

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работу **Фесенко Игоря Александровича «Системный анализ пептидома растений на примере мха *Physcomitrium patens*»**, представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (биологические науки).

Диссертационная работа И.А. Фесенко посвящена анализу идентификации новых функциональных пептидов растений на примере модельного объекта – мха *Physcomitrella (Physcomitrium patens)*.

Функциональная характеристика различных пептидов (как и других БАВ) является одной из важнейших задач современной биологии. Растения отличаются от прочих живых существ наличием огромного количества не охарактеризованных молекул – от десятков тысяч вторичных метаболитов, до сотен неканонических аминокислот, а также тысяч полипептидов различного генеза, включая рибосомный и нерибосомный синтез и продукты деградации более крупных белковых комплексов. Известные функциональные пептиды растений в основном известны как продукты протеолиза специализированных белков, часть из которых подвергается различным пост-трансляционным модификациям (ПТМ). Часть функциональных (регуляторных) пептидов являются продуктами трансляции с РНК, которые не кодируют белки. В этом заключается основная сложность идентификации подобных пептидов, не говоря уже о выяснении их классовой принадлежности и функций. В этой связи системный анализ пептидомов растений, помимо открытия новых функциональных молекул и выявления неизвестных прежде механизмов регуляции клеточных процессов, является важным этапом при разработке методов использования таких пептидных регуляторов в агропромышленном производстве.

Диссертация изложена на 252 страницах и содержит 86 рисунков и 9 таблиц. Работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов и обсуждения (раздел включает 3 крупных подраздела), заключения, выводов и списка цитируемой литературы (394 источника, из которых 1 на русском языке с некорректным цитированием: 98. Одинцова Т.И., Коростылева Т.В. Антимикробные пептиды пшеницы // журнал генетики и .... vavilov.elpub.ru, 2014).

**Целью работы** являлся системный анализ пептидомов и идентификация новых функциональных пептидов растений на примере известного модельного объекта растительной биологии – мха фискомитрелла (*Physcomitrium patens*).

Экспериментальная часть работы начинается с идентификации и анализа внутриклеточных и внеклеточных пептидных пулов фискомитреллы. Для этого **на первом этапе работы** определяли внутриклеточные и внеклеточные пептидные пулы с использованием масс-спектрометрического анализа. Для изучения внутриклеточных пептидных пулов использовали две жизненные формы фискомитреллы – гаметофоры и протонеуму.

В тканях гаметофоров идентифицированы в общей сложности более 4000 пептидов, которые образовались из ~ 2000 белков-предшественников. Наиболее плодовитыми белковыми предшественниками у гаметофоров оказались хлоропластные белки, в частности, одна из субъединица реакционного центра

фотосистемы I продуцировала 52 пептида, поровый белок A9U1R6 давал 42 пептида, а шапероноподобный блок типа LEA являлся предшественником 41 пептида).

В клетках протонемы также идентифицировали более 4000 пептидов, являющихся фрагментами 1,5 тыс. белков-предшественников, наиболее пептидогенными из которых оказались большая субъединица РБФК, фактор элонгации 1-альфа, хлоропластная фруктозо-бисфосфат альдолаза и одна из субъединиц реакционного центра ФС1.

Анализ пептидов экзопротеома (пептидов культуральной среды из-под протонемы фискомитреллы) выявил 800 эндогенных пептида, которые являлись продуктами протеолиза 220 белков-предшественников. По сравнению с внутриклеточным пептидомом протонемы, наиболее пептидогенными белками-предшественниками в экзопротеоме оказались мембранные и секретируемые белки (экспансин, пектинэстераза и др.). От 20 до 40 % пептидов были одинаковыми в среде культивирования и в клетках. Большинство этих общих пептидов происходит из внутриклеточных белков, которые участвуют в различных метаболических процессах. Большая часть белков-предшественников пептидов экзопротеома участвовали в фотосинтезе (D1 и CP47 ФС2, малые и большие субъединицы РБФК) и модификации клеточной стенки (деградация пектина). Биоинформатический анализ показал возможное участие в формировании пептидного многообразия фискомитреллы всех пяти типов протеаз разных семейств: сериновых, аспарагиновых, металлопротеаз, треонин- и цистеиновых протеаз.

**Следующим этапом работы** было изучение влияния стрессовых факторов на процесс формирования пептидомов фискомитреллы. В качестве стрессовых факторов применяли ферментативное повреждение клеточной стенки и обработку жасмоновой и салициловой кислотами.

При ферментативном повреждении клеточной стенки драйзелазой (смесь ферментов, полученная из базидиомицетов и обладающая ламинариназной, ксиланазной и целлюлазной активностями) или при получении протопластов из клеток протонемы обнаружили около 2,5 тыс. пептидов размером от 6 до 78 а.о., являющихся фрагментами около 3,6 тыс. белков-предшественников, среди которых много хлоропластных белков. В то же время в пептидоме нативных хлоропластов, полученных из протопластов, обнаружилось только 82 уникальных пептида, которые были фрагментами 21 белка-предшественника. Это свидетельствует о том, что основные белки хлоропластов подвергаются гидролизу вне интактных хлоропластов.

Легкое касание протонемы 0,025% раствором драйзелазы, который не приводит к образованию протопластов, но вызывает повреждения клеточной стенки, увеличивало количество нативных пептидов во внутриклеточном пептидоме примерно в 2,5 раза, заставляя предположить, что повреждающее воздействие на клетку усиливает процессы протеолиза и генерацию большого количества эндогенных пептидов.

Транскрипционное профилирование обнаружило ~ 2000 генов, уровень мРНК которых вырос в протопластах более чем в 4 раза. В основном это гены стрессовых ответов, такие как гены алленоксидциклазы 2 и 4, алленоксидсинтазы, которые связаны с синтезом оксипиринов, участвующих в биосинтезе жасмоновой кислоты при ответах на биотический стресс. Поэтому последующая перестройка пептидома в протопластах может быть связана с индукцией иммунного ответа, вызванного обработкой клеток драйзелазой. Кроме того, значительно повышался уровень мРНК

генов, кодирующих протеазные и протеосомные белки (активирующий белок протеасомы 200, субтилизин-подобные сериновые протеазы 2 и 3, митохондриальная протеаза FtsH3). Также увеличивается количество мРНК растительного аналога транспортера ТАР, который переносит пептиды, генерируемые протеасомным комплексом, в эндоплазматический ретикулум.

Анализ пептидомов клеток, обработанных Ме-жасмонатом, выявил образование 245 (около 5,5% от общего количества пептидов) новых пептидов; 67 (27%) этих пептидов были получены из новых белков-предшественников в обработанных клетках. После обработки салициловой кислотой в протонеме обнаруживалось 830 эндогенных пептидов от 248 белков-предшественников. При этом наблюдалась деградация 134 новых белков-предшественников.

Помимо специфического и неспецифического протеолиза белков-предшественников, еще одним малоизученным источником пептидов являются короткие открытые рамки считывания (кОРС, < 100 кодонов). Изучению этой проблемы посвящен **следующий раздел работы**, в котором проводился поиск всех потенциально транслирующихся коротких рамок считывания, присутствующих в геноме исследуемого организма. Таким образом было найдено около 640 тыс. кОРС с высоким кодирующим потенциалом (всего идентифицировано 6,7 млн. коротких рамок), которые начинались с кодона AUG и были расположены во всех областях генома *P. patens*. Дальнейший анализ и выборка последовательностей позволили отобрать около 42 тыс. уникальных кОРС с выраженным трансляционным потенциалом, которые локализовались в мРНК или в длинных некодирующих РНК. Около 5 тыс. кОРС содержат трансмембранные домены (ТМ-кОРС), т.е. теоретически могут являться маленькими трансмембранными белками с пока неизвестной функцией.

Транскриптомный анализ кОРС с последующей идентификацией транслируемых пептидов показал трансляцию по меньшей мере 195 кОРС, 56 из которых были выявлены с помощью разных биоинформатических алгоритмов. Около половины транслируемых кОРС оказались абсолютно новыми кОРС, о существовании которых ранее не было известно.

Функциональная характеристика некоторых обнаруженных пептидов составляет **заключительный раздел** диссертации. Работы разделены на 2 блока. **Первый блок работ** посвящен исследованию антимикробной активности экзопротеомов, обработанных метилжасмонатом, на бактериях *E. coli* и *B. subtilis*. Экзопротеомы, обработанные метилжасмонатом обладали выраженным бактериостатическим действием. При этом предварительная обработка экзопротеома ингибиторами протеаз приводила к значительному снижению бактериостатического действия. Это свидетельствует о возможной роли пептидов, образующихся при расщеплении белков, в качестве быстро высвобождаемых антимикробных агентов.

Компьютерные алгоритмы показали, что примерно 3,5 % от всех пептидов, идентифицированных в экзопротеоме могут обладать потенциальной антимикробной активностью. Из 8 отобранных для анализа таких пептидов (5 из клеточного пептидома и 3 из экзопротеома) было выявлено 2 (фрагмент белка, содержащего домен фумарилацетоацетат гидролазы из клеточного пептидома и фрагмент предсказанного белка из клеточного экзопротеома), минимальная ингибирующая концентрация которых составляла 64 и 16 мкг/мл, соответственно. Таким образом, предсказанные

компьютером результаты подтверждены экспериментальным анализом: некоторые пептиды, получающиеся при деградации белков, действительно обладают антимикробной активностью. Кроме того, обработка метилжасмонатом может имитировать условия биотического стресса и увеличивать количество и набор потенциальных антимикробных пептидов как в клетке, так и в экзопротеоме.

Второй блок работ посвящен функциональному анализу некоторых продуктов трансляции кОПС. Для выяснения роли этих кОПС исследовали влияние сверхэкспрессии и нокаута 4 “длнкРНК-кОПС”: PSEP25, PSEP18, PSEP1 и PSEP3. Нокаут микробелка PSEP25 (61 аминокислота) приводил к снижению скорости роста и изменению архитектуры нитей протонемы на среде без глюкозы, но с добавлением тартрата аммония. Трансформанты со сверхэкспрессией PSEP25 продемонстрировали небольшое снижение скорости роста по сравнению с диким типом и почти полное отсутствие морфологических различий в структуре протонемных филаментов. Сравнительный количественный протеомный анализ с изобарными метками iTRAQ растений дикого типа и мутантов/трансформантов выявил 14 белков, экспрессирующихся по-разному. Функции белка по-прежнему остаются неизвестными.

Аналогичный тип анализа (нокаут и сверхэкспрессия) был применен к неконсервативному пептиду PSEP18 (40 а.о.). Нокаут этого пептида приводил к небольшому уменьшению диаметра растений мха на среде с глюкозой и без тартрата аммония. Линии со сверхэкспрессией PSEP18 значительно теряли в росте на среде с глюкозой. Количественный сравнительный протеомный анализ нокаутных линий выявил 8 меняющихся белков. Функции белка по-прежнему остаются неизвестными.

Для PSEP3 (57 а.о. ~30% пролинов) удалось получить нокаутный вариант, в то время как сверхэкспрессия приводила к сильному ингибированию роста и гибели клеток трансгенных линий. Поэтому была сконструирована линия, в которой ген PSEP3 находился под контролем индуцибельного промотора (система индукции  $\beta$ -эстрадиолом). У линий с нокаутом по PSEP3 наблюдалось снижение скорости роста и изменение ветвления протонемных филаментов в сторону коротких боковых филаментов (на среде без глюкозы и тартрата аммония). Индукция экспрессии PSEP3 приводила к существенному увеличению количества мертвых клеток протонемы, выявленных флуоресцеин диацетатом, и повышению уровня АФК. Для изучения активности эндогенного промотора соответствующей длнкРНК использовали систему CRISPR-Cas9 для слияния в одной рамке считывания репортера GUS с последовательностью PSEP3 непосредственно в геноме *P. patens*. Анализ трансгенных линий показал экспрессию микробелка в активно делящихся “точках роста” гаметофоров, что может указывать на важную роль данного микробелка в регуляции процессов развития у *P. patens*. Однако, функции этого белка, как и предыдущих, также остаются неизвестными.

Наконец, был изучен пептид PSEP1 (41 а.о.), которому дали название FAMOSS (FAst-growing MOSS), основываясь на характерном фенотипе. Похожие последовательности обнаружены в транскриптомах печеночников, мхов и папоротников, зеленых водорослей, голосеменных, покрытосеменных. Высокий уровень экспрессии соответствующего транскрипта свидетельствует о том, что этот пептид является неаннотированным консервативным малым белком. Попытка идентифицировать возможных белковых партнеров FAMOSS методами белковой

преципитации и ко-иммунопреципитации привела к обнаружению высококонсервативных белков – малых ГТФаз Rab-типа, которые обычно регулируют слияние внутриклеточных везикул с плазматической мембраной, стимулируя интенсивность их транспорта к апексу клетки и увеличивая скорость полярного роста. С помощью красителя SynaptoGreen C4 выяснилось, что интенсивность везикулярного транспорта значительно выше в апикальных клетках «экспрессантов» в сравнении с диким типом и «нокаутами». Таким образом, пептид *FAMOSS* можно считать важным участником регуляции везикулярного транспорта у растений.

Обобщая полученные результаты, можно констатировать, что системное исследование пептидома мха выявило три большие фракции пептидов:

- 1) «деградом», образованный при расщеплении неспециализированных белков-предшественников;
- 2) пептиды, кодируемые короткими открытыми рамками считывания, и продукты их деградации;
- 3) биоактивные пептиды, образующиеся при специфическом расщеплении специализированных предшественников.

#### Вопросы и комментарии по работе:

1. Вероятно, повсеместное упоминание «секретома» на полях диссертации не вполне оправдано, поскольку речь идет о всех пептидах и белках, которые обнаруживаются в культуральной жидкости, как в результате секреции, так и в результате разрушения (протеолиза) клеточных белков. Возможно, термин «экзопротеом» был бы в данном случае более корректным. То же касается и описания белков в Разделе 4.1.2. диссертации (Рис. 4.8), где внеклеточные белки названы секретурными.
2. Принимая во внимание тот простой факт, что функциональный анализ неизвестных молекул является трудной и иногда долго выполнимой (а порою и вовсе невыполнимой) работой, тем не менее, можно было бы рекомендовать проведение ряда работ, требующих кооперации специалистов в разных областях знаний о растениях. Нельзя объять необъятное, но можно сделать это по частям. В частности, потенциальные белки-регуляторы могут быть экспрессированы (возможно – транзигентно) в модельных растениях и/или их мутантах с целью усиления существующих или комплементации утерянных функций. Полноценный функциональный анализ регуляторных пептидов, вероятно, украсил бы эту многоаспектную работу.
3. Следует ли из результатов работы вывод о том, что перед нами открывается непечатый объем работы по функциональной характеристике «деградом» и КОРС, даже если активные пептиды составляют треть или менее от общего числа идентифицированных? Или, перефразируя известную фразу одного из классиков об электроне и атоме, следует ли полагать, что функциональный «деградом» также неисчерпаем, как и протеом?..
4. Мелкие недоразумения:  
– Грамотрицательные (как и грамположительные) бактерии в обозначениях Грам (+) и Грам (-) должны начинаться с прописной буквы «Г» как дань уважения Гансу Кристиану Граму, придумавшему метод окраски этих бактерий (стр. 62,

194, 196);

- Названия белков, например, psbA и psbB белки фотосистемы (стр. 104) также должны начинаться с прописной буквы;
- Тотальная РНК = общая клеточная РНК
- ... лигирование второго адаптера RMX с моторным белком (стр. 73)

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что автором выполнен огромный объем комплексной и кропотливой работы, требующей исключительного внимания, огромного терпения и высокой исполнительской квалификации. Результаты и положения диссертации опубликованы в известных международных рецензируемых журналах, включая такие высокорейтинговые издания как *Frontiers in Plant Science*, *Plant Molecular Biology*, *New Phytologist*, *Nucleic Acids Research* и др., что демонстрирует высокую квалификацию автора и свидетельствует о признании его работ международным профессиональным сообществом.


Представленная к защите диссертация является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований обнаружены и охарактеризованы новые пептиды, пригодные для практического использования. Также выявлены новые регуляторные закономерности и предложены алгоритмы анализа ранее неизвестных пептидов растений.

Диссертация производит впечатление крупной работы с очевидными точками дальнейшего развития. Выводы из работы обоснованы, автореферат полностью отражает содержание диссертации. Таким образом, данная диссертационная работа полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к докторским диссертационным работам, а ее автор Фесенко Игорь Александрович, несомненно, заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (биологические науки).

Официальный оппонент

Директор Федерального государственного бюджетного  
Учреждения Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева  
Российской академии наук,  
Доктор биологических наук, профессор,  
(специальность Физиология и биохимия растений)  
Член-корреспондент РАН

Лось Дмитрий Анатольевич  
ИФР РАН, Ботаническая ул., 35  
127276 г. Москва  
[losda@ippras.ru](mailto:losda@ippras.ru)  
тел. 8-916-2456842

  
Д.А. Лось

26 мая 2022 г.



ПОДПИСЬ  
ЗАВЕРЯЮ  
ОТД. КАДРОВ

