

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Лезжова Александра Александровича
на тему: «Системный транспорт РНК с выраженной вторичной
структурой в растениях»
по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа Лезжова Александра Александровича посвящена изучению механизмов дальнего транспорта РНК по сосудистой системе растений и идентификации структурных элементов клеточных и вирусных РНК, способных направлять этот процесс.

Рост и развитие растений, их ответ на изменения условий окружающей среды определяется внутренними сигналами, которые могут передаваться не только между клетками, но и по сосудистой системе, состоящей из ксилемы и флоэмы. Мобильными сигнальными молекулами могут выступать различные типы РНК, которые в настоящее время уже обнаружены во флоэмном экссудате некоторых растений. Однако механизмы дальнего транспорта и функции таких РНК остаются неясными, что представляется актуальным.

Автором в диссертационной работе сформулированы следующие задачи: создание экспериментальной системы на основе модифицированного генома Х-вируса картофеля (PVX-REP) для тестирования способности различных последовательностей РНК направлять дальний транспорт, анализ способности тРНК-подобных структур вирусов растений направлять дальний транспорт гетерологичной РНК в системе PVX-REP, анализ способности непроцессированной пре-миРНК390 направлять дальний транспорт РНК в системе PVX-REP и идентификация предшественников миРНК во флоэме *Cucurbita maxima*.

Диссертационная работа логично изложена на 96 страницах и содержит следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. В работе представлены 2 таблицы и 7 рисунков.

Во введении автором описана актуальность исследований, степень разработанности, сформулированы цель и задачи, научная новизна и практическая значимость, обозначены положения, выносимые на защиту. Кроме того указаны степень достоверности результатов, их апробация и представлен список публикаций по теме диссертации в журналах Plant Science, PeerJ и Frontiers in Plant Science. Результаты диссертационной работы были апробированы на 2 конференциях: 44 конгрессе FEBS (2 тезисов) и Всероссийской конференции в Иркутске.

Обзор литературы состоит из трех разделов. В первом разделе автором описан системный транспорт РНК по сосудистой системе флоэмы растений. Транспорт мРНК, миРНК, рРНК, тРНК и других некодирующих РНК представлены в отдельных подразделах, которые следуют после описания структуры и функции флоэмы. Отдельными подразделами автором описаны РНК-связывающие белки флоэмы и сигналы транспорта. Второй подраздел обзора литературы посвящен подробному описанию тРНК-подобных структур в геномных РНК вирусов растений. Третий подраздел представлен описанием биогенеза и функционирования миРНК.

В результате прочтения всего раздела формируются необходимые предпосылки для эффективного изучения экспериментальной части работы.

Глава Материалы и методы представлена описанием современных методов молекулярной биологии, вирусологии и генной инженерии, использованных диссертантом.

Глава Результаты и обсуждения содержит 5 подразделов, которые отражают этапы проведения исследований. На первом этапе автором разработана система для визуализации дальнего транспорта РНК у *N. benthamiana*. Система создана на основе X-вируса картофеля, где область, кодирующая вирусные транспортные белки (ТБ) и белок оболочки (БО), была заменена на последовательность, кодирующую GFP. Такая модификация вируса позволяет исключить влияние вирусных белков на транспорт анализируемых последовательностей РНК. Непосредственно система по детекции дальнего транспорта включает в себя агроинфильтрацию нижних листьев *N. benthamiana* культурой агробактерии, несущей конструкцию модифицированного X-вируса картофеля с целевым фрагментом, и одновременную агроинфильтрацию верхних листьев тех же растений культурой агробактерии, несущей бинарный вектор для экспрессии ТБ ВТМ. Если целевой фрагмент обеспечивает дальний транспорт РНК, то модифицированный вирус попадает в верхние листья, где может реплицироваться и, благодаря ТБ ВТМ, перемещается из клетки в клетку, образуя GFP-содержащие области инфекции. По результатам данного раздела автором сформулирован первый вывод. Следует отметить уникальность созданной диссертантом системы, которая может использоваться в широком спектре исследований механизмов транспорта различных РНК по флоэме.

Во втором разделе Результатов и обсуждений описаны эксперименты по изучению возможного направления дальнего транспорта вирусных 3'НТО, содержащие тРНК-подобные структуры. Разработанная на первом этапе система позволила диссертанту доказать способность таких областей РНК3 вируса мозаики костра, вируса желтой мозаики турнепса и вируса табачной мозаики в направлении дальнего транспорта. На основе отсутствия гомологии в нуклеотидных последовательностях изучаемых элементов автор предполагает, что сигналами, которые

направляют транспорт исследуемых РНК, могут быть элементы вторичной и третичной структуры. Результаты данной главы автором обобщены во втором выводе.

В следующем подразделе Результаты и обсуждений автор приводит подробное описание экспериментов, которые доказывают участие непротессированной пре-миРНК390 в дальнем транспорте. Приводятся аргументы в пользу выбранной пре-миРНК: эффективно связывается белком NtPBL *in vitro*, который имеет сродство к несовершенным дуплексам РНК. Представлены эксперименты по установлению относительного накопления двух разных производных при-миРНК390: с фланкирующими 200-нуклеотидными последовательностями и без. Было показано, что фланкирующие последовательности могут участвовать в процессинге первичного транскрипта миРНК и, как следствие, для дальнейших опытов была выбрана последовательность без таких областей. В результате проведенных экспериментов автором установлено, что последовательность пре-миРНК390 является достаточной для обеспечения системного транспорта гетерологичной РНК. Данное утверждение было отражено в третьем выводе. В этом же разделе, автор приводит результаты биоинформатического анализа по поиску предшественников миРНК390 во флоэмных экссудатах *Cucurbita maxima* и оценке уровня их представленности. Было установлено, что при-миРНК390 может избирательно вовлекаться в путь транспорта по флоэме.

Далее автором представлен подраздел по идентификации предшественников миРНК в данных транскриптома флоэмы *Cucurbita maxima*. Первичные прочтения по мезофиллу листа и флоэмному экссудату из базы NCBI Sequence Read Archive были собраны в транскриптомы. С использованием известных последовательностей 120 пре-миРНК *C. melo* были предварительно установлены пре-миРНК, характерные для листа и флоэмного экссудата. Дополнительный анализ

покрытия пре-миРНК первичными прочтениями позволил автору показать, что значение «среднего покрытия» (average coverage, AC) не может отражать представленность пре-миРНК в транскриптомах. Диссертантом предложено использование значения «локального покрытия» (local coverage, LC), фильтрация по которому позволила установить 11 пре-миРНК, которые являются специфичными для флоэмы.

В заключительном подразделе Результаты и обсуждений приводятся эксперименты по детекции предшественников миРНК во флоэмном экссудате *C. maxima* и анализ их способности к системному транспорту. Детекцию пре-миРНК проводили с использованием обратной транскрипции и ПЦР со специфическими праймерами. Автором были выбраны три при-миРНК, представленность которых различается в листьях и флоэме, хотя в диссертации указано “со сходной представленностью” (стр.70). Для доказательства дальнего транспорта при-миРНК автором успешно применен метод межвидовых прививок: привоя *C. melo* на подвой *C. maxima*. В результате показан системный транспорт при-миРНК319а из подвоя в привой. Далее диссертант приводит аргументированную дискуссию о возможных механизмах дальнего транспорта при-миРНК и их возможной функции. Следует отметить, что автором представлены данные о наличии открытых рамок считывания на некоторых при-миРНК и возможности синтеза пептидов, которые играют регуляторную роль.

В разделе Заключение автор обобщает полученные результаты и формулирует вектор будущих исследований, которые представляются актуальными.

Выводы представлены 5 пунктами, достоверность которых не вызывает сомнений.

В последнем разделе диссертации Списке литературы указаны 180 англоязычных источников.

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации и публикациям.

Следует отметить ряд вопросов и замечаний:

- отсутствие иллюстраций в разделе “Обзор литературы”
- употребление таких слов и словосочетаний как “микропроцессор” (стр.30), “Реакции проводили в трех экземплярах” (стр. 46), “чтений” в применении к нуклеотидным последовательностям, “центрифугировали при максимальных оборотах”, “сайты их транскрипции и функции в большинстве случаев совпадают” и наличие опечаток в диссертационной работе
- в разделе Материалы и методы не указано количество РНК при получении кДНК, количество матрицы при амплификации фрагментов ДНК и маркер молекулярного веса, используемый при агарозном гель-электрофорезе
- Отсутствие расшифровки ряда аббревиатур в списке сокращений (ПД, СТ, УТ, ТСТР и др.) затрудняет восприятие текста диссертационной работы
- Подписи к рисункам выглядят очень избыточными. Следовало бы перенести некоторые описания в основной текст повествования
- Не совсем понятно на основании чего выбраны только три при-миРНК при экспериментальной проверке данных транскриптомного анализа *S. maxima*.

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 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 Лезжов Александр Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент: кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории функциональной геномики и протеомики растений отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук.

Князев Андрей Николаевич

Контактные данные:

тел.: 8(926)173-33-71, e-mail: agrofak@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.00.15 – «генетика»

Адрес места работы:

117997, Москва, улица Миклухо-Маклая, 16/10к1

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

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

Подпись кандидата биологических наук Князева А.Н.

«УДОСТОВЕРЯЮ»

Ученый секретарь

ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков

М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук,

доктор физико-математических наук

Олейников Владимир Александрович

«25» апреля 2022 г.