

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Фесенко Игоря Александровича** «Системный анализ пептидома растений на примере мха *Physcomitrium patens*», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Представленная к защите диссертационная работа Фесенко И.А. посвящена системному анализу внутриклеточного и секретируемого пептидомов растений. Для достижения поставленных целей, автор выполнил целый комплекс исследований, направленных на исследование качественного и количественного состава, а также динамики образования и деградации пептидома широко известного модельного объекта – мха *Physcomitrium patens*. Актуальность работы Фесенко И.А. очевидна - пептиды являются известными регуляторами большого количества биологических процессов и идентифицированы у всех живых организмов. Однако, сложность выделения, идентификации и проверки их биологической активности привела к тому, что данные о структуре пептидомов растений практически отсутствовали. Решению данной проблемы и посвящена эта диссертационная работа.

Диссертационная работа Фесенко И.А. изложена на 252 страницах и содержит 86 рисунков и 9 таблиц. Она построена по традиционной схеме и состоит из «Введения», «Литературного обзора», «Материалов и методов», «Результатов и обсуждения», «Заключения», «Выводов», списка используемых сокращений и списка литературы. Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулирована цель, приведены научная новизна и практическая значимость полученных результатов. Литературный обзор занимает чуть меньше 1/6 от общего объема диссертации и включает в себя общую информацию об источниках пептидов в клетках растений и животных, методах анализа пептидомов и биологических процессах, в которых могут участвовать пептиды растений. Достаточно подробно описаны механизмы формирования пептидома, в том числе нативных пептидов составляющих деградом функциональных белков. Отдельно и очень детально рассмотрена роль различных классов коротких открытых рамок считывания в процессе формирования пептидомов растений и животных. В целом обзор литературы демонстрирует уровень сложности той тематики, которой посвящена диссертационная работа. Количество ссылок – 394, большая часть которых относится к работам последнего десятилетия. Раздел «Материалы и методы» описывает обширный арсенал подходов, которые использует автор в процессе выполнения работы. В этом



разделе описаны как биоинформатические подходы, так и различные биохимические методы. Раздел «Результаты и обсуждение» составляет основную часть диссертации.

Проведенное исследование можно разделить на два этапа: системный анализ пептидов разного генеза в пептидомах растений и анализ их биологической активности. В первом разделе автор представляет результаты идентификации, с помощью масс-спектрометрического анализа, пептидов во внутриклеточном и внеклеточном пептидомах модельного объекта *P. patens*. На данном этапе автором, впервые было продемонстрировано, что пептидом растений может быть представлен тысячами тканеспецифичных пептидов. На основе проведенного системного анализа, автор делает вывод о том, что пептидные пулы растений являются сложной смесью пептидов, образующихся при гидролизе белков протеасомами, органелльными протеазами и продуктов их дальнейшей деградации олигопептидазами. Помимо каталогизации пептидомов, важным результатом, который получил автор является выявление закономерностей формирования пептидных пулов. Например, автором показано отсутствие какой-либо линейной зависимости между количеством эндогенных пептидов, образующихся из белка и его представленностью в протеоме клетки. Рассматривая пептидом как сложную взаимосвязанную систему, автором была предложена интересная модель “быстрого” ответа растений на атаку фитопатогенов при помощи образования из функциональных белков-предшественников пептидов с антимикробной активностью.

Важным результатом, полученным автором на этом этапе является идентификация пептидов/микробелков, кодируемых короткими открытыми рамками считывания (кОРС). Известно, что такие пептиды могут играть важные роли в клетке, однако ранее вклад кОРС в формирование пептидомов растений был неизвестен. Более того, на основе полученных данных, автором впервые была дана классификация транслирующихся кОРС у растений. Особый интерес представляют полученные диссертантом данные об эволюции таких пептид-кодирующих генов. Например, автором впервые показано, что растительные геномы содержат множество не аннотированных ранее транслирующихся кОРС, кодирующих пептиды/микробелки, большая часть которых специфична для определенного вида или филогенетической линии. Этот результат очень важен как для понимания роли транскриптов разного типа, например длинных некодирующих РНК (длнкРНК), в формировании протеома клетки, так и для выявления новых биологически активных пептидов и микробелков у растений.

Исследованию биологических функций идентифицированных пептидов диссертант посвятил второй этап своей работы. При этом диссертант для анализа использовал как



пептиды, которые образовались из функциональных белков, так и пептиды, кодируемые короткими рамками считывания. Так, автор показал, что целый ряд пептидов, обладающих антимикробной активностью, появляется во внутри- и внеклеточных секретах при обработках стрессовыми фитогормонами или индукторами повреждений клеточной стенки. Таким образом, полученные результаты подтверждают предложенную автором теорию о роли функциональных белков как резервуара пептидов с антимикробной активностью. Важной частью проведенного функционального анализа является исследование роли пептидов, кодируемых длинными некодирующими РНК. Важно отметить, что такое исследование было впервые проведено на растениях и в процессе этой работы автором был использован ряд оригинальных подходов, например для анализа интерактома идентифицированных пептидов. В свете полученных находок автор предположил, что пептиды, кодируемые длнкРНК, могут быть важны для адаптации к определенным условиям внешней среды и быть резервуаром для появления новых функциональных генов *de novo*. Эти пептиды консервативны и их ортологи были найдены и в других, более далеких видах. Таким образом, еще одной сильной стороной работы является открытие функциональных консервативных пептидов, функции которых могут быть проанализированы у других видов растений.

Из всего вышеизложенного следует, что в работе Фесенко И.А. получены новые фундаментальные знания о пептидомах растений и открыты новые биологически-активные пептиды. Однако позволю себе высказать ряд критических замечаний, которые не умаляют достоинств работы в целом, но могут быть полезны при ее дальнейшем развитии и популяризации.

#### I. Комментарии к разделу «Обзору литературы»

1. В обзоре литературы подробно описаны методы выделения, очистки и идентификации нативных пептидов. Хотелось бы знать, какие существуют способы предсказания биологической активности пептидов.
2. В обзоре не описаны методы предсказания пространственно-устойчивой конформации нативных пептидов.
3. Возможно, имело бы смысл добавить в обзор сводную таблицу известных биологически-активных пептидов растений с указанием консенсусных последовательностей разных семейств.

#### II. Комментарии к разделу «Материалы и Методы»



1. Фактически отсутствует описание того, как проводились фенотипические измерения растений мха и подсчет количества гаметофоров, которые использовались для анализа влияния нокаута и сверхэкспрессии пептидов.
2. В разделе “ Анализ консервативности длинкРНК и коротких открытых рамок считывания” очень поверхностно описан анализ с помощью hmmsearch. Не даны критерии, по которым фильтровали значимые выравнивания.

### III. Комментарии к разделу «Результаты и обсуждение»

1. Совмещение результатов и обсуждения имеет определенные недостатки, поскольку в этом случае обсуждение результатов, полученных в каждом разделе, ограничивается только этим разделом.
2. Не следует злоупотреблять оборотами «"Это может указывать на то, что протеазы с трипсиноподобной активностью вносят ..."».
3. В рамках обсуждения полученных результатов недостаточно освещен вопрос о том, когда природные пептиды готовы принимать пространственно-устойчивую конформацию? Какой минимальный размер нативных пептидов необходим для формирования стабильных структур?
4. В главе «Анализ консервативности “генных” коротких открытых рамок считывания» приводится сравнение доли консервативных “генных” кОПС и 158 маленьких безинтронных белков из аннотации *P. patens*. Однако такой анализ не совсем корректен, поскольку в белковую аннотацию часто включают те последовательности, которые содержат ортологи у других видов. А значит, доля консервативных маленьких белков будет изначально высокой.

### IV. Комментарии к разделу «Выводы»

В некоторых выводах содержат стилистические неточности, связанные с формулировкой полученных результатов как процесса изучения. "Изучить" - в школе академика А.И. Арчакова, к которой я принадлежу, всегда относилось как к адаптации разума к созданной человеком реальности. То есть, "изучить" — это самостоятельно познать то, что ранее уже сделали другие люди. Так, в выводе 4 написано «...**изучена** роль коротких открытых рамок считывания, локализованных на длинных некодирующих РНК...». Лучше бы



заменить на «...исследована роль коротких открытых рамок считывания, локализованных на длинных некодирующих РНК...».

В заключение отзыва следует отметить, что приведенные комментарии не умаляют многочисленных достоинств диссертации и ее автора. Высказанные замечания не затрагивают основных положений, защищаемых автором, и выводов диссертации и не снижают ценности проведенного исследования и высокого качества представленной диссертационной работы. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация производит впечатление законченного исследования, основанного на объемной и тщательно выполненной экспериментальной работе. Результаты полностью отражены в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах и доложены на отечественных и международных конференциях.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа Фесенко Игоря Александровича «Системный анализ пептидома растений на примере мха *Physcomitrium patens*» соответствует всем требованиям (в том числе, п.9), предъявляемым к докторским диссертациям "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; от 20.03.2021 г. № 426; от 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник,  
Научно-практический образовательный центр-  
обособленное подразделение  
ФГБНУ «Научно-исследовательский  
институт биомедицинской химии  
имени В.Н. Ореховича»,  
доктор биологических наук,  
академик РАН

Андрей Валерьевич Лисица

Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8  
Тел. +7(499)246-69-80, Email: Lisitsa058@gmail.com

27 мая 2022 г.

Подпись

заверяю

Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карлова Е.А.

