

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

**Горбенко Игоря Владимировича «Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOТMP  
*Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений**

**Актуальность темы диссертации.** Митохондрии и пластиды – это уникальные органеллы эукариотических (в случае пластид – растительных) клеток, обладающие собственными геномами. У растений функционирование геномов этих органелл обеспечивает протекание процессов фотосинтеза и дыхания, играет важную роль в контроле программируемой гибели клеток, метаболизма, адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды, ответственно за формирование цитоплазматически наследуемых признаков, в том числе хозяйственно значимых (например, цитоплазматической мужской стерильности). Однако в отличие от представлений о ядерном геноме наши знания о структуре геномов органелл, о регуляции функционирования этих геномов и о контролируемых ими признаках относительно фрагментарны. Геномы органелл работают в тесном взаимодействии с ядерным геномом благодаря функционированию системы антероградной регуляции (ядерного контроля функционирования органелл) и ретроградного сигнального пути (восприятия в ядре генерируемых органеллами сигналов). Изучение соответствующих механизмов имеет большое значение для понимания целостной картины регуляции экспрессии генов в клетке, в том числе в процессе регуляции конкретных признаков, и, как следствие, для повышения эффективности сельскохозяйственной селекции. С этой точки зрения диссертация Игоря Владимировича, посвященная исследованию роли РНК-полимеразы ядерного кодирования RPOТmp, которая локализуется в митохондриях и хлоропластах, в функционировании этих органелл, является очень интересной и важной работой, значение которой как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте бесспорно.

**Структура и содержание работы.** Диссертация изложена на 154 страницах, иллюстрирована 46 рисунками и шестью таблицами. Диссертация имеет классическую структуру и состоит из восьми содержательных разделов («Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список использованной литературы», «Приложения»), а также включает оглавление и список сокращений. Список цитированной литературы включает 444 наименования. Диссертация оформлена аккуратно, написано достаточно грамотно и понятно.

Во «Введении» аргументируется актуальность исследования, определяется цель диссертационной работы, а также методология, дается краткое обоснование научной новизны, теоретической и практической значимости исследования.

Научный контекст исследуемых автором вопросов, а также их проработанность и изученность в публикациях других авторов очень подробно освещаются в разделе «Обзор

литературы». Здесь описана структурная организация геномов митохондрий и хлоропластов, охарактеризованы РНК-полимеразы, осуществляющие транскрипцию в органеллах, отражены современные представления о структуре митохондриальных и пластидных промоторов и о роли транскрипционных факторов в регуляции экспрессии генов органелл. Помимо этого, обсуждается функционирование полимераз ядерного кодирования, локализованных в хлоропластах и митохондриях, в раннем развитии растений, приводятся примеры ядерного контроля функционирования органелл (антероградной регуляции) и ретроградной передачи генерируемых органеллами сигналов в ядро, описывается структурная организация цепи переноса электронов в митохондриях. Наконец, приводится характеристика ранее полученных в коллективе трансгенных линий *Arabidopsis thaliana* с компартмент-специфическими изменениями экспрессии РНК-полимеразы РРОТ<sub>mp</sub> двойной адресации (объекта диссертационного исследования) и результаты фенотипического анализа этих линий. Таким образом, литературный обзор демонстрирует весьма широкий охват тематики, при этом автору вполне удалось сохранить фокус на объекте исследования. Анализ литературных данных осуществлен Игорем Владимировичем достаточно подробно и квалифицированно. В заключении к обзору автор резюмирует основные тезисы обзора, а также формулирует задачи диссертационной работы и положения, выносимые на защиту.

В разделе «Материалы и методы» определяется методическая база исследования.

Собственные результаты автора и их обсуждение приводятся в разделе «Результаты и обсуждение». Работа построена на сравнительном исследовании линии *Arabidopsis thaliana* дикого типа, мутантной линии *rpotmp* и трансгенных линий с компартмент-специфическими изменениями экспрессии полимеразы РРОТ<sub>mp</sub>: со сверхэкспрессией в митохондриях (ОЕМ), хлоропластах (ОЕР), а также со специфической экспрессией в митохондриях (Т<sub>mp</sub>-М) или хлоропластах (Т<sub>mp</sub>-Р) на фоне мутации *rpotmp*. Игорь Владимирович провел детальную и кропотливую работу по анализу изменений транскриптома листьев *A. thaliana* в ответ на компартмент-специфические изменения экспрессии РНК-полимеразы РРОТ<sub>mp</sub>, в результате которой были установлены новые факты о функционировании полимеразы двойной адресации в митохондриях и хлоропластах (раздел 3.1). В частности, результаты транскриптомного профилирования согласуются с преимущественным функционированием РРОТ<sub>mp</sub> в митохондриях; в то же время сверхэкспрессия РРОТ<sub>mp</sub> в хлоропластах специфически изменяет транскрипцию большого числа генов. Автором идентифицированы митохондриальные и хлоропластные гены, дифференциально экспрессирующиеся в ответ на сверхэкспрессию РРОТ<sub>mp</sub> в этих органеллах. Среди дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) выявлено большое количество ядерных генов; это свидетельствует в пользу того, что РРОТ<sub>mp</sub> активирует ретроградный сигнальный путь. Игорь Владимирович отдельно рассматривает ДЭГ, кодирующие ядерные транскрипционные факторы, и успешно использует их для реконструкции генной регуляторной сети, затрагиваемой ретроградной регуляцией. Кроме того, автором определены ядерные ДЭГ, продукты которых имеют митохондриальную и хлоропластную адресацию (в том числе белки с пентатрикопептидным повтором, PPR); это означает, что активация ретроградного сигнального пути РНК-полимеразой РРОТ<sub>mp</sub>



запускает ответную антероградную регуляцию органелл (называемую автором ретроградным ответом). С использованием сетевых подходов автору удалось реконструировать потенциальные взаимодействия между ДЭГ и кодируемыми ими продуктами, что открывает возможность формулировать конкретные гипотезы о механизмах ретроградной регуляции, запускаемой полимеразой *RPO7mp*, для дальнейших экспериментальных исследований. На следующем этапе Игорь Владимирович исследовал роль *RPO7mp* в прорастании семян и показал, что РНК-полимераза двойной адресации влияет на всхожесть семян, вероятно, регулируя чувствительность растений к воздействию абсцизовой кислоты (раздел 3.2). Поскольку дыхание и фотосинтез являются ключевыми функциями митохондрий и хлоропластов, автором было исследовано влияние *RPO7mp* на организацию белковых комплексов митохондрий и тилакоидов (разделы 3.3 и 3.4). Удалось выявить, что сверхэкспрессия гена *RPO7mp* в митохондриях приводит к повышению содержания комплекса I дыхательной цепи в составе суперкомплекса I+III<sub>2</sub>. На основании совокупности полученных результатов автором предложена интересная модель функционирования РНК-полимеразы *RPO7mp* в митохондриях и хлоропластах. Наконец, предложен подход для трансформации митохондрий методом трансфекции протопластов с использованием гена *RPO72* арабидопсиса в качестве селективного маркера успешной трансформации. С целью реализации этого подхода автором созданы генетические конструкции, экспрессирующие репортерный ген *GFP* под управлением промоторов митохондриальных генов *Cox1* и *Rrn26* (раздел 3.5).

В разделе «Заключение» автор резюмирует основные результаты работы.

В разделе «Выводы» конкретизированы выводы, сделанные на основании полученных автором результатов.

Иллюстративные материалы диссертации наглядны и достаточно эффективно дополняют текст.

**Степень обоснованности и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации.** Благодаря подробному и квалифицированному анализу литературных данных, цель работы и задачи исследования представляются актуальными и научно обоснованными. Положения, выносимые на защиту, полностью отражены в материалах диссертации. Выводы диссертации опираются на изложенный материал, полностью соответствуют ему, обоснованы и являются достоверными. Большое комплексное исследование роли РНК-полимеразы ядерного кодирования *RPO7mp*, которая локализуется в митохондриях и хлоропластах, в функционировании этих органелл, выполненное Игорем Владимировичем, проведено на высоком научном и методическом уровне. Это позволило корректно решить поставленные задачи и достичь цель – создать модель функционирования РНК-полимеразы *RPO7mp* в митохондриях и хлоропластах.

**Научная новизна и практическая значимость полученных результатов.** Степень научной новизны полученных автором результатов несомненно высока. При этом диссертационное исследование не только расширяет научные знания в области функционирования геномов органелл, некоторые положения обладают существенной

практической значимостью. Наибольшего внимания заслуживают следующие результаты диссертационной работы. (1) Расширен список митохондриальных и пастидных генов арабидопсиса, экспрессию которых регулирует РНК-полимераза RPO7mp двойной адерсацией. (2) Впервые проведено транскриптомное профилирование растений с измененной экспрессией RPO7mp в митохондриях и хлоропластах. В результате реконструированы неизвестные ранее регуляторные связи, контролирующие ответ на сверхэкспрессию RPO7mp. (3) Впервые показано, что растения со сверхэкспрессией RPO7mp характеризуются ранним прорастанием, которое может быть связано со снижением чувствительности к абсцизовой кислоте. Этот результат может иметь важное прикладное значение в сельскохозяйственной селекции. (4) Впервые показано, что сверхэкспрессия RPO7mp в митохондриях *Arabidopsis thaliana* приводит к повышенному содержанию комплекса I в митохондриях в форме суперкомплекса I+III<sub>2</sub>. (5) Впервые предложено и обосновано использование гена *RPO7* арабидопсиса в качестве селективного маркера для трансформации митохондрий *in vivo*. В качестве первого этапа реализации этого предложения созданы генетические конструкции, обеспечивающие эффективную экспрессию гена под контролем митохондриального промотора, что подтверждается в экспериментах *in organello*. Важно отметить практическую значимость этого результата для сельскохозяйственной биотехнологии, а также тот факт, что до сих пор задача трансформации митохондрий *in vivo* никем не была решена.

**Соответствие содержания автореферата содержанию диссертации.** Текст автореферата в полной мере отражает содержание диссертации Горбенко И.В. Автор имеет достаточное количество публикаций, в которых отражены основные результаты защищаемой работы.

**Замечания по диссертационной работе:**

1. В подразделе 3.1.1 автор делает выводы о «близости» линий *A. thaliana* друг к другу на основании количества специфических для каждой линии ДЭГ. Однако это очень грубая оценка. Чтобы проиллюстрировать сходство или различие транскриптомов, автору стоило провести их анализ с помощью метода главных компонент (что является стандартной процедурой при анализе транскриптомных данных).
2. В наборе линий *A. thaliana*, используемых автором в исследовании, содержатся «дубликаты», то есть различные линии с одинаковым характером изменения экспрессии RPO7mp. Как автор интерпретирует существенные различия, наблюдаемые между такими линиями? Например, списки ДЭГ для линий OEM15 и OEM20 существенно различаются как количественно (что видно из рис. 8), так и качественно (что видно из рис. 10, 11, 12 и т.д.). Для сравнительного анализа автор часто использует только одну из «дублированных» линий (например, рис. 9). Чем обоснован выбор одной конкретной линии, учитывая существенную гетерогенность внутри «дубликатов»?
3. В тексте встречаются жаргонизмы (вплоть до некорректного употребления терминов). Например, на стр. 67 термин «*p*-значение» употребляется как синоним термина «доля ложноположительных результатов» (false discovery rate, FDR), что



совершенно неправильно. Также в тексте присутствуют опечатки и неточности, например, табл. 1 называется «Генетический состав митогенома арабидопсиса», однако отражает состав белок-кодирующих митохондриальных генов, табл. 2 содержит 79 генов, а в тексте указано 87, и проч.

**Заключение.** Перечисленные выше замечания не снижают ценности представленной работы. Представленная диссертация на тему «Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOTMP *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий» полностью соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой завершённую научно-квалификационную работу, а ее автор Горбенко Игорь Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений.

Официальный оппонент:  
Кандидат биологических наук  
(специальность 03.01.03 – молекулярная биология)

Ведущий научный сотрудник сектора системной биологии морфогенеза растений  
лаборатории молекулярно-генетических систем  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук»,  
г. Новосибирск

Землянская Елена Васильевна

«04» декабря 2024 года

р.т. +7 (383) 363 49 63 вн. номер 3113  
e-mail: [ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru](mailto:ezemlyanskaya@bionet.nsc.ru)

Почтовый адрес:  
Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр. ак. Лаврентьева, 10  
Телефон: +7(383) 363-49-80  
Факс: +7(383) 333-12-78  
E-mail: [icg-adm@bionet.nsc.ru](mailto:icg-adm@bionet.nsc.ru)



Подпись Е.В. Землянской заверяю  
Ученый секретарь ИЦГиГСО РАН К.Б.Н.

Орлова Галина Владимировна