

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

Созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 14 июня 2023 г. №16

О присуждении **Ляпиной Ирине Сергеевне**, гражданство РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений» по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология принята к защите 13 апреля 2023 г. (протокол № 13) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (адрес: 117997, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Ляпина Ирина Сергеевна, 12 мая 1995 года рождения. В 2019 году соискатель окончила магистратуру Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева (РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева) г. Москва. В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории системного анализа белков и пептидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и обучается в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук с окончанием обучения в 2023 году. Диссертация выполнена в лаборатории системного анализа белков и пептидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - доктор биологических наук, Фесенко Игорь Александрович, ведущий научный сотрудник лаборатории системного анализа белков и пептидов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории функциональной геномики; **Побегуц Ольга Владимировна**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика

Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, старший научный сотрудник лаборатории протеомного анализа дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, в своем положительном отзыве, подписанном к.б.н. Марией Семеновной Ганчевой, научным сотрудником лаборатории геномной и клеточной инженерии растений СПбГУ (НЦМУ «Агротехнологии будущего»); ВНИИСХМ, лаб. №8; ВИР, лаб. «Центр генетических технологий», и утверждённом к.ф.-м.н., доцентом, проректором по научной работе СПбГУ Микушевым Сергеем Владимировичем, указала, что диссертационное исследование Ляпиной Ирины Сергеевны является законченной научно-квалификационной работой и соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в редакции Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание степени кандидата биологических наук, а ее автор, Ляпина Ирина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология.

Соискатель имеет семь опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано шесть работ общим объемом 6 печ.л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Ляпина И.С. внесла основной либо существенный вклад:

1. Mamaeva* A., **Lyapina* I.**, Knyazev A., Golub N., Mollaev T., Chudinova E., Elansky S., Babenko V., Veselovsky V., Klimina K., Gribova T., Kharlampieva D., Lazarev V., Fesenko I. RALF peptides modulate immune response in the moss *Physcomitrium patens*. Front. Plant Sci. 2023, 14:1077301. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1077301>

2. **Lyapina I.**, Ivanov V. and Fesenko I. Peptidome: Chaos or Inevitability. Int. J. Mol. Sci. 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms222313128>

3. **Lyapina I.**, Filippova A., Kovalchuk S., Ziganshin R., Mamaeva A., Lazarev V., Latsis I., Mikhalechik E., Panasenko O., Ivanov O., Ivanov V., Fesenko I. Possible role of small secreted peptides (SSPs) in immune signaling in bryophytes. Plant Mol Biol. 2021 Mar 13. <https://doi:10.1007/s11103-021-01133-z>

4. **Lyapina I.**, Filippova A. and Fesenko I. The Role of Peptide Signals Hidden in the Structure of Functional Proteins in Plant Immune Responses. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 4343. <https://doi:10.3390/ijms20184343>

5. Fesenko, I., Azarkina, R., Kirov, I., Kniazhev, A., Filippova, A., Grafkskaia, E., Lazarev, V., Zgoda, V., Butenko, I., Bukato, O., **Lyapina I.**, Nazarenko D., Elansky S., Mamaeva A., Ivanov V. and Govorun V. Phytohormone treatment induces generation of cryptic peptides with

antimicrobial activity in the Moss *Physcomitrella patens*. BMC Plant Biol. 2019, 19, 9. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1611-z>

6. Filippova* A, **Lyapina* I**, Kirov I, Zgoda V, Belogurov A., Kudriaeva A., Ivanov V., Fesenko I. Salicylic acid influences the protease activity and posttranslational modifications of the secreted peptides in the moss *Physcomitrella patens*. J Pep Sci. 2019;25:e3138. <https://doi.org/10.1002/psc.3138>.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н., доцента **Голденковой-Павловой Ирины Васильевны**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Нет данных, подтверждающих, что получены нокаутные линии, даже ссылка не приведена, хотя в разделе «Материалы и Методы» описано получение таких нокаутных линий. Как было доказано, что нокаутные линии мха по соответствующим генам прекурсоров пептидов, полученные методом геномного редактирования, имеют нокауты именно в целевых генах? Какие нокауты (их локализация) были сделаны в целевых генах? И являются ли они гомозиготными нокаутными линиями?

2. На основании каких соображений или данных выбраны: сами патогены и их концентрации для заражения растений мха? Как проводили обработку растений мха патогенами?

3. Как рассчитывали относительное количество мРНК целевых генов, по методу $\Delta\Delta Ct$ (в разделе Материалы и Методы не указано)?

4. Важные данные получены соискателем на основе получения и анализа транскриптомных и пептидомных исследований, тем не менее, в диссертации не представлены сведения о размещении первичных транскриптомных и пептидомных данных в открытых базах данных, с указанием ID, или сводных таблицах, например, в Приложении к диссертации. Что было бы уместным для того, чтобы оценить качество и количество полученных данных, и как следствие, обоснованность сделанных заключений.

5. Соискатель в работе отмечает «мы отобрали ряд новых многообещающих кандидатов сигнальных пептидов для дальнейшего синтеза и функционального анализа. Среди них были пептиды от белков-прекурсоров Pp3c14_22870V3.1.p, Pp3c21_4350V3.1.p, а также из Pp3c13_3880V3.1.p и Pp3c17_15750V3.1.p». Тем не менее, не все они были исследованы соискателем, и возникает вопрос, на чем основан выбор кандидатных сигнальных пептидов, которые были включены в дальнейший анализ?

Отзыв официального оппонента к.б.н. **Побегуц Ольги Владимировны**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Учитывал ли автор диссертации при анализе генома мха с целью поиска генов-предшественников биологически-активных пептидов геном хлоропластов? Если нет, то по какой причине?

2. Не может ли такая модификация пептидов, как гидроксирование пролина, быть следствием условий пробподготовки образцов пептидомов для масс-спектрометрического анализа?

3. Непонятно, по каким критериям из новых, выявленных в данной работе эндогенных пептидов, автором были отобраны для дальнейшего анализа два пептида INI и EAA?

4. Как автор может объяснить, что для анализа биологической активности этих пептидов (INI и EAA), используются довольно большие концентрации соответствующих им синтетических аналогов при обработке растений мха (1 мкМ и 5 мкМ)? Обычно для обработки растений используют наномолярные концентрации биологически активных пептидов.

5. В работе отсутствует список сокращений.

6. В работе присутствуют неудачные упрощенные словосочетания, такие как «защитные гены», «мы также обнаружили некоторых представителей семейства белков экспансинов, которые повышались в зараженных растениях», «эндогенные внеклеточные пептиды».

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Методы в работе написаны очень подробно, но нет таблицы с последовательностями праймеров. Для работы использовались праймеры, подобранные автором или использовались только взятые из литературных источников?

2. Выявлены ли рецепторы пептидов PpRALF? Известны ли сайты, необходимые для рецепции пептидов в рецепторах и если да, отличаются ли они у арабидопсиса и мха?

3. Есть ли изменения в фенотипе растений мха, нокаутных по генам *PpRALF*? Сколько нокаутных линий было получено?

4. Выявлена ли дифференциальная экспрессия генов *RALF* в проанализированных транскриптомах?

Отзыв на автореферат д.б.н., доцента, заведующей лабораторией молекулярно-генетических основ иммунитета растений Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН **Одинцовой Татьяны Игоревны**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «Из недостатков можно отметить неудачную, на мой взгляд, классификацию предшественников КСП в Таблице 1 и разделение их на «Известные КСП», «Вероятно известные КСП» и «Предположительные КСП». Остаются непонятными различия между этими группами. Следует также указать на невысокое качество Рис. 8 с множественным выравниванием последовательностей рецепторов PEPR, поскольку последовательности нечитаемы.»

Отзыв на автореферат к.б.н., ведущего научного сотрудника, руководителя группы репродуктивной биологии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» **Захаровой Екатерины Владимировны**. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: «К работе есть одно небольшое замечание, необходимо указать автора классификатора в латинских названиях, хотя бы при первом упоминании в тексте.»

Отзыв на автореферат к.б.н., доцента кафедры биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования

«Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева) **Поливановой Оксаны Борисовны**. Отзыв положительный, без замечаний.

Отзыв **на автореферат** к.б.н., доцента кафедры биотехнологии и микробиологии института фармации, химии и биологии Белгородского национального исследовательского университета **Масловой Е.В.** Отзыв положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии, геной инженерии и протеомики, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации – СПбГУ – ведутся исследования в области молекулярной биологии, а также проводятся работы по изучению роли сигнальных пептидов в развитии растений с применением методов клеточной и геной инженерии. Официальный оппонент **Голденкова-Павлова Ирина Васильевна** является ведущим специалистом в области геной инженерии растений, а также занимается изучением физиологической роли генов и вариаций их экспрессии на экспериментальных моделях растений, выявлением регуляторных кодов и модуляции экспрессии генов растений и разработкой новых биотехнологий на основе принципов биохимической организации живых систем. Официальный оппонент **Побегуц Ольга Владимировна** является специалистом в области протеомики и занимается исследованиями закономерностей организации, функционирования и взаимодействия биологических систем на уровне генома, транскриптома, протеома и метаболома. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований была разработана схема поиска не идентифицированных ранее семейств биоактивных пептидов, объединяющая несколько известных подходов: геномный, транскриптомный и пептидомный анализы. В ходе выполнения данной работы диссертантом впервые был проведен биоинформатический поиск гомологов коротких секретлируемых пептидов покрытосеменных растений у пяти видов бриофитов. Также было показано, что биотический стресс, такой как заражение патогенами, может индуцировать экспрессию генов предшественников коротких секретлируемых пептидов модельного растения - *P. patens*, а также транскриптов, расположенных на длинных некодирующих РНК. Диссертантом впервые был проведен функциональный анализ одного из представителей известного семейства коротких секретлируемых пептидов, RALF, аннотированного в геноме модельного растения *P. patens*. Впервые была показана роль представителей данного семейства в ответе на биотический стресс у несосудистых растений. Диссертантом была разработана методика пептидомного анализа для поиска кандидатов биоактивных пептидов в модельном растении *P. patens*, которая также может быть использована для других растений. Кроме того, были идентифицированы кандидаты биоактивных пептидов мха и показано их потенциальное участие в иммунном ответе мха. Диссертантом впервые обнаружены гомологи рецепторов известного пептида PEP - PEPR,

найденного у многих видов покрытосеменных, в геноме мха *P. patens*, также было показано, что они могут участвовать в сигналинге этого пептида.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что результаты данной работы вносят вклад в изучение механизмов иммунного ответа растений, а также развитие пептидомики растений. Диссертантом было показано, что растения имеют консервативную систему пептидного сигналинга, компоненты которой обнаружены у споровых растений, что может указывать на роль этой системы в освоении растениями суши. В ходе исследований было показано, что стрессовые условия меняют внеклеточные пептидомы растений, стимулируя образование пептидов, обладающих биологической активностью. Кроме того, диссертантом было показано, что гомологи известных семейств пептидов или рецепторов покрытосеменных могут выполнять те же функции в неспоровых растениях, проливая свет на вопросы эволюции соответствующих генов.

Значение полученных соискателем результатов исследования **для практики** подтверждается тем, что полученные результаты могут быть использованы для разработки экологически безопасной системы защиты растений от стрессовых воздействий. Представленная схема поиска новых биоактивных пептидов может быть применена на других растениях для идентификации перспективных регуляторов роста и биопрепаратов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что исследования проводились с использованием современных научных методов, экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована, при анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и проведении экспериментов с применением методов пептидомики, транскриптомики, геной инженерии и молекулярной биологии, а также в обработке и анализе полученных данных. Соискатель принимал участие в подготовке и написании публикаций и представлении результатов исследования на российских и международных конференциях. Синтетические кандидаты биоактивных пептидов и данные об антимикробной активности, а также данные секвенирования РНК были получены в сотрудничестве с лабораторией генетической инженерии ФНКЦ ФХМ. Опыты по заражению растений были проведены совместно с сотрудниками Агробиотехнологического департамента РУДН, к.б.н. Чудиновой Е.М. и д.б.н. Еланским С.Н., а также студентом Моллаевым Т.Д.. Нокаутные линии по генам *PpRALF* были получены сотрудником лаборатории системного анализа белков и пептидов ИБХ к.б.н. Князевым А.Н.. Также в исследовании была использована нокаутная линия мха по гену рецептора *δcerk1*, предоставленная доктором С. Брессендорффом (Копенгагенский университет, Дания).

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Ляпиной Ирины Сергеевны является законченной научно-квалификационной работой, посвященной важным аспектам молекулярной биологии растений – поиску и идентификации эндогенных пептидов, участвующих в регуляции иммунного ответа, и изучению пептидного сигналинга растений. Работа написана автором самостоятельно,

содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа Ляпиной Ирины Сергеевны «Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. В чем заключается новизна подхода биоинформатического анализа с помощью алгоритма SPADA, основанного на скрытых марковских моделях, ведь многие используют поиск по гомологии. Также он спросил, имеет ли значение предсказание 3D структур пептидов для определения их функции.

2. Насколько известной является пара лиганд-рецептор PEP1-PEPR1, упомянутая в работе, и являются ли найденные соискателем ортологи рецептора PEPR1 у мха также рецепторами для пептидов из мха.

3. Нет ли у пептидов семейства PEP консервативного мотива и как они связываются со своими рецепторами. Также был задан вопрос, как предсказывалась 3D структура последовательностей в работе.

4. Каким способом синтезировали пептиды PEP1 и какова была их длина, и где можно найти списки обнаруженных соискателем последовательностей. Кроме того, был задан вопрос о том, в какой точке был взят исследуемый транскриптом после заражения патогеном, как выбиралась эта точка и были ли сделаны биологические повторы.

Соискатель Ляпина И.С. ответила на задаваемые ему в ходе заседания вопросы:

1. Поиск с помощью инструмента SPADA ранее проводился только на покрытосеменных растениях, в связи с чем использование его на бриофитах позволяет выявить не аннотированные ранее семейства и показать различия между сосудистыми и несосудистыми растениями. На второй вопрос Ляпина И.С. ответила, что пространственная структура важна для функциональной активности пептидов, поэтому предсказание и сравнение структур новых кандидатов биоактивных пептидов с уже известными может дать представление об их функции.

2. Пара PEP1-PEPR1 является достаточно хорошо изученной системой пептидного иммунного сигналинга, особенно у растений *Arabidopsis*, однако пептиды семейства PEP отличаются высокой родоспецифичностью и в своей работе соискатель не смог их обнаружить у мха, а рецептор PEPR1 оказался более консервативным. Также соискатель добавила, что для проверки функций ортологов рецептора использовали обработку нокаутных по этому гену линий мха синтезированными пептидами PEP1 из *Arabidopsis*.

3. Ляпина И.С. подтвердила, что некий мотив имеется, но его недостаточно для поиска и, кроме того, для разных семейств растений они достаточно специфичны, но при этом их рецепторы и функция, которую они исполняют, достаточно консервативны, и что для

связи пептида с рецептором были обнаружены специфические консервативные сайты, которые соискатель и обнаружил в найденных в работе ортологах из мха. Ляпина И.С. также добавила, что 3D структура предсказывалась с помощью инструмента AlphaFold2.

4. Пептиды были получены путем химического синтеза и их длина составляла порядка 20 аминокислот. На второй вопрос Ляпина И.С. ответила, что последовательности могут быть найдены в свободном доступе в перечисленных публикациях соискателя, а именно в публикациях 2019 и 2021 года. На третий вопрос Ляпина И.С. ответила, что точка выбиралась в соответствии со стадией заражения, когда наблюдались отчетливое угнетение растения и признаки поражения патогеном, но растение все еще было живо, это было на седьмой день после заражения, и что было сделано три биологических повтора.

На заседании 14 июня 2023 г. диссертационный совет постановил за решение научной задачи по созданию схемы поиска и идентификации новых биологически активных пептидов растений, участвующих в регуляции иммунного ответа, а также по изучению роли пептидного сигналинга в растениях, имеющих важное значение для теоретических и практических исследований в области молекулярной биологии, присудить Ляпиной Ирине Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 8 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.

14 июня 2023 г.



Ефремов Роман Гербертович

Олейников Владимир Александрович