

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.047.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
НАУКИ СИБИРСКОГО ИНСТИТУТА ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ  
РАСТЕНИЙ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело №\_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 20 апреля 2017 г. № 5

о присуждении **Клименко Екатерине Сергеевне** (Российская Федерация)  
ученой степени кандидата биологических наук.

**Диссертация** «Изучение особенностей механизма импорта фрагментов  
ДНК разной длины в митохондрии *Solanum tuberosum*» по специальности  
03.01.05 – «физиология и биохимия растений» принята к защите 16 февраля  
2017 г., протокол №2 диссертационным советом Д 003.047.01 на базе  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского  
института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения  
Российской академии наук (664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, д. 132, а/я  
317), приказ о создании №105/нк от 11 апреля 2012 г.

**Соискатель** Клименко Екатерина Сергеевна, 1977 года рождения,  
работает ведущим инженером в Федеральном государственном бюджетном  
учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений  
Сибирского отделения РАН.

**Диссертация выполнена** в лаборатории генетической инженерии  
растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского  
отделения РАН.

В 1999 году соискатель окончил Федеральное государственное  
бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального  
образования Иркутский государственный университет.

**Научный руководитель** – Константинов Юрий Михайлович, доктор  
биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений  
Сибирского отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией  
генетической инженерии растений.

### **Официальные оппоненты:**

1. Зоров Дмитрий Борисович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского», заведующий лабораторией структуры и функции митохондрий

2. Кирильчик Сергей Васильевич, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт СО РАН, старший научный сотрудник лаборатории ихтиологии.

**дали положительные отзывы о диссертации.**

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН в своем **положительном заключении**, подписанным Дейнеко Еленой Викторовной, доктором биологических наук, профессором, зав. лабораторией биоинженерии растений, отмечает, что диссертационная работа «Изучение особенностей механизма импорта фрагментов ДНК разной длины в митохондрии *Solanum tuberosum*» по актуальности темы, новизне полученных результатов, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа отвечает всем требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, 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.).

Соискатель имеет 15 опубликованных работ по теме диссертации, в рецензируемых научных изданиях из перечня ВАК – 5 работ.

**Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:**

1. Клименко Е.С., Милейко В.А, Лактионов П.П., Константинов Ю.М. Характеристика импорта и экспорта ДНК в митохондриях картофеля

- (*Solanum tuberosum*) с использованием метода количественной ПЦР. // Биологические мембранны. 2011. т.28, №3.С. 199-205.
2. Klimenko E.S., Zaporozhchenko I.A., Mileyko V.A., Morozkin E.S., Koulintchenko M.V., Laktionov P.P., Konstantinov Yu.M. Human cultured cells are capable to incorporate isolated plant mitochondria loaded with exogenous DNA. // Biopolymers and Cell. 2012. V. 28. P. 310-313.
3. Koulintchenko M.V., Ibrahim N., Klimenko E.S., Konstantinov Yu.M., Weber-Lotfi F., Dietrich A. Specificity of DNA import into isolated mitochondria from plants and mammals. // Biopolymers and Cell. 2014. V. 30(1). P. 68-70.
4. Клименко Е.С., Кулинченко М.В., Гребнев П.А., Дитриш А., Константинов Ю.М. Изучение импорта ДНК разной длины и структуры в митохондрии растений. // Журнал стресс - физиологии и биохимии. 2014. № 4. С. 77–84.
5. Константинов Ю.М., Дитриш А., Вебер-Лотфи Ф., Ибрагим Н., Клименко Е.С., Тарабенко В.И., Болотова Т.А., Кулинченко М.В. Импорт ДНК в митохондрии. // Биохимия. 2016. т.81, вып.10, с. 1307-1321.

**На диссертацию и автореферат поступили отзывы:**

1. Д.б.н. Е.Ю. Рыковой, ИХБФМ СО РАН (г. Новосибирск); 2. К .б.н., доц. Д. Е. Гаврикова, ИГУ (г. Иркутск); 3. К.б.н. А. Б. Щербань и д.б.н., проф. Е.А. Салиной, ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск); 4. Д.б.н., проф. В. З. Тарантула, ИМГ РАН (г. Москва); 5. Д.б.н. Д. Ю. Щербакова, ЛИН СО РАН (г. Иркутск); 6. Д.б.н., проф. Д. А. Лося, ИФР РАН (г. Москва); 7. Д.б.н., проф. Н. Р. Мейчик, МГУ (г. Москва); 8. Д.б.н. Б.Р. Кулувеа, ИБГ УНЦ РАН (г. Уфа); 9. Д.б.н. Ф.В. Минибаевой, Казанский институт биохимии и биофизики (г. Казань); 10. К.б.н. Л.Н. Спиридоновой и д.б.н. А.П. Крюкова, ФНЦ биоразнообразия ДВО РАН (г. Владивосток); 11. Д.б.н., акад. НАН РК, проф. Р. И. Берсимбая, ЕНУ им. Л. М. Гумилева (Казахстан, г. Астана); 12. Д.б.н., проф. В. М. Юрина, Белорусский государственный университет (Республика Беларусь, г. Минск); 13. к.б.н., доц. А.А. Батраевой и к.б.н., доц. А.В. Третьяковой, ИГУ (г. Иркутск); 14. К.б.н. И. О. Мазунина, БФУ им. И. Канта (г. Калининград); 15. Д.б.н. Г. В. Шпаковского, ИБХ РАН (г. Москва); 16. Д.м.н., проф. В. А. Вавилина, НИИ биологии и биофизики (г. Новосибирск).

В качестве замечаний в отзывах указывается.

Замечания в отзыве ведущей организации: 1. Определенным упущением автора можно считать отсутствие в разделе «Теоретическая и практическая ценность работы» упоминания о таком важном результате как обнаружение стимуляции импорта в митохондрии в присутствии фракции мембран эндоплазматического ретикулума; 2. Нельзя полностью согласиться с

утверждением автора, что основной интерес исследователей в 80-х годах к изучению митохондриальных плазмид был связан с планами создания генетических конструкций для трансформации митохондрий. 3. На стр. 18 обзора литературы приводится неудачное выражение «терминальные белки». 4. Список сокращений далеко не полон. 5. В тексте встречаются неудачные в стилистическом и смысловом отношении выражения («перестановки в мтДНК», «эффекторы деятельности митохондриального порина» и др.); 6. Не совсем удачное оформление рисунков, что затрудняет восприятие результатов. 7. Чем можно объяснить факт стимуляции импорта ДНК не только под влиянием микросомальной фракции, но и при добавлении БСА.

Замечания в отзыве официального оппонента д.б.н. Д. Б. Зорова: 1. Следовало рассмотреть возможности исключения вторичных эффектов, например, таких как неспецифическое связывание нуклеиновых кислот с митохондриальными белками; 2. Имеет смысл обсудить проблему влияния энергизации митохондрий на транспорт нуклеиновых кислот в митохондрии; 3. Аргументация наличия ADNT1 в митохондриях картофеля, ибо доказанным было его присутствие в другом растении.

Замечания в отзыве официального оппонента к.б.н. С.В. Кирильчика: 1. Расположение рисунков оторвано от первого упоминания в тексте; 2. Список сокращений не полон.

К.б.н., доцент Д.Е. Гавриков: что выступало в качестве контроля для сравнения экспериментальных выборок и проводилась оценка значимости.

К.б.н. А. Б. Щербань и д.б.н., проф. Е.А. Салина: с чем связан выбор гена GFP для оценки импорта ДНК; условия проведения ПЦР; рис. 1 необходимо расшифровать подпись по оси Y - относительная эффективность импорта.

Д.б.н. Д. Ю. Щербаков: тесты на функциональную активность (полярографический контроль дыхания) не исключают наличия поврежденных митохондрий.

К.б.н., доц. А.А. Батраева и к.б.н., доц. А.В. Третьякова: с чем связан выбор объекта исследований; в тексте автореферата нет методики получения митопластов; обработка протеазами полностью ингибитирует импорт ДНК по литературным данным, но по данным автора ингибитирует не полностью, возможно ли говорить о соответствии данных.

К.б.н. Л.Н. Спиридонова и д.б.н. А.П. Крюков: Очень трудно понять предложение «...частично перекрывающимися, но не совпадающими полностью путями»

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их широкой известностью своими достижениями в данной

отрасли науки по специальности защищаемой диссертации. В ведущей организации ФГБУН ИЦиГ СО РАН работают специалисты по физиологии и биохимии растений, генной экспрессии, молекулярной и общей генетике растений. Первый официальный оппонент д.б.н. Д. Б. Зоров является ведущим специалистом в области биоэнергетики митохондрий, второй оппонент к.б.н. С.В. Кирильчик является авторитетным исследователем в области структуры и экспрессии генов органелл эукариот.

**Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:**

**разработано** положение, вносящее значительный вклад в понимание механизмов транспорта нуклеиновых кислот в митохондрии растений;

**предложена** оригинальная гипотеза о биохимическом механизме трансмембранных переноса ДНК разных размерных классов, включающим использование альтернативных транспортных каналов;

**доказана** роль поверхностных белков митохондриальной мембраны в механизме импорта ДНК малой, средней и большой длины.

**Теоретическая значимость исследований обоснована тем, что:**

**Доказано** участие митохондриального порина и адениннуклеотидтранслоказы в механизме импорта ДНК малой, средней и большой длины.

**Применительно к проблематике диссертации результативно использован** комплекс современных подходов и методов исследования;

**изложены** результаты детального изучения мембранных механизмов транспорта ДНК различной длины в митохондрии картофеля (*S. tuberosum*). Впервые показано, что трансмембранный перенос ДНК разных размерных классов осуществляется с использованием разных транспортных механизмов. Разработан метод определения активности импорта ДНК в изолированные митохондрии на основе ПЦР в реальном времени, позволяющий добиться максимальной чувствительности и достоверности количественной детекции в широком диапазоне концентраций. Впервые установлено участие переносчика адениннуклеотидов ADNT1 в импорте в митохондрии молекул ДНК малой ( $\leq 100$  п.н.) и средней ( $\leq 1540$  п.н.) длины. Впервые продемонстрировано, что мембранные микросомальной фракции оказывают стимулирующее влияние на импорт ДНК средней длины (700 – 850 п.н.) в митохондрии. Данный факт может служить указанием на взаимодействия этих органелл при транспорте нуклеиновых кислот в митохондрии *in vivo*;

**раскрыта** функциональная роль таких переносчиков наружной и внутренней митохондриальных мембран как порин и

адениннуклеотидтранслоказа в переносе ДНК определенных размерных классов;

**изучено** участие мембран эндоплазматического ретикулума в процессах транспорта молекул ДНК в митохондрии в реконструированной системе; **проведена модернизация** существующих представлений о мембранных механизмах переноса молекул ДНК разной длины в митохондрии высших растений.

**Заключение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:**

**определены** новые пути переноса ДНК в растительные митохондрии, знание которых может быть использовано в качестве теоретической основы для разработки эффективных стратегий и подходов адресной доставки ДНК в митохондрии растений *in vivo*;

**созданы** предпосылки для более глубокого понимания физиологических процессов в растительном организме, способствующего созданию методами генетики и селекции новых растительных форм с улучшенными хозяйствственно ценными признаками;

**представлены** данные, которые могут быть использованы в работе научно-исследовательских учреждений биологического и образовательного профиля, а также при чтении лекций по генетике и биотехнологии растений для студентов биологических факультетов университетов и сельскохозяйственных ВУЗов.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила следующее:**

**для экспериментальных работ** результаты получены с применением оборудования Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН с использованием стандартных и апробированных методик. Заключение о достоверности результатов основано на статистической обработке экспериментальных данных;

**теория** основана на имеющихся в литературе данных о транспорте нуклеиновых кислот в митохондрии растений;

**использовано** сравнение авторских данных и данных, полученных другими исследователями по рассматриваемой тематике;

**установлено**, что полученные результаты и сформулированные выводы не противоречат результатам, представленным в независимых источниках по данной тематике;

**использованы** современные методики сбора и обработки электронной информации, такие как PubMed, научная электронная библиотека eLIBRARY.RU и др.

**Личный вклад соискателя состоит:** в планировании и проведении экспериментов, в обработке и интерпретации полученных результатов, в написании статей, опубликованных по результатам работы, а также в апробации результатов исследования в ходе выступления на конференциях различного уровня.

На заседании 20 апреля 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Клименко Екатерине Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 17 докторов наук, участвовавших в заседании, из 19 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 0 человек, проголосовали: за – 18 , против – 0 , недействительных бюллетеней – 0.

Председатель  
диссертационного совета Д 003.047.01,  
д.б.н., профессор



Войников Виктор Кириллович

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 003.047.01,  
кандидат биологических наук

Акимова Галина Петровна

20 апреля 2017 года