

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

Диссертация Александра Александровича Лезжова посвящена изучению механизмов дальнего (системного) транспорта РНК по проводящей системе растений и идентификации структурных элементов клеточных и вирусных РНК, способных направлять этот процесс.

В настоящий момент идентифицированы представители различных классов РНК, которые способны к дальнему транспорту. В случае ряда миРНК и мРНК экспериментально показана важность транспорта этих РНК в развитии растений и ответе на стресс. В отдельных случаях идентифицированы последовательности и структурные элементы, способные направлять РНК по пути дальнего транспорта, однако точный механизм транспорта РНК по проводящей системе остается неизвестным и требует дальнейшего изучения. В связи с этим важность и актуальность диссертационной работы А.А. Лезжова не вызывает сомнений.

В рамках диссертации автор решал следующие задачи: 1) создание экспериментальной системы на основе модифицированного генома Х-вируса картофеля (PVX-REP) для тестирования способности различных последовательностей РНК направлять дальний транспорт; 2) анализ способности тРНК-подобных структур вирусов растений направлять дальний транспорт гетерологичной РНК в системе PVX-REP; 3) анализ способности непроцессированного предшественника микроРНК390 направлять дальний

транспорт РНК в системе PVX-REP; 4) идентификация предшественников микроРНК во флоэме *Cucurbita maxima*.

Работа имеет ясную структуру и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных методик, результатов экспериментов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы (180 источников, все на английском языке). Работа занимает 96 страниц, содержит 7 рисунков и 2 таблицы.

Обзор литературы состоит из нескольких разделов, посвященных общему устройству проводящей системы растений, транспорту различных классов РНК по флоэме, идентифицированным во флоэме РНК-связывающим белкам и их функциям, а также известным на сегодняшний день сигналам транспорта по флоэме в составе различных РНК, их структурным и функциональным особенностям. Помимо этого, детально рассматриваются тРНК-подобные структуры вирусов растений и их структурно-функциональные особенности. Детально рассмотрен механизм процессинга микроРНК у растений. Важно отметить, что обзор литературы содержит существенное число работ, опубликованных в самое последнее время. Он отражает самые современные представления в соответствующих областях молекулярной биологии растений. Полностью разделяя точку зрения автора о первостепенной важности современных работ в столь активно развивающейся области науки, считаю, что диссертация выиграла бы от упоминания нескольких классических работ по структуре и функциям флоэмы покрытосеменных растений. Так, было бы приятно увидеть в списке литературы работы К. Еаси и Ю.В. Гамалея (в том числе его важные монографии), а может быть – и учебник А.К. Тимонина (2007), в котором, например, обсуждается отсутствие сопровождающих клеток у ситовидных трубок протофлоэмы. Работая с представителями семейства тыквенные, было бы логично указать в обзоре литературы на особенности структуры флоэмы, свойственные представителям именно этого семейства, отличающие

тыквенные, например, от модельного объекта *Arabidopsis thaliana*. К числу таких особенностей в первую очередь относится наличие двух массивов флоэмы в каждом проводящем пучке стебля – наружной и внутренней, причем внутренняя флоэма – только первичная.

В диссертационной работе предложена оригинальная система для тестирования способности различных последовательностей РНК направлять дальний транспорт. Данная система основана на использовании модифицированного генома Х-вируса картофеля, у которого области генома, кодирующие белки, необходимые для межклеточного и системного транспорта, заменены на последовательность, кодирующую ген GFP и содержащую сайт множественного клонирования. Попадая в клетку, такой модифицированный вирус способен только к репликации и неспособен к межклеточному и системному транспорту. Помимо этого, разработанная система задействует способность транспортного белка 30К вируса табачной мозаики восстанавливать межклеточный транспорт вируса, дефектного по функции транспорта. Используя данную экспериментальную систему, автор продемонстрировал функцию тРНК-подобных структур трех групп РНК-содержащих вирусов растений в обеспечении системного транспорта данных патогенов.

Помимо этого, в рамках диссертационной работы впервые проведен биоинформатический анализ флоэмного экссудата *Cucurbita maxima* с целью выявить наличие предшественников микроРНК. Данные анализа показывают, что предшественники ряда микроРНК способны вовлекаться в путь дальнего транспорта по флоэме, избегая процессинга. Особенно ценной является дальнейшая экспериментальная верификация данных биоинформатического анализа, в частности, детекция предшественников соответствующих микроРНК во флоэмном экссудате и тканях листа тыквы, а также эксперименты с прививками растений. Используя тыкву (*Cucurbita maxima*) в качестве подвоя и дыню (*Cucumis melo*) в качестве привоя, удалось

экспериментально показать дальний транспорт предшественника миРНК319а тыквы. Эксперименты с прививками важны в том отношении, что они позволили получить убедительные доказательства отсутствия существенной контаминации флоэмного экссудата. Интересно, что транспорт по флоэме в данном случае должен проходить в восходящем направлении. Эти данные могли бы быть интересны для более тонкого понимания динамики флоэмного транспорта растений. Без сомнений, вблизи верхушки побега флоэмный транспорт должен идти в восходящем направлении, а далее он должен становиться преимущественно нисходящим или во всяком случае включать сильную нисходящую компоненту. Поэтому важно было бы дать оценку стадии развития побега, на которой имел место восходящий транспорт предшественника миРНК319а. Автор отмечает, что флоэмный экссудат собирали со срезов черешка листа. Возможно, имело бы смысл разделить экссудат, собираемый с каждой из сторон этого разреза. Еще интереснее было бы собрать отдельно экссудат из наружной (преимущественно вторичной) и внутренней (первичной) флоэмы проводящего пучка и оценить возможные различия в характере транспорта по ним. Одновременно это позволит исключить возможную контаминацию с растворами, проводимыми ксилемой.

Диссертационная работа написана понятным языком и практически не содержит опечаток (одна из немногих опечаток – *Solanum tuberosum* subsp. *Andigena*; название подвида не должно начинаться с заглавной буквы). Экспериментальная работа выполнена на высоком и современном научном уровне с использованием множества методов молекулярной биологии, генной инженерии и инструментов биоинформатики. Структура исследования представляется логичной, а выводы обоснованными.

К работе столь высокого уровня трудно сделать какие-то замечания. Все они носят технический характер и отчасти связаны с вопросами использования ботанической терминологии. Автор, по-видимому, неверно

понимает значение термина «протофлоэма» (например, на стр. 12). Флоэма двудольных растений делится на первичную (которая возникает из прокамбия) и вторичную (которая возникает из камбия). Первичная флоэма делится на протофлоэму и метафлоэму. Протофлоэма – это не ранняя стадия развития, через которую проходит каждый проводящий элемент флоэмы, а особый тип флоэмы, который функционирует в органах, которые еще продолжают рост в длину. Использование подходов, развитых в диссертации, в дальнейшем может позволить охарактеризовать возможные функциональные различия между прото-, мета- и вторичной флоэмой, причем представители семейства тыквенные выглядят удобными объектами для таких работ.

В работе иногда дается противопоставление флоэмы «тканям листа» (например, на странице 7). Вместе с тем, в листе есть несколько разных тканей, в том числе и флоэма мелких и крупных жилок.

Автор отмечает (стр. 11), что ксилема покрытосеменных растений состоит «из мертвых клеток трахеид и сосудистых элементов». Термин «трахеальные элементы» обычно употребляют для всех проводящих элементов ксилемы. Есть цветковые растения, имеющие только трахеиды, а есть такие, которые имеют только сосуды. Кроме того, кроме мертвых клеток в ксилеме покрытосеменных растений всегда есть и живые.

В диссертации обсуждаются различия в опубликованных оценках максимального размера частиц, которые могут попадать из сопровождающих клеток в членик ситовидной трубки. Было бы интересно обратить внимание на то, какие объекты были изучены в разных работах, так как данный показатель может быть неодинаковым в разных группах растений.

Указанные замечания ни в коей мере 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 доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой высших растений биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Соколов Дмитрий Дмитриевич

Контактные данные: тел.: 8(495)939-28-20, e-mail: Sokoloff-v@yandex.ru,
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 03.02.01 – «ботаника»

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1 стр. 12

Биологический факультет Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования «Московский
государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Тел.: +7 (495) 939-27-76; e-mail: info@mail.bio.msu.ru

