

**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 Чергинцева Д.А. «Дополнительные белки, кодируемые генными модулями, родственными тройному блоку транспортных генов растений» посвящена исследованию функций двух белков, р42 X-вируса лука-шалота и vDRB предполагаемого вируса мха *Dicranum scoparium*, идентифицированного при анализе данных транскриптома, входящих в состав геномных модулей, родственных тройному блоку генов (TGB), – модуля TGB/p42 вирусов рода *Allexivirus* и тетрацистронного транспортного блока (TCMB), соответственно.

TGB является довольно распространенным среди (+)РНК-вирусов растений блоком из трех генов, который также представлен у ряда вирусов, поражающих экономически важные сельскохозяйственные культуры. Открытые рамки трансляции (ОРТ) генов TGB перекрываются и транслируются на одной матрице, благодаря чему достигается определенное соотношение белковых продуктов, важное для инфицирования растения. Основной функцией белков TGB является осуществление транспорта вирусов по растению. Для выполнения этой функции белки TGB способны связывать РНК, образовывать репликативные комплексы вируса, модифицировать мембраны клеток, изменять пропускную способность каналов плазмодесм, направлять вирус в соседние клетки и осуществлять системный транспорт вируса по проводящим тканям. Также для TGB1 некоторых вирусов была показана функция супрессоров сайленсинга РНК. Эволюция геномного модуля TGB могла идти несколькими путями, во время которых могли приобретаться дополнительные гены, функциями которых может быть оптимизация работы белков TGB при адаптации вируса к

конкретному растению-хозяину. ОПТ vDRB в ТСМВ располагается перед ОПТ белков TGB, частично перекрываясь с TGB1, в то время как ОПТ p42 – после TGB, перекрываясь с 3'-концевой частью TGB3. Белки, кодируемые генами vDRB и p42, ранее не были изучены экспериментально, при этом для vDRB на основе анализа последовательности предполагали способность связывать дцРНК, а для p42, не имеющего схожих по последовательности клеточных белков, функции не могли быть предсказаны. Актуальность проведенного исследования заключается в обнаружении активности супрессоров РНК-сайленсинга у белков, для которых ранее такие свойства не были известны.

Диссертационная работа имеет стандартную структуру и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение» и «Список литературы». Текст работы изложен на 150 печатных страницах и включает 16 рисунков, одну таблицу и список из 369 источников литературы. Во введении автор формулирует цели и задачи, определяет актуальность работы, описывает методологию, объекты исследования, теоретическую и практическую значимость, личный вклад, формирует список выносимых на защиту положений. Материалы, представленные в диссертационной работе, были опубликованы в трех статьях в высокорейтинговых международных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ, что подтверждает высокий уровень работы, достоверность полученных результатов и квалификацию автора.

Хотелось бы отметить особую широту и детализированность обзора литературы, что показывает проработанность темы автором. В данном разделе представлена информация про транспортные белки вирусов растений и подробно освещаются известные факты о функционировании белков TGB и предполагаемых вариантах эволюционного происхождения данного блока. Обширная часть обзора литературы посвящена описанию процесса РНК-

сайленсинга в растениях, а также таких его аспектов, как его регуляция, амплификация и транспорт сигнала сайленсинга. Отдельное внимание уделено противовирусному ответу растений на основе РНК-сайленсинга и разнообразию вирусных супрессоров РНК-сайленсинга. Приведённые примеры вирусных супрессоров сайленсинга с детализацией известных механизмов их работы показывают степень изученности научной области в настоящий момент и помогают читателю определить значимость полученных в исследовании результатов.

Используемые материалы и методы описаны подробно и исчерпывающе. Работа выполнена на высоком уровне с применением современного оборудования и большого количества разнообразных методов генной инженерии, вирусологии и молекулярной биологии. Использование методов является корректным для решения поставленных задач, полученные результаты отвечают критериям достоверности.

В разделе «Результаты» диссертационной работы Чергинцевым Д.А. излагаются данные, полученные в комплексе исследований функций белков р42 X-вируса лука-шалота и vDRB. Эксперименты по временной экспрессии генов были проведены с использованием методики агробактериальной инфильтрации в классических для фитовирусологии модельных растениях *Nicotiana benthamiana*. Для р42 было показано, что данный белок способен транслироваться с функционально тетрацистронной РНК, соответствующей нативной субгеномной РНК вируса, используя при этом механизм «leaky scanning», что указывает на то, что р42 является частью единого геномного блока, содержащего четыре ОПТ. Далее для р42 была показана способность неспецифически связывать одноцепочечные РНК (оцРНК), супрессировать сайленсинг, вызванный оцРНК, и ингибировать процесс нонсенс-опосредованного распада РНК (NMD), что было подтверждено с помощью ОТ-кПЦР и вестерн-блоттинга. Способность р42 супрессировать NMD является особенно интересной в силу того, что существуют лишь считанные

примеры подобной активности у известных белков вирусов. При этом р42 в проведенных экспериментах оказался неспособным супрессировать сайленсинг, вызываемый двухцепочечными РНК (дцРНК), но проявлял активность супрессора в присутствии репортерной системы, основанной на модифицированном геноме вируса морщинистости турнепса (TCV). Также было показано, что локализация р42 в клетке динамичная, р42 может находиться в цитоплазме в форме нитей и мелких телец, которые ассоциированы с микротрубочками, а также располагаться диффузно и в виде более крупных агрегатов.

Для vDRB в работе была установлена способность связывать оцРНК и дцРНК. Как показал анализ мутантного белка, за связывание дцРНК отвечает дцРНК-связывающий домен vDRB, а связывание с оцРНК, как утверждается, является неспецифическим и обусловлено электростатическими взаимодействиями. Было обнаружено, что vDRB в клетках локализуется в форме цитоплазматических телец, но природа данных телец не была изучена. Показано, что данные тельца расположены около мембран ЭПР, вероятно с ним взаимодействуя, но не содержат мембран, не связаны с процессирующими мРНК Р-тельцами и не связаны с мембранами аппарата Гольджи. Как и для р42, для vDRB не удалось обнаружить активности супрессора сайленсинга, вызванного дцРНК, однако vDRB проявлял такую активность в контексте вирусной инфекции TCV и X-вируса картофеля (PVX). Заражение растений *N. benthamiana* конструкцией PVX-vDRB, которая представляет собой полногеномную копию PVX со вставкой гена vDRB, приводило к значительному повышению уровня накопления вирусной РНК по сравнению с контролем. Также на растениях, зараженных PVX-vDRB, были более мягкие симптомы, чем на растениях, зараженных PVX дикого типа, что является нехарактерным для белков с активностями вирусных супрессоров РНК-сайленсинга, выступающих, как правило, в качестве факторов авирулентности и приводящих к гиперчувствительному ответу растения.

Таким образом, в своем исследовании Чергинцев Д.А. смог установить функции дополнительных белков модулей TCMB и p42/TGB в супрессии сайленсинга в ряде экспериментальных систем, также была показана внутриклеточная локализация белков и для p42 был предложен вероятный механизм трансляции. Полученные автором результаты определенно представляют интерес с точки зрения фундаментальной фитовирусологии и приносят новые данные в понимание функциональных особенностей белков вирусов растений. Вместе с тем, при ознакомлении с работой соискателя возник ряд вопросов и комментариев:

1. В работе не показано, как выглядит структура белка p42, и является ли она консервативной у разных аллексивирусов?

2. Примечателен факт того, что изучаемые в работе белки были оценены только с точки зрения их способности выступать в качестве супрессоров сайленсинга, дополнительно к функциям транспортных белков TGB, однако не представлены данные, были ли проанализированы способности p42 и vDRB выполнять функции ТБ самостоятельно. Не было исследовано и влияние изучаемых белков двух вирусов на функционирование «собственных» белков TGB с использованием конструкций, имитирующих нативные геномные модули TCMB и p42/TGB. Было бы интересно узнать, проводились ли подобные эксперименты.

3. Также интересно, что, несмотря на общую единую канву исследований двух белков, не представлены результаты исследования влияния p42 на инфекцию в контексте PVX, странно, что данный эксперимент не был проделан с p42 по аналогии с vDRB. Вероятно, подобный классический эксперимент был бы уместным для полноценного выявления функций p42 и придавал бы большую законченность исследованию.

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:

Кандидат химических наук,
научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и протеомики растений отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Государственный научный центр Российской Федерации Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук»

Спеченкова Надежда Андреевна

подпись

24.02.2026

Дата подписания

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 335-01-00, e-mail: solanum@ibch.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.6 - Биотехнология (Химические науки)

