



Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

410049, г.Саратов, просп. Энтузиастов, д. 13.
Тел.: (845-2) 97-04-44, 97-04-03. Факс: (845-2) 97-04-44, 97-03-83.
E-mail: mail@ibppm.ru, http://ibppm.ru
ОКПО 04740828, ОГРН 1026402489013, ИНН/КПП 6451105279/645101001

№ 106-01-1-516 от 29.11.2019г.

на _____ от _____

Отзыв

ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

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

Исследование механизмов регуляции биогенеза, изменения функциональной активности клеточных органелл представляет собой одно из прорывных направлений современной биологии. Получение гибридных и трансгенных форм с улучшенным биосинтетическим потенциалом и измененной регуляцией внутриклеточных процессов составляет основу технологий создания новых сортов растений. Главным источником энергии и метаболитов для биосинтетических процессов в растительной клетке являются митохондрии. В силу симбиогенетического происхождения, для осуществления своих функций митохондрии нуждаются в импорте белков и нуклеиновых кислот из цитоплазмы клетки. Однако уровень знаний о молекулярных механизмах межклеточного и внутриклеточного транспорта генетической информации у растений крайне недостаточен. Поэтому диссертационная работа Татьяны Андреевны Тарасенко, направленная на исследование организации транспортной системы растительных митохондрий, обеспечивающей импорт ДНК, несомненно, является **актуальной**.

Данная диссертационная работа характеризуется определенной **научной новизной и практической значимостью**. В ней впервые показано, что отсутствие любой из изоформ митохондриального порина VDAC, за исключением VDAC3, приводит к значительному усилению процесса импорта ДНК, возможно, вследствие компенсаторного эффекта, вызванного повышением содержания в мембране изоформы VDAC3 и/или структурных перестроек митохондриальной мембраны. Установлено, что белок внешней мембраны растительных митохондрий TSP0 может участвовать в транспорте при повышенных концентрациях ДНК-субстрата.

Впервые продемонстрировано, что концентрационная зависимость эффективности импорта ДНК-субстрата в митохондрии *S. tuberosum* имеет различный характер: линейный для ДНК малой длины и ступенчатый для ДНК средней длины. При этом импорт ДНК средней длины опосредуется несколькими механизмами.

Впервые исследовано влияние структурно-функциональных особенностей

№ 0218

митохондрий, формирующих разные митохондриальные популяции, на эффективность импорта ДНК. Показано, что митохондрии, обладающие менее развитой системой внутренних мембран, проявляют более выраженную способность к импорту ДНК.

В диссертации представлен новый подход к изучению импорта ДНК с использованием системы *in vivo*. Показано, что ДНК эффективно транслоцируется из цитоплазмы в митохондриальный матрикс в протопластах арабидопсиса; эффективность импорта ДНК *in vivo* значительно выше импорта ДНК в системе *in organello*, что позволяет предположить существование различных клеточных факторов, способствующих эффективному транспорту ДНК в митохондрии.

Достиженные результаты являются значимой методической основой для работ по направленной генетической трансформации митохондрий и редактированию митохондриального генома растений. Полученные знания могут быть использованы для обучения студентов и аспирантов в курсах лекций по биохимии, физиологии и биотехнологии растений.

Диссертационная работа изложена на 157 страницах и построена по традиционному плану. Основные компоненты ее структуры: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список использованной литературы. Последний содержит 271 литературный источник, из них 10 – на русском языке. Материалы диссертации иллюстрированы 38-ю рисунками и 8-ю таблицами.

Обзор написан хорошим литературным языком, структурирован и легко читается. В нем рассмотрены особенности организации митохондриального генома растений различных систематических групп. Приведен анализ данных о механизмах, лежащих в основе пластичности и динамичности митохондриального генома растений. Рассмотрена роль горизонтального переноса генетической информации в растениях на внутриклеточном и межклеточном уровнях. Приведены данные о структурно-функциональной гетерогенности субпопуляций митохондрий в различных органах и тканях растений. В тексте обзора наглядно раскрыта физиологическая роль внутриклеточного транспорта белков и генетического материала в процессах биогенеза митохондрий растительной клетки.

Глава 2 дает представление о материалах и методах исследования. Данная глава оставляет хорошее впечатление, в ней представлен широкий набор методов физиологических исследований, биохимического анализа и молекулярно-биологических техник от выращивания экспериментальных растений, получения препаратов протопластов и митохондрий из тканей различных видов растений, до проведения электрофоретического анализа ДНК, белков и ферментных комплексов, получения препаратов ДНК-субстрата с молекулами различной длины, в том числе меченых флюорохромом, количественного ПЦР анализа в режиме реального времени и анализа уровня экспрессии генов транспортных белков. В целом данный раздел работы демонстрирует научную компетентность и высокую квалификацию автора в методической части.

В **третьей главе** диссертации подробно обсуждаются полученные автором результаты. Изложение исследований структурировано по четырем этапам. В итоге большого количества экспериментов убедительно показано, что модельные ДНК-субстраты с молекулами различной длины, полученные автором, эффективно проникают внутрь изолированных митохондрий различных видов растений и эффективно выявляются в препаратах митохондриальной ДНК независимыми методами. Наличие флуоресцентной метки не ингибирует процесс транспорта. Проведение экспериментов на культуре протопластов значительно увеличивает эффективность транспорта модельной ДНК в митохондрии клеток.

Количественные измерения эффективности транспорта модельных ДНК в митохондрии картофеля позволили исследовать кинетику этого процесса. Для длинных фрагментов ДНК (2,7 т.п.н.) показано наличие как минимум двух концентрационных

порогов эффективности проникновения, при том что для коротких (269 п.н.) зависимость носит линейный характер.

Большой объем работы посвящен анализу роли транспортных белков мембран митохондрий *A. thaliana* в импорте ДНК различной длины. Исследования, проведенные на препаратах митохондрий и протопластов, выделенных из растений, содержащих инсерционные мутации по различным генам, позволили показать, что белки OM47, MIC60, DRP3A и DRP3B не принимают значимого участия в импорте модельной ДНК. Для белка TSP0 показано его включение в процесс импорта в условиях повышенных концентраций ДНК среднего размера. Интересные результаты получены в экспериментах на растениях, содержащих мутации генов отдельных изоформ порина VDAC. В отношении трех из четырех изоформ порина VDAC показана значительная стимуляция импорта ДНК в митохондрии у мутантных по этим белкам линий растений. Для получения дополнительной информации об эффекте мутаций диссертантом проведено исследование уровней экспрессии генов изоформ порина VDAC в растениях мутантных линий. Установлено увеличение общего уровня экспрессии генов изоформ, не подверженных мутации. Наиболее выраженное увеличение экспрессии отмечено для гена VDAC-3 (до 4-х раз). В тоже время в растениях, мутантных по этому гену, увеличения или изменения экспрессии генов изоформ не выявлено. Полученные результаты представляют несомненный интерес для исследования механизмов регуляции трансмембранного транспорта митохондрий в растительных клетках.

Как еще один важный этап работы диссертанта следует отметить изучение влияния функциональной активности митохондрий на эффективность импорта модельных ДНК. В результате анализа гомогенности препаратов изолированных митохондрий выявлено присутствие в образцах как минимум двух субпопуляций органелл, качественно различающихся по седиментационным характеристикам. Наличие субпопуляций показано для всех исследованных образцов митохондрий, выделенных из листьев *A. thaliana*, корнеплодов репы *B. rapa* и колеоптилей *Z. mays*. При анализе ультраструктуры методом электронной микроскопии выявлены значимые отличия митохондрий различных популяций. Показано, что митохондрии более тяжелой субпопуляции имеют плотную упаковку и хорошо выраженную сформированную систему крист внутренней мембраны, в отличие от митохондрий легкой субпопуляции. Вопреки ожиданиям, именно митохондрии легкой фракции продемонстрировали более высокий уровень импорта модельной ДНК во всех исследованных образцах. Среднее увеличение интенсивности импорта модельной ДНК составляет 63% для препаратов митохондрий из листьев *A. thaliana*, 87% для корнеплодов *B. rapa* и 166% для колеоптилей *Z. mays*. Наличие в тканях растений субпопуляций митохондрий с высокой компетентностью к импорту модельной ДНК может иметь важное значение для разработки технологий направленной модуляции биоэнергетики растительной клетки.

Разнообразие использованных методов исследования, их убедительная интерпретация свидетельствуют о **достоверности** полученных автором экспериментальных результатов.

По рассматриваемой диссертационной работе имеются следующие замечания.

1) В тексте отмечается многократное, кажущееся избыточным, цитирование отдельных публикаций: Weber-Lotfi *et al.*, 2009 (10 раз), Logan, 2006 (12 раз), Koulintchenko *et al.*, 2003 (29 раз).

2) Для лучшего восприятия текста следовало бы избегать жаргонных терминов «банд» и «бандов», заменяя их привычными наименованиями «полоса» (в электрофорезе) и «фракция или слой» (в центрифужной пробирке).

3) В главе «Результаты и обсуждение» имеет место недостаточная наглядность и трудная читаемость части рисунков, представляющих результаты сравнения уровня содержания импортированной ДНК в митохондриях с контролем.

4) Для более корректного сравнения эффективности импорта в митохондрии молекул

модельных ДНК различной длины при различных концентрациях было бы удобным использовать сопоставление молярных концентраций фрагментов. Из условий эксперимента следует, что молярные массы этих молекул различаются в 10 раз. В этом случае эффективность импорта длинного фрагмента при добавлении 2 мкг будет соответствовать эффективности импорта короткого фрагмента при добавлении 0,2 мкг и т.д.

5) Для получения дополнительных характеристик процесса импорта можно было бы исследовать его эффективность в зависимости от времени экспозиции митохондрий с модельной ДНК.

Перечисленные выше замечания имеют, в основном, технический характер и не снижают в целом положительную высокую оценку диссертационной работы Т.А. Тарасенко.

Выводы диссертации **достоверны** и соответствуют поставленным задачам. Автореферат адекватно отражает основное содержание работы. Результаты работы представлены в 13 научных публикациях в том числе в 2 статьях в рецензируемых журналах из списка ВАК РФ (входящих в базу Web of Science).

Заключение. Диссертационная работа Т.А. Тарасенко «Изучение факторов транспортной системы растительных митохондрий, участвующих в импорте ДНК» по объему, актуальности, научной новизне и практической значимости является законченным исследованием, отвечающим требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, полностью соответствует пункту 9 «Положения о порядке присуждения ученой степени», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г., № 842, как научно-квалификационная работа, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития представлений о механизмах регуляции биогенеза и функциональной активности клеточных органелл растений, а ее автор, Тарасенко Татьяна Андреевна, **заслуживает** присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.05 – биохимия и физиология растений.

Отзыв заслушан и утверждён на заседании Лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН, протокол № 66 от 26 ноября 2019года

Рецензенты:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии

Селиванов Николай Юрьевич

доктор химических наук, профессор,
зав. лабораторией иммунохимии

Щеголев Сергей Юрьевич

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук (ИБФРМ РАН).
410049, Саратов, пр. Энтузиастов 13,
e-mail: selivanov_n@ibppm.ru; телефон +7(8452) 97-04-03.

Подписи Н.Ю. Селиванова и С.Ю. Щеголева заверяю
Ученый секретарь ИБФРМ РАН, к.б.н.



О.Г. Селиванова