эксперименты по супрессии сайленсинга белком р42 позволяют предположить, что р42 можно рассматривать в качестве слабого ВСП, активного в контексте вирусной инфекции или в условиях активации сайленсинга с помощью оцРНК.

1.5. Белок р42 супрессирует нонсенс-опосредованный распад РНК

Геномная РНК ShVX и сгРНК TGB1 имеют длинные 3'-нетранслируемые области (3'-НТО) и поэтому могут стать мишенью для нонсенс-опосредованного распада (nonsense-mediated decay, NMD). (Garcia et al., 2014; Kervestin, Jacobson, 2012). Для анализа способности р42 подавлять противовирусную стратегию растений, основанную на механизме NMD, использовали репортерную конструкцию GFP-LUTR, длинная 3'-НТО которой представляет собой фрагмент гена GUS длиной 555 нт (Рис. 8А).

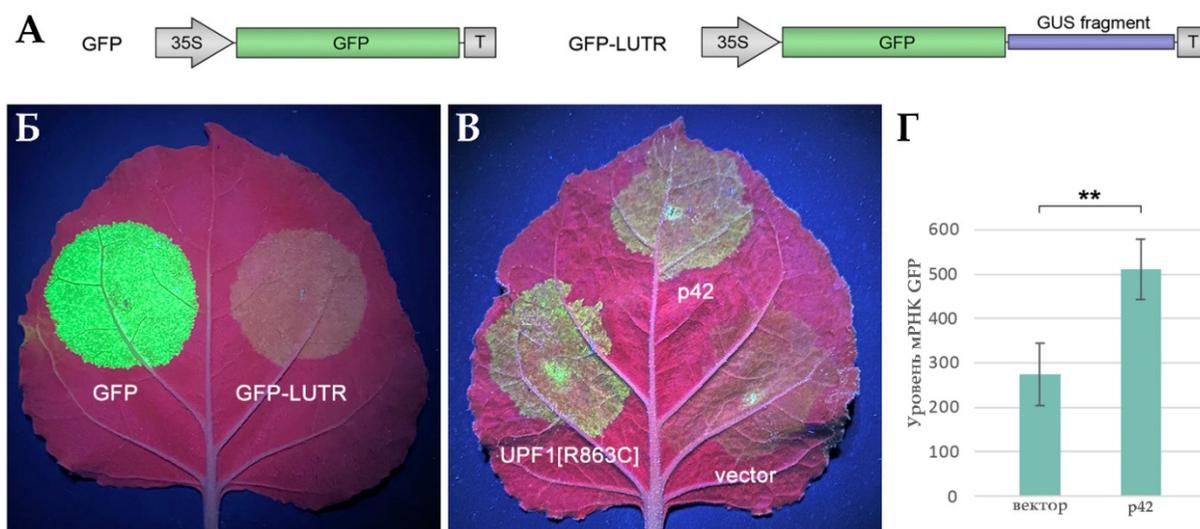


Рисунок 8. Подавление NMD белком р42 ShVX. (А) Схематическое изображение использованных репортерных конструкций. (Б) мРНК GFP-LUTR подвергается NMD. Изображение листа, инфильтрированного культурами агробактерий для экспрессии GFP и GFP-LUTR. (В) Анализ способности р42 подавлять NMD. Лист агроинфильтрировали для совместной экспрессии GFP-LUTR с р42, UPF1[R863C] или с пустым вектором. (Г) Уровни накопления мРНК GFP-LUTR в листьях, временно экспрессирующих GFP-LUTR с пустым вектором и р42. Показаны средние уровни экспрессии, определенные методом кПЦР. Для расчета каждого показанного значения использовали три биологические повторности. Звездочка указывает на статистически значимые различия (**, $p < 0,01$).

В инфильтрированных листьях на 4 дни флуоресценция GFP-LUTR была значительно снижена по сравнению с GFP (Рис. 8Б) в результате NMD. Чтобы проверить способность р42 подавлять NMD, растения агроинфальтрировали для ко-экспрессии GFP-LUTR с р42, пустым вектором (отрицательный контроль) или UPF1[R863C] (положительный контроль). UPF1[R863C] кодирует доминантно-негативный мутант белка UPF1 арабидопсиса, основного эффектора NMD (Garcia et al., 2014; Kertész et al., 2006). На 4 дни при ко-экспрессии GFP-LUTR с UPF1[R863C] уровень флуоресценции GFP был заметно увеличен по сравнению с ко-экспрессией GFP-LUTR с пустым вектором (Рис. 8В), подтверждая, что мРНК GFP-LUTR подвергается NMD. Ко-экспрессия р42 с GFP-LUTR также приводила к увеличению уровня флуоресценции по сравнению с отрицательным контролем (Рис. 8В). Анализ методом кПЦР показал, что уровень мРНК GFP-LUTR был увеличен в 1,86 раза в присутствии р42 (Рис. 8Г). Эти данные позволяют заключить, что р42 способен подавлять NMD.

2. Исследование белка vDRB

2.1. РНК-связывающие свойства vDRB

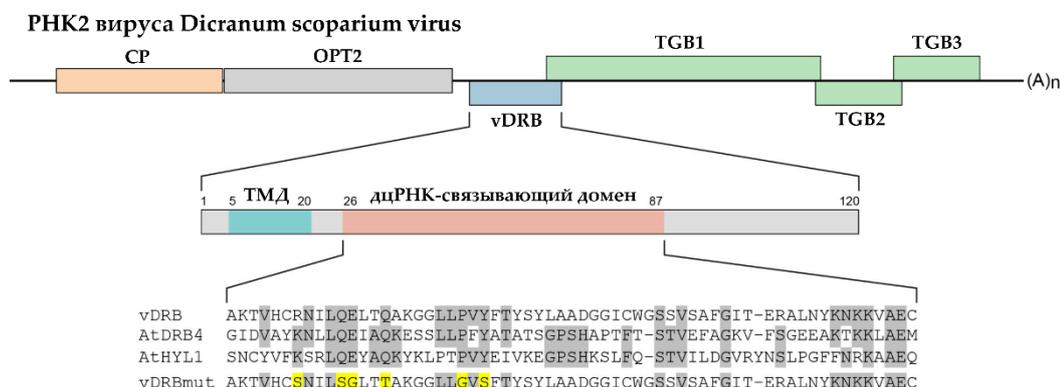


Рисунок 9. Схематическое изображение структуры геномной РНК2 вируса *D. scorarium* и молекулярной организации vDRB. OPT показаны прямоугольниками. ТМД – трансмембранный домен. Под схемой приведено выравнивание последовательности дцРНК-связывающего домена vDRB с соответствующими доменами AtDRB4 и AtHYL1. Серым цветом выделены консервативные аминокислотные остатки. Желтым цветом показаны замены, внесенные в vDRBmut.

Согласно анализу последовательности, белковый продукт третьей открытой рамки трансляции (OPT3) РНК2 вируса *D. scorarium*, способен связывать дцРНК (Morozov, Solovuev, 2022). Для проверки этого предсказания был использован белковый продукт OPT3, экспрессированный в клетках *E. coli*. Для более эффективной экспрессии в бактериях был получен вариант OPT3, из которой был удален участок, кодирующий N-концевой гидрофобный трансмембранный домен vDRB (Рис. 9). Способность полученного рекомбинантного белка vDRB, слитого с бхHis, связывать нуклеиновые кислоты

проанализировали методом изменения подвижности в агарозном геле. В качестве субстратов для связывания с vDRB были использованы оцРНК, дцРНК и дцДНК гена GFP.

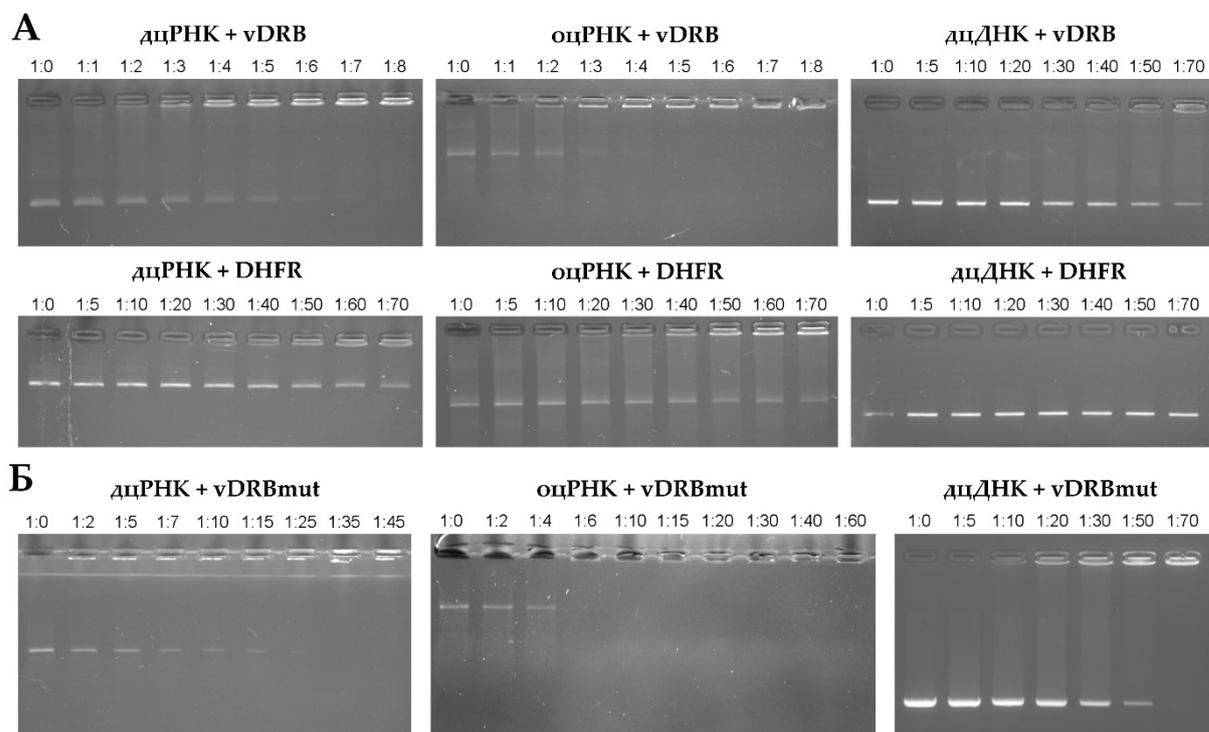


Рисунок 10. Анализ способности белка vDRB связывать нуклеиновые кислоты. (А) Связывание vDRB и DHFR с оцРНК, дцРНК и дцДНК. (Б) Связывание vDRBmut с оцРНК, дцРНК и дцДНК. Молярное соотношение РНК:белок или ДНК:белок указано над дорожками гелей.

Инкубация vDRB с дцРНК приводила к образованию РНК-содержащих комплексов, неспособных входить в гель. Такие комплексы появлялись, начиная с соотношения белок:РНК, равного 2:1, и при соотношении 8:1 большая часть внесенной дцРНК наблюдалась в комплексах, остававшихся в лунках для нанесения (Рис. 10А). В качестве контроля был использован белок дигидрофолатредуктаза мыши (DHFR), который не обладает РНК-связывающей активностью. Комплексы дцРНК с DHFR, которые были не способны войти в гель, наблюдались начиная с соотношения белок:РНК, равного 30:1, что можно объяснить возможным наличием минорных количеств со-выделяемых бактериальных клеточных белков. Однако значительное количество не связанной дцРНК оставалось и при соотношении 70:1 (Рис. 10А). Полученные данные показывают, что vDRB способен эффективно связывать дцРНК, и подтверждают, что наблюдаемое связывание не является следствием присутствия в препарате vDRB со-выделяемых белков. При инкубации vDRB с оцРНК комплексы, не входящие в гель, начинали образовываться уже при соотношении белка к РНК, равном 1:1, а при соотношении 5:1 вся внесенная оцРНК обнаруживалась в составе таких комплексов (Рис. 10А). Как и в случае с дцРНК, контрольный эксперимент с DHFR показал гораздо меньшую способность белка связывать

оцРНК по сравнению с vDRB (Рис. 10А). Таким образом, vDRB способен связывать и оцРНК, причем данная активность vDRB сравнима с дцРНК-связывающей активностью или даже превосходит ее. Также было показано, что vDRB способен формировать комплексы с ДНК, неспособные входить в гель, при больших соотношениях белок:ДНК, таких как 40:1 и выше (Рис. 10А), что может отражать наличие слабой аффинности vDRB к ДНК или способности взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами за счет электростатических взаимодействий.

Далее была проанализирована роль дцРНК-связывающего домена vDRB в связывании дцРНК и оцРНК. Был получен мутант vDRBmut с заменами консервативных аминокислотных остатков в дцРНК-связывающем домене (Рис. 9). Обнаружено, что DRBmut связывал дцРНК слабее, чем vDRB. Инкубированная с vDRBmut дцРНК полностью находилась в составе неподвижных комплексов при соотношении белок:РНК, равном 35:1 (Рис. 10Б). Однако внесенные мутации не оказали значимого эффекта на способность vDRBmut связывать оцРНК (Рис. 10А, Б). Эти данные показывают, что специфичным для дцРНК-связывающего домена vDRB является связывание с дцРНК, но не с оцРНК. Интересно, что vDRBmut также проявил повышенную способность связывать дцДНК по сравнению с vDRB (Рис. 10А, Б). Вероятно, внесенные мутации привели к изменению конформации белка, увеличив его неспецифическую аффинность к ДНК.

2.2. Внутриклеточная локализация vDRB

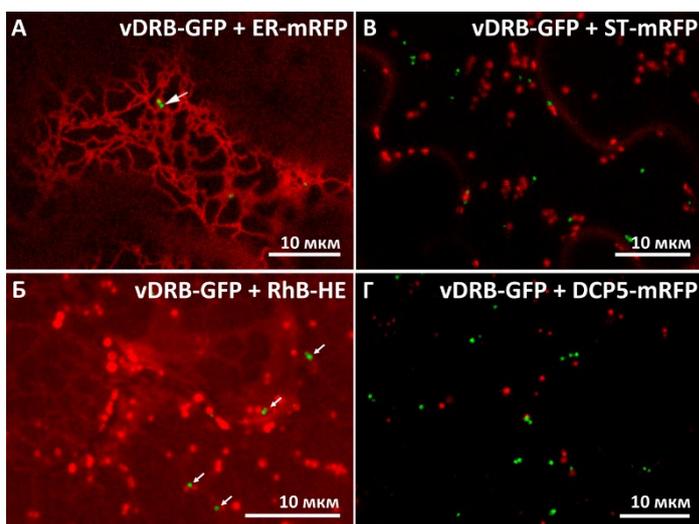


Рисунок 11. Внутриклеточная локализация vDRB-GFP. vDRB-GFP был ко-экспрессирован с маркерами ЭПР (А), аппарата Гольджи (В) и Р-bodies (Г). (Б) Листья, экспрессирующие vDRB-GFP, были окрашены липофильным красителем гексилловым эфиром родамина В (RhB-HE). Фотографии представляют наложение изображений, снятых в каналах для GFP и mRFP. Изображения (А, В, Г) были получены путем реконструкции из Z-серии оптических срезов. Изображение (Б) представляет один оптический срез.

Для изучения внутриклеточной локализации vDRB последовательность OPT3 была слита с последовательностью гена GFP, и полученная конструкция vDRB-GFP была клонирована в бинарном векторе. Внутриклеточную локализацию рекомбинантного белка vDRB-GFP изучали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

агроинфильтрованных листьев *N. benthamiana* на 3 дни. Было обнаружено, что внутри клеток vDRB-GFP расположен в виде многочисленных мелких телец, разбросанных по цитоплазме и локализующихся вблизи структур ЭПР, однако сами тельца не содержат мембран (Рис. 11А, Б), а также не ко-локализуются с аппаратом Гольджи (Рис. 11В) или белковыми процессирующими тельцами (P-bodies) (Рис. 11Г), участвующими в подавлении трансляции мРНК и в разрушении мРНК.

2.3. Супрессия РНК-сайленсинга белком vDRB в невирусных экспериментальных системах

Поскольку vDRB связывает дцРНК *in vitro*, была изучена способность белка функционировать в качестве ВСП и нарушать зависимые от дцРНК пути РНК-сайленсинга.

Листья *N. benthamiana* были агроинфильтрованы для экспрессии GFP, dsGF и vDRB, в качестве положительного контроля был использован ВСП p19. На 4 дни было обнаружено, что при экспрессии GFP и dsGF с vDRB сигнала флуоресценции GFP не было, и область листа не светилась сильнее, чем при ко-экспрессии GFP только с dsGF (Рис. 12А). Можно заключить, что vDRB неспособен супрессировать индуцированный дцРНК РНК-сайленсинг в этих экспериментальных условиях.

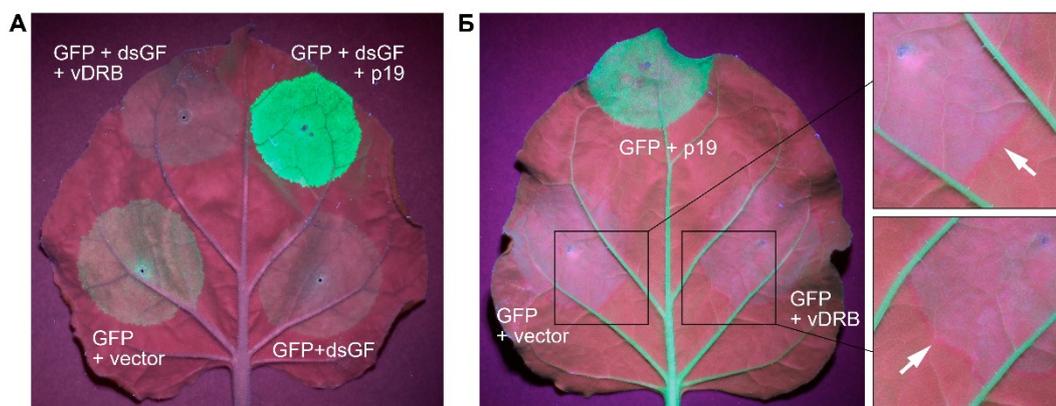


Рисунок 12. Анализ способности vDRB супрессировать РНК-сайленсинг. (А) Анализ способности vDRB супрессировать сайленсинг, индуцированный дцРНК. (Б) Анализ способности vDRB супрессировать сайленсинг, индуцированный оцРНК, и влиять на межклеточный транспорт сигналов сайленсинга в растениях *N. benthamiana* линии 16с. Стрелки на фотографии увеличенной части листа указывают на красные окаймления вокруг областей инфильтрации, указывающей на транспорт сигнала сайленсинга. Фотографии были сделаны под УФ светом на 4 дни (А) и на 5 дни (Б).

Далее была проанализирована способность vDRB подавлять сайленсинг, индуцированный оцРНК, и влиять на локальный межклеточный транспорт сигналов сайленсинга. В этих экспериментах использовали трансгенные растения *N. benthamiana* линии 16с как описано выше для p42 ShVX. На 3 дни в области экспрессии GFP с vDRB

сигнал флуоресценции GFP был слабым и не имел заметных отличий от флуоресценции GFP, ко-экспрессированного с пустым вектором (Рис. 12Б), что указывает на отсутствие у vDRB активности ВСР в отношении сайленсинга, индуцированного оцРНК. При совместной экспрессии GFP с vDRB в листьях растений 16с можно было отчетливо наблюдать красную кайму, окружающую области инфильтрации, похожую на кайму вокруг области временной экспрессии GFP (отрицательный контроль) (Рис. 12Б). Таким образом, vDRB не способен влиять на локальный транспорт сигнала сайленсинга в листьях *N. benthamiana*.

2.4. Супрессия РНК-сайленсинга белком vDRB в эксперименте с TCV

Для оценки способности vDRB являться ВСР в контексте вирусной инфекции была использована экспериментальная система, основанная на репортерной конструкции TCV-GFP, описанная выше для р42 ShVX. Листья, инфильтрированные для ко-экспрессии TCV-GFP либо с vDRB, либо с пустым вектором, исследовали на 5 дни.

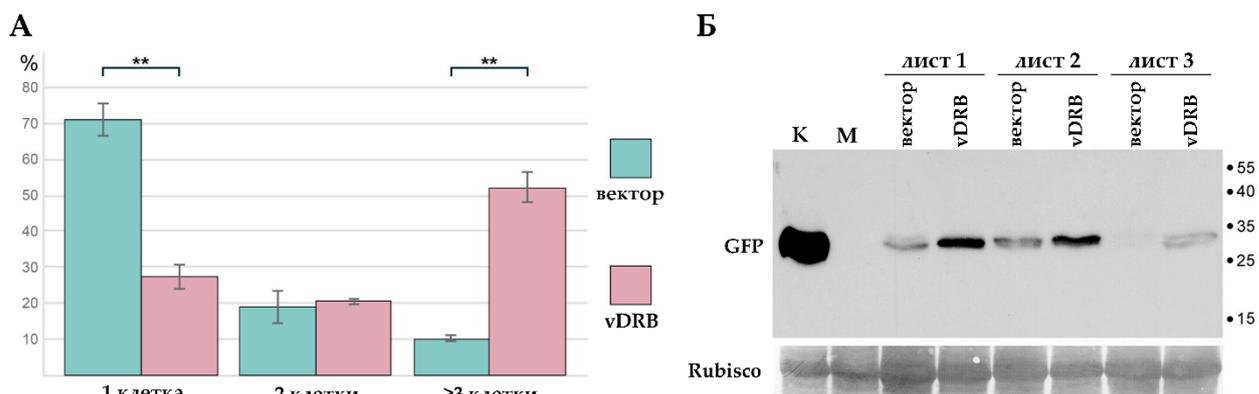


Рисунок 13. vDRB способен супрессировать РНК-сайленсинг в контексте инфекции TCV. (А) Процент флуоресцирующих локусов, состоящих из одной, двух или трех и более клеток, наблюдаемых при совместной экспрессии TCV-GFP либо с vDRB, либо пустым вектором. Число локусов, посчитанных на листьях трех растений, было 183 для ко-инфильтрации с пустым вектором и 241 с vDRB. Звездочками отмечена статистическая значимость различий (** - $p < 0.01$). (Б) Результаты Вестерн-блота проб, отобранных на 5 дни с трех разных листьев *N. benthamiana*. Используются антитела к GFP. М – проба из не инфильтрированной части листа. К – контроль, проба отобрана из листа растений линии 16с. Снизу показана мембрана, окрашенная Амидо черным.

В области листа, агроинфильтрированной TCV-GFP и вектором, локусы, состоящие из одной клетки, составляли в среднем 70,8%, в то время как в области совместной агроинфильтрации TCV-GFP с vDRB таких локусов было 27,3%, что показывает статистически значимое отличие (Рис. 13А). Напротив, процентное количество локусов, состоящих из 3 и более клеток, в случае присутствия vDRB было значительно выше (52,2%) по сравнению с контролем (10,2%). Эти данные показывают, что vDRB способствует транспорту TCV-GFP из клетки в клетку и значительно увеличивает размер

инфицированных локусов. Также, в случае ко-экспрессии TCV-GFP с vDRB накапливалось значительно больше GFP по сравнению с частью листа, экспрессирующей только TCV-GFP (Рис. 13Б). Таким образом, полученные данные демонстрируют, что vDRB проявляет активность ВСП в контексте инфекции TCV.

2.5. Влияние vDRB на инфекцию PVX

Известно, что ВСП способны существенно усиливать симптомы инфекции X-вируса картофеля (potato virus X, PVX) (Scholthof et al., 1995; Voinnet et al., 1999). Чтобы выяснить, способен ли vDRB вызывать сходные эффекты, кодирующая последовательность vDRB была клонирована в составе вектора на основе генома PVX. Листья растений *N. benthamiana* инокулировали либо полученной конструкцией PVX-vDRB, либо вектором PVX без вставки. Типичные симптомы инфекции PVX, такие как мозаика и нарушение морфологии верхних листьев растений, впервые появлялись на 7 дни, и все инокулированные PVX растения имели отчетливо заметные симптомы на 8 дни. В случае PVX-vDRB наблюдалась задержка в проявлении и развитии симптомов на 1-2 дня. На 10 дни и на более поздних временных точках симптомы PVX и PVX-vDRB различались значительно. Симптомы, вызванные PVX-vDRB, были менее выраженными, чем симптомы PVX. Верхние листья инфицированных PVX-vDRB растений были в меньшей степени деформированы, и на них было меньше «темно-зеленых островков» ткани (ТЗО, англ. DGI, «dark green islands»), которые были также меньше по размеру, чем у инфицированных PVX растений (Рис. 14А-Г). ТЗО – участки зеленой ткани листа, которые практически не содержат вируса и являются результатом противовирусного РНК-сайленсинга, приводящего к возникновению устойчивости к вирусу в этих локальных участках (Chen et al., 2015; Moore et al., 2007). Таким образом, экспрессия vDRB в контексте инфекции PVX вызывала ингибирование развития РНК-сайленсинга, что приводило к уменьшению образования ТЗО в инфицированных вирусом тканях. Анализ проб, отобранных на 14 дни, проведенный с помощью кПЦР с обратной транскрипцией, показал статистически значимую разницу в накоплении вируса в растениях, инокулированных PVX и PVX-vDRB. Уровень РНК вируса в случае PVX-vDRB был в 3,6 раз выше, чем для PVX (Рис. 14Д). Также с помощью ПЦР с обратной транскрипцией было показано, что последовательность гена vDRB сохранилась в потомстве вируса PVX-vDRB и спустя 14 дни (Рис. 14Е), из чего можно заключить, что наблюдаемые на инфицированных PVX-vDRB растениях эффекты являются результатом экспрессии vDRB.

Таким образом, vDRB, экспрессированный в контексте инфекции PVX, способен супрессировать противовирусный сайленсинг, увеличивать накопление вируса и влиять на

фенотипическое проявление симптомов, что согласуются с обнаруженной у vDRB функцией ВСП в контексте инфекции TCV.

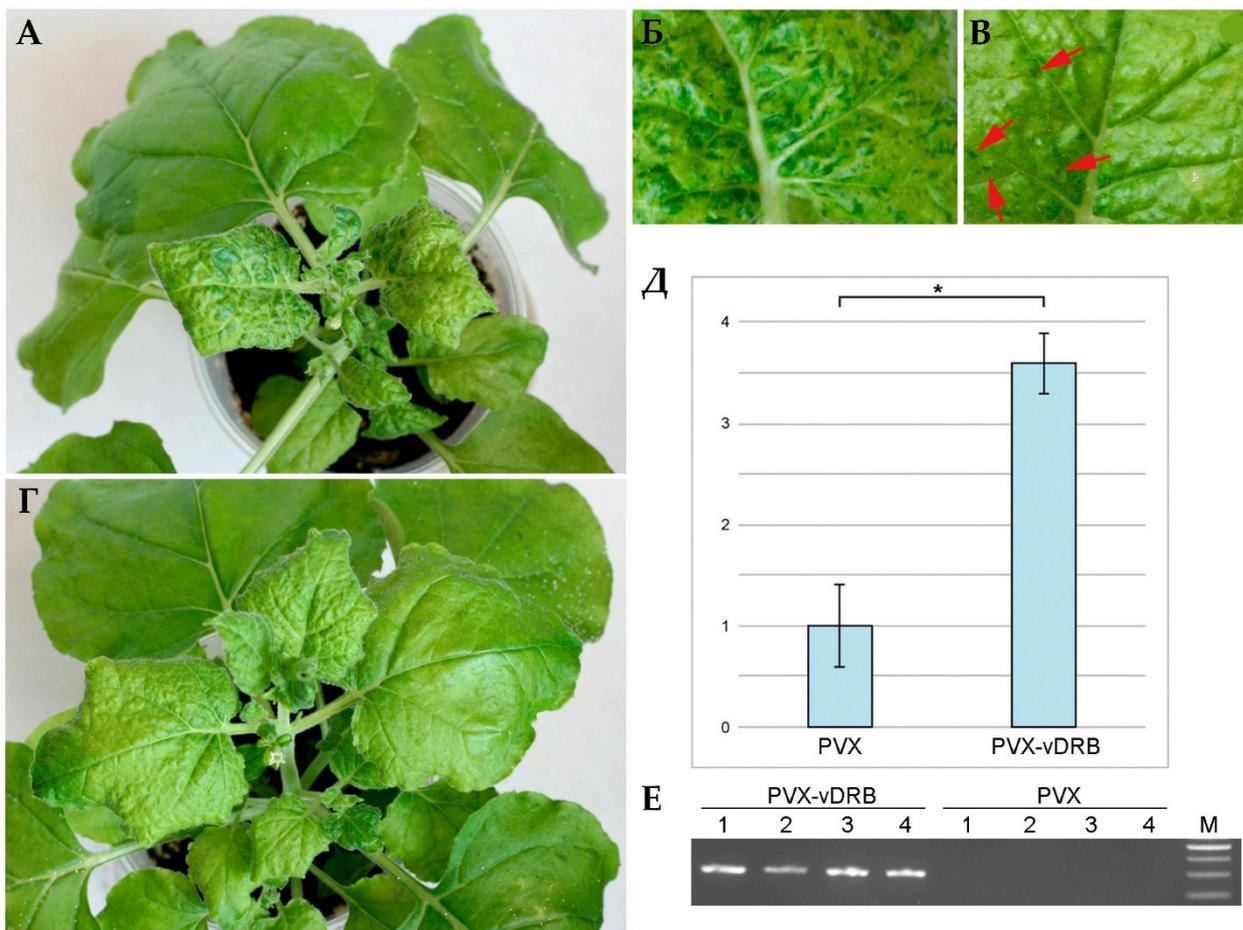


Рисунок 14. Влияние vDRB на инфекцию PVX. Симптомы вирусной инфекции на растениях, инокулированных PVX (А, Б) и PVX-vDRB (Б, Г). Фотографии увеличенных частей листа показывают разницу в количестве и размерах ТЗО (красные стрелки). (Д) Накопление вируса в верхних листьях растений, инфицированных PVX или PVX-vDRB. Количества геномной РНК вируса были определены методом кПЦР. Представленные данные являются средними значениями для трех биологических повторностей. Звездочка обозначает статистическую значимость различий (*- $p < 0.05$). (Е) Детекция последовательности vDRB в верхних листьях растений, инокулированных PVX-vDRB, на 14 дни. Номера соответствуют индивидуальным растениям, инокулированным либо PVX-vDRB, либо PVX. М – маркер длины ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, два исследованных блока генов, ТСМВ и TGB/p42 ShVX, являются геномными блоками, состоящими из четырех генов, а именно трех характерных для TGB генов, кодирующих транспортные белки TGB1, TGB2 и TGB3, и дополнительного гена, кодирующего либо vDRB, либо p42, – белки, которые являются РНК-связывающими и проявляют свойства ВСП. При этом белки, кодируемые «дополнительными» генами, имеют ряд существенных отличий: (1) vDRB и p42 несходны по аминокислотной последовательности; (2) vDRB преимущественно связывает дцРНК, тогда как p42 – оцРНК; (3) белки имеют различающуюся внутриклеточную локализацию; и (4) ген vDRB расположен перед TGB, перекрываясь с 5'-концевой частью TGB1, в то время как ген p42 перекрывается с 3'-концевой частью последовательности TGB3. Таким образом, ТСМВ и блок генов TGB/p42 ShVX представляют собой два примера «расширенных» вариантов TGB, которые возникли в эволюции вирусов растений независимо. Тем не менее, в обоих случаях эти дополнительные гены обеспечивают тройному блоку генов функцию ВСП. Наличие дополнительных ВСП-кодирующих генов в двух TGB-подобных модулях подчеркивает необходимость супрессии сайленсинга для межклеточного транспорта вирусов, который направляется белками TGB. Помимо этого, наличие таких «расширений» у TGB неродственных вирусов может являться следствием эволюционной адаптации TGB-содержащих вирусов к различным растениям-хозяевам, в которых дополнительные белки могут способствовать выполнению части функций белков TGB.

ВЫВОДЫ

1. Для экспрессии гена белка p42 ShVX используется трансляция по механизму «leaky scanning» функционально тетрацистронной РНК, включающей три гена TGB и ген p42.
2. Белок p42 обладает РНК-связывающей способностью и образует комплексы с оцРНК, но не с дцРНК.
3. Белок p42 локализуется в цитоплазме в структурах, ассоциированных с микротрубочками.
4. Белок p42 не супрессирует РНК-сайленсинг, индуцированный дцРНК, и распространение сигнала сайленсинга, но супрессирует сайленсинг, индуцированный оцРНК, и проявляет свойства супрессора сайленсинга в контексте вирусной инфекции, а также супрессирует нонсенс-опосредованный распад РНК.
6. Белок vDRB связывает как оцРНК, так и дцРНК; во взаимодействии с дцРНК участвует дцРНК-связывающий домен белка vDRB.

7. Белок vDRB не супрессирует сайленсинг в тестовых системах, основанных на временной экспрессии генов в растениях, и распространение сигнала сайленсинга, но супрессирует сайленсинг в контексте вирусной инфекции.

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (биологические науки)

1. Chergintsev D.A., Solovieva A.D., Atabekova A.K., Lezzhov A.A., Golyshev S.A., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Properties of Plant Virus Protein Encoded by the 5'-Proximal Gene of Tetra-Cistron Movement Block // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. № 18. P. 14144. EDN: NSWYHX. Импакт-фактор 4,9 (JIF). Доля участия 70%. 1 п.л.
2. Atabekova A.K., Solovieva A.D., Chergintsev D.A., Solovyev A.G., Morozov S.Y. Role of Plant Virus Movement Proteins in Suppression of Host RNAi Defense // International Journal of Molecular Sciences. 2023. Vol. 24. № 10. P. 9049. EDN: OFRGEH. Импакт-фактор 4,9 (JIF). Доля участия 30%. 1,625 п.л.
3. Chergintsev D.A., Lezzhov A.A., Lazareva E.A., Atabekova A.K., Solovieva A.D., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Shallot virus X p42 Protein Expressed in Concert with Virus Movement Proteins Is a Suppressor of Two Plant Antiviral Defense Mechanisms // Plants. 2025. Vol. 14. P. 2552. EDN: YLMNUS. Импакт-фактор 4,1 (JIF). Доля участия 70%. 1,3125 п.л.