

ОТЗЫВ
официального оппонента

на диссертацию Тарасенко Татьяны Андреевны «Изучение факторов транспортной системы растительных митохондрий, участвующих в импорте ДНК» по специальности 03.01.05 - «физиология и биохимия растений», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

5 декабря 2019 г.

Актуальность Импорт ДНК в митохондрии впервые было обнаружено более 20 лет назад, по-прежнему остается недостаточно изученным процессом, происходящим в клетках эукариот. В настоящее время для митохондрий растений установлен лишь один путь, по которому ДНК проникает в митохондриальный матрикс: при участии митохондриального порина VDAC ((Voltage Dependent Anionic Channel) во внешней митохондриальной мемbrane и аденинуклеотидтранслоказы ANT во внутренней митохондриальной мембране. Однако, согласно последним данным, процесс импорта ДНК может не ограничиваться механизмом, в котором участвуют эти два белка, но может происходить при участии нескольких, пока не выясненных альтернативных механизмов. Остается неизвестным, какие другие факторы, помимо мембранных транспортных белков, способствуют формированию транспортной системы митохондрий и тем самым обеспечивают импорт ДНК в митохондриальный матрикс. Поэтому исследование, посвященное выяснению подробностей механизмов проникновения ДНК в клетку, безусловно актуально, как минимум поскольку направлено на механизмы формирования того, П. Понтаротти образно назвал «ризомом жизни» - в некотором смысле – альтернативы древу жизни – из-за горизонтального переноса генетической информации.

Действительно, несмотря на очевидную фундаментальную и прикладную значимость исследований феномена природной компетентности митохондрий к импорту ДНК, биологический смысл этого явления пока во многом остается неясным. Особенно интригующим является предположение о том, что обнаруженная ранее способность изолированных митохондрий поглощать ДНК может в природных условиях объяснять описанный во многих работах феномен горизонтального переноса генетического материала в растительные митохондрии. Экспериментально доказанная связь между транспортом ДНК в митохондрии и процессами внутриклеточного и горизонтального переноса ДНК у растений требует дополнительных детальных исследований мембранных механизмов импорта нуклеиновых кислот в эти органеллы.

Научная новизна диссертационной работы Т.А. Тарасенко определяется тем, что в ней получен ряд полученных автором результатов, которые позволяют расширить и уточнить современные представления о механизмах транспорта ДНК в растительные митохондрии. В частности, автором установлено, что дезактивация одной из четырех изоформ митохондриального порина VDAC арабидопсиса *Arabidopsis thaliana* приводит к стимуляции импорта ДНК в растительные митохондрии, а кинетика импорта ДНК в митохондрии *Solanum tuberosum* (картофеля) имеет различный характер в зависимости от длины импортируемого фрагмента. Кроме того, автором было выявлено, что популяция митохондрий арабидопсиса, *Brassica rapa* (репы) и *Zea mays* (кукурузы) представляет собой смесь различающихся по структурно-функциональным характеристикам органелл и состоит как минимум из двух типов. Различия состоят в разной способности импортировать

ДНК. Следует также отметить, что в рамках представленной работы был преодолен методический барьер, до этого времени ограничивающий исследования в области митохондриального импорта системой изолированных митохондрий (*in organello*): был разработан новый методический подход с использованием протопластов арабидопсиса, позволяющая исследовать импорт ДНК в системе *in vivo*. Новый подход с использованием одновременно двух систем – *in organello* и *in vivo* – является уникальным для подобного рода исследований как в России, так и за рубежом. Материалы работы могут быть рекомендованы при обучении специалистов биологического и медицинского профилей в соответствующих высших учебных заведениях.

Структура диссертации Диссертационная работа изложена на 157 страницах, состоит из традиционных разделов (введения, «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», заключения, выводов и списка литературы). Список литературы содержит 271 источников, в том числе 261 на английском языке. Диссертация содержит 38 рисунков и 8 таблиц.

Введение посвящено обоснованию выбора темы и актуальности диссертационной работы, а описывает также научную и прикладную значимость проводимых исследований. Целью диссертационной работы было установить факторы транспортной системы растительных митохондрий, обеспечивающих импорт ДНК в митохондрии растений. Основные результаты прошли апробацию и были представлены на отечественных и международных конференциях. Результаты диссертации изложены в 14 научных работах, в том числе в 2 статьях в научных изданиях, рекомендованных ВАК (входящих в базу Web of Science).

Обзор литературы посвящен анализу литературных данных и изложению современных представлений о структуре митохондриального генома растений. С развитием методов молекулярной биологии и определением нуклеотидных последовательностей был сделан значительный прорыв в исследованиях закономерностей структурной организации, функционирования и эволюции организмов. В данном разделе автором изложено современное состояние в данной области исследований и выявлены 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 небольшим.

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

Материалы и методы . Раздел посвящен описанию использованных методов, подробно описаны условия и детали проведения экспериментов. Для достижения поставленной цели автором были использованы современные методы биохимии и молекулярной биологии. Выбор использованных методов и подходов обоснован и соответствует поставленным задачам.

Результаты и обсуждение представлены в отдельной главе. Вся совокупность результатов, представленных в этой главе, была получена автором с использованием современных методов биохимии, клеточной и молекулярной биологии. В работе был использован новый подход, позволяющий проводить исследования митохондриального импорта в системе *in vivo*. Было показано, что эффективность импорта ДНК *in vivo* значительно выше по сравнению с импортом ДНК, проводимым в изолированные органеллы. Тем не менее, новый подход *in vivo* гармонично дополнил исследования, проводимые автором *in organello*. Полученные в работе данные о модуляции процесса импорта ДНК при инактивации одной из изоформ митохондриального порина VDAC позволили автору сделать вывод о том, что, вероятно, в этих условиях митохондрий включают компенсаторные механизмы, запускающие активацию других транспортных каналов, в частности, каналов, формируемых другими изоформами VDAC. Показанные различия в кинетике импорта ДНК в зависимости от длины импортируемого фрагмента доказывают, что импорта ДНК средней длины (2.7 т.п.н.) может осуществляться несколькими транспортными каналами, в отличие от импорта ДНК малой длины (265 п.н.), процесс импорта которого не зависит от специфичного транспортного канала. Выявленная неоднородность митохондриальной популяции различных видов растений (*A. thaliana*, *B. rapa*, *Z. mays*) и проведенная характеристика двух типов митохондрий позволили автору предположить, что митохондрии исследованных видов растений имеют функциональную специализацию, выражющуюся в различиях структуры крист, величине дыхательного контроля и способности импортировать ДНК.

Материалы автореферата и 14 опубликованных научных работ соответствуют содержанию диссертации и достаточно полно отражают полученные автором результаты. Работа Т.А. Тарабенко 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 При прочтении диссертации и автореферата у меня возник ряд замечаний:

1. Формулировка первого защищаемого положения «Закономерности импорта ДНК, показанные в исследованиях в системе изолированных митохондрий, сохраняются *in vivo*.» представляется неудачной: логичнее было бы «Закономерности импорта ДНК, показанные в исследованиях *in vivo*, сохраняются в системе изолированных митохондрий.», в соответствии со степенью экспериментальной модификации ткани.
2. Полагаю, что одного лишь микроскопического контроля интактности протопластов и/или митохондрий недостаточно, поскольку исследования транспорта молекул через одну или несколько мембран критически зависят от доли поврежденных клеток/органелл в среде. Использование какого-либо биохимического теста на наличие в среде, например, цитохрома с или митохондриальных РНК, повысило бы доказательную силу экспериментов;
3. Мне представляются, что использование нарисованных от руки кинетик (Рис.20 и 21 а-в диссертации) при наличии простых кинетических уравнений, решения которых легко представить графически, снижают убедительность соответствующих рассуждений в тексте диссертации. Эти рисунки, в частности,

затушевывают то, что кривые 21б и 21в практически невероятно отличить друг от друга при широком наборе реалистических значений констант и использовании экспериментальных данных.

Вышеперечисленные замечания носят характер скорее рекомендаций для дальнейшей работы и не препятствуют сделать следующее заключение:

Заключение. Диссертация Т.А. Тарасенко, 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 ДНК в митохондрии растений. По актуальности проблемы, методическому уровню, объему проделанной работы, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Татьяна Андреевна Тарасенко заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент
заведующий лабораторией геносистематики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Лимнологического института
Сибирского отделения Российской академии наук (ЛИН СО РАН)

доктор биологических наук

Щербаков Дмитрий Юрьевич

640033, г. Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3
тел. +79248330122
E-mail: sherb@lin.irk.ru

Подпись заведующего лабораторией, д.б.н. Д.Ю. Щербакова
и.о. ученого секретаря ЛИН СО РАН

ЗАВЕРЯЮ.

к.б.н. Максимова Н.В.



ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Тарасенко Татьяны Андреевны «Изучение факторов транспортной системы растительных митохондрий, участвующих в импорте ДНК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Актуальность проблемы. Диссертация Т.А. Тарасенко «Изучение факторов транспортной системы растительных митохондрий, участвующих в импорте ДНК» посвящена решению задач, связанных с импортом нуклеиновых кислот в митохондрии высших растений. Целью диссертационного исследования является изучение роли факторов белковой и небелковой природы, влияющих в разной степени на эффективность импорта молекул ДНК в матрикс растительных митохондрий.

Проблема эффективного импорта макромолекул в митохондрии является одной из ключевых в разработке протоколов трансформации митохондрий, как растений, так и животных. Несмотря на то, что система белкового импорта изучена значительно лучше, нежели импорт нуклеиновых кислот, в механизме импорта белков остается много непонятного. В частности, до сих пор не реализован полный перенос белок-кодирующих митохондриальных генов в ядро в модельных клеточных системах, вероятно, в силу высокой гидрофобности таких белков. Импорт нуклеиновых кислот, очевидно, реализуется посредством других механизмов, причем, механизмы, скорее всего, разные для ДНК и РНК. Процесс понимания механизмов импорта упомянутых макромолекул (по степени понимания) я бы расположил следующим образом: белки, ДНК, РНК.

В представленном исследовании соискатель изучает процессы естественного импорта молекул ДНК разной длины в митохондрии как в системе *in vitro*, так и *in vivo*. Полученные данные необходимы для понимания механизмов такого импорта, чтобы в дальнейшем успешно манипулировать вышеуказанными системами для повышения его эффективности.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, их достоверность и новизна. План работ, представленный соискателем, в целом отвечает поставленным задачам, и идейно продолжает огромную работу, проводимую в лаборатории профессора Юрия Михайловича Константинова. Обоснованность и достоверность полученных результатов обусловлены применением в исследовании широкого спектра методов, подтверждающих и дополняющих друг друга. Кроме того, результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на многочисленных конференциях и научных семинарах. Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам. Их формулировка выглядит весьма обоснованной. Анализ научной литературы подтвердил, что никто ранее не публиковал эксперименты по изучению эффективности импорта ДНК в митохондрии растений, дефектных по генам *VDAC* и другим белкам биогенеза митохондрий, а также в различные субпопуляции митохондрий.

Соответствие работы требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация Т.А. Тарасенко является законченным исследованием, направленным на решение актуальной задачи. Цель и задачи четко сформулированы, а выводы соответствуют задачам. Работа прошла апробацию на конференциях. По тематике исследования опубликовано 13 научных работ, из которых 2 статьи в рецензируемых журналах из Перечня ВАК РФ. Таким образом, работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Достоинства и недостатки по оформлению и содержанию работы. Как уже было отмечено, работа представляет собой целостное актуальное законченное исследование с обоснованными выводами. Как человеку, работающему с митохондриями человека, мне было крайне интересно читать литературный обзор по вопросам митохондриальной биологии растений. Методы, представленные в работе, весьма разнообразны и адекватно подобраны. Соискатель проделал огромную работу за время выполнения диссертационного исследования. Представленные методы вполне подходят для обозначенных задач. Немаловажную роль сыграли и многочисленные наработки коллектива лаборатории по

данной проблематике как в теоретических вопросах, так и в конкретных практических нюансах используемых методов.

Одним из достоинств работы стала разработка способа анализа импорта ДНК в изолированные митохондрии растений путем использования флуоресцентно меченых праймеров для амплификации ДНК. Также всегда интересна параллель между экспериментами *in vitro* и *in vivo*, что и было успешно продемонстрировано в ходе работы.

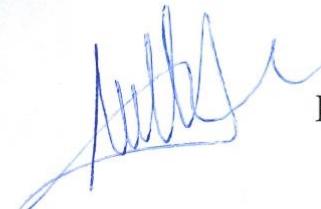
Из недостатков оформления текста стоит отметить мелкие опечатки и повторяющиеся предложения в пределах одного абзаца (страница 123, когда идет речь о различных субпопуляциях митохондрий, и страница 128, где говорится об инактивации различных изоформ порина).

Отдельно хотел бы высказать сомнение относительно адекватности нормирования на митохондриальный ген и использование именно этого отношения в качестве эталона импорта. Одно дело, когда используют ядерный однокопийный ген и нормируют данные на него. Другое дело ДНК митохондрий, количество копий которой постоянно меняется в процессе культивирования клеток, в процессе манипуляции над клетками, а также при разных жизненных стадиях организма. В работе не представлены данные о стабильности копий mtДНК в различных модельных системах, которые использует автор диссертации. Например, когда изучается роль нокаутов различных вариантов VDAC, а также TSPO, MIC60, OM47, DRP3A и DRP3B, нет подтверждения, что это не приводит к уменьшению количества копий mtДНК. Если следовать подходу, который использует соискатель, то количество копий mtДНК в изучаемых нокаутах уменьшается относительно Col-0 и значения импорта экзогенной ДНК будут завышены. Желательно обосновать выбранную схему обсчёта данных. Я понимаю, что сложно показать истинное значение импортируемой ДНК, и видимо, нужно сравнивать несколько методов, чтобы получить более-менее адекватные значения.

Мнение о научной работе соискателя в целом. В целом работа производит прекрасное впечатление, а автор исследования является талантливой и самостоятельной молодой исследовательницей. Диссертационная работа соот-

ветствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней ВАК РФ», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Содержание диссертации соответствует специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений. Таким образом, Татьяна Андреевна Тарасенко заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент
старший научный сотрудник,
кандидат биологических наук
Центра наук о жизни Сколковского
института науки и технологии
121205, Москва, ул. Нобеля, дом 3
Тел. +79527999279
Электронная почта: I.Mazunin@skoltech.ru



И.О. Мазунин
«25» ноября 2019 г.

Подпись И.О. Мазунина удостоверяю

Руководитель отдела кадрового администрирования
Сколковского института науки и технологий



О.С. Гук
«25» ноября 2019 г.

«25» ноября 2019 г.