

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ

«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ
и ГЕНЕТИКИ

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
http://www.bionet.nsc.ru
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

03.04. 2017 № 15345-01-2171

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Института
Академик РАН

«3» апреля 2017 года

Н.А.Колчанов

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Екатерины Сергеевны Клименко посвящена изучению механизма импорта ДНК в митохондрии растений на примере *Solanum tuberosum* L. Феномен активного поглощения ДНК митохондриями, обнаруженный ранее соавторами диссертанта, представляет собой как один из процессов, обеспечивающих горизонтальный перенос генов в митохондриальный геном растений. Выявление молекулярных механизмов и идентификация белков, принимающих участие в переносе фрагментов ДНК в митохондриальный геном растений, представляет огромный интерес для разработки стратегий и подходов направленной доставки чужеродных генов в составе генетических конструкций в митохондрии растений или животных в условиях *in vivo*. Однако к настоящему моменту времени многие вопросы, связанные с феноменом природной компетентности митохондрий к поглощению ДНК, все еще остаются недостаточно изученными.

Одним из мало исследованных вопросов остается взаимосвязь эффективности переноса фрагментов ДНК в митохондриальный геном с размерами переносимых фрагментов. На основании имеющихся в литературе данных относительно широкой вариабельности размеров вставок чужеродного происхождения в митохондриальном геноме высших растений, выявления в митохондриях целого ряда видов высших растений специфического для каждого вида набора кольцевых и линейных митохондриальных

плазмид разной длины, а также образования фрагментов ДНК различного размера при программируемой гибели клеток, становится очевидным, что эффективность переноса фрагментов ДНК в митохондриальные геномы взаимосвязана с размерами переносимых фрагментов. Экспериментальное подтверждение взаимосвязи размеров фрагментов ДНК с эффективностью их переноса в геном митохондрий послужит в дальнейшем научно-методической основой для разработки экспериментальных подходов и методов переноса целевых генов в митохондрии на уровне целого организма. Эти подходы могут быть успешно использованы в дальнейшем в биотехнологии и генетической инженерии растений. В связи с вышеизложенным, актуальность исследования особенностей трансмембранного переноса молекул ДНК разной длины в митохондрии растений **не вызывает сомнения** и представляет интерес как с теоретической, так и практической точек зрения.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 135 страницах и содержит 27 рисунков и 5 таблиц. Список литературы содержит 196 источников, большая часть из которых (189) представлены на английском языке.

Во Введении диссертантом обоснованы актуальность темы, научная новизна и практическая значимость, сформулирована цель исследования и поставлены задачи для ее достижения. На основании представленных в этом разделе материалов, цель диссертационной работы, направленная на изучение мембранных механизмов транспорта ДНК различной длины в митохондрии картофеля (*Solanum tuberosum* L.), вполне обоснована и достижима.

Первая глава диссертационной работы посвящена обзору литературы и включает современные данные о строении и функциях митохондриального генома растений. Диссертантом представлены данные по наличию в составе митохондриальных геномов значительных в процентном отношении количеств ДНК с некодирующими функциями, а также видоспецифических наборов кольцевых и линейных плазмидоподобных ДНК, функции и происхождение которых остаются малоизученными. Следует подчеркнуть, что для митохондрий растений выявлена существенно более высокая частота горизонтального переноса генов в сравнении с частотами переноса ДНК в хлоропласты или ядро. Диссертантом детально проанализированы особенности и различия в механизмах импорта ДНК в изолированные митохондрии не только растений, но и других видов млекопитающих и дрожжей. Приведен детальный анализ других экспериментальных подходов, которые были использованы исследователями для доставки нуклеиновых кислот в митохондриальные геномы.

В целом, обзор литературы касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе диссертантом детально изложены методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал современных методов, применяемых в мировой практике молекулярного клонирования, анализа экспрессии генов, культуры

клеток растений, биохимических исследований. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: автором была предпринята серия экспериментов, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Полученные в диссертационной работе экспериментальные данные расширяют имеющиеся представления о механизмах транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии растений и позволяют автору сделать вывод, что ДНК разных размерных классов (малой, средней и большой длины) импортируется в митохондрии частично перекрывающимися. Однако пути переноса фрагментов ДНК различной длины в митохондриальные геномы полностью не совпадают.

С использованием ингибиторного анализа и подхода конкурентного ингибирования Е.С.Клименко установлено, что импорт в митохондрии ДНК фрагментов ДНК малой длины (≤ 300 п.н.) и большой длины (≥ 3500 п.н.) может эффективно осуществляться с участием ряда альтернативных белковых переносчиков и/или мембранных каналов. Согласно полученным результатам, транспорт средних фрагментов ДНК (500-3000 п.н.) осуществляется преимущественно с участием порина и АНТ.

Как следует из полученных результатов, автором впервые была предпринята попытка реконструкции внутриклеточных взаимодействий митохондрий и эндоплазматического ретикулума с целью изучения влияния мембранных структур эндоплазматического ретикулума на митохондриальный импорт ДНК. Для этого импорт ДНК в системе *in organello* проводили в присутствии общей микросомальной фракции (мембраны эндоплазматического ретикулума). Диссертант предположил, что в условиях *in vivo* в зонах мембранного контакта постоянно происходят функциональные взаимодействия этих органелл. Диссертационная работа Е.С. Клименко, в целом, написана хорошим профессиональным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки.

В разделе «**Заключение**» автором кратко суммируются полученные результаты. Положительной стороной рецензируемой диссертационной работы является сведение полученных результатов в таблицу с целью иллюстрации наиболее важных научных результатов работы этого раздела. Данные, приведенные в таблице, обобщают результаты изучения участия отдельных факторов импорта в переносе разной длины ДНК-субстратов через наружную и внутреннюю мембраны митохондрий с использованием высокоспецифических ингибиторов соответствующих мембранных переносчиков.

Степень новизны, научная и практическая значимость результатов исследования

В диссертационной работе с использованием количественной ПЦР проведено комплексное исследование механизмов импорта молекул ДНК разной длины в изолированные митохондрии картофеля. Диссертантом разработан метод, позволяющий анализировать активность импорта ДНК в изолированные митохондрии и добиться максимальной чувствительности и достоверности количественной детекции в широком диапазоне концентраций.

В работе впервые показано, что процесс связывания и транслокации ДНК через митохондриальные мембраны растений различается в зависимости от длины

импортируемого фрагмента ДНК. ДНК разных размерных классов: малой (100 – 500 п.н.), средней (700 – 3000 п.н.) и большой длины (≥ 3500 п.н.) переносится в митохондрии частично перекрывающимися, но полностью не совпадающими путями, с участием как известных (VDAC, АНТ), так и пока не идентифицированных белковых факторов импорта. Впервые выявлено участие переносчика адениннуклеотидов ADNT1 в импорте в митохондрии молекул ДНК малой (≤ 100 п.н.) и средней (≤ 1540 п.н.) длины.

В целом, полученные в работе новые сведения, характеризующие мембранные механизмы импорта ДНК разной длины в митохондрии, представляют не только теоретический интерес, но и могут иметь важное прикладное значение, поскольку могут служить теоретической основой при создании клеточных технологий и подходов направленной доставки ДНК в эти органеллы в условиях *in vivo*. Предложенный метод можно использовать как для клонирования целевых генов в этих органеллах, так и создания новых типов ЦМС. Одним из очевидных преимуществ создания трансмитохондриомных растений является возможность жесткого контроля их распространения во внешней среде.

С практической точки данная работа интересна тем, что примененный генно-инженерный подход, основанный на использовании последовательностей различной длины в экспрессионных векторах, в дальнейшем может быть полезен для создания высокоэффективных векторов для трансформации растений. Таким образом, диссертантом на достаточном экспериментальном материале показаны целесообразность и необходимость продолжения исследований в этом направлении.

Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований классических и современных молекулярно-генетических и биохимических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Е.С. Клименко, а также выносимых на защиту положений и выводов.

Результаты диссертации рекомендуются для использования в научно-исследовательских учреждениях биологического и образовательного профиля, занимающихся изучением горизонтального переноса генов в митохондриальные геномы, а также при чтении спецкурсов по генетике и биотехнологии растений. Полученные результаты и использованная экспериментальная стратегия могут стать основой для дальнейших биотехнологических исследований по конструированию генетически модифицированных растений для фундаментальных исследований и практических разработок.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации опубликованы в 5 работах в журналах из списка, рекомендованного ВАК. Результаты исследований апробированы на Российских и Международных конференциях. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникает ряд вопросов и замечаний:

1. Определенным упущением автора можно считать отсутствие в разделе «Теоретическая и практическая ценность работы» упоминания о таком важном научном результате, имеющем очевидное теоретическое значение, как

обнаружение стимуляции импорта ДНК в растительные митохондрии в присутствии фракции мембран эндоплазматического ретикулума. Данный факт является оригинальным и служит новым свидетельством в пользу представлений о важности взаимодействий этих органелл в функционировании митохондрий.

2. Нельзя полностью согласиться с утверждением автора на стр. 15 обзора литературы о том, что основной интерес исследователей в 80-х годах прошлого столетия к изучению структурной организации митохондриальных плазмид был связан исключительно с планами создания на их основе векторных конструкций для генетической трансформации митохондрий. На самом деле, в 70-е, 80-е годы прошлого века значительно более важной задачей исследователей в США, Европе и других странах было детальное изучение молекулярно-генетических механизмов цитоплазматической стерильности с целью улучшения существующих типов ЦМС кукурузы и других сельскохозяйственных культур для получения гибридных семян. Поскольку для каждого типа ЦМС кукурузы (Т-, S- и С-тип) характерен специфический набор кольцевых и линейных плазмид, то структура и функции генов этих плазмид интенсивно изучались. Перед исследователями ставилась задача (которая в итоге оказалась не решаемой), попытаться разделить два генетических признака: ЦМС и чувствительность гибридных растений, получаемых на основе наиболее широко используемого в США Т-типа ЦМС, к поражению грибом *Helminthosporium maydis*.
3. На стр. 18 обзора литературы приводится выражение «терминальные белки», что представляет собой буквальный перевод с английского. Под этим подразумеваются белки, связанные с 5'-концами концевых инвертированных повторов линейных митохондриальных плазмид и выполняющих важную роль в их стабилизации и репликации. По нашему мнению, использование такого выражения представляется неудачным.
4. Приведенный на стр. 5 диссертации «Список используемых сокращений» далеко не полон: расшифровка таких часто употребляемых в работе сокращений как НАДН, ГПГ, МРТР, NUMT, ADNT1, ЭТЦ, ПЦР-РВ, RuR, ATR, CATR, PLP, NAN, BA приводится непосредственно в тексте.
5. К сожалению, в тексте диссертации не часто, но встречаются отдельные неудачные в стилистическом и смысловом отношении выражения («перестановки в мтДНК», «с использованием подхода количественной ПЦР», «эффекторы деятельности митохондриального порина» и др.).
6. Можно отметить не совсем удачное оформление части рисунков, проявляющееся в использовании мелких цифр и обозначений, неудачной заливке колонок, что затрудняет нормальное восприятие полученных автором результатов.
7. В отношении полученных автором результатов хотелось бы получить ответ на вопрос, чем можно, хотя бы гипотетически, объяснить факт стимуляции импорта ДНК в митохондрии *S. tuberosum* не только под влиянием микросомальной фракции, но и при добавлении в систему митохондриального импорта бычьего сывороточного альбумина.

Все замечания к работе исчерпываются вышеназванными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути

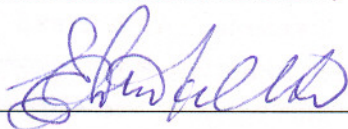
научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Клименко Екатерины Сергеевны на тему «Изучение особенностей механизма импорта фрагментов ДНК разной длины в митохондрии *Solanum tuberosum*» является законченной научно-исследовательской работой, имеющей научно-практическое значение для решения вопросов в области молекулярной генетики растений. По актуальности темы, новизне результатов, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа отвечает всем требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденных постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор, Клименко Екатерина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Отзыв обсужден на заседании межлабораторного семинара по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике» Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии Наук» (Протокол № 2 от «18» марта 2017 г.).

Зав. лабораторией биоинженерии растений
Федерального государственного бюджетного
Научного учреждения «Федеральный исследовательский
Центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
доктор биологических наук по специальности 03.02.07,
профессор



Елена Викторовна Дейнеко

Адрес:
630090, Новосибирск, Россия, просп. академика Лаврентьева, 10, ИЦИГ СО РАН;
+7(383)363-49-80*1233
deineko@bionet.nsc.ru
03 апреля 2017 года.

Подпись доктора биологических наук, Дейнеко Елены Викторовны

«ЗАВЕРЯЮ»

Ученый секретарь:
Федерального государственного бюджетного
Научного учреждения «Федеральный исследовательский
Центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»,
кандидат биологических наук



Орлова Галина Владимировна