

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА № 24.1.210.01
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 24.12.2024 г., протокол № 5
о присуждении **Горбенко Игорю Владимировичу** (Российская Федерация) ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOTrp *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий» по специальности 1.5.21 «Физиология и биохимия растений» принята к защите 18 октября 2024 года, протокол №2, диссертационным советом № 24.1.210.01 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 Горбенко Игорь Владимирович, 1992 года рождения, с 2024 года работает в должности младшего научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории генетической инженерии растений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук

В 2018 году соискатель с отличием закончил обучение в магистратуре биолого-почвенного факультета Иркутского государственного университета по профилю «Биохимия и молекулярная биология». В 2018 году он был зачислен в очную аспирантуру Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, где проходил обучение по специальности «физиология и биохимия растений» (1.5.21) и закончил его в 2022 году, защитив с отличием НКР «Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOTrp *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии органелльных генов».

Научный руководитель – Константинов Юрий Михайлович, доктор биологических наук (1.5.21 – физиология и биохимия растений), профессор, работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, главный научный сотрудник лаборатории генетической инженерии растений.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» (ИМКБ СО РАН) в своем **положительном заключении**, подписанном Вершининым Александром Васильевичем, доктором биологических наук (03.01.07 – молекулярная генетика) и утвержденном директором института доктором биологических наук Демаковым Александром Васильевичем, отмечают, что диссертационная работа «Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOTrp *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий» по своей актуальности, методическому уровню, научной новизне и практической значимости является законченной и соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г., № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Горбенко Игорь Владимирович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений. Отзыв на диссертацию и автореферат заслушан и утвержден на заседании семинара отдела структуры и функции хромосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» 25 ноября 2024 года, протокол № 2.

Замечания в отзыве ведущей организации.

1. В оформлении работы (в тексте диссертации и автореферата) наблюдается несоответствие между количеством задач, поставленных в исследовании (пять), и количеством положений, выносимых на защиту (два). В первом положении декларируется наличие роли RPOTrp в различных процессах, происходящих в клетке *Arabidopsis thaliana*, без конкретного определения, в чем же состоит эта роль. Во втором предложении дается более конкретное описание тех процессов, что происходят в растениях в отсутствие функциональной RPOTrp. Учитывая большой объем экспериментальных исследований, проделанных Горбенко И.В., подробное, убедительное описание разделов «Научная новизна» и «Выводы», можно было ожидать также более развернутую формулировку положений, выносимых на защиту. Рекомендуем это сделать в диссертационном докладе.
2. Автору не стоило использовать в тексте англицизмы, типа «ретроградно/антероградный сигналинг», которые понятны для узких специалистов в данной конкретной области. Однако для более широкой аудитории лучше использовать более понятный русский язык.

В отзыве ведущей организации отмечено, что замечания носят рекомендательный характер и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Официальные оппоненты

1. Землянская Елена Васильевна, кандидат биологических наук (03.01.03. – молекулярная биология), Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», сектор системной биологии морфогенеза растений лаборатории молекулярно-генетических систем, ведущий научный сотрудник.
2. Щербаков Дмитрий Юрьевич, доктор биологических наук (1.5.12. - зоология, 1.5.7. - генетика), Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, заведующий лабораторией геносистематики, главный научный сотрудник

дали положительные отзывы о диссертации.

Замечания в отзыве официального оппонента к.б.н. Е.В. Землянской.

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 измерения экспрессии RPOTrp. 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 «р-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 прочее.

Замечания в отзыве официального оппонента д.б.н. Д.Ю. Щербакова.

1. Не совсем понятно, почему в основном экспериментальная процедура «Получение данных методом ДНК-микрочипирования» описывается в разделе о биоинформационных методах. Описание неполно с точки зрения воспроизводимости и корректности изложения: помимо перечисления наборов, стоило хотя бы сообщить, что следовали протоколу производителя. Приведенные там же скрипты не удалось проверить, поскольку они предназначены для использования файлов на компьютере автора. Однако видимых ошибок они не содержат.
2. В разделе «Материалы и методы» стоит привести принятое автором определение «центральности» как минимум, поскольку различные метрики предполагают разные

свойства графа (разные требования к множеству окружающих вершин). Также требуется обсуждение различий между этими метриками, иначе не понятно, зачем их все использовали.

3. Следует отметить несколько небрежное отношение автора к обоим правилам для биологических текстов: во-первых, латинские названия рода и вида пишутся курсивом (реже и устарело - подчеркнуты), при повторном упоминании там, где это не приводит к путанице – род обозначается первой буквой, например, *A. thaliana*.

4. Сильно затрудняет восприятие текста диссертации злоупотребление сокращениями. При работе с текстом необходимо либо держать все их в уме, либо обращаться к таблице, что неудобно.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается полным соответствием направлений их основной научной деятельности направлениям паспорта научной специальности 1.5.21 - Физиология и биохимия растений: (2) Геном растений, регуляция экспрессии генома; транскрипция; трансляция, пост-транскрипционные и посттрансляционные механизмы, (6) Сигнальные системы клеток и целых растений, рецепция и трансдукция внутренних и внешних сигналов (фоторецепция, гормональная, гуморальная и биоэлектрическая регуляция), (9) Генная инженерия растений, физиология трансгенных растений, получение хозяйственно-ценных генотипов. В ведущей организации ИМКБ СО РАН работают специалисты, выполняющие фундаментальные научные исследования в области функциональной геномики, сотрудники имеют большое количество публикаций по специальности 1.5.21 - Физиология и биохимия растений, посвященных архитектуре геномов злаковых и бобовых растений, а также выведению перспективных гибридов. Официальный оппонент к.б.н. Е.В. Землянская является известным специалистом в области системной биологии растений, имеет большой опыт работы и множество публикаций в области геномики, транскриптомики культурных и модельных растений, исследовании роли фитогормонов в стресс-реакциях растений. Д.б.н. Д.Ю. Щербаков является ведущим специалистом в области структуры и экспрессии митохондриальных и ядерных генов эукариот.

На автореферат поступили отзывы (все отзывы положительные):

1. д.б.н. О.В. Дорогина, ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», г. Новосибирск.
2. к.б.н. И.А. Кайгородова, ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск (в тексте автореферата допущены некоторые стилистические погрешности, отсутствует единый формат оформления библиографии в списках опубликованных работ. Сложно вычлнить личный вклад соискателя, поскольку результаты опубликованы в соавторстве с коллегами по лаборатории и не только).
3. д.б.н. А.А. Кособрухов, Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр Пушчинский научный центр биологических исследований РАН», г. Пушкино.
4. д.б.н. Б.Р. Кулуев, Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение ФГБНУ Уфимского федерального исследовательского центра РАН, г. Уфа.
5. к.б.н. Ю.С. Букин, ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск (1. В автореферате встречается ряд аббревиатур (АБК, ГК, БС и др.), которые никак не расшифровываются при первом упоминании, также нет раздела расшифровки сокращений, что затрудняет восприятие текста. 2. На рисунке 1 из легенды и подрисуночной подписи непонятно, в чем измеряются уровни экспрессии генов, аббревиатура LFC в легенде рисунка и подрисуночной подписи не расшифровывается).
6. к.б.н. П.Б. Дроздова, НИИ биологии ФГБОУ ВО «Иркутский государственный университет», г. Иркутск. (1. Автор несколько злоупотребляет сокращениями, которые не расшифрованы (LFC, БС, ORF и с/е) и понятны с первого взгляда, вероятно, только специалистам в соответствующей области. 2. Из текста автореферата невозможно понять, чем отличаются линии OEM15 и OEM20, и поэтому возникает очень много вопросов о такой значительной разнице между этими образцами по результатам анализа профилей экспрессии. В статье, ссылка на которую дана в автореферате, таких обозначений тоже нет, и только из диссертации можно выяснить, что отличие заключалось в числе копий трансгена, которое и может объяснять наблюдаемую разницу).
7. к.б.н. Д.А. Кнорре, НИИ физико-химической биологии А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва.

8. к.б.н. В.Е. Творогова, ФГБОУН «Санкт-Петербургский государственный университет», г. Санкт-Петербург (существуют ли данные о работе и функциях RPOТmp у немодельных видов, в частности, хозяйственно значимых культур? Как можно оценить возможность использования мутантов по ортологичным генам у этих видов в качестве реципиентов генетических конструкций для трансформации митохондрий?).
9. д.б.н. А.Б. Щербань, ФИЦ «Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск (выводы слишком подробные, можно короче, без излишней детализации).
10. д.б.н. Е.В. Гармаш, Институт биологии – обособленное подразделение ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар (в автореферате и, главным образом, в диссертации имеются стилистические ошибки и несогласованные предложения. Список литературы представлен исключительно англоязычными ссылками, тогда как сведения, представленные в Обзоре литературы, целесообразно было также подкрепить ссылками на работы отечественных ученых).
11. д.б.н. Т.К. Головкин, Институт биологии – обособленное подразделение ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар (на основе плазмиды созданы генетические конструкции, содержащие ген под управлением промотора митохондриальных генов, произведен их импорт в изолированные митохондрии арабидопсиса. К сожалению, этим важным результатам в автореферате уделено недостаточно внимания, в то время как создание такой конструкции открывает перспективу расширения работ по трансформации и селекции трансформированных митохондрий).
12. к.б.н. Л.В. Суханова, ФГБУН Лимнологический институт СО РАН, г. Иркутск (в тексте автореферата допущены некоторые стилистические и лексические погрешности).
13. д.б.н. Г.В. Шпаковский, НИЦ «Курчатовский институт», г. Москва.
14. к.б.н. И.В. Уколова, ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, г. Иркутск (1) В подписях к рисункам 3, 4 и 7 стоило указать программы, в которых были построены и созданы сети и изображения. 2) На рисунке 7 на представленной электрофореграмме в области комплекса I и суперкомплекса I₁III₂ визуализируются по две электрофоретические полосы вместо одной, однако массы указаны только для одной из двух полос. Есть ли у автора предположения относительно природы вторых электрофоретических полос в области указанных структур? Проводился ли расчет их молекулярных масс? 3) Из данных, представленных в тепловой карте на рисунке 1, следует, что у линии OEM15 с гиперэкспрессией RPOТmp наблюдался повышенный уровень 25 митохондриальных транскриптов. В то же время у другой линии OEM20 с гиперэкспрессией RPOТmp не отмечено подобного повышения транскриптов. С чем могут быть связаны подобные противоречия?).

Соискатель имеет 9 научных работ, из них 5 статей в рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ, также включенных в международные базы научного цитирования Web of Science и Scopus.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Tarasenko V.I. Differential Expression of a Foreign Gene in Arabidopsis Mitochondria In Organello / V. I. Tarasenko, T. A. Tarasenko, **I. V. Gorbenko**, Yu. M. Konstantinov, M. V. Koulintchenko // Mol. Biol. – 2023. – V. 57, N 1. – P. 447-456.
2. **Gorbenko I.V.** Overexpression of RPOТmp Being Targeted to Either Mitochondria or Chloroplasts in Arabidopsis Leads to Overall Transcriptome Changes and Faster Growth / I. V. Gorbenko, V. I. Tarasenko, E. Y. Garnik, T. V. Yakovleva, A. I. Katyshev, V. I. Belkov, Yu. L. Orlov, Yu. M. Konstantinov, M. V. Koulintchenko // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – V. 25, N 15. – P. 8164.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработаны новые положения, вносящие вклад в представления о контролирующей роли фермента РНК-полимеразы двойной адресации RPOТmp в экспрессии генов пластид и митохондрий и о его связи с состоянием покоя семян, метаболизмом и рецепцией фитогормонов, регуляцией роста и цветения растений;

предложены схемы клеточных событий, происходящих при избытке или отсутствии РНК-полимеразы RPOТmp. Предложенные схемы объясняют связь между экспрессией подконтрольных для RPOТmp генов с физиологическими характеристиками трансгенных растений;

доказана роль RPOТmp в транскрипции 3 генов пластид и 25 генов митохондрий модельного растения *A. thaliana*;

показано, что отсутствие функциональной РНК-полимеразы RPO7mp запускает ранее неописанный сигнальный путь от генетической системы митохондрий, который изменяет экспрессию ядерных генов. Активация этого пути у *A. thaliana* приводит к таким физиолого-биохимическим последствиям, как изменение формы и размера листьев, развитие стрессового состояния, замедление скорости прорастания семян, замедление роста и развития растений.

Теоретическая значимость работы обоснована тем, что:

показана связь активности РНК-полимеразы двойной адресации RPO7mp с процессами рецепции и метаболизма фитогормонов, что изменяет физиологические и биохимические характеристики растения; **показано**, что отсутствие функциональной RPO7mp запускает ранее неописанный путь регуляции экспрессии ядерных генов, вызываемый сигналом от генетической системы митохондрий. **Применительно к проблематике диссертации с получением обладающих новизной результатов в области физиологии и биохимии растений использован** комплекс современных подходов и методов исследования, включающих молекулярно-биологические, транскриптомные, биоинформатические и физиологические методы; **впервые** исследован полный транскриптом растений с гиперэкспрессией РНК-полимеразы двойной адресации RPO7mp в митохондриях (ОЕМ15) и хлоропластах (ОЕР12). **Впервые** у *A. thaliana* проанализированы физиологические последствия, вызываемые скоординированными изменениями в экспрессии генов, которые происходят при избытке или отсутствии функциональной RPO7mp. **Впервые** для анализа сетей белок-белковых взаимодействий было применено одновременно несколько метрик центральности. **Впервые** были проанализированы в совокупности скоординированная экспрессия групп генов *A. thaliana*, белок-белковые контакты и контроль экспрессии генов транскрипционными факторами, что вносит ясность в генетический контроль физиолого-биохимических характеристик растения. **Впервые** показано, что митохондрии растений, мутантных по гену *rpotmp*, содержат функциональный комплекс I электронно-транспортной цепи митохондрий в форме суперкомплекса I+III₂. **Впервые** получены генетические конструкции, содержащие ген зеленого флуоресцентного белка под управлением промоторов генов *Cox1* и *Rrn26* из митохондриального генома *A. thaliana*. Проведен их успешный импорт в изолированные митохондрии *A. thaliana* и **впервые** показано, что эффективность транскрипции чужеродного гена в системе импорта ДНК в митохондрии *in organello* зависит от используемого промотора.

разработаны схемы клеточных событий, которые демонстрируют связь между избытком или отсутствием функциональной RPO7mp в митохондриях или пластидах с проявляемыми растениями физиолого-биохимическими характеристиками: изменением чувствительности к абсцизовой кислоте, изменением чувствительности к NaCl, изменением скорости прорастания семян, изменением глубины состояния эндогенного покоя семян, изменением скорости начала цветения растений.

раскрыты связи активности РНК-полимеразы RPO7mp с рецепцией фитогормонов: ауксинов, абсцизовой кислоты, гибберелловой кислоты и брассиностероидов;

изучены ансамбли генов со скоординированной экспрессией, которые возникают при изменении количества активной RPO7mp в митохондриях и пластидах у модельного представителя высших растений *A. thaliana*;

изучена связь между отсутствием функциональной RPO7mp и развитием стрессового состояния, которое проявляется в повышении чувствительности к абсцизовой кислоте и к солевому стрессу, в трансформации метаболизма и рецепции фитогормонов, вероятно, вследствие изменения активности группы транскрипционных факторов семейства NAC;

проведена формулировка дополнений к существующим представлениям о транскрипционной активности RPO7mp в митохондриях и в пластидах и ее связи с физиологическими и биохимическими характеристиками растений.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

получены данные о приобретении трансгенными растениями с повышенным количеством активного фермента RPO7mp улучшенных хозяйственно-ценных характеристик (стрессоустойчивость, раннее цветение, ускоренный рост), что позволяет создать новые перспективные линии трансгенных растений для нужд сельского хозяйства.

показана экспрессия чужеродного гена в митохондриях *in organello*, что является важным этапом в разработке трансформации митохондриального генома растений, которая позволит

получать новые перспективные трансгенные линии с улучшенными хозяйственно-ценными признаками.

представлены материалы, которые могут быть использованы для создания курсов лекций по физиологии и биохимии растений, молекулярной биологии и биоинформатике на кафедрах соответствующего профиля.

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 апробированных методик. Заключение о достоверности результатов основано на статистической обработке экспериментальных данных;

теория основана на имеющихся в литературе и депонированных в рецензируемых базах данных сведениях о регуляции экспрессии генов растений на различных уровнях, структуре растительного генома и функциях продуктов генов;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных другими исследователями по физиологии и биохимии растений;

установлены связь РНК-полимеразы RPO7mp в клетке с регуляторными ансамблями, причастными к управлению состоянием покоя семян, рецепцией и метаболизмом абсцизовой кислоты, гиббереллинов, брассиностероидов и ауксинов, к регуляции роста растений и цветения.

использованы современные методики сбора и обработки информации с использованием ресурсов PubMed, ScienceDirect, Web of Science и др., специализированных баз данных TAIR, PlantGSAD, ATTED-II и др., а также специализированного свободного программного обеспечения, депонированного в Github, CRAN, Bioconductor и др.

Выполненная работа **полностью соответствует** направлениям паспорта научной специальности 1.5.21 - Физиология и биохимия растений: (2) Геном растений, регуляция экспрессии генома; транскрипция; трансляция, пост-транскрипционные и посттрансляционные механизмы, (6) Сигнальные системы клеток и целых растений, рецепция и трансдукция внутренних и внешних сигналов (фоторецепция, гормональная, гуморальная и биоэлектрическая регуляция), (9) Генная инженерия растений, физиология трансгенных растений, получение хозяйственно-ценных генотипов.

Личный вклад соискателя состоит: в планировании и проведении экспериментов, статистической обработке, глубоком информационном анализе, обобщении и интерпретации полученных данных, в написании статей, опубликованных по результатам работы, а также в апробации результатов исследования в ходе выступления на конференциях международного уровня.

В ходе защиты диссертации соискатель аргументированно ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы.

На заседании 24 декабря 2024 г. диссертационный совет за решение научной задачи, имеющей значение для развития отрасли знаний биологические науки по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений, принял решение присудить Горбенко Игорю Владимировичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 16 человек, из них 15 докторов наук по специальности 1.5.21 – физиология и биохимия растений, участвующих в заседании, из 17 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту – 0 человек, проголосовали: за - 16, против - 0, ~~недействительных бюллетеней - 0.~~

Председатель
диссертационного совета
№ 24.1.210.01
д. б. н., профессор

Ученый секретарь
диссертационного совета
№ 24.1.210.01
к. б. н.



Войников В. К.

Коротаева Н. Е.

26.12.2024