

Ляпина Ирина Сергеевна

Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений

1.5.3. - Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2023

Работа 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**

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

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится 14 июня 2023 г. в 11 часов на заседании 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 адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН и на сайте www.ibch.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2023г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор физико-математических наук



Олейников В.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОБЛЕМЫ

Актуальность исследования. В процессе роста и развития растения взаимодействуют с огромным количеством патогенных и непатогенных организмов. Взаимодействие характерных для патогенных микроорганизмов молекулярных структур со специфичными мембранными рецептор-подобными киназами растений приводит к запуску иммунного ответа, обеспечивая защиту от фитопатогенов. Таким образом, разнообразие репертуара рецепторов, узнающих соответствующие патогенные элиситоры является одним из определяющих факторов устойчивости растений к фитопатогенам. Кроме того, важную роль в регуляции иммунного ответа играют специальные эндогенные пептиды растений, называемые фитоцитокинами. В последние годы у цветковых растений открыты более десятка семейств фитоцитокинов, однако исследования их разнообразия далеки от завершения. Помимо фитоцитокинов, в ответе на стрессовые факторы участвуют пептидные гормоны, регулирующие процессы роста и развития. Антимикробные пептиды выполняют роль защитных агентов, атакуя клетки патогенных организмов.

Семейства биологически активных пептидов, способных секретироваться во внеклеточное пространство и, взаимодействуя с соответствующими рецепторами, регулировать специфические процессы, объединены под общим названием “короткие секретлируемые пептиды” (КСП). Короткие секретлируемые пептиды были найдены практически у всех покрытосеменных, однако их поиск прежде не проводили в других отделах царства растений. Механизм действия многих биологически активных пептидов еще не до конца понятен, а их функциональный анализ часто затруднен в связи с большим количеством представителей определенных семейств у цветковых растений. В этом случае использование модельных растений, семейства пептидов у которых состоят всего из нескольких генов, упрощает функциональный анализ. Примером может служить семейство пептидов RALF (Rapid Alkalinization Factors), состоящее из нескольких десятков представителей у покрытосеменных и всего из трех у модельного растения - мха *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*.

Таким образом, поиск и идентификация биологически активных пептидов является сложной, но актуальной задачей современной биологии. Такие проблемы, как роль пептидного сигналинга в процессе освоения растениями суши и во взаимодействии с другими организмами, находятся в фокусе внимания современных исследователей. Эволюция пептидных сигналов и рецепторов, консервативность компонентов сигнальных каскадов, возможности переноса компонентов иммунной системы между разными группами растений на сегодняшний день изучены мало. Достижения современной науки могут предоставить возможность поиска и идентификации новых пептидных лигандов для рецептор-подобных киназ растений, а также других участников иммунной системы растений, однако

существующие инструменты для этого все еще недостаточно развиты, поэтому важным является улучшение методик и разработка новых подходов.

Целью данного исследования является поиск и изучение эндогенных пептидов, участвующих в регуляции иммунного ответа растений, на примере модельного растения *Physcomitrium patens*.

Для достижения поставленной цели мы сформулировали следующие **задачи**:

1. Аннотация белков-предшественников коротких секретлируемых пептидов (КСП) в геномах бриофитов;
2. Идентификация дифференциально экспрессирующихся КСП в транскриптоме *P. patens* при заражении патогенами;
3. Функциональный анализ роли цистеин-богатого семейства пептидов RALF (Rapid Alkalinization Factors) в иммунном ответе *P. patens*;
4. Анализ внеклеточных пептидных пулов модельного растения *Physcomitrium patens* при индукции иммунного ответа;
5. Функциональный анализ роли новых эндогенных пептидов, образование которых индуцировано стрессом;
6. Изучение консервативности пептидного иммунного сигналинга у сосудистых и несосудистых растений.

Научная новизна и практическая значимость исследования. Биологически активные пептиды растений выполняют множество различных функций, однако их поиск, идентификация и функциональный анализ все еще являются сложной задачей. Мы разработали схему поиска не идентифицированных ранее семейств биоактивных пептидов, объединяющую несколько известных подходов: геномный, транскриптомный и пептидомный анализы. В ходе выполнения данной работы мы впервые провели биоинформатический поиск гомологов коротких секретлируемых пептидов покрытосеменных растений у пяти видов бриофитов. Было показано, что распределение количеств коротких секретлируемых пептидов разных групп у бриофитов отличается от такового у покрытосеменных. Количество найденных гомологов пептидов было меньше у бриофитов, чем у покрытосеменных. Это может как отражать разные стратегии регуляции иммунного ответа, используемые семенными и споровыми растениями, так и указывать на то, что существующие методы анализа нуждаются в доработке. Нами также было показано, что биотический стресс, такой как заражение патогенами, может индуцировать экспрессию генов предшественников коротких секретлируемых пептидов модельного растения - *P. patens*. Среди транскриптов, экспрессия которых повышается при заражении, многие были аннотированы как длинные некодирующие

РНК, что показывает, что современный способ аннотации неточен и пропускает много потенциальных функциональных белков.

В ходе данного исследования мы впервые провели функциональный анализ одного из представителей известного семейства коротких секретрируемых пептидов, RALF, аннотированного в геноме модельного растения *P. patens*. Впервые была показана роль представителей данного семейства в ответе на биотический стресс у несосудистых растений. Пептидомный анализ является одним из наиболее прямых методов идентификации эндогенных нативных пептидов, однако он недостаточно хорошо развит для растений. Мы разработали методику пептидомного анализа для поиска кандидатов биоактивных пептидов в модельном растении *P. patens*, которая также может быть использована для других растений. Наш подход позволил нам выявить пептиды, обладающие возможным биоактивным потенциалом, выщепление которых из белков-прекурсоров было индуцировано стрессовыми факторами.

В ходе этой работы мы также синтезировали и провели функциональный анализ кандидатов биоактивных пептидов, идентифицированных в индуцированных стрессом пептидомах мха *P. patens*, и показали их возможную роль в иммунном ответе мха.

Помимо этого, в ходе нашего исследования мы впервые обнаружили гомологи рецепторов известного пептида PEP - PEPR, найденного у многих видов покрытосеменных, в геноме мха *P. patens*. Мы также показали, что синтетические пептиды PEP из *Arabidopsis thaliana* вызывали в клетках *P. patens* стрессовый ответ, схожий с тем, что наблюдается у покрытосеменных. Кроме того, было показано, что найденные гомологи рецептора PEPR мха могут участвовать в сигналинге этого пептида, хотя гомологов пептидов PEP в геноме мха обнаружено не было. Полученные в ходе данного исследования результаты могут указывать на консервативность системы пептидного сигналинга растений и возможную роль этой системы в освоении растениями суши.

Личный вклад автора. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов с применением методов пептидомики, транскриптомики, геной инженерии и молекулярной биологии, а также в обработке и анализе полученных данных. Автор принимал участие в подготовке и написании публикаций и представлении результатов исследования на российских и международных конференциях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Растения имеют консервативную систему пептидного сигналинга, компоненты которой обнаружены у споровых растений;
2. Стрессовые условия меняют внеклеточные пептидомы растений, стимулируя образование пептидов, обладающих биологической активностью;

3. Семейство цистеин-богатых пептидов RALF (Rapid Alkalinization Factors) участвует в регуляции иммунного ответа сосудистых и несосудистых растений;
4. Найденные в геноме мха *P. patens* гомологи известного рецептора PEPR могут выполнять функции, схожие с рецепторами PEPR из покрытосеменных.

Публикации и апробация работы. По теме диссертации опубликовано 6 статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертации. Материалы диссертации были представлены в стендовых и устных докладах на российских и международных научных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 134 страницах и содержит 16 рисунков и 1 таблицу. Список литературы содержит 229 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Идентификация пептидных регуляторов иммунного ответа у бриофитов

На первом этапе нашего исследования мы разработали схему идентификации новых, ранее не охарактеризованных семейств биологически активных пептидов, которая объединила методы анализа геномов, транскриптомов и пептидомов. В качестве модельного растения был использован мох *Physcomitrium patens* (рис. 1 А).

1.1 Поиск генов-предшественников коротких секретируемых пептидов (КСП) в геномах бриофитов

Для поиска закономерностей эволюции пептидных семейств растений, на первом этапе нашего исследования мы провели биоинформатический поиск генов белков-предшественников коротких сигнальных пептидов в геномах бриофитов (рис. 1 В). Для этого был использован алгоритм SPADA (Small Peptide Alignment Discovery Application), позволяющий предсказать гены, кодирующие КСП, в геномах растений (рис. 1 С). Для анализа были отобраны пять видов бриофитов, чьи геномы хорошо аннотированы: мхи *Physcomitrium patens* и *Sphagnum fallax*, печеночник *Marchantia polymorpha*, а также антоцеротовые мхи *Anthoceros agrestis* (линии Bonn и Oxford) и *A. punctatus*.

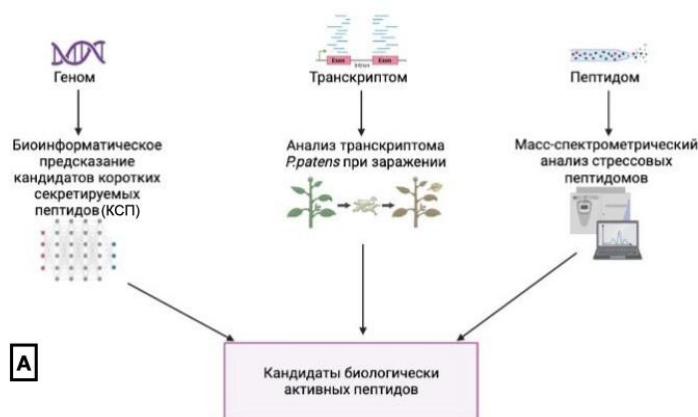
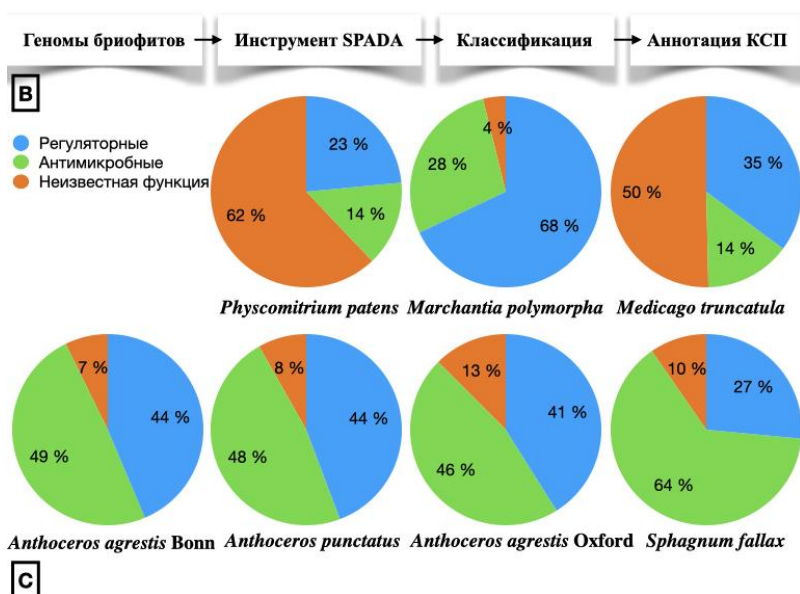


Рис. 1. А - Общая схема идентификации новых биологически активных пептидов; В - общая схема анализа геномов с помощью инструмента SPADA; С - диаграммы, показывающие распределение групп генов предшественников КСП в разных таксонах растений в соответствии с *in silico* предсказанием с помощью инструмента SPADA.



Предсказанные с помощью алгоритма SPADA гены, предположительно кодирующие предшественники КСП, были поделены на четыре группы, на основании наличия или отсутствия сигнальной последовательности на N-конце и трансмембранного домена, длины прекурсора, а также степени схожести последовательностей с известными короткими сигнальными пептидами (Таблица 1). Последовательности, отнесенные к группам “известные короткие секретлируемые пептиды” и “вероятно известные короткие секретлируемые пептиды”, имеют длину прекурсора 200–250 а.о. и высокую степень гомологии с известными короткими секретлируемыми пептидами других растений. Последовательности, отнесенные к группам “предположительные короткие секретлируемые пептиды” и “не относящиеся к коротким секретлируемым пептидам”, имеют длину прекурсора 230 а.о. и больше, а также слабую степень гомологии с известными короткими секретлируемыми пептидами или не имеют ее вовсе.

Таблица 1 – Количество предсказанных прекурсоров КСП

	<i>P. patens</i>	<i>M. polymorpha</i>	<i>A. agrestis</i> B	<i>A. agrestis</i> O	<i>A. punctatus</i>	<i>S. fallax</i>
Известные КСП	132	78	55	56	61	83
Вероятно известные КСП	5	4	4	3	6	9
Предположительные КСП	404	442	421	401	405	695
Не относящиеся к КСП	375	278	120	110	112	265
Всего	916	802	600	570	584	1052

Далее мы сосредоточились на подробной характеристике генов, которые были предсказаны как “известные короткие секретлируемые пептиды” и в некоторых случаях как “вероятно известные короткие секретлируемые пептиды”, в каждом виде бриофитов.

Алгоритм SPADA позволил нам предсказать несколько белков-предшественников известных пептидных семейств регуляторных пептидов, вовлеченных в регуляцию процессов развития растений, а также фитоцитокинов, участвующих в иммунном ответе, в геномах бриофитов. Так, мы выявили несколько коротких секретлируемых пептидов (RALF, EPFL, CLE), уже идентифицированных ранее у *P. patens*, а также несколько коротких секретлируемых пептидов

(RALF), аннотированных у *M. polymorpha*, что рассматривалось как положительный контроль использованного метода.

Нами были идентифицированы гены предшественников коротких секретлируемых пептидов семейства CAPE, играющего роль в регуляции иммунного ответа у покрытосеменных, практически во всех анализируемых видах бриофитов, кроме *A. punctatus*. Также нами были предсказаны предшественники цистеин-богатых пептидов семейства RALF, которые участвуют во многих разнообразных процессах от регуляции роста до иммунных и стрессовых реакций у покрытосеменных. Гены предшественников RALF-подобных пептидов были найдены во всех изучаемых видах, кроме двух линий *A. agrestis*. В нашем анализе SPADA также предсказала несколько уже аннотированных прекурсоров цистеин-богатых пептидов EPFL у *P. patens*, а также потенциальные прекурсоры пептидов EPFL в трех геномах *Anthoceros*. У покрытосеменных пептиды из этого семейства играют роль в процессах роста и развития, а также вероятно в регуляции иммунного ответа. Гены прекурсоров пептидов семейства фитоцианинов, отвечающих за регуляцию роста пыльцевых трубок у сосудистых растений, были обнаружены у всех анализируемых видов бриофитов, однако непонятно, какую функцию они могут выполнять в них. Также в геномах всех пяти изучаемых видов бриофитов были предсказаны предшественники высококонсервативных пептидов TAX, участвующих в процессах биосинтеза таксанов и синтеза никотиновых алкалоидов. Несмотря на высокую степень сходства последовательностей, прежде не было никаких свидетельств присутствия TAX пептидов у бриофитов. Семейство цистеин-богатых неспецифичных белков переноса липидов, участвующих в переносе липидов, защитных реакциях и развитии растений у большинства сосудистых растений, было уже аннотировано прежде в геномах бриофитов. Нами также были предсказаны дополнительные предшественники этих коротких секретлируемых пептидов во всех изучаемых видах. Мы также смогли обнаружить белки-прекурсоры пептидов Root_Cap/Late_Embryogenesis, принадлежащих к группе «регуляторных» в *P. patens* и в обеих линиях *A. agrestis*. Прекурсоры растительных натрийуретических пептидов (PNP) были предсказаны у *M. polymorpha* и обеих линий *A. agrestis*, но не были идентифицированы у *P. patens*, *S. fallax* или *A. punctatus*.

С помощью алгоритма SPADA мы также смогли предсказать предшественники известных антимикробных пептидов, которые были обнаружены практически у всех видов растений. Мы обнаружили прекурсоры гевеиноподобных и тиониноподобных пептидов во всех анализируемых видах, хотя прежде эти антимикробные пептиды не были аннотированы у бриофитов. Найденные последовательности содержали консервативные мотивы, свойственные представителям известных гевеиноподобных и тиониноподобных пептидов.

Кроме того, нами были предсказаны предшественники пептидов, имеющих известные домены, позволяющие отнести их к известному семейству, однако действие которых в бриофитах не до конца понятно. К ним относились такие семейства коротких секретлируемых пептидов, как ингибиторы субтилизина, фитоцистатины, ингибитор протеиназ II типа картофеля и ряд других. Также мы идентифицировали прекурсоры специфического для клубеньков белка, богатого глицином (NodGRP), у всех исследованных видов бриофитов и несколько низкомолекулярных цистеин-богатых пептидов (LCR) в *P. patens*, большинство из которых были аннотированы SPADA *de novo*. Прекурсоры LCR также были предсказаны в других изучаемых видах бриофитов, кроме *M. polymorpha* и *A. agrestis* линии Bonn. Во всех анализируемых видах, кроме мхов *P. patens* и *S. fallax*, были предсказаны прекурсоры группы специфичных для клубеньков богатых цистеином пептидов (NCR).

В заключение можно сказать, что количество предсказанных генов, кодирующих короткие секретлируемые пептиды, выше у мхов, чем у Антоцеротовых и печеночников, но все же ниже, чем у покрытосеменных растений, таких как *Medicago truncatula* (рис. 1 С).

1.2 Анализ транскриптома *P. patens* при заражении фитопатогенами

Для поиска групп пептидов, потенциально обладающих функциональной активностью, мы проанализировали транскриптом мха *P. patens* после заражения грибом *Botrytis cinerea*. Мы разработали подход, позволивший нам заново предсказать открытые рамки считывания в транскриптом с новыми параметрами, отфильтровать их по длине, наличию сигнальной последовательности и по изменению уровня транскрипции при заражении (\log_2 fold change > 1; $P < 0,05$).

Нами были предсказаны 1749 потенциальных белков-предшественников пептидов (длина < 200 а.о.), гены которых дифференциально экспрессировались при заражении. После сравнения с нашими результатами предсказания коротких секретлируемых пептидов в геноме мха мы идентифицировали кандидаты из 7 семейств “известных коротких секретлируемых пептидов”: EPFL, MEG, nsLTP, CAPE, STIG-GRI, фитоцианины, а также семейство, обозначенное как c121 (неизвестная функция).

Большинство идентифицированных нами транскриптов генов, кодирующих пептиды EPFL, экспрессия которых повышалась после заражения, уже были аннотированы в геноме мха *P. patens*, однако мы также предсказали несколько схожих транскриптов, вероятно, образующих семейство, имеющее структуру, подобную известным представителям EPFL пептидов из других растений (рис. 2 А и В).

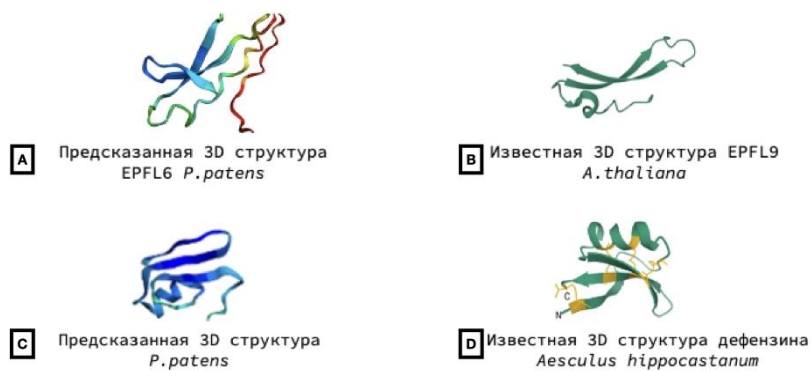


Рис. 2. 3D структура пептидов **A** - EPFL6 мха *P. patens*, **B** - EPFL9 арабидопсиса, **C** - предположительного гомолога дефензина мха *P. patens*, **D** - дефензина *Aesculus hippocastanum*, предсказанная с помощью инструмента AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) для гомологов из *P. patens*.

Кроме того, предсказанные транскрипты генов, экспрессия которых значительно повышалась, кодировали белки переноса липидов, чья роль в иммунном ответе мха еще не изучена. Еще одним известным защитным пептидом, транскрипты генов вероятных гомологов которого мы обнаружили в транскриптоме после заражения, оказался CAPE, выщепляющийся из функционального белка PR1. Последовательность этого пептида у мха содержит консервативный мотив на С-конце, соответствующий известным функциональным CAPE пептидам у покрытосеменных.

Кроме вероятных гомологов известных коротких секретлируемых пептидов нами были обнаружены 49 открытых рамок считывания, кодирующих потенциальные кандидаты новых биологически активных пептидов, уровень транскрипции которых повышается в ответ на заражение. 27 из этих транскриптов также ранее были аннотированы как длинные некодирующие РНК. Мы провели анализ их структуры и показали, что некоторые из них могут относиться к известным группам антимикробных пептидов и белков, таких как дефензины (рис. 2 C и D).

1.3 Анализ пептидомов *P. patens* после обработки элиситорами стрессового ответа

Учитывая, что поиск в геномах, основанный на сходстве последовательностей, не всегда позволяет обнаруживать новые семейства биоактивных пептидов, а уровень транскрипции генов известных фитоцитокинов не всегда повышается в ответ на стрессовое воздействие, мы разработали метод анализа эндогенных нативных пептидов, основанный на масс-спектрометрическом анализе пула эндогенных пептидов растений. Данный подход может быть также использован на других растениях. Мы выполнили поиск пептидов, выщепляющихся из маленьких белков (< 200 а.о.) в ответ на обработку стрессовыми гормонами. Кроме того, мы провели поиск кандидатов в новые биоактивные пептиды после

обработки известным элиситором, хитозаном, растений мха дикого типа, а также мутантных по гену одного из его рецепторов.

Используя масс-спектрометрический анализ нативных пептидных пулов без обработки, мы обнаружили примерно 2500 эндогенных пептидов, выщепляющихся из 270 белков-прекурсоров длиной менее 200 а.о., что составляет около 7% от всего пептидома. Среди этих белков 8% не имеют предсказанной функции и, таким образом, могут быть потенциальными прекурсорами пептидных гормонов.

Далее мы оценили, как влияет индукция стрессового ответа фитогормонами метилжасмонатом и салициловой кислотой на внеклеточный пептидом нашей модели - *P. patens*. Используя масс-спектрометрический анализ, мы показали, что обработка 400 мкМ салициловой кислоты приводит к образованию в 5 раз большего количества уникальных пептидов по сравнению с контролем. Обработка 400 мкМ метилжасмоната также привела к увеличению количества выщепляющихся уникальных пептидов в три раза по сравнению с контрольными образцами. Сравнительный анализ этих пептидомов показал, что салициловая кислота и метилжасмонат индуцируют протеолиз небольших белков, включая белки с неизвестной функцией. Часть маленьких белков-предшественников, расщепление которых было индуцировано стрессовыми гормонами, не имели аннотации, а некоторые не имели гомологов в других видах растений, что может указывать на новые специфичные семейства сигнальных пептидов, свойственные только несосудистым растениям. Мы также обнаружили среди белков, расщепление которых было индуцировано стрессовыми гормонами, предсказанные нами прекурсоры некоторых коротких секретлируемых пептидов, в том числе пептидов RALF. Среди белков-прекурсоров с неизвестной функцией нами были выделены несколько кандидатов, в том числе Pr3c21_4350 и Pr3c14_22870, меняющие свой профиль расщепления под действием стрессовых факторов. Последовательности пептидов от этих белков, идентифицированные в индуцированных гормонами пептидомидах (INIINAPLQGFKIA; EAAPAPVAEVEAPKAEE), встречаются несколько раз внутри последовательностей соответствующих белков, что напоминает структуру белка-прекурсора известного фитоцитокина – гидроксипролин-богатого системина HypSys. Кроме того, нами было показано, что обработка стрессовыми гормонами приводила к увеличению общего числа модифицированных пептидов.

Для проверки предположения о том, что активация иммунного ответа может влиять на формирование эндогенных пептидных пулов, мы идентифицировали пептиды, индуцированные обработкой иммунным элиситором хитозаном. Чтобы определить пептиды, специфически индуцированные хитозаном, мы также провели масс-спектрометрический анализ пептидома из культуральной жидкости растений, мутантных по гену его рецептора CERK1. Согласно нашему анализу, обработка хитозаном приводит к выщеплению новых

уникальных пептидов как у дикого типа, так и у мутантов. Однако достоверной разницы между количеством стабильно выщепляющихся пептидов дикого типа и мутантов, как и между их интенсивностями, найдено не было. Это может указывать на то, что при ответе на специфический стресс ключевую роль играют конкретные последовательности, а не их количество. Так, к примеру, среди новых пептидов, появляющихся только при обработке в диком типе, но не в мутантах, мы нашли кандидаты биоактивных пептидов, обнаруженных нами при обработке стрессовыми гормонами (INIINAPLQGFKIA; EAAPAPVAEVEAPKAEE) (Рис. 3).



Рис. 3. Диаграмма Венна, демонстрирующая сравнение секретируемых пептидов, индуцированных тремя стрессовыми факторами: 400 мкМ салициловой кислоты, 400 мкМ метилжасмоната и 1 мг/мл хитозана.

2. Анализ биологической активности эндогенных пептидов

2.1 Изучение роли коротких секретируемых пептидов RALF в иммунном ответе у *P. patens*

В результате проведенного нами биоинформатического анализа было показано, что в геноме *P. patens* присутствуют как минимум три гена прекурсоров цистеин-богатых пептидов RALF, которые были обозначены как: Pp3c3_15280 – *PpRALF1*; Pp3c6_7200 – *PpRALF2*; Pp3c25_4180 – *PpRALF3*, – роль которых у мха все еще изучается.

Известно, что у покрытосеменных данное семейство пептидов участвует в регуляции как процессов роста, так и иммунного ответа. Однако, вследствие большого размера семейства RALF пептидов в геноме арабидопсиса, ключевые функции данных пептидов в ответе на стрессовые воздействия изучены слабо. Следовательно, мы выбрали данное семейство пептидов для изучения роли КСП, регулирующих рост и развитие, в иммунном ответе у растений. Сначала, мы провели анализ аминокислотного состава пептидов PpRALF мха и сравнили их с пептидами AtRALF арабидопсиса, отобразив процентное содержание аминокислот в каждом из пептидов с помощью метода главных компонент (PCA) (Рис. 4 А).

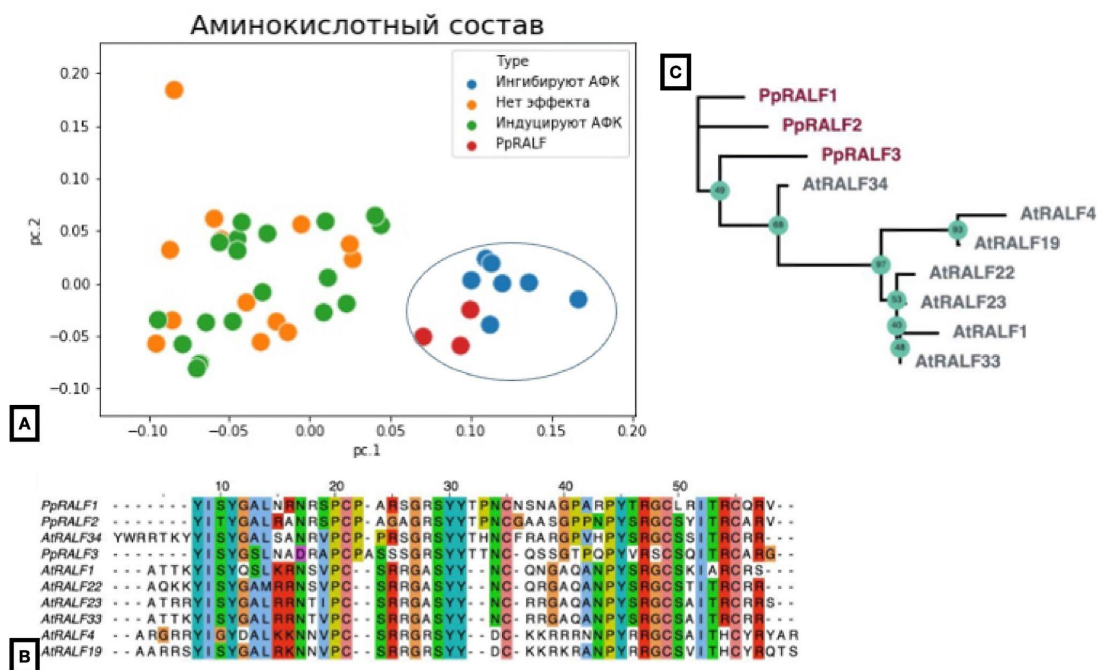


Рис. 4. **А** - Анализ главных компонент (PCA) аминокислотного состава, рассчитанный с помощью инструмента iFeature, для пептидов AtRALF и PpRALF. **В** - Множественное парное выравнивание пептидов PpRALF и пептидов AtRALF, связанных с иммунитетом (AtRALF1, AtRALF4, AtRALF19, AtRALF22, AtRALF23, AtRALF33, AtRALF34). **С** - Неукорененное филогенетическое дерево с аминокислотными последовательностями RALF из *Physcomitrium patens* (PpRALF1, PpRALF2, PpRALF3) и связанных с иммунитетом AtRALF; значения бутстреп (1000 повторов).

Мы показали, что пептиды PpRALF мха кластеризуются с известными иммунными пептидами RALF из арабидопсиса, такими как AtRALF1, AtRALF4, AtRALF19, AtRALF22, AtRALF23, AtRALF33 и AtRALF34, ингибирующими индуцированную патогенами генерацию АФК (Рис. 4 А). Эти данные свидетельствуют о том, что общий аминокислотный состав пептидов RALF в некоторой степени отражает их функциональную направленность, при этом пептиды PpRALF могут иметь функции, сходные с пептидами AtRALF, которые участвуют в негативной регуляции иммунного ответа. При этом пептид PpRALF3, в отличие от двух других RALF пептидов мха, имеет замену в консервативном сайте «RGC» (Рис. 4 В). Наш филогенетический анализ показал, что пептид PpRALF3 отделился от PpRALF1 и PpRALF2 и образует группу с иммунными пептидами AtRALF (Рис. 4 С).

Для изучения роли пептидов PpRALF в иммунном ответе мха в нашей лаборатории с помощью технологии CRISPR/Cas9 были созданы нокаутные линии по соответствующим генам прекурсоров этих пептидов. Первым шагом мы проанализировали генерацию всех внутриклеточных молекул активных форм кислорода (АФК), являющихся первичным маркером стресса у растений, у мха *P. patens* дикого типа и нокаутных линий при обработке индуктором иммунного ответа – драйзелазой (смесь ферментов, разрушающих клеточную

стенку, из *Basidiomycetes* sp.). Мы обнаружили, что уровень накопления молекул АФК был значительно снижен в линиях, нокаутированных по генам *PpRALF1* и *PpRALF2*, по сравнению с растениями дикого типа и нокаутной линией гена *PpRALF3* после обработки драйзелазой, что может указывать на роль пептида PpRALF3 в негативной регуляции иммунного ответа (Рис. 5 А).

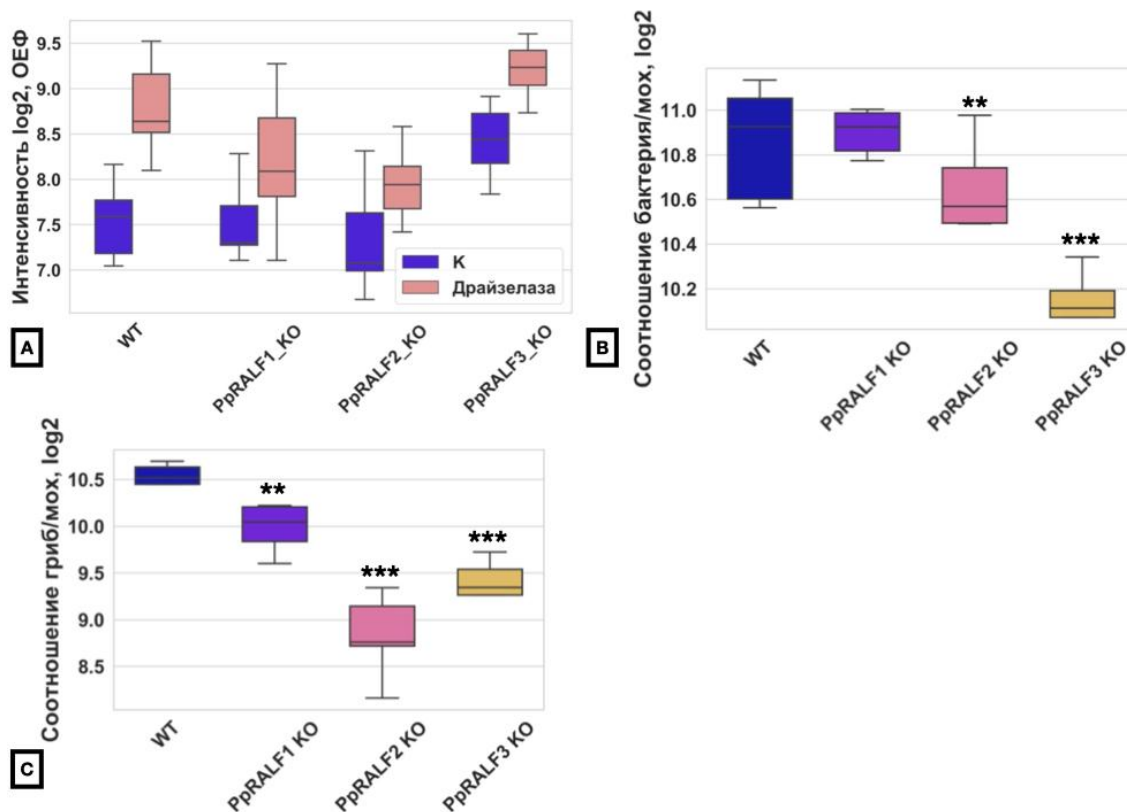


Рис. 5. А - Влияние нокаутов генов *PpRALF* на генерацию АФК в растениях дикого типа и нокаутных линиях, обработанных 0,0025% драйзелазы (ОЕФ - относительные единицы флуоресценции); Отношения концентраций ДНК **В** - *P. carotovorum* и **С** - *F. solani* к геномной ДНК *P. patens*, которые были оценены с помощью количественного анализа ПЦР. Показаны результаты шести независимых экспериментов. Для результатов количественной ПЦР проведен анализ дисперсии и апостериорный тест Тьюки (**P < 0,01; ***P < 0,001).

Далее мы изучили возможные функции пептидов PpRALF в защитном ответе растений *P. patens* при заражении фитопатогенами. Для этого мы заразили растения мха двумя известными фитопатогенами - *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* и *Fusarium solani*. С помощью измерения соотношения концентраций ДНК патогена к ДНК растения мы показали, что скорость колонизации *P. carotovorum* была значительно выше на растениях дикого типа по сравнению с нокаутными линиями по генам *PpRALF2* и *PpRALF3* (Рис. 5 В; ANOVA с апостериорным тестом Тьюки P < 0,001). Нокаутные линии по генам *PpRALF2* и *PpRALF3* также оказались наиболее устойчивыми к заражению *F. solani* (Рис. 5 С; ANOVA с апостериорным тестом Тьюки P < 0,001). Эти данные указывают на возможную роль пептидов PpRALF2 и PpRALF3 в негативной регуляции иммунного ответа мха.

Следующим шагом мы провели транскриптомный анализ растений, нокаутированных по гену *PpRALF3* после заражения *F. solani*. Мы показали, что заражение грибом *F. solani* изменяло паттерны экспрессии для дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) у нокаутной линии по сравнению с диким типом. Экспрессия 474 общих ДЭГ между диким типом и нокаутной линией изменялась схожим образом (Рис. 6 А).

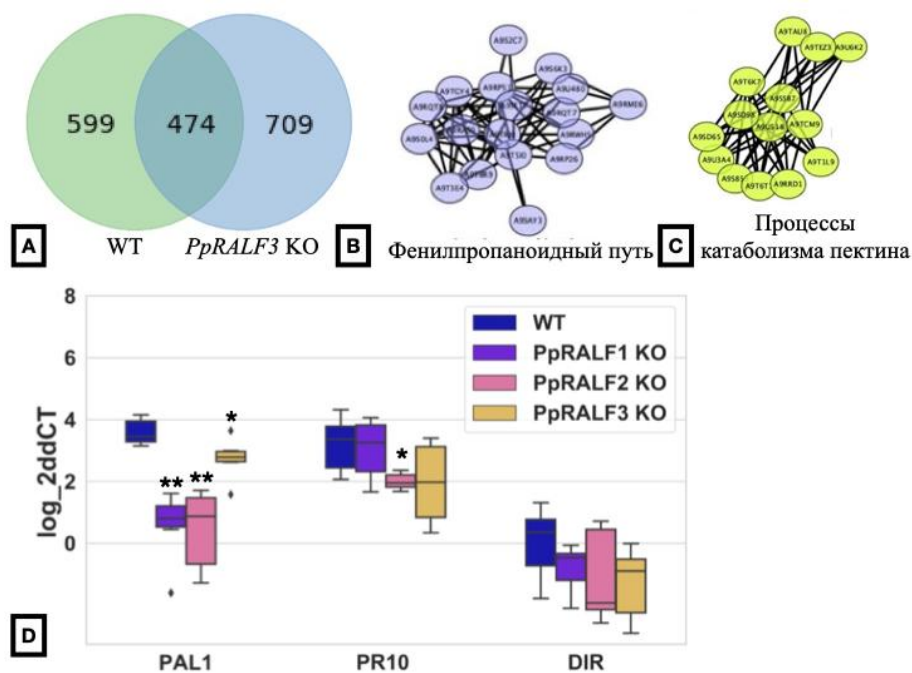


Рис. 6. А - Диаграмма Венна, показывающая перекрывающиеся дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) между растениями дикого типа и нокаутной линией по гену *PpRALF3*; Сети белок-белковых взаимодействий группы дифференциально экспрессируемых генов с В - повышенной экспрессией в растениях дикого типа, которые относятся к процессу метаболизма фенолпропаноидов и С - с пониженной

экспрессией, которые относятся к процессу катаболизма пектина, в растениях, нокаутных по гену *PpRALF3*. Гены представлены на узлах схемы, а взаимодействия между белками представлены линиями; **D** - qOT-ПЦР анализ экспрессии генов PAL1, PR10 и DIR в гаметафорах мха *P. patens* дикого типа, а также нокаутированных по генам *PpRALF1*, *PpRALF2* и *PpRALF3*, заражённых *F. solani* (U-критерий Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05).

Среди ДЭГ, повышающих свою экспрессию в диком типе, явно выделялся кластер генов, связанных с фенолпропаноидным путем (Рис. 6 В). Это известный консервативный путь, активируемый в условиях биотического стресса у растений. В отличие от растений дикого типа, в нокаутной линии по гену *PpRALF3* понижался уровень экспрессии генов, связанных с модификацией клеточной стенки, а именно с процессами катаболизма пектина (Рис.6 С). В растениях этот процесс является одной из защитных реакций на атаку патогена. Кроме того, мы дополнительно проанализировали транскрипцию таких защитных генов, как фенилаланин аммиак-лиаза (PAL1), белок 10, связанный с патогенезом (PR10), и диригентный белкой (DIR) в зараженных линиях, нокаутированных по генам *PpRALF1* и *PpRALF2*. Индукция транскрипции гена PAL1 в нокаутных генотипах была значительно ниже по сравнению с растениями дикого типа (Рис. 6 D).

Таким образом, можно заключить, что PpRALF3 действительно участвует в негативной регуляции иммунного ответа мха. Мы предполагаем, что его роль может быть связана с отсутствием модификации клеточной стенки, что усложняет проникновение патогена.

2.2 Биологическая активность пептидов EAA и INI

Поскольку пептидомный анализ может помочь выявить кандидаты новых биоактивных пептидов, мы проанализировали активность синтезированных пептидных последовательностей, идентифицированных нами после индукции тремя стрессами (стрессовыми гормонами и хитозаном). Мы показали, что пептид, обозначенный нами как INI (INIINAPLQGFKIA), обладает высокой антимикробной активностью против таких бактерий как *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* (МИК = 16 мкг/мл). Также мы обнаружили, что обработка растений мха этим пептидом меняла экспрессию таких защитных генов как алленоксидсинтаза (AOS) и редуктаза оксофитодиеновой кислоты (OPR) (Рис. 7 А). Можно предположить, что, регулируя уровень экспрессии AOS и OPR, пептид INI может участвовать в сигналинге метилжасмоната и регулировать количество OPDA у мха в условиях стресса.

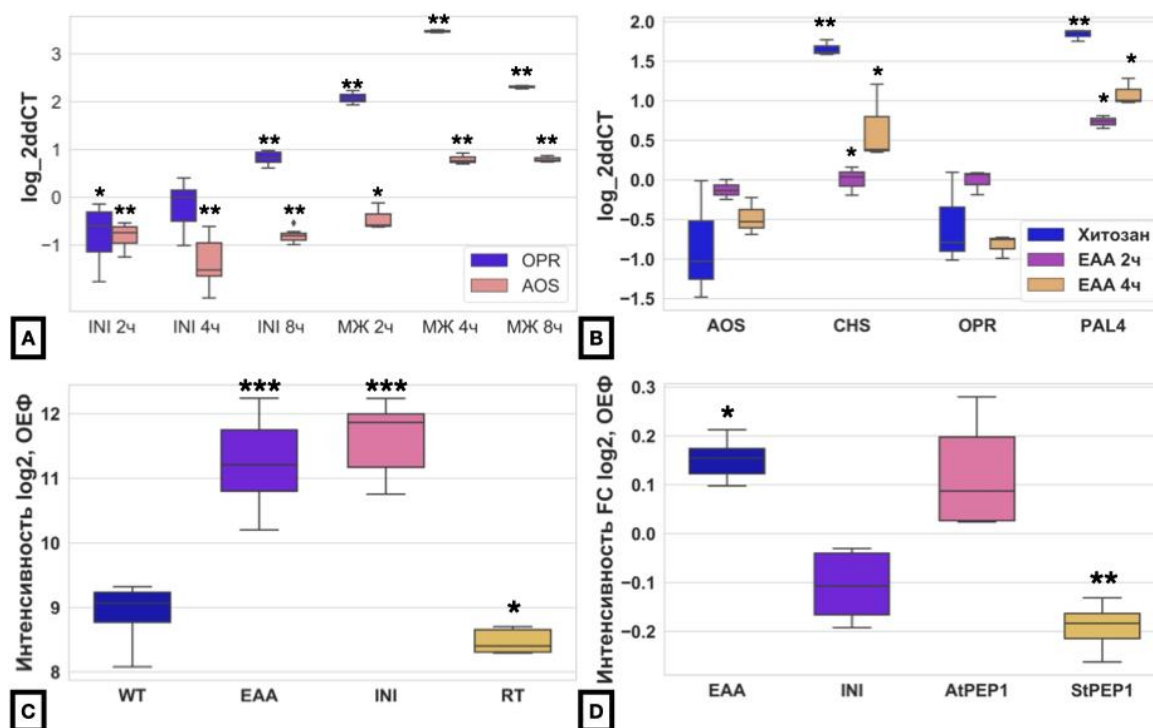


Рис. 7. qRT-ПЦР анализ экспрессии **А** - генов AOS и OPR в протонеме *P. patens* после обработки 400 мкМ метилжасмоната и 1 мкМ INI в течение 2, 4 и 8 часов (непарный t-тест: *P < 0,05; **P < 0,01); **Б** - генов AOS, CHS, OPR и PAL4 в протонеме *P. patens* после обработки 0,01 мг/мл хитозана и 5 мкМ EAA в течение 2 и 4 часов (U-критерий Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05). Сравнение интенсивности аккумуляции молекул АФК С - во внутриклеточном пространстве и **Д** - во внеклеточном пространстве с использованием флуоресцентного красителя после обработки 1 мг/мл хитозана, 5 мкМ синтетических пептидов EAA, INI, AtPEP1 и StPEP1, а также пептидами с известным временем удержания (RT) в качестве отрицательного контроля. На боксплоте **С** представлены логарифмированные значения интенсивности сигнала, на боксплоте **Д** – логарифмированные значения фолдченджа

интенсивностей относительно необработанного контроля (парный t-тест; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001).

Обработка вторым кандидатом в биоактивные пептиды EAA (EAAPAPVAEVEAPKAEE) также изменяла экспрессию таких защитных генов, как AOS, OPR, халконсинтаза (CHS) и фенилаланин аммиаклиаза (PAL4), схожим с известным элиситором, хитозаном, образом, указывая на активацию фенилпропаноидного пути (Рис. 7 В). Кроме того, стрессовый гормон салициловая кислота индуцировал расщепление его предшественника с образованием новых пептидов и увеличением количества уже выщепляющихся.

Мы также показали, что обработка этими пептидами индуцировала выброс молекул АФК во внутриклеточном и внеклеточном пространстве (Рис. 7 С, D). Возможно, эти пептиды действительно являются биоактивными у мха и играют роль амплификации иммунного ответа.

3. Сравнительный анализ функций короткого секретлируемого пептида PEP у сосудистых и несосудистых растений

3.1 Предсказание гомологов рецептора PEPR в геноме *P. patens*

Одним из известных семейств КСП, которое не было обнаружено у бриофитов в нашем анализе, является семейство растительных элиситорных пептидов PEP, гомологи которого, так же, как и его рецепторов PEPR, были найдены практически у всех покрытосеменных. Вероятно, это может быть связано с его высокой родоспецифичностью.

Известные последовательности рецепторов PEPR демонстрируют более высокую степень консервативности среди разных видов растений. Используя список последовательностей известных рецепторов PEPR однодольных и двудольных растений, мы провели поиск гомологов PEPR у модельного объекта *P. patens* с помощью инструмента BLASTp. Мы показали, что ключевые аминокислотные остатки, необходимые для взаимодействия между пептидами PEP и рецепторами PEPR, оказались наиболее консервативными как в покрытосеменных, так и у *P. patens* (Рис. 8 А). Наиболее высокий уровень схожести с последовательностями PEPR покрытосеменных среди PEPR-подобных гомологов *P. patens* продемонстрировали гены Pr3c3_12560V3.1 и Pr3c2_18570V3.1, экспрессия которых также повышалась при обработке стрессовыми гормонами.

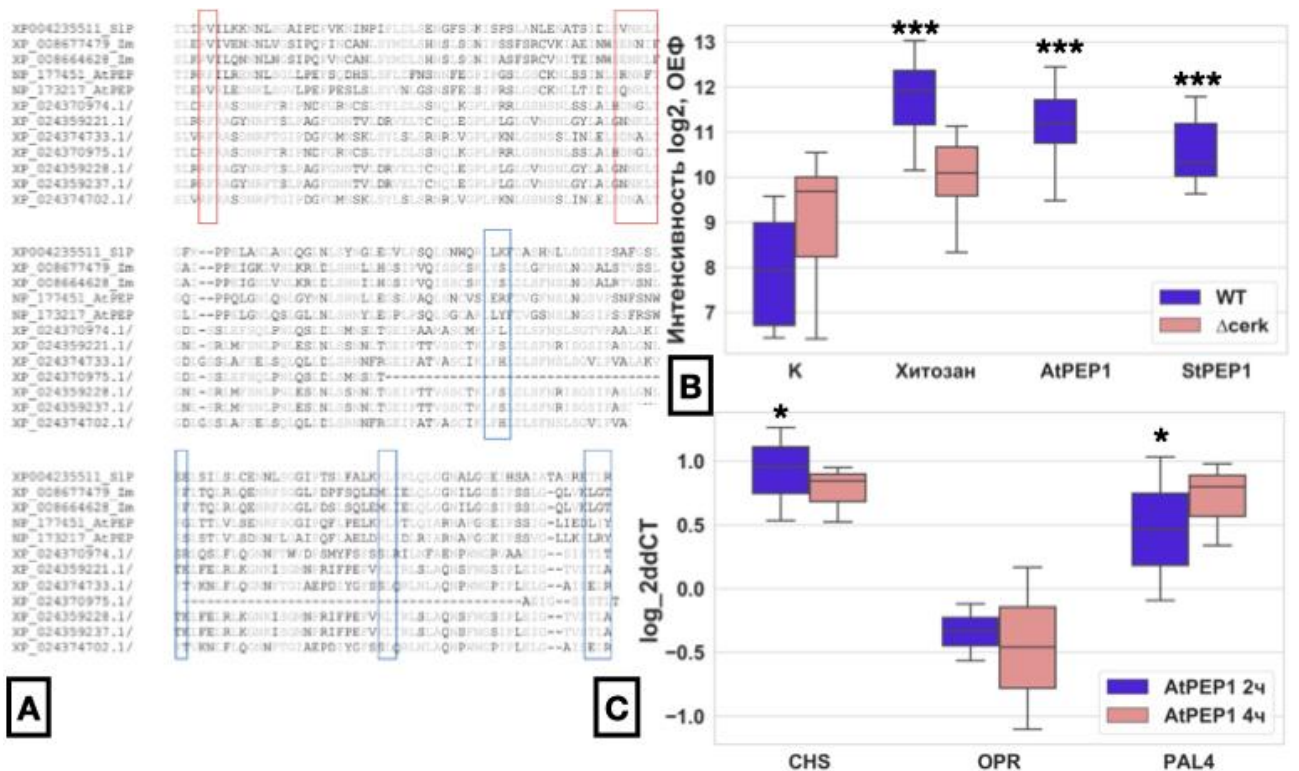


Рис. 8. А - Множественные выравнивания последовательностей рецептора PEPR и потенциальных гомологов PEPR из *P. patens* в области взаимодействия с ВАК1 системы PEPR1-AtPEP1-ВАК1. Красные рамки указывают на область взаимодействия с PEP, синие рамки - на область взаимодействия с ВАК1. В - Сравнение интенсивности аккумуляции внутриклеточных молекул АФК с использованием флуоресцентного красителя после обработки 1 мг/мл хитозана, 5 мкМ синтетических пептидов AtPEP1 и StPEP1, в протонеме растений *P. patens* дикого типа и нокаутных по гену CERK1 (парный t-тест; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001); С - qОТ-ПЦР анализ экспрессии генов CHS, OPR и PAL4 в протонеме *P. patens* после обработки 5 мкМ AtPEP1 в течение 2 и 4 часов (U-критерий Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05).

3.2 Анализ активности синтетических пептидов PEP при обработке *P. patens*

Для анализа роли обнаруженных предположительных гомологов рецептора PEPR1 у мха мы синтезировали пептиды AtPEP1 из *Arabidopsis thaliana* и StPEP1 из *Solanum tuberosum* и обрабатывали ими клетки *P. patens*. Мы показали, что при этом действительно наблюдается похожий стрессовый ответ, как при обработке известным иммунным элиситором хитозаном, выражающийся в повышении уровня АФК в клетках мха (Рис. 8 В и 7 D). При этом нокаутная линия по гену *Δcerk* (ген рецептора хитозана, см. параграф 1.3) не показала значительных изменений в паттернах накопления АФК (Рис. 8 В). Обработка пептидом AtPEP1, в отличие от StPEP1, индуцировали накопление как внеклеточных молекул АФК, так и внутриклеточных (Рис. 8 В и 7 D). Обработка пептидом AtPEP1 также изменяла экспрессию таких защитных генов, как OPR, CHS и PAL4, в протонеме мха *P. patens* (Рис. 8 С). Все это позволило предположить, что в клетках мха действительно присутствуют рецепторы, способные детектировать последовательности AtPEP1.

Для более глубокого понимания роли найденных гомологов рецептора PEPR1 в сигналинге пептидов PEP, с помощью технологии CRISPR/Cas9 мы получили нокаутные линии по генам этих гомологов, обозначенных нами как PEPR-like 1 (Pr3c3_12560V3.1) и PEPR-like 2 (Pr3c2_18570V3.1), и проанализировали интенсивность накопления молекул АФК и изменение экспрессии таких защитных генов, как OPR, CHS, PAL4. В отличие от растений дикого типа обработка пептидом AtPEP1 не индуцировала выброс молекул АФК у нокаутных линий, а также экспрессия защитных генов, в особенности CHS, отличалась от дикого типа, что может подтверждать участие этих рецепторов в сигналинге PEP, указывая на консервативность путей иммунного сигналинга (Рис. 9 А, В).

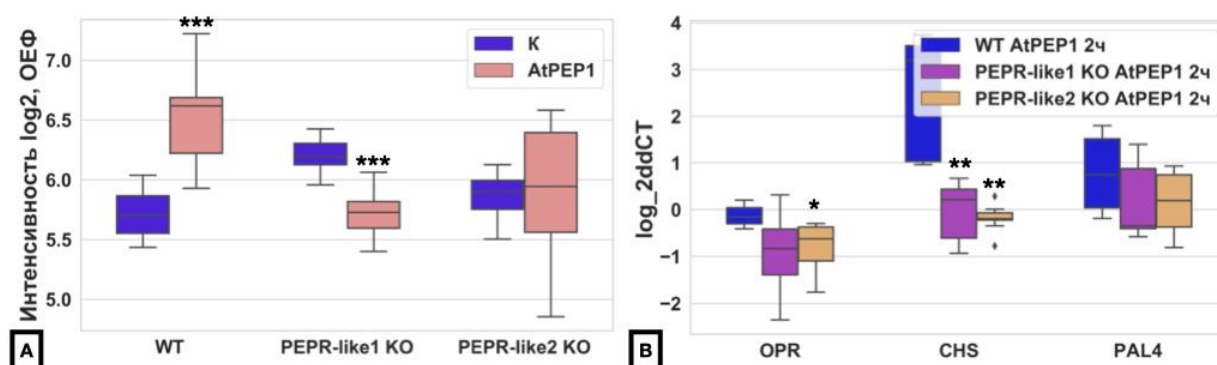


Рис. 9. А - Сравнение интенсивности аккумуляции внутриклеточных молекул АФК с использованием флуоресцентного красителя после обработки 5 мкМ AtPEP1 в протонеме растений *P. patens* дикого типа и нокаутных по генам *PEPR-like 1* и *PEPR-like 2* (парный t-тест; *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001); В - qОТ-ПЦР анализ экспрессии генов OPR, CHS и PAL4 после обработки 5 мкМ AtPEP1 в течение 2 часов в протонеме *P. patens* дикого типа и нокаутных по генам *PEPR-like 1* и *PEPR-like 2* (U-критерий Манна-Уитни; **P < 0,01; *P < 0,05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Первый биологически активный пептид растений был идентифицирован около 30 лет назад. С тех пор, были описаны свыше десяти функциональных семейств пептидов, что, по-видимому, составляет только небольшую часть от общего пула биоактивных пептидов растений. Связано это с тем, что аннотация и функциональный анализ пептидов до сих пор являются сложной задачей. Например, существующие способы аннотации геномов могут пропускать короткие функциональные рамки считывания, способные кодировать биологически активные пептиды. Целью данной работы являлись разработка методов поиска и изучение эндогенных пептидов растений, участвующих в регуляции иммунного ответа. В качестве модельного объекта был использован мох *Physcomitrium patens*. На первом этапе работы мы разработали подходы для поиска гомологов известных коротких секретлируемых пептидов в геномах бриофитов, а также кандидатов новых биологически активных пептидов в транскриптом и пептидоме *Physcomitrium patens* после заражения патогеном и индукции различными стрессами. Мы обнаружили, что геномы эволюционно далеких видов растений – покрытосеменных и бриофитов содержат сходные семейства коротких секретлируемых пептидов. Согласно нашим данным, экспрессия генов белков-предшественников таких коротких секретлируемых пептидов, как EPFL, MEG, nsLTP, CAPE, STIG-GRI и фитоцианины, увеличивалась в ответ на заражение, указывая на роль этих пептидов в регуляции иммунного ответа *P. patens*. Это является свидетельством консервативности путей пептидного сигналинга в филогенетически отдаленных таксонах растений.

Одним из семейств известных коротких секретлируемых пептидов, найденных нами в геноме *P. patens*, было семейство цистеин-богатых пептидов RALF. В последние годы данное семейство пептидов привлекает особое внимание исследователей в связи с разнообразием их функций у цветковых растений. Однако роль данных пептидов у предков современных покрытосеменных, а также эволюция их функций практически не изучены. В этой работе нами было показано, что пептиды PpRALF мха имеют сходную структуру и аминокислотный состав с пептидами AtRALF из арабидопсиса, участвующими в регуляции иммунного ответа. Заражение нокаутных по генам белков-предшественников RALF пептидов линий *P. patens* показало, что пептид PpRALF3 негативно регулирует иммунный ответ у *P. patens*. На основе полученных результатов мы делаем вывод о том, что RALF пептиды и их рецептор FERONIA играли важную роль в регуляции ответа на стрессовые воздействия у общего предка покрытосеменных и споровых растений. Кроме того, в нашей работе мы показали на практике как растения с редуцированным, по сравнению с покрытосеменными, числом генов белков-предшественников могут быть использованы для функционального анализа данного семейства пептидов.

С помощью нашего подхода мы также предсказали ряд коротких рамок считывания, – в том числе расположенных на длинных некодирующих РНК, – дифференциально экспрессирующихся в *P. patens* после заражения патогеном, чьи последовательности имеют признаки, характерные для белков-предшественников известных фитоцитокинов и регуляторных пептидов, но не содержат известных функциональных доменов. Изменение экспрессии генов, кодирующих предположительные предшественники биологически активных пептидов, в процессе иммунного ответа указывает на вероятность вовлеченности этих пептидов в регуляцию защитных реакций.

Анализ пептидных пулов растений, образующихся под действием стрессовых факторов, является одним из прямых методов поиска биологически активных пептидов. Однако, несмотря на стремительное развитие методов масс-спектрометрического анализа в последние годы, пептидомика растений остается мало изученной областью. Мы разработали методику выделения и анализа пулов эндогенных пептидов, которая также может применяться для других растений. В ходе нашей работы мы показали, что стрессовые факторы, такие как стрессовые гормоны и патогенные молекулярные структуры, могут влиять на формирование секретируемого пептидома, индуцируя расщепление уникальных прекурсоров, способных быть белками-предшественниками потенциальных биологически активных пептидов, а также стимулируя выщепление пептидов из новых областей уже существующих прекурсоров. Потенциальные биологически активные пептиды при этом могут содержать пост-трансляционные модификации, а также показывать антимикробную активность. В нашей работе мы обнаружили два потенциальных кандидата в новые биоактивные пептиды, чье образование было стабильно индуцировано различными стрессами. Мы показали, что экзогенная обработка синтезированными пептидами вызывала в растениях *P. patens* иммунный ответ, выражающийся в повышении уровня накопления молекул АФК, а также в изменении экспрессии защитных генов. Таким образом, обнаруженные пептиды могут представлять собой новые фитоцитокины, специфичные для мха.

Несмотря на то, что в геноме мха присутствуют гены многих известных семейств коротких секретируемых пептидов, представители некоторых семейств слишком специфичны или к моменту отделения ветви бриофитов в процессе эволюции растений их гены еще не появились. Одним из таких семейств оказалось семейство пептидов PEP, последовательности которых мы не смогли обнаружить в геноме мха. Однако экзогенная обработка синтетическими пептидами AtPEP1 из арабидопсиса показала, что они способны активировать защитный ответ в клетках мха, указывая на присутствие генов возможных рецепторов этих пептидов в геноме *P. patens*, а также на наличие консервативных участников пептидного сигналинга, вероятно имевшихся также у последнего общего предка наземных растений.

Проведенный поиск показал присутствие в геноме мха двух наиболее вероятных гомологов рецептора PEPR, узнающего пептиды семейства PEP. С помощью нокаутных линий по соответствующим генам мы показали участие этих гомологов рецептора PEPR в регуляции таких иммунных реакций мха *P. patens*, как накопление молекул АФК и изменение экспрессии защитных генов, в ответ на обработку синтетическими пептидами AtPEP1.

Таким образом, в ходе нашего исследования мы показали, что пептиды играют важную роль в регуляции разнообразных процессов, таких как иммунные реакции (Рис. 10). Компоненты пептидных сигнальных путей в высокой степени консервативны среди различных таксонов растений, что позволяет проводить функциональный анализ семейств биологически активных пептидов с большим количеством представителей в таких простых генетических системах, как бриофиты.

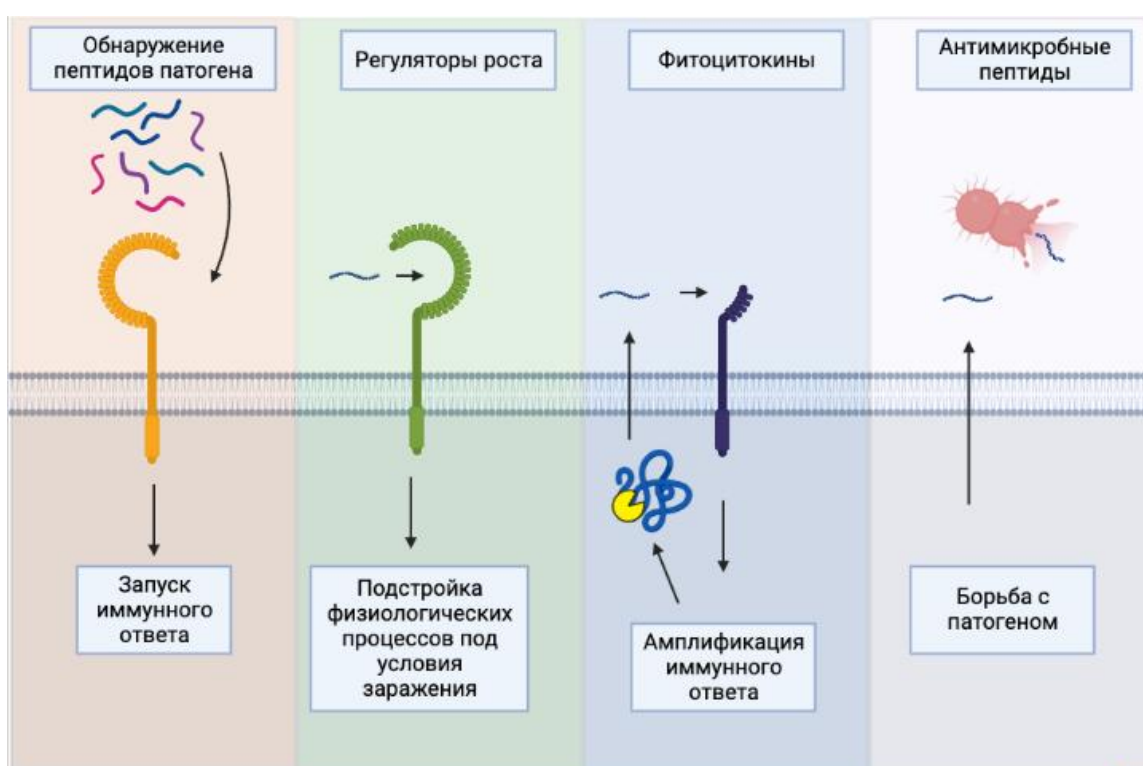


Рис. 10. Функциональные группы биоактивных пептидов (иллюстрация создана с помощью BioRender.com).

ВЫВОДЫ

1. Геномы бриофитов содержат гены белков-предшественников известных семейств коротких секретлируемых пептидов.
2. Экспрессия генов белков предшественников коротких секретлируемых пептидов у *Physcomitrium patens* растет в ответ на заражение *Botrytis cinerea*, что указывает на их роль в защитном ответе и подтверждает консервативность иммунных путей растений разных таксономических групп.
3. Пептиды известного семейства RALF у *P. patens* имеют общие черты по структуре и аминокислотному составу с RALF пептидами арабидопсиса, регулирующими уровень АФК в клетках при биотическом стрессе.
4. Представитель семейства коротких секретлируемых пептидов PrRALF3 играет роль в негативной регуляции иммунного ответа у *P. patens*.
5. Стрессовые факторы индуцируют гидролиз белков, приводя к появлению в пептидоме *P. patens* биологически активных пептидов.
6. Обнаружены пептиды INI и EAA от нефункциональных белков предшественников, которые регулируют выброс АФК и экспрессию защитных генов у *P. patens*.
7. Показано, что при экзогенной обработке растений *P. patens* фитоцитокином арабидопсиса AtPER1 активируется синтез АФК и экспрессия защитных генов, что указывает на наличие компонентов пептидного иммунного сигналинга у последнего общего предка покрытосеменных и споровых растений.
8. Нокаут гомологов рецептора PEPR1 (участвующего в узнавании AtPER1 у арабидопсиса) у *P. patens* снижает выброс АФК, а также влияет на транскрипционный ответ защитных генов при обработке синтетическим пептидом AtPER1, указывая что именно эти рецепторы связаны с распознаванием данного фитоцитокина.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи (знаком "*" отмечены авторы, внесшие равный 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., Mikhhalchik 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., Kniyazev, A., Filippova, A., Grafaskaia, 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 posttranslation modifications of the secreted peptides in the moss *Physcomitrella patens*. *J Pep Sci.* 2019;25:e3138. <https://doi.org/10.1002/psc.3138>

Материалы конференций:

1. **Ляпина И.С.**, Ковальчук С.И., Зиганшин Р.Х., Мамаева А.С., Лазарев В.Н., Лацис И.А., Иванов В.Т., Фесенко И.А. (2021) Изучение роли коротких секретируемых пептидов в иммунном сигналинге растений. Сборник тезисов III Объединенного научного форума физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII Съезда биохимиков России. X Российского симпозиума «Белки и пептиды». VII Съезда физиологов СНГ, Москва, С. 79.
2. **Ляпина И.С.**, Филиппова А.А., Фесенко И.А. (2020) Роль пептидного сигналинга в иммунитете растений. Сборник тезисов XXXII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, С. 20.
3. **Lyapina I.**, Filippova A., Kirov I., Grafaskaia E., Lazarev V., Zgoda V., Fesenko I. (2019) A study on cryptic peptides biological activity in plants. Тезисы международной конференции «Bryology2019», Мадрид.
4. **Ляпина И.С.**, Филиппова А.А., Киров И.В., Графская Е.В., Лазарев В.Н., Згода В.Г., Фесенко И.А. (2019) Изучение роли криптических пептидов в иммунитете растений. Сборник тезисов 19-ой Всероссийской конференции молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», Москва, с. 21-22.
5. **Ляпина И.С.**, Князев А.Н. (2018) Эффективное CRISPR-CAS9 редактирование коротких рамок считывания на модельном объекте *Physcomitrella patens*. Сборник тезисов XVIII Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева «Биотехнология в Растениеводстве, Животноводстве и Ветеринарии», Москва, с. 111-112.