

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор по научной работе
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Санкт-Петербургский
государственный университет»

С.В. Микушев

2022 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о диссертации Игоря Александровича Фесенко
«Системный анализ пептидома растений
на примере мха *Physcomitrium patens*»,
представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность работы

Изучение молекулярных механизмов контроля функциональной активности пептидов обладает высокой актуальностью в свете относительно малой изученности данной проблемы, а также принципиально новых возможностей, открываемых современным уровнем техники для исследования не только отдельных пептидов, но и их совокупности – пептидома. Актуальность данной работы также обусловлена выбором объекта исследования – мха *Physcomitrium patens*, который является популярным модельным объектом, используемым также и в биотехнологии. Протеомы растений обладают высокой сложностью и включают значительное количество пептидов, многие из которых обладают ценными биологическими активностями, включая, например, бактерицидные и фунгицидные, поэтому

детальная характеристика пептидома *P. patens*, выполненная в настоящем исследовании, имеет действительно значительную актуальность, которая четко сформулирована автором во введении диссертационного исследования.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа имеет стандартную структуру, изложена на 252 страницах, содержит 86 рисунков, 9 таблиц и 394 ссылки на источники литературы.

Во введении И. А. Фесенко раскрывает актуальность и новизну исследования, уделяя особое внимание значительному прогрессу в исследованиях пептидов различных организмов, а также все возрастающему пониманию биологической значимости этих молекул и широкому репертуару их функциональной активности. Автор формулирует цель и задачи, которые посвящены комплексному исследованию пептидома *P. patens* в структурном, функциональном и эволюционном аспектах.

Обзор литературы диссертационного исследования посвящен анализу механизмов образования пептидов в клетках эукариот, описанию разнообразия функций пептидов растений, а также методологии исследования пептидомов как в контексте описания разнообразия слагающих их пептидов при помощи фракционирования с последующим масс-спектрометрическим анализом, так и изучения пептидных интерактонов. Обзор литературы достаточно детальный и хорошо структурирован.

Раздел «Материалы и методы» посвящен характеристике экспериментальных и вычислительных подходов, использованных в работе. Он весьма подробный, занимает около 40 страниц. Автор приводит детали экспериментальных протоколов, характеристику реактивов, тщательно описывает параметры биоинформатической обработки данных. Раздел производит благоприятное впечатление и может быть полезен для воспроизведения полученных результатов другими исследователями.

Центральный раздел диссертационного исследования «Результаты и обсуждение» изложен на 141 странице текста и содержит три основных подраздела. В первом из них И. А. Фесенко анализирует нативные пептидомы двух различных жизненных форм мха *P. patens*, в результате чего удастся установить, что пептидомы

этих растений включают в себя несколько тысяч пептидов, являющихся продуктами деградации белков, причем некоторые белки-предшественники образуют около ста нативных пептидов, располагающихся преимущественно в виде своеобразных «лесенок» в первичной структуре соответствующего белка. Примечательно, что автору удалось показать существенные отличия пептидомов двух исследованных жизненных форм мха и выявить ряд любопытных закономерностей, касающихся представленности пептидов, происходящих из различных функциональных групп белков или белков, отличающихся по локализации. Анализ возможных механизмов формирования клеточных пептидных пулов у мха позволил предположить вовлеченность в этот процесс различных групп ферментов, включая протеосомный комплекс, протеазы и олигопептидазы. Анализ пептидома секретома протонемы показал, что он происходит не только из мембранных и секретируемых белков, но и, частично, из белков с предполагаемой внутриклеточной локализацией. При этом анализ аминокислотного состава и физико-химических свойств показал существенные отличия у пептидов внутриклеточного и секретируемого пептидомов. Анализ механизмов формирования внеклеточного пептидома мха показал участие в нем ферментов сходных с теми, что участвуют в формировании внеклеточных пептидомов у животных, что свидетельствует в пользу возможной консервативности и функциональной значимости таких механизмов. Анализ пептидомов *P. patens* в условиях действия различных стрессирующих факторов выявил существенное изменение состава пептидомов, включая формирование пула уникальных пептидов, в том числе, обладающих биологическими активностями, такими как бактерицидная. Эти данные показывают, что пептидом растений является динамичной системой, принимающей, вероятно, участие в ответе на факторы стресса.

Далее И. А. Фесенко провел детальный анализ важного компонента пептидома *P. patens*, представленного продуктами трансляции коротких открытых рамок считывания. Для этого исследования были использованы оригинальные вычислительные подходы для предсказания коротких открытых рамок считывания с высоким кодирующим потенциалом и их классификации. В результате был охарактеризован пул пептидов, кодируемых короткими открытыми рамками

считывания, проанализированы особенности их структуры и функций. Особый интерес представляет выявленная группа пептидов, кодируемых открытыми рамками считывания, расположенными в длинных некодирующих РНК.

В следующей главе исследования автором была изучена биологическая активность некоторых из выявленных им пептидов. Антимикробные эффекты были показаны для пептидов протопластов, внутриклеточного пептидома и секретома, что позволило автору предположить их функциональность и участие в ответе действие факторов стресса. Интересные результаты были получены при исследовании эффектов делеции и сверхэкспрессии коротких открытых рамок считывания в составе генов длинных некодирующих РНК, которое позволило установить существенное влияние этих изменений на различные биологические процессы, экспрессию генов и морфологию мха. Важным свидетельством в пользу возможной функциональной роли выявленных пептидов стало обнаружение тканеспецифичной экспрессии гена, кодирующего один из таких пептидов, а также выявление вовлеченности другого пептида в контроль полярного роста, вероятно, путем взаимодействия с малыми ГТФазами.

Завершается описание результатов заключением, в котором автор суммирует основные полученные данные и выдвигает ряд гипотез, объясняющих их. Значительного внимания, несомненно, заслуживает идея автора о роли белкового «деградома» в формировании специфичного пула биологически активных пептидов, в том числе, в ответ на стрессирующие факторы. Частично эта гипотеза нашла подтверждение в результатах диссертационного исследования. Важным достижением данного исследования является и детальная характеристика части пептидома, представленной пептидами, кодируемыми короткими открытыми рамками считывания, расположенными в генах длинных некодирующих РНК, а также описание биологической роли этих пептидов.

Достоверность полученных данных не вызывает сомнений. Результаты описаны детально, сопровождаются иллюстративным материалом, приведены подробные экспериментальные протоколы. Для обработки результатов использован современный статистический аппарат.

По результатам работы сформулировано шесть выводов. Выводы четкие, конкретные, отражают основные результаты работы, показывают значимость и новизну диссертационного исследования.

Новизна и научно-практическая значимость исследования

Диссертационная работа И. А. Фесенко, представленная на рассмотрение, обладает существенной значимостью и новизной на мировом уровне. Она представляет собой одно из первых всесторонних и подробных исследований пептидомов у растений. Проведение такого исследования потребовало не только масштабных и трудоемких экспериментов, но и значительной адаптации методической базы, включая как экспериментальные, так и биоинформатические методы, целый ряд из которых был разработан в рамках данной работы и может служить основой для дальнейших исследований различных научных коллективов, что также определяет высокую значимость этой работы. Апробация предложенных автором методов в рамках настоящей работы позволила выявить несколько тысяч новых пептидов, ряд из которых может иметь и практическую ценность благодаря биологическим активностям, таким как бактерицидные свойства. Высокую значимость для фундаментальной науки, как упоминалось выше, представляет предложенная и исследованная в диссертации гипотеза о функциональной роли пептидов, образующиеся в результате контролируемой деградации белков-предшественников под действием факторов стресса. Также работа вносит важный вклад в знание о пептидах, кодируемых короткими открытыми рамками считывания, расположенными в генах длинных некодирующих РНК, понимание их функций и особенностей регуляции у растений.

По результатам работы опубликовано 19 статей в международных периодических изданиях с высокой научной репутацией, таких как Genome Research, Nucleic Acids Research, New Phytologist и другие. Почти во всех из представленных публикаций И. А. Фесенко либо последний, либо первый автор, что свидетельствует в пользу его ключевого вклада в представленные исследования. Работа апробирована в 9 устных докладах на международных конференциях.

Замечания

Текст на некоторых рисунках в диссертации слишком мелкий и труден для чтения. Разрешение рисунков не всегда достаточное, порой они выглядят несколько размытыми.

Автор не всегда в полной мере корректен в использовании генетической терминологии, используя, например, словосочетания «нокаут белка» (корректный вариант – нокаут гена, кодирующего белок), «сверхэкспрессия микробелка» (сверхпродукция микробелка) и т.п. Необходимо отметить, что наличие сверхэкспрессии гена, строго говоря, не означает сверхпродукции соответствующего белка, если это не подтверждено методами анализа, такими как вестерн-блот. Также не очень понятна логика обозначений пептидов и кодирующих их открытых рамок считывания (гены принято обозначать курсивом, белки – нет, но в работе использованы самые разные варианты).

Из обзора литературы не очень понятно, есть ли у растений (в частности, у исследованного автором мха) нерибосомные пептиды, и, если есть, то почему они не были исследованы в данной работе. Вероятно, стоило их хотя бы упомянуть.

Весьма любопытны, хотя и не очень подробно обсуждены в диссертации, данные о наличии у некоторых из выявленных пептидов доменов с пониженной сложностью аминокислотного состава. Эти домены склонны к агрегации и образованию упорядоченных агрегатов, в том числе, амилоидных. Известно, что пептиды разных организмов способны к обратимой агрегации, вовлеченной в контроль биологических функций (например, агрегация пептидных гормонов у человека). При этом агрегация белка является одним из характерных маркеров стресса. Не может ли агрегация пептидов растений, имеющих домены с пониженной сложностью, представлять собой один из механизмов физиологического контроля функций пептидома, в том числе, в условиях ответа на факторы стресса? Представляется, что изучение агрегирующей части пептидома растений могло бы иметь существенную значимость в контексте дальнейшего изучения структуры и функций пептидома, но является весьма сложным ввиду высокой стабильности

белковых агрегатов и их устойчивости к протеолитическим ферментам и детергентам, затрудняющей использование стандартных протеомных подходов.

Заключение

Диссертационная работа И. А. Фесенко «Системный анализ пептидома растений на примере мха *Physcomitrium patens*», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, является законченным научным исследованием, посвященным всестороннему изучению пептидома мха *P. patens* в различных условиях. В работе представлены обладающие приоритетом на мировом уровне данные, касающиеся состава пептидома *P. patens*, его изменения под действием различных факторов, а также биологических функций составляющих его пептидов. Исследование выполнено на высоком методическом уровне, содержит ряд оригинальных экспериментальных и биоинформатических подходов, разработанных автором, результаты сопровождаются требуемыми иллюстрациями и корректной статистической обработкой, что обуславливает их достоверность, а также обоснованность положений, выносимых на защиту. Содержание диссертации в полной мере соответствует специальности 1.5.3 – молекулярная биология. Содержание автореферата соответствует содержанию диссертации. Выводы обоснованы и соответствуют поставленным задачам и полученным результатам.

В целом, представленная на рассмотрение диссертационная работа И.А. Фесенко по своей актуальности, научной новизне и практической значимости, полноте описания и достоверности полученных результатов соответствует всем требованиям «Положения о присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями, внесенными Постановлениями Правительства РФ от: 21.04.2016 № 335; 02.08.2016 № 748; 29.05.2017 № 650; 20.03.2021 № 426; 11.09.2021 № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Фесенко Игорь Александрович заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Отзыв о диссертационной работе И. А. Фесенко рассмотрен и утвержден на семинаре кафедры генетики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (протокол №3 от 26 апреля 2022 г.).

Доцент кафедры генетики и биотехнологии
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Санкт-Петербургский
государственный университет»,
доктор биологических наук,
профессор РАН

Антон Александрович Нижников



Подпись *А. А. Нижников*
ЗАВЕРЯЮ
Вишневская О.С.
06.05.2022

Адрес ведущей организации:
199034, г. Санкт-Петербург,
Университетская набережная, д. 7/9
Тел.: +7(812)328-20-00
e-mail: spbu@spbu.ru