

Отзыв

официального оппонента доктора биологических наук Соловьева Андрея Геннадьевича о диссертационной работе Супруна Андрея Романовича «Регуляция экспрессии генов *Arabidopsis thaliana* L. с помощью экзогенного применения *in vitro* синтезированных РНК», представленную в диссертационный совет 99.0.064.02 на базе ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – биотехнология и 1.5.4 – биохимия (биологические науки).

Актуальность исследования

Диссертация Супруна А.Р. посвящена исследованию механизмов РНК-интерференции в растениях и способов их практического применения. В настоящее время показана принципиальная возможность использования экзогенных РНК для регуляции экспрессии генов растений, борьбы с патогенами и адаптации растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, однако подходы к решению этих задач по-прежнему в значительной степени не разработаны, что относится как к пониманию молекулярных механизмов воздействия экзогенных РНК, так и к методической стороне таких подходов. Эти обстоятельства делают тему диссертационной работы Супруна А.Р. весьма актуальной.

Структура диссертационной работы

Диссертация Супруна А.Р. изложена на 117 страницах текста, состоит из введения, главы «обзор литературы», главы «материалы и методы», главы «результаты», главы «обсуждение», выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 30 рисунками и содержит 5 таблиц. Список литературы включает 201 научную публикацию.

Во введении Супрун А.Р. дает обоснование актуальности выбранной темы, определяет цель работы (влияние экзогенных дцРНК и киРНК на экспрессию трансгенов и эндогенных генов у *Arabidopsis thaliana*) и формулирует задачи, необходимые для достижения поставленной цели. Далее автор приводит положения, выносимые на защиту, и дает свою оценку научной новизны и практической значимости выполненной научно-исследовательской работы.

В литературном обзоре диссертант освещает современное состояние изучаемой проблемы. Кратко рассмотрев природное разнообразие некодирующих РНК, общие принципы РНК-интерференции в растениях и биогенез малых РНК, автор подробно останавливается на применении экзогенных двуцепочечных РНК (дцРНК) и малых РНК для защиты растений от насекомых-вредителей и патогенных грибов. Далее рассматриваются такие аспекты применения РНК-интерференции для защиты растений, как методы получения соответствующих препаратов РНК и их стабильность в организме растения. Эти части обзора литературы непосредственно связаны с предметом исследований и в них достаточно полно отражены современные тенденции исследований, направленных на практическое применение в растениях методов, основанных на РНК-интерференции. Обзор литературы вполне адекватно отражает состояние исследований в данной области и, безусловно, служит хорошей теоретической базой для представленной экспериментальной работы.

В главе «Материалы и методы» приведена краткая характеристика объектов исследования и описание всех использованных в ходе работы методов. Протоколы методов изложены достаточно подробно, что делает возможным повторение приведенных в диссертации экспериментов другими исследователями. Важной частью данной главы является описание методов статистической обработки полученных экспериментальных данных.

Самая объемная глава диссертационной работы посвящена описанию результатов исследования. Автор рассматривает получение трансгенных линий *A. thaliana*, экспрессирующих репортерные гены NPTII и EGFP, которые

использовались в модельных экспериментах. Далее приводятся результаты экспериментов по подавлению экспрессии трансгенов EGFP- и NPTII с помощью экзогенных дцРНК и малых РНК. Существенный массив данных относится к экспериментальной работе, направленной на оптимизацию условий и способа обработки растений растворами дцРНК и киРНК. Приведены результаты, полученные при изучении молекулярных механизмов воздействия экзогенных РНК на растения, которые включают детекцию малых РНК в тканях растения и результаты анализа метилирования локусов трансгенов. В заключительной части данного раздела диссертационной работы даны результаты анализа воздействия экзогенных РНК на экспрессию эндогенного локуса CHS, включая анализ фракции малых РНК с помощью высокопроизводительного секвенирования. Результаты изложены ясно и подробно.

Обсуждение результатов приводится в главе 4. Здесь автор рассматривает полученные результаты с привлечением данных литературы и приходит к выводу о том, что обработка листовой поверхности растений растворами экзогенных РНК имеет значительный потенциал для использования в сельском хозяйстве.

Выводы полностью соответствуют полученным данным.

Научная новизна и практическая значимость полученных результатов

В данной диссертационной работе впервые детально исследовано влияние экзогенных дцРНК и малых РНК на активность модельных трансгенов *A. thaliana*, а также природных генов растительного генома.

С точки зрения научной новизны особый интерес представляют три группы результатов, которые можно считать существенными шагами на пути к пониманию молекулярных механизмов, лежащих в основе эффектов, вызываемых экзогенными РНК в растениях.

Во-первых, показано, что экзогенные дцРНК расщепляются в растениях, давая начало соответствующим малым РНК. Этот результат является принципиально важным, поскольку в ряде ранее опубликованных работ не удалось показать такого расщепления, и без ответа оставался вопрос о механизме сиквенс-специфического действия дцРНК на соответствующие гены или трансгены. Приведенные в работе данные показывают, что этот механизм задействует дцРНК-специфические малые РНК.

Во-вторых, обнаружено, что происходит метилирование геномных локусов, соответствующих дцРНК, использованной для обработки растений, с образованием остатков 5-метил-цитозина. Такое метилирование вероятнее всего приводит к транскрипционному сайленсингу данных локусов. Вместе с результатами анализа дцРНК-специфических малых РНК эти данные могут указывать на то, что экзогенная дцРНК обладает двойным механизмом действия, вызывая как пост-транскрипционный, так и транскрипционный сайленсинг.

В-третьих, показан транспорт экзогенных малых РНК из обработанных ими листьев растения в необработанные листья, что интересно как с точки зрения возможности индукции в растениях специфического системного ответа на локальную обработку препаратом малых РНК, так и с точки зрения механизма такого транспорта, который для экзогенных РНК, в отличие от эндогенных, может быть как симпластическим, так и апопластическим, что, безусловно, требует дальнейшего изучения.

Сильной стороной представленной работы является исследование влияния экзогенных РНК на экспрессию природного гена CHS, которое позволило получить результаты, показывающие применимость заключений и выводов, сделанных на основе изучения модельных трансгенов, к природным генам растительного генома.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки методов практического применения технологий на основе РНК-интерференции

в растениеводстве с целью борьбы с патогенами растений и увеличения устойчивости сельскохозяйственных культур к абиотическим стрессам.

Обоснованность и достоверность полученных результатов и выводов диссертационной работы

Использование для исследований современных методов физико-химической биологии подтверждает обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в работе Супруна А.Р., а также выносимых на защиту положений и выводов. Во всех исследованиях выборка достаточна, а выбранные методы статистического анализа являются адекватными. Приведенные в таблицах и гистограммах данные позволяют проверить правильность расчетов, сделанных диссертантом. Следует отметить, что автор и сам тщательно подходит к статистической обработке полученных данных, оценивая достоверность различий с использованием стандартных методов статистики. Таким образом, полученные Супруном А.Р. научные результаты и выводы являются обоснованными и достоверными. Следует отметить и то, что основные результаты диссертации Супруна А.Р. опубликованы в рецензируемых журналах и апробированы в научных конференциях. Автореферат соответствует содержанию диссертации.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

К диссертационной работе возник ряд замечаний.

1. В обзоре литературы при рассмотрении биогенеза малых РНК не обсуждается 2'-О-метилирование 3'-концевой рибозы малых РНК, придающее им стабильность. Такое обсуждение было бы полезно для обоснования применения в работе метилированных синтетических малых РНК. Несколько удивляет, что нигде в тексте работы такое обоснование не дается, а более высокая эффективность метилированных малых РНК в сравнении с неметилированными, задокументированная в работе, не находит очевидного объяснения, связанного с их более высокой стабильностью.

2. В работе применяются синтетические малые РНК и их дуплексы. К сожалению, не дается объяснений того, почему малые РНК именно с такими последовательностями были выбраны для экспериментов. Можно предполагать, что за таким выбором стояли некие рациональные соображения, которые следовало бы включить в текст диссертации. Этот вопрос является достаточно принципиальным, поскольку разработка принципов дизайна малых РНК, которые могут применяться для решения практических задач, представляет существенный интерес, и критическое осмысление относительной эффективности различных малых РНК в зависимости от особенностей их структуры и положения их мишеней могло бы способствовать дальнейшему развитию наших знаний в этой области. Такого рода анализ, безусловно, украсил бы диссертационную работу.

3. Эксперимент по идентификации слитных (read-through) транскриптов описан с недостаточной степенью детальности. Не указано, какие праймеры использовались для обратной транскрипции и ПЦР, неясно на какой день после обработки проводился анализ и какая линия трансгенных растений использовалась. Отсутствие такой информации явно мешает связать данные этого эксперимента с результатами индивидуального анализа транскриптов GFP и NPTII, представленными на Рис. 8.

4. При изложении экспериментов по анализу метилирования геномной ДНК под воздействием обработки дцРНК имело бы смысл сказать, что речь идет о детекции остатков 5-метил-цитозина, а не «цитозинового метилирования» вообще.

5. На стр. 91 на основании весьма сходных данных, полученных для дцРНК CHS и NPTII, автор делает заключение о том, что первая подвергается расщеплению, давая соответствующие малые РНК, а вторая - деградирует, что представляется несколько надуманным. Очевидно, что обе дцРНК расщепляются до малых РНК, которые автору удалось детектировать экспериментально (Рис. 29), но только CHS-специфические молекулы имеют мишень в клетке растения.

6. Работа не лишена досадных технических оплошностей. Например, на Рис. 9 размер маркерных фрагментов ДНК в агарозном геле указан в кДа вместо нуклеотидных пар. Также возникла путаница со схемами генноинженерных конструкций, использованных для трансформации растений (Рис. 5 и Рис. 6), в которых ген GFP находится под контролем 35S-промотора и 35S-терминатора транскрипции, а ген NPTII - под контролем соответствующих регуляторных элементов гена октопинсинтазы, что не вполне корректно отражено на указанных иллюстрациях.

7. Наконец, я позволю себе не согласиться со стилем изложения выводов. С моей точки зрения, выводы диссертационной работы должны являться результатом сущностного осмысления проведенных экспериментов, описывая общие явления и закономерности, которые удалось обнаружить или лучше понять в результате выполнения работы, а не представлять собой тезисное перечисление полученных результатов.

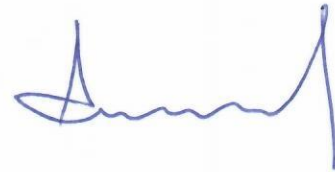
Сделанные в отзыве замечания носят уточняющий, редакционный или стилистический характер и не влияют на актуальность, новизну, практическую значимость и фундаментальный характер полученных выводов диссертационной работы.

Заключение

Диссертационное исследование Супруна А.Р. «Регуляция экспрессии генов *Arabidopsis thaliana* L. с помощью экзогенного применения *in vitro* синтезированных РНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – биотехнология и 1.5.4 – биохимия (биологические науки) является законченной научно-квалификационной работой, в которой получены данные о влиянии экзогенных синтетических дцРНК и киРНК на экспрессию трансгенов, а также важных генов, участвующих во вторичном метаболизме растений. По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертация отвечает требованиям п. 9-11, 13, 14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением

Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018 с изм. от 26.05.2020), а её автор Супрун Андрей Романович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – биотехнология и 1.5.4 – биохимия (биологические науки).

Доктор биологических наук (03.02.02 – вирусология),
профессор,
заведующий отделом биохимии вирусов растений
НИИ Физико-химической биологии
имени А.Н.Белозерского ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет имени М.В.Ломоносова



Соловьев Андрей Геннадьевич

21 ноября 2022 г.

Адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru

Тел.: +7 (495) 939-31-98



ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ.КАНЦЕЛЯРИЕЙ
И.И. СИДОРОВА




Сведения об официальном оппоненте

по диссертационной работе Супруна Андрея Романовича «Регуляция экспрессии генов *Arabidopsis thaliana* L. с помощью экзогенного применения *in vitro* синтезированных РНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6. Биотехнология и 1.5.4 – Биохимия (биологические науки)

1. Соловьев Андрей Геннадьевич
2. Почтовый адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40
3. Телефон: +7 (495) 939-31-98
4. e-mail: solovyev@belozersky.msu.ru
5. Место основной работы: заведующий отделом биохимии вирусов растений НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».
6. Ученая степень: доктор биологических наук по специальности 03.02.02 – Вирусология (биологические науки).
7. Ученое звание: профессор
8. Список основных публикаций по теме рассматриваемой диссертационной работы в рецензируемых научных журналах за последние 5 лет:
 1. Lezzhov A.A., Atabekova A. K., Tolstyko E.A., Lazareva E.A., Solovyev A.G. RNA phloem transport mediated by pre-miRNA and viral tRNA-like structures // *Plant Science*. 2019. V. 284. P. 99–107.
 2. Морозов С.Ю., Соловьев А.Г., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. Двуспиральные РНК как средство защиты растений от патогенных организмов и вирусов культивируемых растений // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. №. 4. P. 13–21.
 3. Morozov S.Y., Solovyev A.G. Emergence of intronless evolutionary forms of stress response genes: possible relation to terrestrial adaptation of green plants // *Frontiers in plant science*. 2019. V. 10. P.83.
 4. Tolstyko E.A., Lezzhov A.A., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Phloem transport of structured RNAs: A widening repertoire of trafficking signals and protein factors // *Plant Science*. 2020. V. 299.
 5. Tolstyko E.A., Lezzhov A.A., Pankratenko A.V., Serebryakova M.V., Solovyev A.G., Morozov S.Y. Detection and *in vitro* studies of *Cucurbita maxima* phloem serpin-1 RNA-binding properties // *Biochimie*. 2020. V. 170. P. 118–127.
 6. Lazareva E.A., Lezzhov A.A., Chergintsev D.A., Golyshev S.A., Dolja V.V., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A.G. Reticulon-like properties of a plant virus-encoded movement protein // *New Phytologist*. 2021. V. 229 P. 1052–1066
 7. Толстыко Е.А., Чергинцев Д.А., Толичева О.А., Виноградова Д.С., Коневега А.Л., Морозов С.Ю., Соловьев А.Г. Связывание РНК *in vitro* серпинами растений // *Биохимия* Т. 86, № 10, с. 1550-1562
 8. Lezzhov A.A., Morozov S.Y., Solovyev A.G. Phloem exit as a possible control point in selective systemic transport of RNA // *Frontiers in plant science*. 2021. V. 12. P. 2685.
 9. Lazareva E.A., Atabekova A.K., Lezzhov A.A., Morozov S.Y., Heinlein M., Solovyev A. G. Virus Genome-Based Reporter for Analyzing Viral Movement Proteins and Plasmodesmata Permeability // *Methods in molecular biology*. 2022. V. 2457. P. 333–349.
 10. Solovyev A.G., Atabekova A.K., Lezzhov A.A., Solovieva A.D., Chergintsev D.A., Morozov S. Y. Distinct Mechanisms of Endomembrane Reorganization Determine Dissimilar Transport Pathways in Plant RNA Viruses // *Plants*. 2022 V. 11, 2404