

## 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»

Изучение особенностей организации генома эукариот, в том числе растений было и остается одной из ключевых задач современной молекулярной биологии. У фитовирусных геномов перекрывание открытых рамок считывания (ОРС), связанное с альтернативной транскрипцией и сплайсингом, а также использование неканонических механизмов синтеза белка встречается достаточно часто, в то время как клеточные гены с этой точки зрения изучены недостаточно. Определение полных нуклеотидных последовательностей ряда растительных геномов с последующим биоинформационным анализом позволяют выявлять разнообразные кандидатные гены, содержащие дополнительные внутренние или перекрывающиеся рамки трансляции. Экспериментальных данных по этой теме на сегодняшний день явно недостаточно, поэтому подробное исследование области генома растения *Nicotiana benthamiana*, кодирующей гомолог ингибитора пептидазы Кунитца (*NbKPILP*), предпринятое автором, является интересной и актуальной научной задачей. Помимо регуляции гена *NbKPILP*, соискатель рассматривает примеры перекрывания ОРС генов транспортного и капсидного белков в группе тобамовирусов (род *Tobamovirus*, семейство *Virgaviridae*); типовой представитель данной группы - широко известный Вирус табачной мозаики (ВТМ), способен заражать, в том числе, и *Nicotiana benthamiana*.

Диссертация Е. В. Шешуковой построена по традиционной схеме и содержит следующие основные разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». В тексте цитируются 208 англоязычных и 3 русскоязычных источника. Объем работы составляет 86 страниц, в ней содержится 24 рисунка и 6 таблиц.

Литературный обзор написан хорошим языком, материал изложен достаточно четко и доступно, удачно иллюстрирован. Рисунки 1 и 2 показывают возможные схемы организации генов и связанных с ними рамок считывания. Автор подробно рассматривает примеры коротких рамок считывания, расположенных внутри «основной» ОРС, а также в 5' и 3'-концевых нетранслирующих участках мРНК. Приведенные примеры, в основном, касаются геномов человека и животных, для растений единственным экспериментально подтвержденным геном, содержащим «вложенную» альтернативную ОРС, остается ген Zm908 из кукурузы. В обзоре описаны специфические методы, предназначенные для исследования коротких ОРС и кодируемых ими пептидов, в том числе алгоритмы и программы для биоинформатического поиска, рибосомальный профайлинг, протеогеномика, серийный анализ экспрессии генов (SAGE) и другие подходы к анализу транскриптома. В отличие от глав излагающих данные по коротким ОРС, глава, посвященная альтернативной инициации транскрипции и альтернативному сплайсингу, на мой взгляд, изложена несколько фрагментарно, при этом количество упоминаемых работ могло быть более значительным. Например, в качестве примера функциональной роли альтернативного сплайсинга у человека приводится рак молочной железы, но не упоминается такой хорошо изученный пример, как детская прогерия (синдром Хатчинсона-Гилфорда).

В разделе «Материалы и методы» изложены основные экспериментальные подходы, примененные автором для выполнения

рецензируемой работы. Основные молекулярно-биологические и биохимические методы описываются достаточно детально, со всеми необходимыми подробностями. Мне кажется, для лучшего понимания главы «Получение генноинженерных конструкций» необходима иллюстрация, более подробно показывающая область геномов вирусных векторов крВТМ:53ак и крВТМ:53ак\_мут, расположенную между геном транспортного белка (ТБ) и последовательностью 53ак, замещающую ген белка оболочки (БО). Известно, что у крВТМ дикого типа гены ТБ и БО перекрываются на значительном протяжении, причем данная область включает, помимо С-концевой части гена ТБ, значительный участок субгеномного промотора и, соответственно, 5'-концевой нетранслируемой области субгеномной РНК, влияющей на эффективность синтеза целевого пептида 53ак. Кроме того, желательно было бы добавить главу с описанием использованных в работе биоинформатических методов, в частности филогенетического анализа.

Результаты работы и их обсуждение объединены в один раздел, который, в свою очередь, включает 2 основные главы. Первая из них, «Исследование генной матрицы *NbKPILP*, кодирующей КРІ-подобный белок» содержит преимущественно экспериментальные данные, в то время как в главе, посвященной 3'-терминальным перекрывающимся ОРС тобамовирусов, изложен исключительно теоретический материал, в том числе биоинформационный анализ известных на сегодняшний день последовательностей тобамовирусных геномов. Автор клонировал и подробно исследовал ген *NbKPILP* из *Nicotiana benthamiana* и его промоторную область. Показано, что данный ген содержит короткую ОРС (53 аминокислотных остатка), которая способна контролировать накопление «собственной» мРНК, при этом транскрипционный промотор гена *NbKPILP*, по видимому, является конститутивным и не оказывает существенного влияния на динамику накопления соответствующей мРНК в клетке. Уровень синтеза РНК *NbKPILP* повышается при абиотическом стрессе (в темноте), а

также при вирусной инфекции ВТМ дикого типа или вирусных векторов на основе крВТМ, кодирующих чужеродный ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Анализ 3'-проксимальной области геномов тобамовирусов *in silico* позволил сформулировать гипотезу о том, что природная организация генов транспортного и капсидного белков может обеспечивать адаптацию к растению-хозяину. Полученные автором данные, на мой взгляд, являются достоверными, а высказанные соискателем предположения и выводы – достаточно обоснованными. Новизна полученных результатов и их научное значение не вызывает сомнений. Тем не менее, необходимо упомянуть ряд замечаний к данному разделу диссертации. Использование значений бутстрэппинга ниже 40% в данных филогенетического анализа (Рисунки 4 и 23) мне кажется необоснованным. На мой взгляд, соответствующие деревья следовало бы подвергнуть дополнительному редактированию, а метод максимального правдоподобия для сравнения последовательностей растительных генов *KPI* и *KPILP* не является оптимальным. При анализе данных по биотическому стрессу, полученных в опытах с вирусными векторами, кодирующими ген *GFP*, практически невозможно разделить эффекты, связанные с вирусной инфекцией как таковой, и эффекты, полученные при накоплении в клетке чужеродного белка (GFP). Мне кажется, в этой части для окончательных выводов не хватает дополнительных результатов, которые можно было бы получить при экспрессии в листьях гена *GFP* в бинарном векторе под контролем любого конститутивного растительного промотора, например 35S или выделенного автором NbKPILP. К сожалению, получив конструкцию, кодирующую слитый белок 53ак-GFP, соискатель не использовал ее для исследования внутриклеточной локализации данного белка, чтобы подтвердить высказанное предположение о локализации 53ак в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Влияние синтеза 53ак на уровень «собственной» мРНК постулируется, но возможный механизм подробно не разобран. Наконец, формулировка второго вывода («природная организация

3'-терминальных перекрывающихся ОРС у тобамовирусов обеспечивает эффективную адаптацию и репродукцию в данном хозяине») мне представляется излишне оптимистической, поскольку в работе приводятся только данные теоретического анализа, не имеющие пока экспериментального подтверждения. На мой взгляд, слово «обеспечивает» следовало бы заменить выражением «может обеспечивать».

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Автореферат адекватно отражает основное содержание диссертационной работы. 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 Шешукова Екатерина Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

ведущий научный сотрудник кафедры вирусологии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Иванов Петр Алексеевич



12.04.18

Контактные данные:

тел.: 7(910)4202775, e-mail: pivanov@belozersky.msu.ru

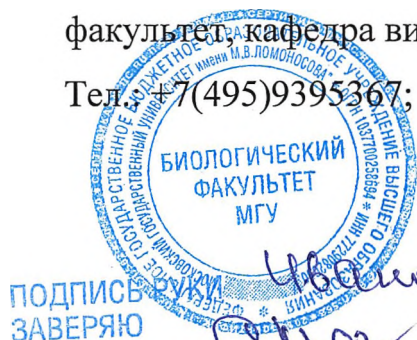
Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

03.00.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический  
факультет, кафедра вирусологии

Тел.: +7(495)9395367; e-mail: info@mail.bio.msu.ru



Иванов П. А.



Документовед биологического факультета МГУ