

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ  
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ  
БИОЛОГИИ**

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИМКБ СО РАН)

пр. Академика Лаврентьева, д. 8/2, Новосибирск, 630090  
телефон (383) 3639042, факс (383) 3639078  
e-mail: [info@mcb.nsc.ru](mailto:info@mcb.nsc.ru)  
<http://www.mcb.nsc.ru>  
ОКПО 30781167, ОГРН 1115476157070,  
ИНН / КПП 5408291757 / 540801001

27.11.2024 № 15318–6215

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИМКБ СО РАН, д.б.н.

С.А. Демаков

« 27 » ноября 2024 г.

### ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертацию Горбенко Игоря Владимировича на тему: “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 работы.** Две растительные органеллы, митохондрии и пластиды, имеют собственные геномы, которые вместе с ядерным геномом участвуют в контроле и регуляции важнейших энерготрансформирующих процессов. Установлено, что транскрипция генов митогенома и генома пластид у двудольных растений реализуется с помощью трех кодируемых ядерным геномом и импортируемых из цитозоля РНК-полимераз фагового типа: *RPOТm*, *RPOТp* и *RPOТmp*. Две РНК-полимеразы, *RPOТm* и *RPOТp*, осуществляют транскрипцию только митохондриальных либо пластидных генов, тогда как *RPOТmp* имеет особенный транзитный пептид, направляющий импорт фермента из цитозоля как в митохондрии, так и в хлоропласты. Хотя участие *RPOТmp* в митохондриальной транскрипции подтверждено в ряде работ, четкого разделения митохондриальных генов на *RPOТm*-зависимые и *RPOТmp*-зависимые не установлено. В пластидах двудольных растений функция *RPOТmp* остается также слабо изученной. Известно, что гены пластид и митохондрий могут находиться под управлением нескольких различных промоторов, что предполагает конкурирующую или совместную транскрипцию генов различными типами ферментов. Таким образом, локализация и активность фермента *RPOТmp* связана с обоими растительными органеллами, которые существенно различаются по своим структуре и функциям. Поэтому выяснение роли

RPOТmp в осуществлении ядерного контроля транскрипции генов этих органелл имеет значительный научный интерес.

Исследования молекулярных механизмов физиологической регуляции экспрессии генов митохондрий и пластид в последние годы приобретают особую актуальность в связи с перспективами использования методов и подходов геномного редактирования для улучшения хозяйственно-ценных признаков. В отличие от пластид генетическая трансформация растительных митохондрий является нерешенной задачей, что служит препятствием в исследованиях сложных механизмов регуляции генной экспрессии в этих органеллах. Выяснение роли RPOТmp в осуществлении ядерного контроля транскрипции генов этих органелл может стать основой для создания модельной системы трансформации митохондрий растений *in vivo* и иметь прикладное значение. Таким образом, актуальность темы диссертационной работы И.В.Горбенко, посвященной изучению роли RPOТmp в регуляции экспрессии белков митохондрий и пластид, не вызывает сомнений.

**Научная новизна исследования.** Автором впервые исследовано влияние повышенного содержания РНК-полимеразы RPOТmp в митохондриях и хлоропластах растений арабидопсиса с гиперэкспрессией РНК-полимеразы RPOТmp на транскриптом, а также на рост и развитие растений. Детально изучена роль RPOТmp в регуляции раннего развития растений арабидопсиса при действии факторов, оказывающих влияние на прорастание семян (абсцизовая кислота, солевой стресс). Осуществлен анализ ко-экспрессии генов, вызываемой гиперэкспрессией или отсутствием функциональной RPOТmp у арабидопсиса, что расширяет представление о процессах и регуляторных путях, в которых потенциально участвует данный фермент. Для анализа сетей белок-белковых взаимодействий соискатель впервые применил одновременно несколько метрик центральности и проанализировал связи между скоррелированной экспрессией, белок-белковыми взаимодействиями и мишенями транскрипционных факторов. Горбенко И.В. показал, что мутантное растение *rpotmp* содержит функциональный комплекс I в форме суперкомплекса I+III<sub>2</sub>. Им получены генетические конструкции и показана дифференциальная экспрессия с них чужеродного гена в системе импорта ДНК в митохондрии *in organello*.

**Практическая значимость работы.** Практическое значение работы И.В.Горбенко заключается в определении влияния гиперэкспрессии RPOТmp на раннее прорастание, ускоренный рост и раннее цветение растений, что позволяет использовать этот феномен для получения новых трансгенных растений с улучшенными хозяйственно-ценными

свойствами. Выявленная роль *RPO7mp*, а также связь данного фермента с различными клеточными процессами, делают перспективным использование гена *RPO7* в качестве репортерного гена для решения на актуальной задаче – трансформации митохондрий – с помощью системы импорта ДНК в митохондрии.

**Структура и общая характеристика диссертации.** Работа представляет собой законченное исследование, которое по оформлению отвечает предъявляемым к кандидатским диссертациям требованиям. Она изложена на 154 страницах и состоит из списка сокращений, введения, трех глав, заключения, выводов, списка использованной литературы, включающего 444 источника, и приложений. Работа иллюстрирована 46 рисунками и 6 таблицами.

**Материалы автореферата и 5 публикаций по теме диссертации** достаточно полно отражают содержание диссертационной работы. Работа И.В. Горбенко успешно прошла апробацию на 4-х международных конференциях (*PlantGen2019*, *BGRS-SB2020*, *PlantGen2021*, *Chromosoma2023*) и на отчетной сессии Института (2023).

**Во введении** автор обосновывает актуальность исследования физиологической роли *RPO7mp* в регуляции экспрессии белков митохондрий и пластид и формулирует цель работы. Обосновывается положение о том, что результаты диссертационного исследования могут послужить основой для создания модельной системы трансформации митохондрий растений *in vivo*. В этом же разделе приведены сведения об апробации научных результатов исследования.

**Первая** глава «Обзора литературы» включает 9 разделов с описанием современных представлений о биохимической организации пластид и митохондрий высших растений, включая генетический аппарат этих полуавтономных органелл. В первом разделе дано описание структуры и функций ДНК-содержащих органелл растительной клетки – пластид и митохондрий. Во втором разделе охарактеризованы особенности транскрипционного аппарата органелл, состоящего как из РНК-полимераз фагового типа ядерного кодирования (митохондрии и пластида), так и из РНК-полимеразы эубактериального типа органелльного кодирования (пластида). В третьем разделе описаны особенности транскрипции генов в растительных митохондриях, рассматриваются характеристики промоторов митохондриальных генов. Четвертый раздел посвящен особенностям транскрипции генов пластид и содержит информацию о пластидных промоторах и транскрипционных факторах пластид. В пятом разделе приведены известные данные о роли органелльных РНК-полимераз ядерного кодирования в раннем развитии растений. В шестом разделе дано описание особенностей

взаимодействия трех геномов растительной клетки - ядерного, пластидного и митохондриального, механизмы антероградной и ретроградной регуляции экспрессии генов. В седьмом разделе приведены подробные сведения о структуре и функциях комплексов дыхательной цепи растительных митохондрий, их супрамолекулярной организации в виде суперкомплексов. В восьмом разделе описан метод, которым были получены трансгенные растения, использованные в работе. В последнем девятом разделе «Заключение обзора литературы» сделано заключение об актуальности исследования РНК-полимеразы двойной адресации RPO7mp в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий у растений *Arabidopsis thaliana*, формулированы цель и задачи исследования, а также выносимые на защиту положения. В целом обзор литературы написан с привлечением всей имеющейся современной литературы на 55 страницах очень добротной, если не сказать чрезмерно подробно, глубоко и обширно, что подтверждает рекордное количество - 444 процитированных источников.

Во **второй** главе «Материалы и методы» дается описание методов клеточной, молекулярной биологии и биоинформатики, которые использованы автором в ходе исследования. Глава включает 12 разделов. В последнем разделе описана статистическая обработка данных.

**Третья** глава содержит описание результатов и их обсуждение. Глава состоит из пяти разделов. Первый из них включает 11 подразделов и посвящен биоинформатическому анализу транскриптомных данных, полученных методом ДНК-микрочипирования. Раздел включает в себя общую характеристику транскриптомных данных, анализы обогащения Генной Онтологии и метаболических путей KEGG. В нем детально рассмотрены экспрессия отдельных групп генов – транскрипционных факторов, белков митохондрий и пластид, PPR-белков. Девятый подраздел содержит результаты анализа ко-экспрессии генов с описаниями пяти выделенных модулей ко-экспрессии, полученных сетей белок-белковых взаимодействий и предполагаемого контроля модулей транскрипционными факторами. Десятый подраздел посвящен анализу скоррелированной экспрессии генов с помощью минимального остовного дерева и методов анализа сетей. Одиннадцатый подраздел содержит комбинированные сети, синтезированные автором на основании практически всей полученной из транскриптомных данных информации. Во втором разделе дается описание результатов экспериментов по изучению всхожести семян трансгенных растений на средах, содержащих фитогормон – абсцизовую кислоту, или NaCl. В третьем разделе обсуждаются данные о супрамолекулярной организации дыхательной цепи митохондрий исследуемых линий трансгенных растений, полученные с помощью голубого нативного

электрофореза, двумерного электрофореза и вестерн-блоттинга. В четвертом разделе приводятся данные о супрамолекулярной организации ЭТЦ пластид изучаемых линий. Пятый раздел посвящен сборке генетических конструкций, содержащих ген зеленого флуоресцентного белка из медузы *Aequoria victoria* под управлением промоторов генов *Rrn26* и *Cox1* митогенома *Arabidopsis thaliana*.

В разделе **Заключение** автор приводит две результирующие схемы, поясняющие клеточные события, которые происходят при гиперэкспрессии RPOТmp или недостатке данной РНК-полимеразы и резюмирует результаты проведенного исследования.

**Выводы.** Полученные выводы полностью соответствуют целям и задачам работы, а их достоверность не вызывает сомнений.

**Замечания.** В оформлении работы (в тексте диссертации и автореферата) наблюдается несоответствие между количеством задач, поставленных в исследовании (пять), и количеством положений, выносимых на защиту (два), что объясняется, по-видимому, скромностью соискателя. В первом положении декларируется наличие роли RPOТmp в различных процессах, происходящих в клетке *Arabidopsis thaliana*, без конкретного определения, в чем же состоит эта роль. Во втором положении дается более конкретное описание тех процессов, что происходят в растениях в отсутствии функциональной RPOТmp. 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.

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.

Замечания носят рекомендательный характер и не снижают общего положительного впечатления от работы.

### **Заключение**

В целом, диссертация Игоря Владимировича Горбенко «Роль РНК-полимеразы двойной адресации RPOТmp *Arabidopsis thaliana* в регуляции экспрессии белков пластид и митохондрий» является законченным научно-квалификационным исследованием, выполненным автором самостоятельно, на высоком научном и методическом уровне, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний. Важно отметить, что полученные автором результаты

могут быть использованы в дальнейшем в исследованиях по созданию системы генетической трансформации митохондрий растений.

Основные результаты, полученные Горбенко И.В., опубликованы в изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus.

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 вполне 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 «Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» 25 ноября 2024 года, протокол № 2.

д.б.н.



А.В. Вершинин

27.11.2024

Сведения о составителе отзыва: Вершинин Александр Васильевич, д.б.н. (03.01.07 – молекулярная генетика), заведующий лабораторией молекулярной генетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» (ИМКБ СО РАН). Адрес: 630090, Новосибирск, пр-т Ак. Лаврентьева, 8/2, тел.: +7(383) 363-90-46, e-mail: [avershin@mcb.nsc.ru](mailto:avershin@mcb.nsc.ru)

Сведения о лице, утвердившем отзыв: Демаков Сергей Анатольевич, доктор биологических наук (03.02.07 – генетика), директор ИМКБ СО РАН