

ОТЗЫВ

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

Актуальность темы диссертационной работы

Механизмы контроля живых организмов как для поддержания гомеостаза в нормальных условиях жизнедеятельности, так и при действии различных стрессовых факторов является предметом исследования во многих странах. Интерес к изучению механизмов стрессового ответа основан на том, что такие механизмы важны для неподвижных организмов, поскольку этот тип организмов не способен выжить, если не их способность справиться с изменениями окружающей среды. Современные данные свидетельствуют о сложности механизмов ответных реакций растений на стрессовые воздействия, в том числе и при взаимодействии с патогенными и непатогенными микроорганизмами. Большой успех в этой области исследований достигнут с использованием совокупности классических и современных методов молекулярной биологии, биохимии и генетики, которые позволили идентифицировать и оценить изменение экспрессии многих генов и их белковых продуктов. Тем не менее, глубокое понимание молекулярных механизмов защитных процессов требует поиска и изучения участников иммунного ответа, таких как эндогенные пептиды, называемые фитоцитокинами. Методы поиска таких соединений основаны на совокупности методов пептидомики, транскриптомики, геной инженерии и молекулярной биологии, а также методов *in silico* анализа большого пула геномных, транскриптомных и протеомных данных. Следует подчеркнуть, что оценка количественного и качественного состава биологически активных пептидов позволит прояснить роль пептидного сигналинга в процессах функционирования иммунной системы растений. Так, идентификация новых сигнальных молекул и сигнальных путей стрессовых стимулов, понимание молекулярных основ этих сложных молекулярных процессов, идентификация ключевых пептидов, связывающих стрессовый ответ и процессы развития, выявление ответов у организмов при действии фитопатогенов, остаются первоочередными научными задачами. Такие исследования важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической. Диссертационная работа Ляпиной Ирины Сергеевны посвящена поиску и изучению эндогенных пептидов, участвующих в регуляции иммунного

ответа растений, на примере модельного растения *Physcomitrium patens*. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает широкий круг вопросов, а именно приводится: (1) краткое описание основных компонентов иммунной системы растений, включая мембранные, цитоплазматические и внутриклеточные рецепторы и ко-рецепторы, а также их лиганды, участвующие в иммунном сигналинге и связанные с иммунитетом; (2) современные данные об известных моделях иммунитета растений и эволюция иммунитета растений; (3) детальная характеристика биоактивных пептидов растений; (4) описание основных теоретических и экспериментальных подходов, которые используются в исследованиях биологически активных пептидов растений.

В целом обзор литературы написан хорошим языком и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Весьма отраднo, что Ирина Сергеевна при написании литературного обзора, использует не только научные результаты зарубежных коллег, но и хорошо знает и цитирует научные публикации российских исследователей. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем изложены основные методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал классических и современных методов, применяемых в мировой практике молекулярных исследований, анализа экспрессии генов и пептидомики, а также подходов к *in silico* анализу больших наборов биологических текстов и экспериментальных данных. Следует отметить вполне удовлетворительную

разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: соискателем была проведена серия теоретических и экспериментальных исследований, в целом, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили решить поставленные в ходе работы задачи. Эта часть диссертационной работы включает три основных раздела, которые представлены подразделами.

Первая часть диссертационной работы связана с идентификацией пептидных регуляторов иммунного ответа у бриофитов. Соискателем первоначально проведен биоинформатический поиск генов-предшественников коротких секретлируемых пептидов (КСП) в геномах пять видов бриофитов с использованием on-line ресурса SPADA (Small Peptide Alignment Discovery Application). Предсказанные прекурсоры КСП поделены на четыре группы, на основании их структурных особенностей и степени сходства последовательностей с известными короткими сигнальными пептидами, с последующей подробной характеристикой генов, которые предсказаны как "известные короткие секретлируемые пептиды" и в некоторых случаях как "вероятно известные короткие секретлируемые пептиды", в каждом виде бриофитов. Проведенные *in silico* анализ позволил Ирине Сергеевне сделать заключение, 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*.

Результаты дальнейшего биоинформатического анализа транскриптомных данных, полученных после заражения мха *P. patens* патогенным грибом *Botrytis cinerea* позволили соискателю идентифицировать несколько транскриптов, из 7 семейств "известных коротких секретлируемых пептидов", а также более 40 открытых рамок считывания, кодирующих потенциальные кандидаты новых биологически активных пептидов, уровень транскрипции которых повышается в ответ на заражение.

На основании того факта, что поиск в геномах, основанный на сходстве последовательностей, не всегда позволяет обнаруживать новые семейства биоактивных пептидов, а уровень транскрипции генов известных фитоцитоклинов не всегда повышается в ответ на стрессовое воздействие, диссертантом проанализирован пул эндогенных пептидов растений методом, основанном на

масс-спектрометрическом анализе. В этом исследовании использован биологический материал растений мха дикого типа, а также мутантных по гену одного из его рецепторов при индукции стрессового ответа метилжасмонатом и салициловой кислотой, а также известным элиситором, хитозаном. Сравнительный анализ этих пептидомов показал, что салициловая кислота и метилжасмонат индуцируют протеолиз небольших белков, включая и белки с неизвестной функцией. Часть маленьких белков-предшественников, расщепление которых было индуцировано салициловой кислотой и метилжасмонатом, 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.

Полученные результаты позволили Ирине Сергеевне сделать обоснованное заключение, что стрессовые факторы индуцируют гидролиз белков, приводя к появлению в пептидоме *P. patens* биологически активных пептидов, включая прекурсоры некоторых коротких секретлируемых пептидов, в том числе пептидов RALF.

В целом, проведенный биоинформатический анализ позволил выявить кандидаты новых биоактивных пептидов и в связи с этим вполне логичными видятся дальнейшие исследования Ирины Сергеевны по экспериментальной верификации результатов биоинформатического анализа, и, в частности, по оценки биологической функциональности некоторых таких кандидатов.

Первые кандидаты - три гена прекурсоров цистеин-богатых пептидов RALF, для изучения их роли пептидов RALF в иммунном ответе мха созданы нокаутные линии по соответствующим генам прекурсоров этих пептидов методом геномного редактирования. Ряд исследований этих линий позволил диссертанту сделать обоснованное заключение, что один из них, а именно, PpRALF3 действительно участвует в негативной регуляции иммунного ответа мха, и предполагаемый механизм его действия может быть связан с отсутствием модификации клеточной стенки, что усложняет проникновение патогена.

Дополнительно, внимание Ирины Сергеевны было направлено на изучение биологической активности еще двух пептидов - EAA и INI, которые были получены за счет синтеза из последовательностей. Проведенная серия исследований, убедительно продемонстрировала, что пептид INI (INIINAPLQGFKIA), обладает высокой антимикробной активностью против ряда бактерий, таких как *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*. А обработка растений мха этим пептидом изменяла

уровень транскрипции ряда защитных генов, позволяя предположить участие пептида INI в сигналинге метилжасмоната в условиях стресса. В отношении пептида EAA (EAAPAPVAEVEAPKAEE) получены убедительные подтверждения, что обработка им растений мха сказывается на транскрипции таких защитных генов фенилпропаноидного пути, а салициловая кислота индуцирует расщепление его предшественника с образованием новых пептидов и увеличением количества уже выщепляющихся. Совокупность полученных результатов позволило диссертанту высказать предположение о его роли в амплификации иммунного ответа.

Несмотря на то, что основная цель диссертационной работы - поиск и изучение эндогенных пептидов, участвующих в регуляции иммунного ответа растений – практически достигнута, соискатель ставит перед собой еще одну важную задачу. Это задача – исследовать эволюционную консервативность пептидного иммунного сигналинга у сосудистых и несосудистых растений на примере пептида PEP и его рецепторов.

Для решения этой задачи Ириной Сергеевной проведена серия теоретических и экспериментальных работ, которые в итоге позволили продемонстрировать участие найденных гомологов рецептора PEPR в регуляции таких иммунных реакций мха *P. patens*. Эти результаты позволили соискателю высказать вполне логичное предположение, что рецепторы PEPR связаны с распознаванием фитоцитокина PEP.

Степень новизны результатов научных исследований.

Соискателем использована схема поиска не идентифицированных ранее семейств биоактивных пептидов, объединяющая несколько известных подходов: геномный, транскриптомный и пептидомный анализы. Проведенные теоретические и экспериментальные исследования впервые провели функциональный анализ одного из представителей известного семейства коротких секретлируемых пептидов, RALF, аннотированного в геноме модельного растения *P. patens* и показана роль представителей данного семейства в ответе на биотический стресс у несосудистых растений.

Приоритетными можно назвать и результаты по обнаружению гомологов рецепторов известного пептида PEP - PEPR, в геноме мха *P. patens* и оценки его функциональной роли в регуляции таких иммунных реакций мха.

Научная и практическая значимость результатов

Диссертационная работа Ирины Сергеевны Ляпиной совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярных механизмах регуляции ответа растений на действия фитопатогенов. С практической точки данная работа интересна тем, что полученные данные могут быть востребованы при решении вопросов повышения устойчивости растений к биотическим факторам среды.

Обоснованность заключительных выводов и рекомендации

Использование для исследований классических и современных биоинформатических, молекулярно-биологических и генетических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Ирины Сергеевны, а также выносимых на защиту положений и выводов.

Полнота опубликованности положений и результатов диссертации

Основные положения и результаты исследований по диссертации Ирины Сергеевны Ляпиной опубликованы в 6 статьях в зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникло ряд вопросов:

1. Нет данных, подтверждающих, что получены нокаутные линии, даже ссылка не приведена, хотя в разделе «Материалы и Методы» описано получение таких нокаутных линий. Как было доказано, что нокаутные линии мха по соответствующим генам прекурсоров пептидов, полученные методом геномного редактирования, имеют нокауты именно в целевых генах? Какие нокауты (их локализация) были сделаны в целевых генах? И являются ли они гомозиготными нокаутными линиями?

2. На основании каких соображений или данных выбраны: сами патогены и их концентрации для заражения растений мха? Как проводили обработку растений мха патогенами?
3. Как рассчитывали относительное количество мРНК целевых генов, по методу $\Delta\Delta Ct$ (в разделе Материалы и Методы не указано)?
4. Важные данные получены соискателем на основе получения и анализа транскриптомных и пептидомных исследований, тем не менее, в диссертации не представлены сведения о размещении первичных транскриптомных и пептидомных данных в открытых базах данных, с указанием ID, или сводных таблицах, например в Приложении к диссертации. Что было бы уместным для того, чтобы оценить качество и количество полученных данных, и как следствие, обоснованность сделанных заключений.
5. Соискатель в работе отмечает «мы отобрали ряд новых многообещающих кандидатов сигнальных пептидов для дальнейшего синтеза и функционального анализа. Среди них были пептиды, от белков-прекурсоров Pr3c14_22870V3.1.p, Pr3c21_4350V3.1.p, а также из Pr3c13_3880V3.1.p и Pr3c17_15750V3.1.p». Тем не менее, не все они были исследованы соискателем, и возникает вопрос, на чем основан выбор кандидатных сигнальных пептидов, которые были включены в дальнейший анализ?

Это осталось в работе без пояснения или обсуждения.

По разделам диссертационной работе Ирины Сергеевны Ляпиной имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя.

Ко всем разделам диссертационной работы:

- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не профессиональное использование некоторых терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы использовать обозначения: «прочтения» вместо «риды»; «Резуховидка Таля» вместо «Арабидопсис», и т. д.

- Раздел Обзор литературы – в некоторых случаях – калька перевода из статей зарубежных авторов, что приводит к затруднению восприятия представленных литературных данных.

- В разделе «Обзор литературы», было бы уместным суммировать в таблице экспериментальные методы и подходы, которые рассматривает соискатель, с указанием их преимуществ и ограничений, а также общее заключения по современному состоянию проблемы, с указанием тех пунктов, которые представляют интерес для соискателя, и определить основные пути для решения поставленных научных задач в этой области исследований.

- Желательно было бы дополнить диссертацию списком используемых сокращений.

- Диссертант цитирует научные публикации российских исследователей, и было бы разумным в списке литературы представлять ссылки на языке оригинала – это ссылки 117 (Ovchinnikov, I.A., Kiriushkin, A.A., Vinogradova, E.I., Rozynov, B.V., Shemiakin, M.M., [Mass spectrometric determination of the amino acid sequence in peptides and proteins]. *Biokhimiia* 1967, 32, 427–438), 155 (Smirnova, A.V., Matveyeva, N.P., Poleskaya, O.G., Yermakov, I.P., Generation of reactive oxygen species during pollen grain germination. *Russ J Dev Biol* 2009, 40, 345) и 194 (Slavokhotova, A.A., Shelenkov, A.A., Andreev, Ya.A., Odintsova, T.I., Hevein-like antimicrobial peptides of plants. *Biochemistry Moscow* 2017, 82, 1659–1674).

- Желательно было указать ID геномов используемых организмов, а также транскриптомов и пептидомов, полученных в работе. Лучше приводить ID в SRA транскриптома, который использован в анализе, а не только ссылку на научную публикацию.

- Недостаточно четкие рисунки, которые затрудняют их анализ, было бы лучше дать их не в четырех частях как один рисунок, а разными рисунками. – например, рис. 5.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация на тему «Изучение роли пептидных сигналов в иммунном ответе растений» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, с изменениями в Постановлений Правительства 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; от 26.09.2022 г., №1690 и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, а ее автор, Ляпина Ирина Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:
 Доктор биологических наук,
 Руководитель лаборатории функциональной геномики
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки
 Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева
 Российской академии наук,



Голденкова-Павлова Ирина Васильевна

«29» мая 2023 года

Контактные данные:

тел. +7 (499) 678-53-56; E-mail: irengold58@gmail.com; Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.07 – генетика

Адрес места работы:

127276 Российская Федерация, г. Москва, ул. Ботаническая, дом 35, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, группа функциональной геномики

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Ирины Васильевны Голденковой-Павловой удостоверяю:

Ученый секретарь
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки
 Института физиологии растений им К.А. Тимирязева
 Российской академии наук,

Наталья Витальевна Щербакова

«29» мая 2023 года

