

Отзыв официального оппонента

о диссертации 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

Актуальность темы. Диссертационная работа И.А. Фесенко является интересной работой на пересечении физиологии растений, протеомики, молекулярной биологии и биоинформатики. Основной темой его интересов является совокупность пептидов растений - пептидо́м, при этом рассматривается пептидом органелл, клеток, а также пептидом, выделяемый клеткой в окружающую среду, то есть пептидный секрето́м. В качестве объекта выбран модельный организм - мох Фиксомитрелла раскрытая (*Physcomitrium patens*).

Функциональная роль пептидов до сих пор относительно слабо изучена, но того, что о них известно, достаточно для уверенного заключения об их функциональной важности для многих биологических процессов. До сих пор основное внимание уделялось пептидам млекопитающих, в первую очередь благодаря нейропептидам и пептидным гормонам, а также иммунопептидам. В последнее время была осознана роль пептидов при регенерации органов млекопитающих. Однако едва ли не бо́льшую роль играют пептиды у растений, у которых, наряду с функциями гормонов и сигнальных молекул, пептиды выполняют важную роль антимикробной защиты. Предлагаемая работа по сути представляет собой пионерское исследование мирового уровня в области физиологии растений, впервые предоставляя систематическую картину пептидома *Physcomitrium patens*, исследованную на разных стадиях развития организма, в протопластах, в органеллах, в секретоме, в нормальных условиях и при ответе на стресс, с характеристикой с точки зрения физиологической роли выделенных пептидов и с проведением сравнительных-видовых исследований. Отдельные исследования проливают свет на эволюционное происхождение пептидов *Physcomitrium patens*, кодирующих их генов, и, в случае происхождения путем протеолиза - белков-предшественников. Работа безусловно является актуальной.

Научная новизна. Систематический анализ растительного пептидо́ма до сих пор проводился в очень ограниченной степени. В своих работах диссертант в значительной степени ликвидирует этот пробел, подробно анализируя пептидо́м с точки зрения его

происхождения, функций и эволюции, используя в качестве объекта хорошо изученное модельное растение - мох *Physcomitrium patens*. Привлекая для своих исследований большой арсенал молекулярно-биологических и биоинформатических методов диссертант рисует широкую картину как профиля пептидома в разных "тканях" низшего растения (протонеме, гаметофорах и протпластах), так и изменений в пептидоме при повреждении клеточной стенке и обработке стрессовыми гормонами. Отдельное место занимает подробное исследование связи между пептидомом и таким, недавно попавшим в фокус внимания объектом, как длинные некодирующие РНК. Диссертант показывает, что ряд РНК, ранее определенных как длинные некодирующие, на самом деле содержат участки, кодирующие функционально важные пептиды, и, таким образом, строго говоря, не могут считаться "некодирующими". Одним из таких малых белков, закодированных в "длинной некодирующей РНК", впервые описанным в работе, является пептид FAMOSS, являющийся, как показывает диссертант, регулятором полярного роста растений. Все результаты работы безусловно являются новыми, находятся на высоком мировом уровне, о чем свидетельствует ряд публикаций в ведущих мировых журналах.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций.

На защиту выносятся ряд положений. (i) Впервые показано, что пептидные пулы *Physcomitrium patens* специфичны для разных тканей и зависят от факторов внешней среды. Предложена гипотеза об «активном управлении» пептидными пулами, согласно которой в стрессовых условиях происходит протеолиз функциональных белков-предшественников, с образованием биологически активных элементов, формирующих ответ на стресс. (ii) С помощью масс-спектрометрического анализа впервые показано наличие у растений пептидов, кодируемые различными классами коротких открытых рамок считывания (кОРС). При этом наиболее многочисленной группой продуктов трансляции кОРС в пептидоме являются пептиды, кодируемые на аннотированных транскриптах мРНК, но в другой рамке считывания, чем аннотированный белок. Это открытие подчеркивают неполноту существующей аннотации генов растений, и дает возможность улучшения её с учетом информации из протеомов. (iii) Впервые для растений методами сравнительного анализа транскриптомов с помощью средств биоинформатики проведен детальный анализ эволюции пептидов, кодируемых малоизученным типом транскриптов - длинными некодирующими РНК (длнкРНК). Идентифицированы

многочисленные консервативные пептиды, кодируемые кОПС. (iv) Впервые для растений изучены функции пептидов, кодируемых РНК, аннотированными как длинные некодирующие РНК. Функциональный анализ таких пептидов показал, что они участвуют в регуляции роста и дифференцировки тканей. Эти результаты указывают на то, многие молекулы длинных некодирующих РНК на самом деле могут содержать кОПС, кодирующие функционально разнообразные пептиды, и таким образом, формально не могут считаться некодирующими. Все эти положения вполне убедительно изложены в работе и подтверждены ясными иллюстрациями.

Структура и объем работы Объем диссертации составляет 252 страницы, включая 86 рисунков и 9 таблицу. Список литературы содержит 394 ссылок.

Диссертация построена по классической схеме и состоит из Введения, обзор литературы, методической главы, главы, содержащей результаты и обсуждение, заключения, общих выводов, списка сокращений и списка литературы.

Во введение автор проводит обоснование актуальности темы исследования, и формулирует цели и научные задачи исследования. Сформулированы основные научные результаты, выносимые на защиту.

Диссертации предпослан сравнительно короткий, но эффективный обзор литературы, описывающий механизмы образования пептидов в клетках растений и животных, разнообразие и функциональную значимость активных пептидов растений, а также современные методы исследования пептидов. Следует заметить, что практически каждый раздел обсуждения результатов содержит большое количество ссылок на различные публикации, что ставит каждый конкретный результат в широкий современный научный контекст.

Методическая глава — содержит подробное описание методов, использованных при работе. Основным методом является масс-спектрометрия, но кроме нее в диссертации используется широкий набор современных методов молекулярной биологии, включая методы иммунной ко-преципитации для изучения белок-белковых взаимодействий, секвенирование транскриптомов, методы геномной инженерии с использованием геномного редактирования CRISPR, флуоресцентная микроскопия и широкий набор методов биоинформатики. Методическая глава производит сильное впечатление как широтой набора, так и детальностью описания различных использованных в работе методов.

Глава "Результаты и обсуждение" состоит из трех разделов. В первом разделе описывается изучение внутриклеточных и секретируемых пептидомов *P. patens*, а также влияние таких факторов как повреждение клеточной стенки или обработка стрессовыми гормонами на пептидом. По большей части эти пептидомы образованы путем протеолиза белков-предшественников. Во втором разделе подробно описывается та часть пептидома, которая формируется путем трансляции коротких открытых рамок считывания (кОРС). В этом разделе описываются пептиды, закодированные в кОРС в составе РНК, в настоящее время аннотированных как "длинные не кодирующие". В третьем разделе подробно изучаются функции ряда новых пептидов, открытых в этой работе, в частности пептида FAMOSS, закодированного в кОРС в "длинной не кодирующей РНК" и, как впервые показано, регулирующего полярный рост у *P. patens*.

В «Заключении» суммируются основные результаты диссертационной работы.

Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В диссертационной работе в целом описываются оригинальные экспериментальные и вычислительные методы анализа формирования, функциональной активности, динамики и эволюции пептидов *P. patens*. Работа отличается междисциплинарностью, системным подходом, всесторонней характеристикой выбранного объекта исследования и оригинальностью полученных биологических результатов, ряд которых имеет фундаментальное значение.

В целом, результаты, полученные автором, являются новыми научными знаниями по специальности "молекулярная биология". Основные результаты диссертации неоднократно обсуждались на различных конференциях и симпозиумах и получили одобрение ведущих специалистов.

По теме диссертации представлено 27 публикаций, из них 19 статей в научной периодике (все по списку ВАК) и 9 тезисов конференций.

Практическое значение работы

В работе сформулирован ряд фундаментальных гипотез, меняющих текущие воззрения на формирование иммунного ответа растений, в частности при реакции на воздействие микроорганизмов. Предложенная гипотеза формирования быстрого ответа на стресс путем ускоренного протеолиза функциональных белков позволяет объяснить ряд обнаруженных ранее эффектов, например подавление активности протеасомного пути

деградации фитопатогенами или повышенной экспрессии генов, участвующих в ответе на стресс при накоплении пептидов от хлоропластных белков у мутантов по определенным олигопептидазам. Это открывает новые направления в изучении роли пептидогенеза в ответе на стрессовые факторы внешней среды и защите растений от фитопатогенов в частности.

Методами масс-спектрометрии автору удалось продемонстрировать, что известные мРНК, кодирующие аннотированные белки, могут также кодировать пептиды в кОРС со сдвигом рамки считывания. Аналогичные кОРС были найдены в молекулах, аннотированных как "длинные неcodирующие РНК". Эти результаты имеют фундаментальное значение для геномики, поскольку показывают существенную неполноту существующих аннотаций геномов.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Биоинформатические протоколы анализа геномных, транскриптомных и протеомных данных могут использоваться в курсе биоинформатики для студентов университетов. Разработанные методы использования масс-спектрометрии в комплексе с анализом транскриптомов могут использоваться для предсказания функциональных кОРС у самых разных организмов..

Использованные методы и полученные результаты можно использовать в дальнейших исследованиях в научных учреждениях РАН, РАМН, ФАНО РФ, занимающихся физиологией растений, масс-спектрометрией, пепдиомикой, секвенированием транскриптомов, геной инженерией и геномным редактированием, и при планировании и анализе подобных экспериментов.

Практические рекомендации, сформулированные в диссертации, обоснованы проведенными исследованиями и могут служить руководством в работе.

Оценка содержания диссертации, ее завершенность

Работа хорошо структурирована, каждый раздел главы "Результаты и обсуждение" содержит ясное обсуждение, подтверждающее обоснованность выводов по диссертации в целом. Работа содержит большое число иллюстраций и таблиц и написана ясным, но в то же время живым языком. Читается работа, несмотря на сложность материала, очень легко.

Несмотря на высокий уровень работы, диссертация не свободна от спорных моментов. При анализе данных Oxford Nanopore используется неоправданно низкий порог на качество рида, соответствующий среднему Phred значению, равному семи. Этот порог соответствует 20% ошибке в определении буквы, то есть ожидаемо, каждая пятая буква рида неправильно определена. Такие рида вряд ли будут однозначно равняться на геном. На рисунок 4.21, вопреки утверждениям в тексте мне не удалось разглядеть на тепловых картах особого влияния метилжасмоната. В особенности две карты справа, на первый взгляд, совершенно идентичны. Ошибка перепредсказания при определении кодирующего потенциала выглядит очень высокой, имея в руках данные масс-спектрометрии, автор мог бы не использовать значения по умолчанию, а понизить чувствительность до минимального уровня, при котором продолжают предсказываться все экспериментально определенные пептиды. Встречаются опечатки, иногда смешные, например "препропробелка" (стр. 28). Все эти недостатки не снижают общего высокого качества работы. В целом работа оставляет солидное впечатление, содержит результаты, у которых есть большой шанс стать классическими, ставит много новых задач, и безусловно имеет большую научную ценность.

Заключение

Диссертация Фесенко Игоря Александровича «Системный анализ пептидома растений на примере мха *Physcomitrium patens*» является законченным научно-исследовательским трудом, открывающим новое направление в анализе пептидомов растений.

В диссертации использован ряд современных экспериментальных и биоинформатических методов анализа пептидомов растений на классическом модельном объекте, мхе *Physcomitrium patens* и решен ряд важнейших задач происхождения, и динамики растительного пептидома. Решение этой задачи имеет большое значение для задач молекулярной биологии (пункты 1, 4, 7 и 8 паспорта специальности 1.5.3). По совокупности полученных результатов работа Фесенко Игоря Александровича соответствует всем критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; от 20.03.2021 г. № 426; от 11.09.2021 г. № 1539). Результаты достоверны и достаточно полно опубликованы, автореферат

адекватно отражает содержание диссертации. Автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология».

27 мая 2022 года.

Заведующий лабораторией системной биологии и вычислительной генетики ИОГен РАН

Член-корреспондент РАН, д.ф.-м.н. Макеев В.Ю.

Подпись заведующего лабораторией системной биологии и вычислительной генетики ИОГен РАН, члена-корреспондента РАН, доктора физико-математических наук Макеева Всеволода Юрьевича удостоверяю

Зам директора ИОГен РАН

к.б.н. Брускин С.А.



«27» мая 2022г.

Контактные данные:

Адрес: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3

Телефон: 8(916)5833536

E-mail: vsevolod.makeev@gmail.com