

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01

14 июня 2023 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Ляпиной Ирины Сергеевны

По теме: **«Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе
растений»**

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

Москва – 2023

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, от 22 февраля 2023 года.

Зам. председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н., профессор Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
2.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
4.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
5.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
6.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
7.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
8.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
9.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
10.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11.	Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
12.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
13.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
14.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
15.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
16.	Д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
17.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
19.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Ефремов Р.Г., председатель: Добрый день, уважаемые коллеги, уважаемые члены диссертационного совета! Предлагаю считать открытым очередное заседание нашего совета. Сегодня на повестке дня у нас диссертационная работа Ляпиной Ирины Сергеевны на тему «Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений». Работа представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. Научный руководитель: д.б.н. Фесенко Игорь Александрович, он присутствует онлайн. Официальные оппоненты по работе: Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории функциональной геномики Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук; и Побегуц Ольга Владимировна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории протеомного анализа ФНКЦ Физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России. Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет». Владимир Александрович, огласите, пожалуйста, материалы. Да, и если есть какие-то вопросы, замечания по повестке дня, то, пожалуйста, задавайте вопросы, обращайтесь. Если нет, тогда Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя).* Да, материалы личного дела. Ляпина Ирина Сергеевна, Российская Федерация, окончила магистратуру Российского государственного аграрного университета имени К.А. Тимирязева в 2019 году. С 2019 по 2023 обучалась в аспирантуре нашего института. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология сдан с оценкой «отлично». С 2017 по 2019 год инженер-исследователь, а с 2019 – младший научный сотрудник лаборатории системного анализа белков и пептидов нашего института, ИБХ РАН. Соответственно, в этой лаборатории системного анализа выполнена сама работа. Научный руководитель, уже произнесли, это доктор наук Фесенко Игорь Александрович. И по теме диссертации опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, то есть 13 апреля этого года, и все необходимые документы в деле имеются.

Ефремов Р.Г., председатель: Есть какие-нибудь вопросы по представленным материалам? Вопросов нет, тогда, Ирина Сергеевна, пожалуйста, изложите основные положения Вашей работы. Регламент 20 минут у нас стандартный.

Ляпина И.С., соискатель: *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Уважаемые коллеги, вопросы. Открываем дискуссию. Вопросы, пожалуйста, у кого есть? Позвольте тогда мне начать. У Вас один из этапов Вашего протокола это биоинформационный анализ. И Вы ссылаетесь на некий алгоритм SPADA, марковские цепи. А в чем новизна? То есть вот поиск скрытых гомологий, многие этим занимаются. Оригинальность Вашего подхода в чем заключалась?

Ляпина И.С., соискатель: Как я уже говорила, такой поиск, именно с помощью этого инструмента, и в принципе, основанный на...

Ефремов Р.Г., председатель: Но это не Ваш инструмент?

Ляпина И.С., соискатель: Нет, это не наш инструмент, не нами придуманный. Но с помощью этого инструмента в основном искали такие биоактивные пептиды только у покрытосеменных и больше ни в каких отделах царства Растений.

Ефремов Р.Г., председатель: То есть, новизна в объекте, да?

Ляпина И.С., соискатель: Да. Поскольку все-таки эти растения тоже представляют определенное значение, то для них тоже должны быть выработаны определенные методы поиска.

Ефремов Р.Г., председатель: Понятно. То есть Вы сам алгоритм никак дополнительно не модифицировали, то есть не калибровали, не настраивали, просто применили к новому классу объектов, там, где никто еще до Вас не искал, правильно?

Ляпина И.С., соискатель: Фактически да. То есть мы сравнили уже с готовыми НММ профилями из *Arabidopsis*, с самыми такими модельными. И показали, что для наших объектов, для бриофитов, есть достаточно большие различия, и как раз это, собственно, нуждается в улучшении. И это как раз наши дальнейшие планы.

Ефремов Р.Г., председатель: Понятно. А еще у Вас там были показаны на нескольких слайдах пространственные структуры ряда пептидов, там и предсказанные, и показанные. Зачем они были продемонстрированы? То есть, они дают какое-нибудь понимание о механизме действия, допустим, этих пептидов? Зачем Вы их показали, я, честно говоря, не очень уловил. Тем более, у Вас там было написано, что 3D структура или модель там, и название, видимо, этого организма, а какой пептид-то конкретный.

Ляпина И.С., соискатель: Пептиды там тоже указаны.

Ефремов Р.Г., председатель: На какой-то из моделей просто 3D структура и что-то на латыни. *P.patens*. Видите, предсказанная 3D структура *P.patens*. Это что означает? По-видимому, просто раньше было, какой-то конкретный пептид?

Ляпина И.С., соискатель: Да, то есть я сравниваю рядом дефензин и предсказанная структура возможного дефензина у мха. Я пропустила слово.

Ефремов Р.Г., председатель: Да, и вот смысл этого сравнения в чем? То есть, Вы считаете, что структуры похожи? То есть, есть какая-то гомология по пространственной структуре?

Ляпина И.С., соискатель: Да. Было показано, собственно, из литературных данных, что вот такая конкретно структура с альфа-спиралью и тремя этими складками.

Ефремов Р.Г., председатель: Тогда их надо было наложить. Потому что они у Вас с разного ракурса показаны. А насколько они похожи вообще? Я не вижу, честно говоря. Фолд да, похож, трехпетлевая бета-структура и альфа-спираль, прилегающая к одному из бета-тяжей, но, насколько это похоже или нет, Вы как-то проверяли? Суперпозицию делали? И зачем это нужно?

Ляпина И.С., соискатель: Нет, прямо чтобы складывать друг с другом мы не делали, мы проверяли на конкретные части этой структуры, как раз для того, чтобы заключить потенциал их функциональности. Потому что было показано, что для таких пептидов очень важна конкретно структура для их функциональности, для их действия. И поэтому мы предполагаем, что добавление такого инструмента как, собственно, предсказание структуры, может очень продвинуть предсказание новых каких-то гомологов или новых пептидов, которые могут действовать похоже, хотя имеют разные последовательности.

Ефремов Р.Г., председатель: То есть у них схожий с дефензинами механизм действия, Вы считаете? Какая мишень?

Ляпина И.С., соискатель: Мы предполагаем, что у них может быть схожее действие, но мы пока еще не проверяли. Это как раз дальнейшая работа. То есть, да, мы предполагаем, что это тоже может быть антимикробным пептидом. И соответственно, мы дальше будем проверять это на уже биологических моделях.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Еще вопросы, коллеги? Да, пожалуйста.

Ямпольский И.В.: Не могли бы Вы пояснить, я, может, не совсем расслышал или не совсем сходу понял. Про рецепторы. Я правильно понял, что Вы нашли рецепторы одного из Ваших пептидов?

Ляпина И.С., соискатель: Если я правильно понимаю, Вы здесь спрашиваете? Нет, это не наших пептидов. Мы нашли именно гомологи рецепторов пептидов из покрытосеменных, которые достаточно консервативны у других семейств покрытосеменных растений.

Ямпольский И.В.: Что это за рецепторы?

Ляпина И.С., соискатель: Это рецепторы пептида PER из Arabidopsis. Однако сами пептиды не отличаются особой консервативностью. То есть у них есть маленький небольшой паттерн...

Ямпольский И.В.: То есть это рецептор с какой-то известной функцией? Я просто такой рецептор не знаю.

Ляпина И.С., соискатель: Да, это рецептор известный. То есть вот эта пара пептида PEP и рецептора PEPR, как раз была доказана их связь, что пептид PEP является лигандом для этого рецептора. И соответственно мы считаем, что рецепторы намного более консервативны, чем сами пептиды, и, собственно, поэтому мы провели поиск гомологов рецепторов на нашем объекте.

Ямпольский И.В.: То есть Вы здесь предполагаете, что какие-то из Ваших пептидов, или все, связываются с этим рецептором, так?

Ляпина И.С., соискатель: Мы скорее предполагаем, что есть какие-то консервативные рецепторы, которые могут воспринимать какие-то специфические сигналы. Хотя эти сигналы все еще могут эволюционно не появиться, например.

Ямпольский И.В.: Ну, то есть это немножко все-таки так, не то чтобы это какие-то уже твердые знания, да?

Ляпина И.С., соискатель: Нет, это пока предположение только.

Ямпольский И.В.: Гипотетически поиск, да?

Ляпина И.С., соискатель: Ну, не настолько гипотетический. Мы все-таки пытаемся проверить их функцию. Но это все еще большая работа.

Ямпольский И.В.: А вот именно по функции у Вас какие-то данные есть?

Ляпина И.С., соискатель: Вот, поскольку мы показываем, что сигналинг пептида из Arabidopsis, собственно, откуда этот рецептор, у мха без каких-либо других модификаций какой-то ответ иммунный показывает похожий.

Ямпольский И.В.: Ну вот здесь я все-таки какой-то прямой связи с этим рецептором не вижу.

Ляпина И.С., соискатель: Но, поскольку мы сделали еще нокауты этих генов наших предполагаемых рецепторов...

Ямпольский И.В.: А, ну вот! Это уже кое-что.

Ляпина И.С., соискатель: Да. То есть мы показываем, что действительно это меняет сигналинг. Так что мы думаем, что все-таки эти рецепторы действительно могут участвовать в каком-то похожем сигналинге. Хотя, может, пептидов все еще не образовалось на том этапе.

Ямпольский И.В.: Ну вот, меняет в два раза экспрессии генов. Спасибо, спасибо.

Ефремов Р.Г., председатель: А вот, честно говоря, к этому же вопросу. Насколько те пептиды, которые известны, что действуют на рецептор, насколько они гомологичны? Или там какая-то скрытая гомология, или у них есть какие-то структурные особенности

общие? Какие-то элементы структуры общие? Почему Вы думаете, что... Просто не было информации. Почему Вы считаете, что найденные Вами пептиды, вот они именно могут действовать на этот рецептор?

Ляпина И.С., соискатель: Нет, мы как раз не нашли пептиды. В этом и проблема была, что пептиды РЕР они не отличаются особой консервативностью, они достаточно специфичны для каждого отдельного семейства. И поэтому их поиск и затруднен. И, собственно, у бриофитов вообще ничего даже похожего не было найдено. Хотя у покрытосеменных были найдены функциональные аналоги, были найдены какие-то гипотетически похожие пептиды. Но именно рецепторы более консервативны.

Ефремов Р.Г., председатель: Это понятно. Меня вот как раз больше интересовало сходство вот этих вот пептидов, которые у растений у высших, и вот то, что Вы предполагаете.

Ляпина И.С., соискатель: Ну да, у высших растений сами пептиды не особенно похожи друг на друга. А вот рецепторы как раз больше похожи, намного. И, собственно, из-за этого мы и искали именно рецепторы, а пептиды мы так и не нашли.

Ефремов Р.Г., председатель: Как Вы считаете тогда, если столь разнообразное семейство пептидов, как они действуют специфически на конкретный рецептор? В чем детерминанта их связывания, чем определяется?

Ляпина И.С., соискатель: Да, спасибо. Собственно, да, мы и предполагаем, что на связывание очень сильно влияют определенные аминокислотные остатки в определенных позициях, то есть какое-то пространственное...

Ефремов Р.Г., председатель: Это известные какие-то вещи, да?

Ляпина И.С., соискатель: Да. И как раз поэтому мы предсказываем и 3D структуры найденных нами новых пептидов. Для того чтобы, если вдруг последовательности пептидов недостаточно консервативны и не похожи, мы можем заключить...

Ефремов Р.Г., председатель: Ну понятно, фармакофор какой-то должен быть. Вы просто не показали его, поэтому вопросы и возникают. Тот самый фармакофор, который отвечает за связывание пептидов у высших растений с этими рецепторами, Вы предполагаете, что подобный фармакофор пространственный есть и в Ваших пептидах, обнаруженных Вами. Кстати, как Вы предсказываете пространственную структуру?

Ляпина И.С., соискатель: Мы предсказывали с помощью AlphaFold инструмента.

Ефремов Р.Г., председатель: А насколько он годится для этой задачи?

Ляпина И.С., соискатель: Ну, достаточно. Мы проверили на известных структурах, которые из базы данных, и соответствовало достаточно хорошо для растительных последовательностей.

Ефремов Р.Г., председатель: Да, спасибо.

Ляпина И.С., соискатель: Да, и еще раз хочу сказать, что пептиды РЕР у мха найдены не были. Мы их не нашли, поскольку они достаточно специфичные. И по последовательности конкретно их найти очень сложно. И, собственно, поэтому мы заходим с другой стороны, заходим со стороны рецепторов.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Да, пожалуйста. Только к микрофону выходите, пожалуйста.

Истомина Е.А.: У меня тоже вопрос как раз к РЕР-ам. Чисто теоретический, даже практический. Вы говорили о том, что Вы его синтезировали. Меня интересует, каким способом и какую молекулу. Потому что на самом деле он скорее всего длинный. Где-то там от 100 до 150 аминокислот. Каким путем он был у Вас получен?

Ляпина И.С., соискатель: Да, спасибо за вопрос. На самом деле мы синтезировали РЕР из *Arabidopsis* и еще РЕР из картофеля, синтезировали их химическим синтезом обычным. Но они не длинные, это длинный прекурсор его, то есть белок, из которого он выщепляется. Сама функциональная область достаточно короткая, то есть в пределах нескольких десятков... Меньше, меньше!

Истомина Е.А.: А сколько вот конкретно, двадцать, я не знаю. Сколько аминокислот? Приблизительно.

Ляпина И.С., соискатель: Честно, точно не вспомню, но до двадцати.

Истомина Е.А.: Еще у меня тоже очень практический, точнее даже теоретический вопрос. Вы говорите о том, что Вы очень много нашли последовательностей. У Вас где-нибудь эти последовательности есть, чтобы на них можно было посмотреть?

Ляпина И.С., соискатель: Которые новые? Да, на самом деле у нас были опубликованы работы.

Истомина Е.А.: То есть это все у Вас уже опубликовано?

Ляпина И.С., соискатель: Да, это все опубликовано. Вот, например, мы публиковали еще в 2019 году последовательности новых отобранных нами для синтеза пептидов. Мы также проверяли антимикробную активность для них. И, собственно, один из этой работы был отобран для дальнейшего функционального анализа. То есть, не все пептиды, которые мы отобрали изначально, они были какими-то функциональными, то есть мы проверяли эти последовательности и только часть из них показала хотя бы какую-то функциональную активность. Собственно, мы это и показываем.

Истомина Е.А.: То есть цель была не только найти, но и обнаружить их функциональную значимость.

Ляпина И.С., соискатель: Да. Мы как раз хотели проверить их биологический потенциал, биологическую активность.

Истомина Е.А.: И еще один вопрос по поводу транскриптома. Когда Вы проводили транскриптом, Вы брали конкретную точку? У Вас их много просто, я так поняла, было транскриптомов? Как Вы выявляли, в какой момент брать точку на эксперимент? То есть, какая была, там 24 часа, я не знаю, 48 часов? Какие были параметры для отбора вот этих вот точек для транскриптома?

Ляпина И.С., соискатель: Я поняла, спасибо большое. Да, как раз тот транскриптом, который мы делали сами, потому что предыдущие, то, что я говорила, это был из литературных данных...

Истомина Е.А.: А, то есть Вы делали, получается, один конкретный?

Ляпина И.С., соискатель: Да, да, мы делали только вот этот транскриптом, который нокаут RALF3 после заражения грибом. Соответственно, мы брали точку, когда заражение грибом уже дошло до того момента, когда есть видимые признаки.

Истомина Е.А.: Вот оно когда было?

Ляпина И.С., соискатель: Это было через семь дней после заражения.

Истомина Е.А.: То есть у Вас одна единственная точка получается? Семь дней. Повторы, технические?

Ляпина И.С., соискатель: Да. И соответственно было три биологических повтора, это безусловно.

Истомина Е.А.: Ага, спасибо.

Ляпина И.С., соискатель: Спасибо большое.

Ефремов Р.Г., председатель: Еще вопросы, пожалуйста? Вопросов больше нет. Спасибо. Тогда слово предоставляется научному руководителю. Игорь Александрович Фесенко у нас присутствует онлайн, насколько я понимаю. Да, Игорь Александрович, пожалуйста, скажите о соискателе.

Фесенко И.А., научный руководитель: Да, здравствуйте, члены диссертационного совета и все присутствующие. Ирина работает в лаборатории с 2017 года, защитила здесь и бакалаврский диплом и магистерский диплом. Ее работа была посвящена как раз как поиску биоактивных пептидов, так и анализу какой-то эволюционной консервативности рецепторов, пептидного сигналинга. И надо сказать, что это достаточно сложная работа, и вот та дискуссия, которая разгорелась вокруг гомологов рецепторов, пептидных сигналов, она говорит как раз о том, что тема сейчас активно изучается, еще много чего непонятно. Но Ирина сделала очень много, как работы руками, так и биоинформатическая работа, и по поиску возможных гомологов, по обработке, по получению нокаутных линий. Она,

может быть, не совсем четко расставила акценты, когда говорила про рецепторы, вот, в частности, здесь говорили про PER и PERP рецепторы. Это очень интересное семейство, которое имеет очень много функциональных ортологов у разных таксонов растительных, но тем не менее не очень понятно, какие рецепторы, как это все функционирует. Но вот в своей работе она тоже попыталась внести свой вклад. В целом могу оценить очень положительно. Человек, который способен не только выполнять что-то руками, как часто бывает, вот люди делают то, что им скажут, но и какие-то свои идеи защищать, предлагать, выполнять. Поэтому можно оценить соискателя только с самой положительной стороны. Очень любознательная и, что самое главное, наверное, для будущего ученого, помимо работы руками она еще очень хорошо пишет статьи, пишет сама и, я считаю, что это очень важно. И то количество работ, которое опубликовано по данной достаточно сложной теме, в которых она всех принимала, естественно, самое непосредственное участие, в написании, в планировании экспериментов, говорит о том, что ее уровень как такого будущего сотрудника со степенью, в общем-то работа полностью соответствует этому.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Уважаемые коллеги, есть вопросы к научному руководителю? Вопросов нет. Тогда, Владимир Александрович, ознакомьте, пожалуйста, присутствующих с письменными отзывами.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает положительное заключение организации, где выполнялась работа).* Ну, во-первых, естественно, мы начинаем с заключения организации, где выполнялась работа. Выполнялась работа в нашем институте, в институте биоорганической химии, руководитель, как уже было сказано, Фесенко руководитель лаборатории. Название диссертации все уже, так сказать, выучили, я думаю. Биографические данные, они были в начале оглашены, поэтому я останавливаться тоже не буду. Хочу сказать, что тема диссертационной работы утверждена на заседании Ученого совета еще 18 декабря 2019 года. И, соответственно, диссертационная работа была обсуждена на открытом семинаре отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений нашего института. Ну, естественно, начинается все с актуальности исследования. И тут я хочу просто подчеркнуть, что поиск и идентификация биологически активных пептидов является сложной, но актуальной задачей современной биологии. Ну и, соответственно, достижения современной науки могут предоставить возможность поиска и идентификации новых пептидных лигандов для рецептор-подобных киназ растений, однако существующие инструменты для этого все еще недостаточно развиты, поэтому важным является улучшение методик и разработка новых технологий. Вот в этом, так сказать, актуальность. Личное участие. Ну, все эксперименты в данной работе выполнены лично автором. Дальше, результаты проведенных исследований. Ну,

здесь восемь пунктов, которые в общем-то были отражены в выводах, в заключении диссертации, которые мы увидели и услышали в выступлении. Достоверность сомнений не вызывает. Все это сделано на высоком научном уровне с применением современных методов пептидомики, транскриптомики, молекулярной биологии, биоинформатики. Новизна и практическая ценность. Ну, тоже отражается здесь, в этом заключении, и новизна, и практическая ценность. Научная специальность, а именно Молекулярная биология 1.5.3. Соответственно, эта работа вот этой специальности соответствует. Публикации. Шесть статей в рецензируемых очень хороших журналах. И соответственно, все требования к диссертации соблюдены, в соответствии с положением ВАКа. И, соответственно, вот эта диссертация рекомендуется этим семинаром к защите. Соответственно, подписано секретарем семинара кандидатом химических наук Симонова и утверждено заключение директором нашего института академиком Александром Габировичем Габировым. Это что касается заключения.

Теперь ведущая организация (*зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный*). Как уже было сказано, это Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский гос. университет». Отзыв полностью положительный. Опять же подчеркивается актуальность, цель работы состоит в поиске и изучении эндогенных пептидов, участвующих в регуляции иммунного ответа у мха. И считает специалист ведущей организации, что это очень актуально. Они это подчеркивают. Новизна исследования. Представлена новая схема поиска ранее не идентифицированных пептидов, объединяющая геномный, транскриптомный и пептидомный подходы. Поиск коротких секретлируемых пептидов у пяти видов бриофитов. Ну и, соответственно, показано, что заражение патогенами индуцирует экспрессию генов, кодирующих предшественники коротких секретлируемых пептидов, у мха. Впервые получены нокаутные по генам RALF линии мха, ну и так далее. Впервые обнаружены гомологи рецепторов PEPR у мха и показано, что они могут участвовать в сигналинге пептида PER. Значимость работы. Практическая значимость работы состоит в разработке подхода для поиска пептидов, который может быть применен для всех растений. Фундаментальная значимость работы состоит в обнаружении новых биологически активных пептидов в геномах 5 видов мха. Структура и содержание работы. Ну, работа построена по стандартной схеме. 136 страниц, 229 источников. Автором использовано большое количество источников, проанализирован огромный массив имеющей информации, что позволяет сделать вывод о высоком уровне подготовки диссертанта. «Обсуждение» включает три раздела, ну, фактически это мы тоже все слышали. Хочется отдельно отметить главу «Заключение», в которой отлично

подытоживается огромный массив полученных результатов. Выводы написаны очень аккуратно, они полностью соответствуют поставленным целям и задачам. Замечания по работе. Первое: Методы в работе написаны очень подробно, но нет таблицы с последовательностями праймеров. Для работы использовались праймеры, подобранные автором или использовались только взятые из литературных источников? Это вопрос. Второе: Выявлены ли рецепторы пептидов PpRALF? Известны ли сайты, необходимые для рецепции пептидов в рецепторах и если да, отличаются ли они у арабидопсиса и мха? Есть ли изменения в фенотипе растений мха, нокаутных по генам PpRALF? Сколько нокаутных линий было получено? Четвертое: Выявлена ли дифференциальная экспрессия генов RALF в проанализированных транскриптомах? Ну, и в заключение здесь пишется, что, несмотря на всякие замечания, это хорошая, законченная научно-квалификационная работа, которая полностью соответствует всем требованиям ВАК, перечисляются соответствующие положения, которым соответствует, а автор этой работы, Ляпина Ирина Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология. Отзыв подписан доктором биологических наук профессором РАН, и.о. заведующего кафедрой генетики и биотехнологии СПбГУ Нижников Антон Александрович, и кандидатом биологических наук, научным сотрудником лаборатории вот этой же самой, Ганчева Мария Семеновна. Соответственно, утвержден проректором по научной работе СПбГУ Микушевым. Ну вот, были замечания здесь. Я не знаю, сразу?

Ефремов Р.Г., председатель: Да, если других, были еще отзывы?

Олейников В.А., ученый секретарь: Да, еще есть на автореферат.

Ефремов Р.Г., председатель: Ну тогда, может, сначала ответите, Ирина Сергеевна, на вот эти вот вопросы, замечания, а потом продолжим.

Ляпина И.С., соискатель: Да, большое спасибо. Я хочу поблагодарить также тех, кто писали мне отзыв от ведущей организации. И в ответ на вопросы, по первому вопросу, про таблицу с последовательностями праймеров. Да, я согласна, это было упущение с моей стороны. Все праймеры у нас перечислены в наших опубликованных работах, и большая часть была подобрана нами самостоятельно, кроме праймера для бактерии, собственное, который мы использовали для определения концентрации ДНК. По второму вопросу, выявлены ли рецепторы пептидов RALF у мхов. Можно сказать, что были выявлены кандидаты, гомологи рецепторов RALF у мха. Однако не была еще проведена работа по подтверждению их функциональности. Но насчет определенных сайтов для рецепции пептидов, они у *Arabidopsis* известны. Собственно, вот здесь представлен как раз комплекс для рецепции одного из пептидов, которые связаны с регуляцией иммунитета у

Arabidopsis, *RALF23*, и рецепторы *LLG* и *FERONIA*. Оба гомолога были найдены у мха, но опять же повторяюсь, что не была проведена конкретно работа ни по сравнению сайтов, ни по функциональной какой-то их активности у мха. Следующим вопросом было есть ли изменения в фенотипе растений мха, нокаутных по генам *RALF*. Да, мы наблюдали изменения в фенотипе, как раз они представлены здесь. И, собственно, здесь как раз представлены нокауты на двух средах с добавлением аммония тартрата и без добавления аммония тартрата, который влияет на образование гаметафор у мха. И, собственно, как можно видеть, нокауты по *RALF3*, их рост более активный, а у нокаутов по *RALF1* и *RALF2* снижен рост по сравнению с диким типом. Также мы получали несколько нокаутных линий, собственно. Но в работе было использовано по две нокаутные линии всего, и они не особо отличались между собой. Так, выявлена ли дифференциальная экспрессия генов *RALF* в проанализированных транскриптомах. Собственно, в транскриптомах наших, которые мы анализировали, мы не нашли у нокаутов по *RALF*. В нокаутах одного из генов *RALF* другие гены... не была особенно в транскриптом заметна их экспрессия. И, собственно, в принципе обычно *RALF* транскрибируется в апикальных клетках, и, собственно, поэтому общий уровень транскрипции может быть достаточно низким, если выделять полностью из всего растения РНК. И, собственно, поэтому мы даже делали в нашей лаборатории линии *RALF*, слитый с *GUS*, с белком *GUS*, анализировали их, но мы так и не получили каких-то определенных данных, потому что очень слабый сигнал был. Так что в транскриптом очень сложно их обнаружить, в основном их обнаруживаем конкретно таргетно, проверяя с помощью праймеров, с помощью анализа ПЦР. Так, это все вопросы.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Владимир Александрович, тогда оставшиеся отзывы, пожалуйста.

Олейников В.А., ученый секретарь: Да, я продолжаю зачитывать отзывы. Соответственно, поступило четыре отзыва на автореферат. Отзывы в целом все положительные. Вот, чисто положительный отзыв, я просто зачитаю откуда. Подписано: доцент кафедры биотехнологии сельхозакадемии имени К.А. Тимирязева, кандидат биотехнологических наук Поливанова Оксана Борисовна. В отзыве, так сказать, подчеркивается, что хорошая работа. Дальше отзыв на автореферат, опять же звучит оригинальность работы, заключается в том, что – ну, мы это уже, как бы, слышали. Впервые разработана методика выделения. Подписано: доцент кафедры биотехнологии и микробиологии института фармации, химии и биологии Белгородского национального исследовательского университета, кандидат биологических наук Маслова Е.В. Далее, отзыв тоже в целом положительный, но вот опять же подчеркивается, что большой

экспериментальный объем работы, все замечательно. Но к работе есть одно небольшое замечание: необходимо указать автора классификатора в латинских названиях, хотя бы при первом упоминании в тексте. Я надеюсь, что диссертант понимает, о чем речь. И подписано: ведущий научный сотрудник, руководитель группы репродуктивной биологии растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», соответственно, Захарова Екатерина Владимировна подписала. Вот это одно замечание. И еще есть тут отзыв на автореферат, в котором тоже указано некое замечание: из недостатков можно отметить неудачную, на мой взгляд, классификацию предшественников КСП в Таблице 1 и разделение их на «Известные КСП», «Вероятно известные КСП» и «Предположительные КСП». Остаются непонятными различия между этими группами. Следует также указать на невысокое качество Рис. 8 с множественным выравниванием последовательностей рецепторов PEPR, поскольку последовательности нечитаемы. Однако отмеченные недостатки ни в коей мере не умаляют достоинства проведенного исследования, ну а в целом работа соответствует и очень хорошая. Зав. лабораторией молекулярно-генетических основ иммунитета растений Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, доктор биологических наук Одинцова. Ну вот, были замечания.

Ефремов Р.Г., председатель: Да, Ирина Сергеевна, пожалуйста, ответьте на замечания озвученные.

Ляпина И.С., соискатель: Да, спасибо. Хочу поблагодарить тех, кто писал отзывы на мой автореферат. И по замечаниям, собственно, с первым прозвучавшим замечанием насчет того, что нужно указывать автора классификации, да, полностью согласна, недочет. Насчет второго замечания про классификацию предшественников КСП. Возможно, это тоже недочет с моей стороны, что в автореферате я недостаточно хорошо прописала конкретно эту классификацию. Но сама классификация была разработана не нами, это классификация, собственно, для предшественников КСП, которая была предложена авторами метода SPADA, которым мы пользовались для их поиска. И, соответственно, мы посчитали ее достаточно информативной, достаточно подходящей под наши цели, поскольку она как раз указывает на те элементы структур предшественников, которые считаются важными для определения их как предшественников биологически активных пептидов. Собственно, на это и был расчет, когда мы их отбирали. Также насчет различий, как раз, собственно, различие в том, насколько они близки к известным структурам предшественников биологически активных пептидов, КСП, конкретно. И, согласна, что невысокое качество рисунков, да, это, к сожалению, технический недочет.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Так, уважаемые коллеги, если вопросов нет по прозвучавшим отзывам и ответам на замечания, тогда переходим к отзывам официальных оппонентов. Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, пожалуйста.

Голденкова-Павлова И.В., официальный оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*. Глубокоуважаемый председатель, глубокоуважаемые члены диссертационного совета, коллеги, позвольте мне дословно не зачитывать отзыв, там все изложено. Я буквально кратко остановлюсь, почему мне работа понравилась, и скажу то, что у меня вызвало некие мои замечания и комментарии, потом озвучу. Значит, в принципе, если мы говорим об объекте, это растение. Растения, они такие удивительные живые организмы, которые имеют такой оседлый образ жизни. Они вот прикрепилась и живут. И на самом деле им не очень просто в таком мире, они подвергаются со всех сторон опасностям и так далее, их пытаются загубить. И растения выработали уникальные механизмы защиты, в том числе от патогенов. И там огромное количество молекул, которые противостоят вот этой окружающей среде. И среди них как раз включаются эти вот объект исследования соискателя, это пептиды. Но для того, чтобы их изучать, это не так просто. Они малы, но бывает так, что «мал золотник, но дорог», и нужно бы исследовать эти «золотники», которых в растениях может быть много. И нужно найти объект, объект, который бы позволял это сделать. И в этом случае, мне кажется, в этом плане, работа действительно интересная, в том, что объект выбран вроде как удивительно, – причем здесь мох, да? – почему не Arabidopsis, почему не другое растение. А все верно. Поскольку, когда был проведен анализ, убедительно показано, что да, действительно, объект правильно выбран. И в этом плане и соискатель, и, соответственно, его руководитель молодцы. Что было сделано. Как их искать, эти пептиды? Ну, первое, конечно, на взгляд, берем геном и попытаемся найти. Что автор, соискатель, и сделал. То есть он попытался найти пептиды с использованием программы, которую озвучил, SPADA, которая ищет в сосудистых растениях. И действительно, действительно удается найти. В основном все известные. Известные, а вот в отношении тех, которые неизвестные, потенциально которые могут быть интересными пептидами, к сожалению, не так их уже и много позволяет эта программа обнаружить. Ну, в геноме есть, хорошо, замечательно. Но наличие в геноме еще не подразумевает, что они будут функционировать. Мы хорошо знаем, что бывают и гены, которые не работают, как дублируются и замолкают, поэтому следующий этап это транскриптомный анализ. Не простой, а анализ растения без обработки и растения после обработки соответствующим патогеном. Давайте сравним транскриптомы и попытаемся в них найти соответствующие последовательности, которые могут кодировать пептиды. Замечательно, посмотрели, сравнили, нашли, в

основном опять же только известные. То есть у нас получается так, что пока еще нет инструмента такого надежного, который бы мог пойти дальше, вглубь, а есть ли что-то неизвестное. Транскриптом, конечно, нам показывает экспрессию на уровне транскрипции, это тоже как бы хорошо, что-то индуцируется. Но, как исследователи, мы хорошо знаем, что транскриптом относится к протеому согласно поговорке «обещал не значит женился», не всегда образуется белок. И поэтому следующий анализ именно пептидомный, следующий за ними, который выполнен как раз в лаборатории авторами, за счет того, что они индуцировали не патогеном, а индуцировали определенными соединениями вот этот защитный ответ, так сказать, имитировали атаку патогенов, они посмотрели, что меняется в пептидоме. Это, конечно, принесло свои результаты. То есть они попробовали все имеющиеся возможности: геномные, транскриптомные, пептидомные – для того, чтобы понять, как действовать дальше и что можно найти. Это замечательный подход, мне кажется, что очень удачный. Следующая экспериментальная такая часть, касающаяся анализа интересных пептидов RALF. Значит, их обнаружили во мхе. И здесь использованы достаточно современная технология геномного редактирования, то есть нокаутировали гены, посмотрели, что из этого происходит, как изменяются все показатели в ответ на заражение растений вот этими разными патогенами. Опять же это доказывает то, что функциональные пептиды, и не только функциональные, а именно куда они направляют изменение метаболизма растения в ответ на атаку патогена. И, конечно, не все пептиды можно вот так вот выключить в геноме за счет нокаутирования, в частности, о которых говорили, пептиды, найти которые невозможно, и поэтому идут от обратного, то есть синтезируют пептиды, обрабатывают и смотрят, как они действуют, включают ли они механизмы защиты при воздействии патогенами. Это показано уже на синтетических пептидах. Вывод, сделанный на основании этих результатов, конечно, имеет достойное доказательство. И последнее, чем доклад начался обратно у нее, значит, вот как раз с рецепторов. И конечно, вопрос, когда я читала диссертацию, вот нашли, вот показали и так далее – ну все, слава богу, диссертацию прочитала, а нет! Читаем дальше, оказывается, весьма интересный вопрос, который может быть в конечном итоге и подходом для поиска пептидов это консервативность и взаимодействие сигналинга, то есть рецептор-пептид, сигнализация идет. То есть, если рецепторы более консервативны, то благодаря этому мы можем найти потенциальные пептиды, которые с ними, и потом уже поискать в геноме, где же они расположены и как они образуются. Вот это, мне кажется, тоже такая удачная находка соискателя с руководителем, которая позволила действительно, как бы так сказать, по крайней мере подняться на ступеньку, от которой можно дальше стартовать многие исследования. Ну, и

как любая работа, конечно, всегда возникают некие вопросы. Прежде всего это вопрос о нокаутных линиях, который у меня возник. То есть в разделе «Материалы и Методы» все написано и так далее, но не приводится ссылка. И при это я задаю себе вопрос, а как было доказано, что это нокаутные линии? Были это гомозиготные линии, либо нет? То есть, где был проведен нокаут, где локализация в последовательности генов, в которой проведено нокаутирование. Значит, еще вопрос, очень много пептидомных, транскриптомных данных и геномных, но при этом нигде не приводится ссылка, хотя бы ID в открытых базах данных, где же они локализованы, чтоб посмотреть, насколько качественно транскриптомы получены, использованные в работе. Это, видимо, было упущено диссертантом. Еще один небольшой такой вопрос. На часть вопросов я получила ответы, когда она рассказывала доклад, поэтому нет смысла второй раз отвечать. И то, что мне понравилось, то, что в обзоре литературы такое положительное, даже не замечание, а наоборот положительно, что не только человек ссылается на работы зарубежных авторов, а тоже знает хорошо и работы исследователей наших российских, которые работают в этой области, то есть она следит за публикациями по этой тематике достаточно широко. Ну, и конечно, заключительная фраза, которую всегда произносят, произносит кто – оппонент. Как у оппонента, у меня стоит две задачи. Первая задача — это ответить на вопрос, соответствует ли работа требованиям ВАК, и второе – достоин ли соискатель искомой степени. Работу я рассказала, теперь про соискателя. У меня обычно такое требование, я встречаюсь с соискателем, с ним беседую, задаю вопросы для того, чтобы понять, как говорит сейчас молодежь, «в теме» ли он данного исследования, способен ли он держать свою линию, отвечать на вопросы и так далее. Мы с Ириной Сергеевной встречались как раз в институте, побеседовали, и я сложила свое мнение, что у нас готовый специалист в области изучения вот таких замечательных соединений, пептидов растений. Поэтому я считаю, что работа соответствует требованиям ВАК, а ее автор Ляпина Ирина Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология. Благодарю за внимание.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Ирина Сергеевна, ответьте, пожалуйста, на замечания оппонента.

Ляпина И.С., соискатель: Большое спасибо за такой отзыв. Собственно, к замечаниям, я ответу тогда на прозвучавшие замечания, поскольку Вы сказали, что на часть Вы уже получили ответ в ходе доклада. Да, собственно, когда я получила эти замечания, я постаралась по максимуму ответить на некоторые из вопросов. Собственно, насчет прозвучавших замечаний, про то, что не было данных в работе, подтверждающих как получены нокаутные линии, что это нокаутные линии. Ну собственно, мы проверяли с

помощью секвенирования. Что касается нокаутных линий генов ортологов рецептора PEPR, вот, было показано из всех линий, что в искомым линиях была остановлена рамка, заканчивалась транскрипция прямо в начале рамки. И в другой линии в значительной части был добавлен новый кусок, который тоже сдвигал рамку считывания, что, собственно, как и меняет полностью весь продукт гена. Что касается получения нокаутных линий генов *RALF* у мха, мы также подтверждали с помощью секвенирования отдельной области их, и также было подтверждено, что заканчивается синтез белков в самом начале или же он продолжается со смещением рамки, что, собственно, опять же указывает на то, что это с другой функцией уже какие-то белки. Собственно, мы не секвенировали полностью весь геном мха для того, чтобы проверить, в какой области конкретно еще относительно всего генома мог бы быть какой-то оффтаргет, но, поскольку мы отбираем концентрацию геномной РНК так, чтобы избежать этих оффтаргетов, и в принципе по литературным данным это достаточно такая не очень частая вещь, конкретно для мха, собственное, почему он такой удобный для нокаутов. И поэтому да, мы считаем, что вот эти оффтаргеты они практически исключены и вот такой метод подтверждения считаем достаточно всеобъемлющим и достаточным для подтверждения того, что это были именно нокаутные линии. И также помогает то, что да, мы уверены, что это гомозиготные нокаутные линии, поскольку мох в большей части своего жизненного цикла находится в гаплоидной стадии. Так что, собственно, опять же, почему он такой удобный для каких-то нокаутов получения. И прозвучал еще вопрос, на основании каких данных были выбраны патогены. Собственно, патогены мы отбирали по предыдущим нашим исследованиям на основании того, что среди известных патогенов нет тех, которые в обычных условиях заражают мох, и мы выбирали те, которые заражают также еще сельскохозяйственные культуры какие-то важные, поскольку мы планируем передвигать дальше еще фокус работы на какие-то другие растения, и также одним из критериев было то, что эти патогены не такие агрессивные как, например, вот который у нас еще был в работе *Botrytis*, поскольку они, в отличие, собственно, от *Botrytis*, который убивает мох практически сразу же, то есть буквально через два дня он уже перекидывается на питательную среду и заражает ее и мох очень быстро умирает. То есть мы не можем провести никаких морфологических анализов, и особо там выделять будет не из чего, поскольку мох умирает. И, соответственно, вот эти вот, выбранные нами патогены, они как раз таки достаточно долго размножались на мхе, но тем не менее, как уже я говорила, на седьмой день, когда мы их проверяли, было заметно, что заражение происходит, то есть были заметны под микроскопом некротические пятна у мха. И как проводилась обработка. Мы выращивали гаметафоры мха, то есть вот такие кустики, на питательной среде и

капали суспензию либо бактериальной культуры, либо спор гриба, так и проводилась обработка. Насчет замечания о том, что не было представлено ID для геномных, транскриптомных и пептидомных данных, да, я согласна, это было наше упущение. Но опять же, все ID представлены в наших работах. Я согласна, что я должна была их представить в диссертации тоже, да, согласна с этим замечанием.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Ирина Васильевна, Вы удовлетворены ответами соискателя? Спасибо. Тогда слово предоставляется второму оппоненту, Побегуц Ольга Владимировна. Пожалуйста.

Побегуц О.В., официальный оппонент: *(излагает отзыв, отзыв положительный)*.
Добрый день, уважаемые члены ученого совета и присутствующие. Я не буду зачитывать тоже свой отзыв. Я с большим удовольствием и интересом ознакомилась с диссертацией Ирины Сергеевны. Я совершенно согласна с предыдущим оппонентом, которая очень подробно рассказала в общем работу и все ее плюсы. Я хочу отметить некоторые моменты. Во-первых, работа очень большая, очень объемная, масштабная такая. И мне кажется, она достаточно выходящая за рамки работ, которые представляются для защиты на кандидата наук. И, конечно, здесь уже отмечалось, что работа выполнена на очень хорошем экспериментальном уровне, применены новейшие методы, начиная с нокаутных мутантов, которые очень сложно получить, и масс-спектрометрии, которая тоже очень сложная, – пептидомика вообще очень сложная вещь, – для идентификации пептидов, транскриптомный анализ и, в общем, заканчивая целым арсеналом, не только SPADA, а целым арсеналом на самом деле биоинформатических инструментов, которые были использованы. И я хочу отметить, что все эти методы были освоены Ириной Сергеевной, работа вообще на сто процентов, я так понимаю, сделана ею, при общении и обсуждении с ней этой работы, что очень ценно и достойно. Вообще сегодня очень много вопросов было, вообще пептидомика и поиск биологически активных пептидов, а также вот это направление, иммунитет растений, иммунный ответ растений, это вообще очень новое направление, которое развивается не более двух десятков лет, по-моему, поэтому очень много еще вопросов, ничего практически не известно, ну, известны какие-то рецепторы, известны какие-то лиганды, но очень большое разнообразие вот этих рецептор-лиганд, вот этих систем и семейств пептидов, и поэтому это довольно сложная тема. Очень сложная тема, которая развивается очень сейчас активно. И актуальность вообще диссертационной работы, естественно, не вызывает никаких вопросов. На чем я еще хотела остановиться, что работа настолько объемная, настолько много информации, заложенной в полученных данных, что, мне кажется, что это для анализа для дальнейшего очень большой задел сделан, для дальнейшего анализа и развития этой темы. О выборе объекта сегодня

говорили, конечно, и уже сказано было, конечно, выбор объекта очень интересен и понятен, потому что действительно, гаметофит, гаплоидный набор хромосом и можно делать нокаутные линии, удобно, изучать молекулярный механизм отдельных каких-то систем рецепторов-лигандов. Действительно, объект очень удобный. И он позволяет не только изучать эти вот механизмы молекулярные, но и изучать эволюционные закономерности вот этих систем и пептидных семейств. Работа выполнена в стандартной форме, и работа замечательна, я еще раз повторяюсь, но как любая замечательная работа, возникает много вопросов и каких-то замечаний тоже. И у меня возникли следующие вопросы. Учитывал ли автор диссертации при анализе генома мха с целью поиска генов-предшественников биологически-активных пептидов геном хлоропластов? Если нет, то по какой причине? Не может ли такая модификация пептидов, как гидроксирование пролина, быть следствием условий пробподготовки образцов для масс-спектрометрического анализа? Тут говорилось о том: что пептиды, их роль, их структура, как они связываются с рецептором, как раз задавали вопросы. На самом деле я еще хотела сказать, что часть материала, который есть в диссертации, не освещена здесь при докладе, потому что, видимо, большая работа, и все осветить невозможно было. И они еще сделали анализ модификаций этих пептидов, который тоже имеет значение в литературных данных, она это обсуждает, что это есть. И вот одна из этих модификаций это гидроксирование пролина. Вот, мой вопрос. Непонятно, по каким критериям Вы подбирали два пептида, у которых Вы потом анализировали функциональное значение и роль. Вот эти INI и EAA. Как автор может объяснить, что для анализа биологической активности этих пептидов используются довольно большие концентрации, то есть микромолярные, а не наномолярные, как обычно используются по литературным данным? Ну и вот такое замечание: в работе отсутствует список сокращений. Ну и некоторые неудачные упрощенные словосочетания, типа защитный ген, ну и так далее, я тут привожу несколько. Это все мои замечания. Ну и в заключение я хочу сказать, что диссертационная работа, конечно, является самостоятельным, комплексным и законченным научным исследованием. Автор вносит существенный вклад в изучение роли пептидогенеза в ответе на стрессовые факторы внешней среды и защиты растения от фитопатогенов. Основные результаты работы, уже говорилось, что они представлены в шести публикациях с импактом около шестерки в среднем. Сделанные замечания не ставят под сомнение научную ценность проделанного исследования. Выводы сформулированы корректно и имеют биологическую значимость. По актуальности темы, научному методическому уровню, большому объему проделанной работы, качеству полученных результатов, научной новизне и практической значимости диссертация Ляпиной Ирины

Сергеевны полностью соответствует критериям, установленным ВАК, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология. Спасибо за внимание.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Ирина Сергеевна, были замечания, пожалуйста, ответьте.

Ляпина И.С., соискатель: Большое спасибо Вам за отзыв также. К первому замечанию, искали ли мы в хлоропластах, в их геноме. Ну, собственно, я могу сказать про все, и поиск в транскриптом, и в геноме, и в пептидоме. Собственно, при транскриптомном, понятно, что ни митохондриальный, ни хлоропластный геном не учитываются при поиске, поскольку мы берем только полиаденилирующиеся последовательности РНК. И в пептидомах мы находили несколько десятков пептидов от хлоропластных белков, и мы даже показали, что они повышаются, количество их повышается в стрессовых условиях. И даже мы предполагаем, что это действительно может иметь какое-то значение, как общего пептидома потенциал биологически активный, как совокупность, а не отдельных пептидов. Но конкретно именно биологически активные пептиды от белков хлоропластных мы никогда не находили, структур, которые были бы похожи на какие-то известные. Ну, собственно, это же касается и генома, что в хлоропластном геноме опять же не было ни в литературных данных, ни по нашим данным каких-то определенных сигнатур, про которые мы говорили, которые показывали бы, что потенциально эти белки могут быть прекурсорами каких-то биоактивных пептидов. Насчет второго вопроса, модификация гидроксиглирование пролина может ли быть следствием условий пробподготовки. Да, мы не исключаем такую возможность, что некоторая часть действительно может быть именно из-за условий пробподготовки, хотя мы все-таки стараемся минимизировать появление каких-то артефактов, связанных именно с условиями выделения и техническими моментами. Однако, поскольку мы делаем не общий анализ, ну то есть, не абсолютный анализ, а сравнительный с условиями, которые были в контроле и которые были при стрессовой обработке, то мы можем сказать, что действительно, при одних и тех же условиях в разных пептидомах постоянно и постоянно появляются одни и те же варианты модификаций. И опять же по литературным данным эта модификация является важной для функциональной активности некоторых биологически активных пептидов. Поэтому да, мы считаем, что большая часть тех модификаций, которые мы находим, она все-таки связана именно с какой-то активностью. Насчет критериев, по которым отбирались новые пептиды. Ну, я уже говорила это в работе, в ходе доклада, основными критериями было то, что пептиды были индуцированы стрессом, разными стрессами; то, что они выщепляются из маленьких белков-прекурсоров, до 200

аминокислот; то, что у них есть сигнальная последовательность на N-конце прекурсора; и в большинстве случаев отсутствует функциональная аннотация прекурсора. Это такие ключевые моменты, по которым мы отбираем предполагаемых предшественников биологически активных пептидов. Как я уже говорила, это, собственно, связано опять же с литературными данными, поскольку большинство пептидов биологически активных, которые были найдены, они как раз таки выщепляются вот именно из белков с такой структурой. И дальше мы уже проверяли конкретно на каком-то функциональном потенциале, то есть смотрели на получаемый защитный ответ в ответ на обработку, предсказывали какой-то антимикробный потенциал, что, собственно, отсеяло большую часть остальных пептидов, которые мы выбирали таким образом. Насчет замечания по концентрации обработки синтетическими пептидами, опять же в литературных данных в основном для таких пептидов растений показано, что лучше всего работают именно концентрация микромолярная, а не наномолярная, поскольку все-таки это синтетический пептид, то есть вероятность, хотя и маленькая, что он как-то не так свернется, что там будут отсутствовать какие-то модификации, которые не были замечены при его обнаружении и также, собственно, такая концентрация в принципе может дать лучше видный ответ, так сказать. Собственно, поэтому да, ссылаясь на литературные данные, выбиралась именно такая концентрация. С замечанием по поводу отсутствия списка сокращений полностью согласна, недоглядела. И неудачные упрощенные словосочетания, да, тоже полностью согласна.

Ефремов Р.Г., председатель: Ольга Владимировна, Вы удовлетворены ответами соискателя? Спасибо. Так, уважаемые коллеги, тогда мы открываем дискуссию по работе Ляпиной Ирины Сергеевны. Кто хотел бы высказаться? Николай Владимирович, пожалуйста.

Бовин Н.В.: Коллеги, то, что называется, я не могу смолчать. У меня при прослушивании этого доклада возникло ощущение, что я недотепа. То есть я почти ничего не понял. Когда стали задавать вопросы из зала, я понял, что я не один такой, потому что многие, судя по вопросам, оказались в такой же ситуации. То есть мое ощущение, мое, я делюсь своим ощущением, я его никому не навязываю, но у меня такое, что доклад не продуман, не структурирован, и сделан крайне недружественно по отношению, по крайней мере, ко мне. А слайды, которые, докладу помогать, в данном случае делают его еще более трудно воспринимаемым. Тридцать пять или около того слайдов на кандидатскую диссертацию это по крайней мере вдвое больше, того, что выдерживает доклад по кандидатской диссертации. Это мелькание, это получается не фотография, это получается видео, раз-раз-раз. И на многих из этих слайдов была настолько высокая перенасыщенность

информацией, где две трети или три четверти того, что изображено на слайде, просто лишнее, оно не нужно там, не только не нужно, оно мешает восприятию. Не понятно, на что смотреть, непонятные обозначения, сокращения, которых уйма, и не совпадает с тем, что говорит докладчик. Коллеги, слава богу, что у нас есть оппоненты. Если бы не оппоненты, я бы, честно говоря, не знал, какого цвета камешек бросить во время голосования.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо, Николай Владимирович. Так, коллеги, еще, кто хотел бы высказаться? Дискуссия развернулась. Ну, я хотел бы добавить, тут очень много действительно, и оппоненты, и научный руководитель, и ведущая организация, как бы, пояснили. Надо дальше работать. Есть, над чем работать в дальнейшем сложившемся уже, на мой взгляд, исследователю. Пожалуйста, кто-то хотел бы еще сказать свои слова о работе, о соискателе, поддержать дискуссию? Владимир Александрович.

Олейников В.А., ученый секретарь: На самом деле, я во многом согласен с Николаем Владимировичем, потому что действительно, так сказать, выстроен доклад был не очень. Но, действительно, спасибо оппонентам, которые нам объяснили в общем-то суть работы, и в целом стало понятно, что работа очень мощная, очень хорошая и достойная присуждения степени и, соответственно, нашей поддержки. Ну, в целом, благодаря дискуссии, благодаря нашему заседанию, благодаря тому что задавались вопросы грамотные, хорошо, стало понятно, что мы услышали, что мы услышали хорошую работу. Спасибо.

Ефремов Р.Г., председатель: Ну, я еще хотел бы, уже прозвучало несколько раз, на мой взгляд, очень весомый аргумент, это список публикаций автора. Так что, глядя на них, понимаешь, что да, все серьезно. Спасибо. Тогда, Ирина Сергеевна, тогда Вам предоставляется слово заключительное, прежде чем мы перейдем к процедуре голосования.

Ляпина И.С., соискатель: Да, я хочу поблагодарить, во-первых, всех присутствующих, всех, кто задавал мне вопросы, всех, кто давал какие-то комментарии, и большое спасибо диссертационному совету за замечания для моей дальнейшей работы, чтобы улучшаться. Большое спасибо, я приму это к сведению, я постараюсь поработать над этим. И также я хочу выразить большую благодарность коллективу своей лаборатории, в которой я работаю, всем тем, кто помогал мне писать эту работу, кто помогал ее делать, а также выражаю благодарность лаборатории генетической инженерии ФХМ и сотрудникам агробиотехнологического департамента РУДН за сотрудничество при проведении экспериментов. И также отдельная благодарность моему научному руководителю, Фесенко

Игорю Александровичу собственно за терпение, поддержку, отзывчивость, ценные наставления. Все, что я хотела сказать. Спасибо вам.

Ефремов Р.Г., председатель: Спасибо. Так, коллеги, тогда сейчас должны избрать состав, утвердить состав счетной комиссии. Поступило предложение счетную комиссию избрать в составе Долгих Дмитрия Александровича, Завриев Сергей Кириакович и Олейников Владимир Александрович. Есть ли замечания, отводы, самоотводы? Я не вижу, тогда мы утверждаем состав счетной комиссии. Тогда мы можем приступить к процедуре тайного голосования.

(Идет тайное голосование)

Ефремов Р.Г., председатель: Коллеги, пока идет подсчет голосов, давайте, если у кого-то есть замечания, по проектам заключений.

(Проходит обсуждение проекта заключения совета. Бовин Н.В. и Лебедев Ю.Б. предлагают внести небольшие коррективы в некоторые формулировки. С учетом этого диссертационный совет единогласно принимает заключение.)

Ефремов Р.Г., председатель: Владимир Александрович, огласите, пожалуйста, результаты голосования тайного.

Олейников В.А., ученый секретарь: Так, ну счетная комиссия выполнила свою работу. И первым выступала у нас Ляпина Ирина Сергеевна. Присутствовало на заседании 20 членов диссертационного совета, роздано бюллетеней 20, оказалось в урне 20, за – 20, против и недействительных нет.

Ефремов Р.Г., председатель: Коллеги, спасибо. Коллеги, предлагается открытым голосованием утвердить. Так, и утвердить одновременно проект заключения вот с учетом тех поправок, которые были внесены, только что озвучены. Кто за то, чтобы утвердить заключения? Спасибо. Ну, и наконец, поздравляем с состоявшимися защитами наших соискателей и дальнейших им успехов и в науке, и в жизни, во всех делах. Спасибо, всем присутствующим. И заседание объявляю закрытым.

Зам. председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н., профессор Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

