ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Клименко Екатерины Сергеевны «Изучение особенностей механизма импорта фрагментов ДНК разной длины в митохондрии *Solanum tuberosum*» представленную к защите на соискании ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений

Из-за того, что большая часть составных частей митохондрий кодируется не в митохондриальном, а в ядерном геноме, функционирование митохондрий зависит от импорта в эти органеллы белков и нуклеиновых кислот. К сожалению, приходится констатировать, что к настоящему времени детальных сведений о биологической роли и биохимическом механизме импорта нуклеиновых кислот в митохондрии эукариот пока нет. Совершенно очевидно, что эти знания были бы очень полезными и могли бы представлять не только фундаментальный интерес, но и значительную научную ценность для разработки стратегий целенаправленной доставки генетического материала в эти органеллы. В связи с этим **актуальность темы** диссертационной работы Клименко Е.С., направленной на исследование особенностей мембранных механизмов импорта фрагментов ДНК разной длины в митохондрии высших растений, не вызывает сомнений. Исследования автора проводились с использованием митохондрий картофеля *Solanum tuberosum*, как одного из легко доступных объектов, полностью отражающего универсальные процессы, происходящие в митохондриях в животном и растительном царстве. Несмотря на очевидную фундаментальную и прикладную значимость, в настоящее время, многие вопросы, связанные с феноменом природной компетентности митохондрий к поглощению ДНК, остаются слабо изученными. В этой связи нельзя исключать, что обнаруженный ранее механизм активного импорта ДНК изолированными митохондриями (Константинов и др, 1989; Koulintchenko et al., 2003) может в условиях *in vivo* объяснять описанный во многих работах феномен горизонтального переноса генов (ГПГ) в растительные

митохондрии (Cho et al., 1998; Bergthorsson et al., 2003, 2004; Kleine et al., 2009; Renner, Bellot, 2012; Mower et al., 2012). Вероятно, существующая связь между транспортом ДНК в митохондрии и процессами внутриклеточного горизонтального переноса генов у растений служит дополнительным свидетельством в пользу актуальности изучения мембранных механизмов импорта нуклеиновых кислот в эти органеллы.

Научная новизна представленной Е.С. Клименко к защите диссертации определяется тем, что в ней получен ряд важных научных результатов, расширяющих современные представления о переносе молекул ДНК разных размерных классов через наружную и внутреннюю мембраны растительных митохондрий. В частности, автором установлено, что трансмембранный перенос ДНК разного размера осуществляется с участием разных транспортных механизмов. Помимо уже известных белковых факторов импорта (вольт-зависимый анионный канал и транслокатор адениновых нуклеотидов, АНТ) предположено участие другой изоформы АНТ, а именно ADNT1 в импорте в митохондрии молекул ДНК малой (≤ 100 п.н.) и средней (≤ 1540 п.н.) длины. Автором впервые установлено, что присутствие эндоплазматического ретикулума (микросомы) оказывает стимулирующее действие на транспорт ДНК в митохондрии. Этот факт можно расценивать как указание участия микросом в транспорте нуклеиновых кислот в митохондрии. Результаты диссертационной работы могут быть использованы для разработки эффективных стратегий и подходов адресной доставки ДНК в митохондрии растений *in vivo*. Кроме этого, материалы работы могут быть рекомендованы при обучении специалистов биологического и медицинского профиля в соответствующих высших учебных заведениях в спецкурсах по внутриклеточной сигнализации, имеющей отношение к молекулярно-биологическим связям митохондрий с другими компартментами клетки.

Характеристика диссертации. Представленная работа изложена на 135 страницах, состоит из традиционных разделов (введения, «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и обсуждения»,

заключения, выводов и списка литературы). Список литературы содержит 178 источников, в том числе 172 на английском языке. Диссертация содержит 27 рисунков и 5 таблиц.

В разделе «Введение» автор обосновывает выбор темы и актуальность диссертационной работы, а также научную и практическую значимость проводимых исследований. Целью диссертационной работы было изучение мембранных механизмов транспорта ДНК различной длины в митохондрии картофеля (*Solanum tuberosum*). Основные результаты исследований прошли апробацию и были представлены на отечественных и международных конференциях. Результаты диссертации изложены в 15 работах, в том числе 5 статей в научных изданиях, рекомендованных ВАК.

Раздел «Обзор литературы» посвящен анализу литературных данных и изложению современных представлений о структуре митохондриального генома растений. С развитием методов молекулярной биологии и определением нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов был сделан значительный прорыв в исследованиях закономерностей структурной организации, функционирования и эволюции организмов. В данном разделе автором сделана попытка изложить современное состояние в данной области исследований и выявить нерешенные вопросы, все еще стоящие перед научным сообществом. К числу таких наиболее важных вопросов можно, вероятно, отнести поиск способов и стратегий трансформации митохондриального генома, выяснение возможного биологического значения и генетических и негенетических последствий транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии растений. Несмотря на фундаментальную и прикладную значимость изучения транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии, количество работ с использованием растительных модельных объектов остается пока весьма ограниченным.

В конце этого раздела диссертационной работы автором сделаны некоторые заключения, обобщающие литературные данные, и приводится краткое обоснование актуальности исследований по этой проблеме.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны условия и использованные методики проведения экспериментов, приведен перечень использованных в работе реактивов. Для достижения поставленной цели автором были использованы современные методы биохимии и молекулярной биологии. Выбор использованных методов вполне обоснован и соответствует поставленным задачам.

Результаты исследований и их обсуждение представлены в отдельной главе. Вся совокупность экспериментальных данных, представленных в этой главе, получена автором с использованием вполне современных методов биохимии, клеточной и молекулярной биологии. В работе был использован новый подход для определения эффективности транспорта ДНК в изолированные митохондрии картофеля, основанный на использовании ПЦР в режиме реального времени. Полученные с использованием ингибиторного анализа переноса ДНК в митохондрии экспериментальные данные позволили автору сделать вывод о том, что ДНК разных размерных классов (малой, средней и большой длины) импортируется в митохондрии частично перекрывающимися, но не совпадающими полностью путями. Импорт в митохондрии ДНК малой длины (≤ 300 п.н.) и большой длины (≥ 3500 п.н.) может эффективно осуществляться, по-видимому, с участием ряда альтернативных белковых переносчиков и/или мембранных каналов. Согласно полученных в работе данным, транспорт средних фрагментов ДНК (500-3000 п.н.) осуществляется преимущественно с участием таких «классических» митохондриальных переносчиков наружной (VDAC) и внутренней (АНТ) мембран митохондрий. В разделе «Заключение» автором приводится таблица, обобщающая полученные результаты с использованием известных ингибиторов основных митохондриальных переносчиков (рутений красный, атрактилозид, карбоксиатрактилозид и др.).

Как следует из полученных в работе результатов, Е.С. Клименко удалось полностью решить поставленные задачи по выяснению особенностей импорта ДНК разной длины в митохондрии *Solanum tuberosum*.

Материалы автореферата и 5 опубликованных в журналах из Перечня ВАК РФ работ соответствуют содержанию диссертации и достаточно полно отражают полученные автором результаты. Работа Е.С. Клименко прошла успешную апробацию на всероссийских и международных конференциях и симпозиумах.

Выводы диссертации в целом полностью отражают ее содержание. Степень обоснованности выводов и основных положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений.

Замечания к диссертационной работе:

Несомненное, очень положительное впечатление от работы, сопровождается некоторыми проблемными моментами, которые хотелось бы увидеть в качестве дискуссии. Мне понятны посылы работы, которой предшествовала большая история с чередой своих доказательств однако все же следовало рассмотреть возможности исключения вторичных эффектов, например таких как неспецифическое связывание нуклеиновых кислот с белковыми компонентами митохондрий (как я понимаю, полианион, которым является нуклеиновая кислота, имеет полное право связаться в катионными белками, которых в митохондрии множество, а ряд использованных ингибиторов также имеет право менять поверхностный потенциал мембран митохондрий, тем самым меняя характер связывания). Вероятно, такой сценарий не реализуется, и у авторов имеется аргумент – трипсин не тормозит транспорт, но широкое обсуждение этого имеет смысл.

Мне кажется, что имело смысл и обсудить проблему влияния энергизации митохондрий на предполагаемый транспорт нуклеиновых кислот в митохондрии, хотя несколько параграфов касаются этой проблемы. Но все дело в том, что энергизация рассматривается в основном как некий обобщенный пул, который разряжается при действии разобщителей. Однако было бы желательным обсудить проблему того, что само направление энергизации в принципе не очень способствует транспорту нуклеиновой кислоты внутрь митохондрии, так как митохондриальный матрикс заряжен

отрицательно и по термодинамическим принципам поставка снаружи полианиона требует либо существенной энергии (что правда), либо осуществляется не по электрогенному принципу, то есть нуклеиновая кислота идет в нейтральной форме, например, в комплексе с катионами. Я думаю, что даже опыты по предотвращению эффектов рутениевым красным, могли бы частично объяснить такую симпортную систему, ибо известно, что этот краситель прежде всего рассматривается как ингибитор электрогенного транспорта ионов кальция в митохондриях. Да и если приглядеться, то можно в некоторых примерах увидеть насыщающий характер транспорта, который можно было бы объяснить тем, что после прохождения одной отрицательно заряженной молекулы в отрицательно заряженный отсек, для прохождения второй такой же молекулы потребуется больше энергии, и т.д.

Как пожелание выглядит и какая-то аргументация наличия ADNT1 в митохондриях картофеля, ибо доказанным было его присутствие в другом растении, и такое доказательство наличия в картофеле усилило бы объяснение торможения транспорта пиридоксаль фосфатом.

Но я опять же повторяю, что все эти вопросы - дискуссионного характера, и они нисколько не умаляют общего, очень хорошего впечатления о замечательно проделанной работе, которые говорят о научного зрелости как самой работы, так и ее автора.

В целом, отмеченные выше дискуссионные моменты и замечания не снижают несомненной научной ценности проделанного Е.С. Клименко исследования, которое по своей теме полностью соответствует специальности "физиология и биохимия растений". С основными положениями, выносимыми на защиту, оппонент согласен.

Заключение

Диссертация Е.С. Клименко, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной научно-исследовательской работой, в которой автором получен ряд оригинальных

фактов и выводов по проблеме транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии растений. По актуальности проблемы, методическому уровню решения, объему проделанной работы, теоретической и практической ценности полученных результатов она соответствует требованиям пп. 9 – 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобразования и науки РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Клименко Екатерина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Отзыв на диссертационную работу Клименко Екатерины Сергеевны рассмотрен и одобрен на семинаре лаборатории структуры и функции митохондрий НИИФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ. Протокол № 1 от 20 марта 2017 г.

Заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. Ломоносова»,
доктор биологических наук, профессор,
действительный член Европейской академии
д.б.н. по специальности 03.01.04 - Биохимия

/Зоров Дмитрий Борисович/

22 марта 2017 г.

Почтовый адрес: Москва 119992, Воробьевы горы,
НИИФХБ им. А.Н.Белозерского
Телефон 7-495-939-5944, факс 7-495-939-3188
адрес электронной почты zorov@genebee.msu.su

ПОДПИСЬ
Зав.канцел.