

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Горбенко Игоря Владимировича “Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPO_Tm_p *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 - физиология и биохимия растений.

4 декабря 2024 г.

Актуальность Транскрипция генов митогенома и генома пластид у двудольных растений осуществляется с помощью трех кодируемых ядерным геномом и импортируемых из цитозоля РНК-полимераз фагового типа: RPO_Tm, RPO_Tp и RPO_Tm_p. При этом RPO_Tm и RPO_T транскрибируют только митохондриальные либо пластидные гены, тогда как RPO_Tm_p имеет особенный транзитный пептид, позволяющий двунаправленный импорт фермента как в митохондрии, так и в хлоропласты. Таким образом, эта РНК-полимераза участвует в транскрипции генов обеих органелл. Роль RPO_Tm_p в митохондриальной транскрипции была подтверждена ранее рядом работ, в которых показано, что нокаут RPO_Tm_p приводит к снижению уровней транскриптов генов субъединиц митохондриальных дыхательных комплексов I и IV и характерному фенотипу замедленного роста и развития. Однако, четкого разделения митохондриальных генов на RPO_Tm-зависимые и RPO_Tm_p-зависимые установлено не было. Функция RPO_Tm_p в пластидах двудольных растений до последнего времени остается предметом дискуссии. Гены пластидного генома низших растений, включая водоросли, за исключением *Physcomitrella*, транскрибируются с участием мультисубъединичного фермента эубактериального типа – РЕР-полимеразы. Остается неясным значение использования РНК-полимераз фагового типа, дополнительно к РЕР-полимеразе, для транскрипции генов пластидного генома покрытосеменных растений. Гены пластид и митохондрий могут находиться под управлением нескольких различных промоторов. Это предполагает конкурирующую или совместную транскрипцию генов различными типами ферментов. Поскольку локализация и активность RPO_Tm_p связана с двумя важнейшими энерготрансформирующими растительными органеллами, существенно различающимися по своей структуре и функциям, выяснение роли RPO_Tm_p в осуществлении ядерного контроля транскрипции генов этих органелл представляет собой значительный научный и прикладной интерес. В связи с этим актуальность темы диссертационной работы И.В. Горбенко, посвященной изучению роли RPO_Tm_p в регуляции экспрессии белков митохондрий и пластид с использованием трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих РНК-полимеразу с адресацией в один из типов органелл, мутантной линии *grotm_p*, а также трансгенных линий с комплементацией функций RPO_Tm_p в митохондриях или пластидах, не вызывает сомнений.

Научная новизна представленной И.В. Горбенко к защите диссертации определяется, в частности, тем, что в ней впервые исследован полный транскриптом растений с гиперэкспрессией RPO_Tm_p в митохондриях и хлоропластах. Охарактеризовано влияние повышенного содержания РНК-полимеразы RPO_Tm_p в митохондриях и хлоропластах растений арабидопсиса с гиперэкспрессией РНК-полимеразы RPO_Tm_p на транскриптом, а также на рост и развитие растений. Диссертантом детально исследована роль RPO_Tm_p в регуляции раннего развития растений арабидопсиса при действии факторов, оказывающих влияние на прорастание семян (абсцизовая кислота, солевой стресс). Полученные результаты указывают на важную роль как самой РНК-полимеразы двойной адресации, так

и образующихся с ее участием продуктов транскрипции в ретроградном/антероградном сигналинге. Впервые проанализирована ко-экспрессия генов, вызываемая гиперэкспрессией или отсутствием функциональной RPO_Tmp у Арабидопсиса, что дает представление о процессах и регуляторных путях, в которых потенциально участвует данный фермент. Для анализа сетей белок-белковых взаимодействий автором впервые применено одновременно несколько метрик центральности. С помощью методов анализа сетей проанализированы связи между скоррелированной экспрессией, белок-белковыми взаимодействиями и мишенями транскрипционных факторов. Установлено, что мутантное растение *grotmp* содержит функциональный комплекс I в форме суперкомплекса I+III₂. Получены генетические конструкции и показана дифференциальная экспрессия с них чужеродного гена в системе импорта ДНК в митохондрии *in organello*.

Работа И.В. Горбенко имеет также несомненную практическую ценность, поскольку установленная в ней роль RPO_Tmp, а также связь данного фермента с различными клеточными процессами, позволяют предложить ген RPO_T2 в качестве репортерного гена для решения на данный момент пока недостигнутой задачи: трансформации растительных митохондрий *in vivo* с использованием природной компетентности митохондрий к активному поглощению (импорту) ДНК.

Характеристика диссертации Работа представляет собой законченное исследование, отвечающее по оформлению требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Она изложена на 154 страницах и состоит из списка сокращений (3 стр.), введения, трех глав, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 444 наименования (все на иностранных языках) и приложений. Список цитированной литературы включает источники, имеющие прямое отношение к теме диссертации. Работа иллюстрирована 46 рисунками и 6 таблицами.

Публикации и апробации Материалы автореферата и 5 публикаций по теме диссертации достаточно полно отражают содержание диссертационной работы. Работа И.В. Горбенко успешно прошла апробацию на 4-х международных конференциях (PlantGen2019, BGRS-SB2020, PlantGen2021, Chromosoma2023) и на отчетной сессии Института (2023).

Введение

Во введении автор обосновывает в кратком виде актуальность исследования физиологической роли RPO_Tmp в регуляции экспрессии белков митохондриальной и пластидной адресации у растений и предварительно формулирует цель работы. Обосновывается положение о том, что результаты диссертационного исследования могут послужить основой для создания модельной системы трансформации митохондрий растений *in vivo*. В этом же разделе приведены сведения об апробации полученных результатов.

Обзор литературы

«Обзор литературы», включает 9 разделов и имеет объем 45 стр. Он содержит подробное описание современных представлений о биохимической организации пластид и митохондрий высших растений, включая генетический аппарат этих полуавтономных органелл.

В первом разделе приведено описание структуры и функций ДНК-содержащих органелл растительной клетки – пластид и митохондрий. Во втором разделе охарактеризованы особенности транскрипционного аппарата органелл, состоящего как из РНК-полимераз фагового типа ядерного кодирования (митохондрии и пластиды), так и из РНК-полимеразы эубактериального типа органелльного кодирования (пластиды). В третьем разделе приводятся особенности транскрипции генов в митохондриях растений,

подробно рассматриваются промоторы митохондриальных генов. Четвертый раздел посвящен особенностям транскрипции генов пластид и содержит информацию о пластидных промоторах и известных факторах транскрипции пластид. В пятом разделе приведены известные данные о роли органелльных РНК-полимераз ядерного кодирования в раннем развитии растений. В шестом разделе дается описание особенностей взаимодействия трех геномов растительной клетки - ядерного, пластидного и митохондриального, механизмы антероградной и ретроградной регуляции экспрессии генов. В седьмом разделе даются подробные сведения о структуре и функциях комплексов дыхательной цепи митохондрий растений, их супрамолекулярной организации в суперкомплексы и существующих моделях этой организации. В восьмом разделе описан метод, которым были получены трансгенные растения, использованные в работе. И, наконец, в девятом разделе «Заключение обзора литературы» путем обобщения имеющихся в научной литературе сведений делается вывод об актуальности исследования РНК-полимеразы двойной адресации RPOTmp в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий у растений *Arabidopsis thaliana*, формулируются цель и задачи исследования, а также приводятся выносимые на защиту положения.

Материалы и методы

Приводится описание методов клеточной, молекулярной биологии и биоинформатики, которые были использованы автором в ходе исследования. Глава включает 12 разделов. В последнем разделе описана статистическая обработка данных.

Результаты и обсуждение

Эта глава включает пять разделов.

Первый из них включает 11 подразделов и посвящен биоинформатическому анализу транскриптомных данных, полученных методом ДНК-микрочипирования. Раздел включает в себя общую характеристику транскриптомных данных, анализы обогащения Генной Онтологии и метаболических путей KEGG, детально рассмотрены экспрессия отдельных групп генов – транскрипционных факторов, белков митохондрий и пластид, PPR-белков. Девятый подраздел содержит результаты анализа ко-экспрессии генов с описаниями пяти выделенных модулей ко-экспрессии, полученных сетей белок-белковых взаимодействий и предполагаемого контроля модулей транскрипционными факторами. Десятый подраздел посвящен анализу скоррелированной экспрессии генов с помощью минимального остовного дерева и методов анализа сетей. Одиннадцатый подраздел содержит комбинированные сети, синтезированные автором на основании практически всей полученной из транскриптомных данных информации.

Второй раздел содержит данные экспериментов по изучению всхожести семян трансгенных растений на средах, содержащих фитогормон – абсцизовую кислоту, или NaCl.

Третий раздел посвящен данным о супрамолекулярной организации дыхательной цепи митохондрий исследуемых линий трансгенных растений, полученные с помощью глобального нативного электрофореза, двумерного электрофореза и вестерн-блоттинга и их обсуждению.

Четвертый раздел приводит данные о супрамолекулярной организации ЭТЦ пластид исследуемых линий.

Пятый раздел посвящен сборке генетических конструкций, содержащих ген зеленого флуоресцентного белка из медузы *Aequoria victoria* под управлением промоторов генов *Rrn26* и *Cox1* митохондриального генома *Arabidopsis thaliana*.

Заключение

содержит две результирующие схемы, описывающие клеточные события, которые происходят при гиперэкспрессии RPO_{Tmr} или недостатке данной РНК-полимеразы, суммируются результаты проведенного исследования.

Выводы

в целом отражают содержание проделанного И.В. Горбенко исследования.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов Достоверность полученных результатов основывается на применении адекватных поставленным задачам современных статистических, биоинформационных и молекулярно-генетических методов. Исследование проведено на достаточном количестве материала, результаты хорошо проиллюстрированы, осмыслены и подробно обсуждены. Выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных и соответствуют поставленным задачам.

В целом хотелось бы отметить высокое качество представленных экспериментальных материалов, иллюстрирующих эксперименты, выполненные на хорошем современном уровне.

Вопросы и замечания

Перечисленные ниже замечания носят скорее характер обсуждения и ни в коей мере не умаляют моей высокой оценки рецензируемой работы.

1. Не совсем понятно, почему в основном экспериментальная процедура "Получение данных методом ДНК-микрочипирования" описывается в разделе о биоинформационных методах. Описание неполно с точки зрения воспроизводимости и корректности изложения: помимо перечисления наборов, стоило хотя бы сообщить, что следовали протоколу производителя. Приведенные там же скрипты не удалось проверить, поскольку они предназначены для использования файлов на компьютере автора. Однако видимых ошибок они не содержат (с точностью до моего знакомства с R).
2. В разделе "Материалы и методы" стоит привести принятое автором определение "центральности как минимум поскольку различные метрики предполагают разные свойства графа (разные требования к множеству окружающих вершин). Также требуется обсуждение различий между этими метриками, иначе не понятно, зачем их все использовали
3. Следует отметить несколько небрежное отношение автора к общим правилам для биологических текстов: во-первых, латинские названия рода и вида пишутся курсивом (реже и устарело - подчеркнуты), при повторном упоминании там, где это не приводит к путанице - род обозначают первой буквой, например *A. thaliana*
4. Сильно затрудняет восприятие текста диссертации злоупотребление сокращениями. При работе с текстом необходимо либо держать все их в уме, либо обращаться к таблице, что не удобно.

Заключение

Диссертация Игоря Владимировича Горбенко “Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOThp *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий” представляет собой завершенное научно-квалификационное исследование, в котором решена важная научная задача по выяснению физиологической роли RPOThp в экспрессии ключевых белков окислительного фосфорилирования и фотосинтеза. Полученные И.В. Горбенко научные результаты могут послужить в дальнейшем основой для создания модельной системы трансформации митохондрий растений *in vivo*.

Таким образом, диссертационная работа “Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOThp *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий” по своей актуальности, методическому уровню, научной новизне, практическому значению является законченной и соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09. 2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Горбенко Игорь Владимирович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 - физиология и биохимия растений.

д.б.н., заведующий лабораторией геносистематики
Лимнологического института СО РАН,
664033 Иркутск, ул. Улан-Баторская 3,
тел. (3952) 42-29-23,
Электронная почта: sherb@lin.irk.ru



Д.Ю.Щербаков

Подпись заведующего лабораторией, д.б.н. Щербакова Д.Ю. ЗАВЕРЯЮ.
Ученый секретарь ЛИН СО РАН к.б.н. Максимова Н.В.

