

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шешуковой Екатерины Владимировны
на тему: «Перекрывающиеся открытые рамки считывания у табака и
вируса табачной мозаики: особенности организации и
функционирования»
по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Предметом диссертационной работы Е.В. Шешуковой является изучение перекрывающихся открытых рамок считывания у растений, структурной организации таких генов и функциональной роли кодируемых пептидов. Хотя у эукариот ситуация, когда одна мРНК содержит помимо основной открытой рамки считывания (ОРС) альтернативную или перекрывающуюся ОРС и направляет синтез двух полипептидов достаточно редкие, в последние годы появляется все больше сообщений о том, что такие альтернативные ОС не только существуют, но и могут играть функциональную роль. Короткие ОРС, расположенные в 5' нетранслируемых участках генов, являются распространенными регуляторными элементами в мРНК. Длительное время такие ОРС не рассматривали в качестве кодирующих и приписывали им только цис-регуляторную функцию в контроле трансляции основной рамки. Однако, позднее были обнаружены и транслируемые ОРС в 5'-НТО генов. Гораздо реже у эукариот встречаются ОРС, расположенные в 3'-НТО и внутри «основных» генов. Хотя методами биоинформатики внутри генов предсказано много таких альтернативных ОРС, лишь в единичных случаях получено экспериментальное подтверждение их функционирования, т.е. образования белкового продукта *in vivo*. Так, для генома человека доказано существование таких ОРС в 4-х случаях, а для растений имеется лишь один пример подобного гена – «матрешки», - ген Zm908 кукурузы. Поэтому поставленная цель работы по

идентификации других «генных матрешек» у растений актуальна для молекулярной биологии и обладает несомненной новизной.

Диссертационная работа построена в целом по традиционному плану, содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение» и «Выводы». Во **введении** дается общая информация о структуре генов эукариот в целом и, в частности о мРНК, содержащих две перекрывающиеся ОРС, их возможной функциональной роли. Завершается этот раздел формулировкой цели исследования, а именно, выявления особенностей организации и функционирования «генной матрешки», кодирующей гомолог ингибитора пептидазы Кунитца у растений *Nicotiana benthamiana* (NbKPILP), и перекрывающихся открытых рамок считывания у вируса табачной мозаики.

В **обзоре литературы** представлена информация о состоянии исследований в данной области. В начале обзора автор рассматривает, как понятие гена изменялось по мере развития молекулярной биологии, в частности, обнаружения мРНК с альтернативными стартовыми кодонами и коротких открытых рамок считывания, описывает понятие «гена-матрешки». Далее рассматривается вопрос о том, каким образом альтернативная инициация транскрипции и альтернативный сплайсинг обеспечивают многообразие вариантов экспрессии одних и тех же генов. Третья часть обзора литературы посвящена идентификации генов-матрешек методами биоинформатики и проверки этих предсказаний экспериментально, - анализ транскриптов, рибосомный профайлинг и прямая детекция белковых продуктов альтернативных ОРС методами протеомики. Далее рассматриваются примеры альтернативных ОРС, расположенных в 5' и 3' НТО и внутри основной ОРС. Таких «доказанных» примеров таких совсем немного и все они рассмотрены в обзоре. Хотя обзор и короткий, он достаточно информативен и замечаний к нему немного. Встречается достаточно странное утверждение о том, что «в отличие от транскрипции, трансляция считается высокоэффективным процессом». Как сравнивать их

эффективности из обзора неясно. Другое замечание касается одной из задач работы – анализу перекрывающихся 3'-терминальных генов у тобамовирусов. О тобамовирусах и их генах в обзоре ничего не сказано.

В **Материалах и методах** представлено описание использованных методик, в основном получения генно-инженерных конструкций. Каких-то особенно сложных методов нет, но было бы полезно проиллюстрировать получение плазмид на рисунках, поскольку только текстовое описание не дает полного представления об их структуре.

Основное содержание работы представлено в **«Результатах и обсуждении»**. Начинается работа с идентификация гена- гомолога ингибитора трипсина Кунитца в растении *N. benthamiana* (ген NbKPILP). Судя по материалам и методам, ген идентифицировали методом «прогулки по хромосоме». Неясно, зачем это делали, поскольку геном *N. benthamiana* просеквенирован и соответствующая статья была опубликована еще в 2012г. Не удивительно, что ген оказался на 100% идентичен известному гену NbMLP3, о чем соискатель пишет на стр. 36. Автор сравнил NbKPILP с другими известными белками и построил филогенетическое дерево, включающее другие KPI и KPILP белки. Оказалось, что NbKPILP принадлежит к той же ветви, что и другие KPILP из растений Solanaceae, хотя бутстреп-поддержка большинства ветвей низкая для категоричного утверждения. Автор проанализировал способность NbKPILP ингибировать трипсин и показал, что этот белок не обладает соответствующей активностью, что оставляет открытым вопрос о его биологической функции.

Анализируя уровни экспрессии мРНК (рТПЦР) и синтез белка (с помощью Вестерн-блоттинга) автор установил, что уровень экспрессии NbKPILP в корнях намного выше, чем в листьях, при этом в листьях он увеличивается при длительной инкубации растений в темноте. Увеличение экспрессии наблюдалось также при заражении растений табака вирусом табачной мозаики. В целом, результаты хорошо документированы, но остается вопрос о том, почему наблюдаемый размер полос на вестерн-блоте

из корней не соответствует ожидаемому размеру NbKPIIP и этих полос несколько. В этой части работы вызывает сомнение утверждение автора о том, что «синтез чужеродного белка в листьях *N. benthamiana* также может приводить к стимуляции накопления мРНК NbKPIIP». В использованной экспериментальной системе листья инфильтрировали агробактериями с вирусным вектором-продуцентом GFP и наблюдали увеличение экспрессии по сравнению с контролем, которым был «пустой» бинарный вектор. Но в этом эксперименте много факторов могут влиять на индукцию NbKPIIP, например, репликация РНК вируса-вектора, а не только синтез GFP. Кроме того, оверэкспрессия белка является искусственной и вряд ли наблюдается в растении в природе, скорее эксперимент имитирует вирусную инфекцию.

Следующий раздел посвящен идентификации и характеристике промотора NbKPIIP. Текст на страницах 46-47 уместен не здесь, а в обзоре литературы, например такие определения как «Промотор - это область хромосомной ДНК (длиной 100-1000 пар оснований), с которой происходит инициация транскрипции определенного гена», при этом дается ссылка на статью 2014 года (Hernandez-Garcia and Finer, 2014). Автор идентифицировал промотор и проанализировал его последовательность, при этом были обнаружены различные регуляторные элементы, - светочувствительный элемент, элемент циркадного ритма, гомолог элемента *Vox-W1 Petroselinum crispum*, отвечающего за реакцию в ответ на повреждение и инфекцию патогена. Их наличие объяснило наблюдаемую картину индукции NbKPIIP в темноте и при различных стрессах, что также было подтверждено в экспериментах по экспрессии репортерных генов с промоторов NbKPIIP и 35S. В этом разделе не ясно, почему автор сделал заключение о том, что «нельзя рассматривать изменение экспрессии репортерного гена в данном эксперименте как результат специфического ответа, опосредованного активностью промотора, на длительную инкубацию растения в темноте». Да, «индукция» наблюдалась и в случае 35S промотора, но автор и в нем нашел гомолог светорегуляторного элемента.

Наиболее важный результат работы, демонстрация того что NbKPILP содержит вложенную ОРС, контролирующую накопление своей мРНК в листьях, представлен в следующем разделе. С помощью 5'-RACE был идентифицирован старт транскрипции мРНК NbKPILP, а анализ последовательности транскрипта позволил выявить потенциальную «вложенную» ОРС, которая способна кодировать 53-ак полипептид. Для демонстрации возможности экспрессии 53ак-аОРС автор, сохраняя природный контекст 53ак-аОРС и организацию гена NbKPILP, поставил репортерный ген GFP в одной рамке с 53ак-аОРС таким образом, чтобы в результате трансляции 53ак-аОРС образовывался слитый белок 53ак-GFP. Белок GFP действительно был обнаружен, что указывает на возможность синтеза 53ак-пептида *in vivo*. Утверждению о том, что «экспрессия 53ак-аОРС осуществляется с основной («материнской») мРНК NbKPILP *in vivo*», имеет высокую вероятность, хотя нельзя исключить и экспрессию его с «внутреннего» промотора. Автор приводит аргумент, что «5'-RACE подтвердили отсутствие дополнительных более коротких вариантов кДНК». Это так, но представленные на рис 14Б данные не позволяют исключить наличия слабого промотора и соответственно другого 5' конца РНК, при том что уровень экспрессии 53ак-GFP был невысок по сравнению с наблюдаемым при агроинфильтрации конструкцией 35S-GFP.

Показав возможность экспрессии 53ак-аОРС, автор перешел к исследованию роли 53ак-аОРС в накоплении мРНК NbKPILP в листе *N. benthamiana*. Убедительными являются показанные на рис. 19 результаты, показывающие, что 53-ак полипептид способен влиять на структуру мембраны и вызывать гибель клеток. Также показано, что введение мутаций в 53-ак пептид, не нарушающих последовательность белка NbKPILP, привело к более чем двукратному увеличению уровня мРНК NbKPILP. Этот эксперимент менее убедителен, поскольку в нем меняется последовательность мРНК, что может влиять на ее стабильность. Возможно, точечная замена старт кодона в последовательности, кодирующей 53-ак

пептид, была бы более адекватной. Далее автор выдвигает гипотезу о том, каким образом в стрессовых условиях может увеличиваться содержание материнской мРНК NbKPILP и как на это влияет 53-ак пептид. Она состоит в том, что «в условиях стресса синтез 53-ак полипептида и разрушения материнской мРНК NbKPILP не происходит, поскольку инициация трансляции осуществляется на первом AUG кодоне несмотря на его менее благоприятный контекст». Однако, убедительной аргументации в пользу этого объяснения не представлено.

Заключительная часть «результатов и обсуждения» озаглавлена «Организация 3'-терминальных перекрывающихся ОРС у тобамовирусов обеспечивает эффективную адаптацию и репродукцию в данном хозяине». Вся она представляет либо анализ литературы (напр. стр. 63-66), либо рассуждения автора по данному вопросу. Экспериментальных данных в этом разделе нет. Какой-то связи с основной задачей работы по характеристике нового растительного «гена-матрешки» этот раздел не имеет и его наличие в диссертации представляется избыточным.

Важнейшим результатом работы является демонстрация того, что ген NbKPILP содержит вложенную ОРС, контролирующую накопление материнской мРНК в листьях. Это второй пример такого гена в растениях, что определяет новизну и научную значимость работы. Конечно, приведенные доказательства существования кодируемого вложенной ОРС 53-ак полипептида *in vivo* в растении являются скорее косвенными, поскольку прямого подтверждения его существования на уровне белка нет. Однако, совокупность представленных аргументов достаточно убедительна, даже при всех высказанных замечаниях.

Указанные выше замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Результаты работы опубликованы, в том числе в ведущих международных научных журналах. 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 оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Е.В. Шешукова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Равин Николай Викторович

доктор биологических наук,

профессор, заместитель директора Федерального государственного

учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные

основы биотехнологии» Российской академии наук»



09-04-2018г.

Контактные данные:

тел.: 7(499)7833264, e-mail: nravin@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 03.02.02 – «вирусология»

Адрес места работы:

119071, г. Москва, Ленинский просп, д. 32, стр. 2.

ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биоинженерии

Тел.: 7(499)7833264; e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН Равина Н.В. удостоверяю:
ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН



А.Ф. Орловский