

## Отзыв

официального оппонента к.б.н. Побегуц Ольги Владимировны на диссертацию Ляпиной Ирины Сергеевны «Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

Диссертация Ляпиной И.С. посвящена разработке методов поиска и изучению биологической активности эндогенных пептидов, участвующих в регуляции иммунного ответа растений. В работе на примере модельного объекта *Physcomitrium patens* разработана платформа для идентификации новых биологически активных пептидов с применением методов анализа геномов, транскриптомов и пептидомов, с помощью которой проведен поиск генов белков-предшественников коротких секретлируемых пептидов в геномах бриофитов, определены дифференциально экспрессирующиеся в ответ на заражение патогенами гены белков-предшественников уже известных и новых пептидов, проведен функциональный анализ уже известных и новых эндогенных пептидов, которые индуцируются в результате биотического и абиотического стрессов.

### Актуальность темы выполненной работы.

Система врождённого иммунитета растений позволяет им активно противостоять большому количеству стрессовых факторов. Важную роль в регуляции иммунных реакций у растений играют пептиды. Помимо антимикробных пептидов, в последние годы были обнаружены сигнальные и регуляторные пептиды, участвующие в каскаде защитных реакций. Эти пептиды скрыты в структуре специальных предшественников или функциональных белков и узнаются специализированными рецепторами на поверхности клеток. Несмотря на то, что в последние 2 десятилетия пептидные эндогенные лиганды, узнаваемые рецептор-подобными киназами растений, активно изучаются, пока мало что известно о том, как конкретно происходит активируемый эндогенными пептидами сигналинг, как эволюционировали его компоненты, насколько они консервативны среди растительных таксонов, каковы механизмы возникновения пар лиганд-рецептор. В основном исследователи изучают механизмы пептидного сигналинга у покрытосеменных растений, подобных работ для споровых растений очень мало. Поиск и изучение иммуногенных пептидов и их рецепторов представляет практический интерес для создания устойчивых к стрессу мутантных линий сельскохозяйственных культур, а также для



возможности регулировать их защитные реакции. Поэтому актуальность выбранной темы несомненна.

Поскольку «пептидомика» и поиск биологически активных пептидов являются сравнительно новым направлением в изучении биологических систем, методы предсказания и анализа довольно сложны и требуют дальнейшей разработки. Поэтому предложенный в работе новый системный подход для поиска и анализа коротких секретлируемых пептидов является очень актуальным и перспективным.

### **Новизна исследования и полученных результатов.**

«Пептидомика» является довольно молодым направлением исследований в отличие от давно проверенной «протеомики» и методы анализа пептидов на сегодняшний день все еще недостаточно развиты. Учитывая очень низкую концентрацию пептидов в клетках и «секретомах», а также сложность их выделения из растений, пептиды остаются малоизученными компонентами растительной клетки. Из-за большой вариабельности физико-химических свойств пептидов и сложности в поиске соответствующих белков-предшественников, определение и последующее сопоставление с базой белковых прекурсоров для идентификации представляют сложную задачу для эндогенных пептидов. Эти сложности привели к необходимости разработки новых подходов, которые объединяли бы не только биоинформатический анализ геномов, но и другие подходы. В диссертационной работе Ляпина И. С. предлагает новый подход идентификации уже известных и ранее не охарактеризованных семейств биологически активных пептидов, который объединил методы анализа геномов, транскриптомов и пептидомов. Такой системный подход в этой работе применен впервые. На основании этого подхода впервые проведен поиск гомологов коротких секретлируемых пептидов покрытосеменных растений у пяти видов бриофитов и показано, что их количество и распределение отличается от покрытосеменных растений. Предсказано несколько белков-предшественников известных пептидных семейств регуляторных пептидов, вовлеченных в регуляцию процессов развития растений, фитоцитокинов, участвующих в иммунном ответе, а также антимикробных пептидов. Впервые проведен функциональный анализ одного из представителей известного семейства коротких секретлируемых пептидов RALF и показана роль представителей этого семейства в ответе на биотический стресс у бриофитов. Выявлены новые пептиды, обладающие возможным биоактивным потенциалом, проведен их функциональный анализ и показана роль в иммунном ответе.



В качестве объекта исследования использован представитель бриофитов - *Physcomitrium patens*. Покрытосеменные и бриофиты имеют общие консервативные пути передачи сигнала в процессе иммунного ответа, но репертуар рецепторов и эндогенных пептидных лигандов значительно меньше у мхов по сравнению с сосудистыми растениями. Большую часть жизненного цикла бриофиты проводят в форме гаплоидного гаметофита и имеют более простую организацию генома. Все это облегчает задачи в изучении молекулярных механизмов регуляторных каскадов в ответ на стресс, исследовании функций отдельных компонентов иммунного ответа, а также получении мутантных линий. В связи с этим, выбор объекта исследования для достижения цели и решения задач диссертационной работы вполне обоснован. Он позволил не только определить роль известных и вновь обнаруженных эндогенных пептидов, получить нокаутные мутанты по целевым генам, но и определить некоторые эволюционные закономерности пептидных семейств растений. В частности показать, что пептиды, относящиеся к классу RALF, являются консервативными среди покрытосеменных и споровых растений, и играли важную роль в ответ на стресс у их общего предка. Научная новизна диссертационной работы не вызывает сомнений.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций,  
сформулированных в диссертации.**

Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, являются обоснованными и подтверждены публикациями автора по теме диссертации в ряде высокорейтинговых журналов.

**Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций.**

Достоверность выносимых на защиту научных положений, сформулированных выводов и предложенных методических подходов, отражающих полученные в ходе выполнения диссертационной работы научные достижения, не вызывает сомнений. В работе использованы новейшие научно-обоснованные подходы, а также методы статистической обработки данных.

**Структура диссертации.**

Диссертационная работа имеет классическую структуру, изложена на 134 страницах, содержит 16 рисунков и 1 таблицу и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы»,



«Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список использованных источников».

В разделе «Введение» автор аргументирует актуальность темы и выбор объекта для исследования, описывает цель и задачи работы, ее научную новизну. Положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и соответствуют поставленным задачам. Достоверность результатов подтверждается публикациями в высокорейтинговых журналах и докладами на российских и международных научных конференциях.

Литературный обзор написан подробно, хорошо структурирован, содержит всю необходимую информацию для понимания диссертационной работы. Подробно описаны различные модели иммунитета растений, разобраны внеклеточные и внутриклеточные иммунные реакции, активируемые при узнавании мембранными рецепторами растений лигандов и эффекторов патогенов. Отдельная глава посвящена эволюции иммунитета растений, отмечается консервативность механизмов иммунитета и компонентов сигнальных путей у растений. Представлена информация о путях образования пептидов, обладающих биологической активностью, в частности с помощью протеолиза и прямой трансляции с коротких рамок считывания. Автор также подробно описывает классификацию известных пептидов, участвующих в иммунном сигналинге и их основные характеристики. Подробно описаны современные методы масс-спектрометрии и биоинформатические инструменты для предсказания и аннотации предшественников пептидов в геномах и анализа пептидомов растений.

Глава «Материалы и методы» содержит краткое описание применяемых автором методов. Необходимо отметить, что в данной работе использованы самые современные методы, начиная с получения нокаутных линий, РНК-секвенирования и ВЭЖХ-МС анализа для идентификации пептидов, и заканчивая целым арсеналом биоинформатических инструментов для поиска и предсказания генов, кодирующих короткие секретрируемые пептиды, их функциональной аннотации и идентификации в стресс-индуцированном транскриптоме. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 3 разделов.

Первый раздел посвящен идентификации семейств биологически активных пептидов у 5 представителей бриофитов. На основании разработанного автором подхода, объединяющего методы анализа геномов, транскриптомов и пептидомов, проведен поиск видоспецифичных кандидатов семейств таких пептидов, проанализированы результаты РНК-секвенирования до и после заражения *Physcomitrium patens* патогенным грибом *Botrytis cinerea*, а также проведен анализ нативного пептидома *Physcomitrium patens* после обработки гормонами стресса и хитозаном. В результате предсказаны уже известные и



новые гены прекурсоры, обнаружены 49 открытых рамок считывания, кодирующих потенциальные кандидаты новых биологически активных пептидов, уровень транскрипции которых повышается в ответ на заражение. Обнаружено, что обработка стрессовыми фитогормонами меняет секретлируемый пептидом и приводит к выщеплению уникальных модифицированных пептидов. Идентифицированы уже известные и новые пептиды и их прекурсоры, связанные с ответом на стресс.

Второй раздел посвящен анализу биологической активности уже известных и новых, определившихся в результате данного исследования, эндогенных пептидов. В частности, используя нокаутные мутанты, анализ аминокислотного состава и сравнительный анализ транскриптомов, полученных до и после заражения дикого типа *Physcomitrium patens* и нокаутных мутантов по генам, соответствующим прекурсорам трех секретлируемых пептидов, относящихся к семейству RALF, показана ключевая роль трех пептидов PpRALF1, PpRALF2 и PpRALF3 в негативной регуляции иммунного ответа при заражении фитопатогеном. Предполагается их участие в процессах биосинтеза фенилпропаноидов и ремоделирования клеточной стенки, одних из ключевых защитных механизмов растений, и в качестве модулей, которые связывают между собой рост растений и регуляцию устойчивости к стрессу. Проведен функциональный анализ двух пептидов, которые были общими индуцируемыми в результате всех используемых абиотических стрессов - INI (INIINAPLQGFKIA) и EAA (EAAPAPVAEVEAPKAEE). Показано, что пептид INI обладает высокой антимикробной активностью против таких бактерий, как *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. Показано также, что оба пептида индуцируют экспрессию генов, участвующих в защите в условиях стресса, и предполагаются в качестве иммунных сигналов.

Третий раздел посвящен сравнительному анализу функций короткого секретлируемого пептида PEP у сосудистых и несосудистых растений. Автором идентифицировано 12 потенциальных генов белков-предшественников, которые могли бы содержать последовательности PEP, а также предсказаны 14 гомологов рецептора PEPR1 у мха *Physcomitrium patens*. Кроме того, обнаружено, что экспрессия генов этих гомологов повышается при обработке стрессовыми гормонами. Анализ активности синтетических пептидов PEP при обработке *Physcomitrium patens* и нокаутных мутантов по трем генам-гомологам PEP-рецепторов позволил предположить, что рецепторы PEPR *Physcomitrium patens* могут связываться с пептидами PEP и запускать иммунный сигнальный каскад.

Результаты работы изложены подробно и читаются с большим интересом. Выводы, сделанные автором в этой работе, достоверны, подкреплены экспериментальным материалом и соответствуют поставленным задачам.



## Оценка содержания диссертационной работы.

Содержание диссертационной работы Ляпиной И.С., представленной к защите на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология» отражает основные результаты, опубликованные по теме исследований в международных журналах. В целом, полученные результаты приведены в соответствии с логикой заявленных цели и задачам диссертационной работы. Однако есть ряд замечаний, возникших при ознакомлении с работой.

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 пробоподготовки образцов пептидомов для масс-спектрометрического анализа?
3. Не понятно, 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».

### Заключение.

Диссертационная работа Ляпиной И.С. «Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология» является самостоятельным, комплексным и законченным научным исследованием, которое вносит существенный вклад в изучение роли пептидогенеза в ответе на стрессовые факторы внешней среды и защите растений от фитопатогенов. Основные результаты работы отражены в печати в 5



статьях, опубликованных в рецензируемых изданиях, индексируемых в международных системах цитирования Web of Science и Scopus (средний импакт-фактор IF= 5,73).

Сделанные замечания не ставят под сомнение научную ценность проведенного исследования. Выводы сформулированы корректно и имеют биологическую значимость. По актуальности темы, научному и методическому уровню, большому объему проделанной работы, качеству полученных результатов, научной новизне и практической значимости диссертация Ляпиной Ирины Сергеевны полностью соответствует критериям, установленным «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, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 20.03.2021 г. № 426, от 11.09.2021 г. № 1539 и от 26.09.2022 г. № 1690), а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

**Официальный оппонент:**

Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории протеомного анализа Федерального государственного бюджетного учреждения Федерального Научно-клинического Центра Физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России)

Побегуц Ольга Владимировна

Адрес места работы: г. Москва, ул. Малая Пироговская, 1А, ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России; тел. +7 499 246-02-93, адрес электронной почты – [nikitishena@mail.ru](mailto:nikitishena@mail.ru)

26.05.2023 г.

Подпись к.б.н. Побегуц О.В. ЗАВЕРЯЮ:

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ

им. Ю.М. Лопухина ФМБА России

к.б.н. Лихнова О.П.

