

### Отзыв официального оппонента

на диссертацию Кириенко Анны Николаевны «ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РЕЦЕПТОР-ПОДОБНОЙ КИНАЗЫ K1 ГОРОХА В КОНТРОЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям : 03.01.05 Физиология и биохимия растений и 03.02.03 Микробиология

Работа Кириенко А.Н. построена по общепринятой схеме и состоит из списка сокращений и условных обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы, благодарностей. Список литературы включает в себя 203 источника, из них только 5 на русском, остальные 198 на английском языке, что говорит о хорошем владении автором зарубежной литературой. Правда, в списке литературы публикации за последние пять лет составляют только 10% всей процитированной автором литературы. Работа изложена на 112 страницах машинописного текста, содержит 15 рисунков и 5 таблиц.

**Актуальность исследования** автор обосновывает тем, что изучение молекулярных механизмов восприятия клеткой внешних сигналов их рецепция, формирование функционального ответа у растений значительно отстает от исследований, проведенных на млекопитающих и микроорганизмах. В частности, для симбиоза между бобовыми растениями и ризобиями особое значение имеют сигнальные молекулы, олигомеры N-ацетилглюкозамина (Nod-факторы), которые вырабатываются бактериями и приводят к развитию на корнях бобовых растений азотфиксирующих клубеньков. Автор считает, что представление о молекулярных механизмах рецепции этих молекул при симбиозе еще далеки от понимания, что определяет актуальность исследования рецепторов этих сигнальных молекул у гороха.

В обзоре литературы соискатель на 30 страницах проводит анализ имеющихся данных по рецепторам, связанным с G-белками, рецепторам, взаимодействующим с системой убиквитинирования, ионным каналам и рецепторам, связанным с ферментами у животных и растений. Рецепторным и рецептор-подобным протеинкиназам у растений уделено более подробное внимание и, в частности, LysM-содержащим рецепторам, которые узнают класс соединений, состоящих из остатков N-ацетилглюкозамина. Анализируя LysM-содержащие рецепторы у бобовых растений соискатель приходит к выводу, что у гороха двух выявленных ранее рецепторов к Nod-факторам, кодируемые генами *PsSym10* и *PsSym37* недостаточно для описания полной картины рецепции и требуется поиск дополнительных рецепторов. В частности автора заинтересовал ген *K1*, имеющий высокий уровень сходства с геном *Sym37*, но плохо изученный из-за отсутствия мутантов.

В связи с найденным для исследования объектом в диссертационном исследовании соискатель ставит и решает следующие научные задачи:

1. Анализ уровня экспрессии гена *k1* при развитии клубеньков с помощью метода количественной ОТ-ПЦР.
2. Выявление с помощью TILLING подхода мутантов по гену *k1* и их генотипическая и фенотипическая характеристика.

3. Комплементация мутантных генов *k1* и *sym37* с помощью полноразмерных последовательностей этих генов гороха дикого типа для проверки функциональной взаимозаменяемости.
4. Анализ способности рецептор-подобной киназы K1 формировать олигомерные комплексы с другими известными рецепторными киназами гороха *Sym10* и *Sym37* в различных гетерологичных системах (модифицированный FRET-анализ и дрожжевая двугибридная система).
5. Построение схемы работы рецепторов к Nod-факторам у гороха.

**Научная новизна** работы состоит, по мнению соискателя, в следующем:

- 1) Впервые у бобовых с недетерминированным типом клубеньков (на примере гороха) охарактеризован рецептор K1 с активным киназным доменом, который в составе гетеролигомерного комплекса участвует в инициации развития симбиоза.
- 2) Впервые изучена экспрессия и роль гена *k1* в контроле развития симбиоза гороха с клубеньковыми бактериями. В ходе изучения роли *LysM*-ППК K1 при развитии симбиоза была выявлена его уникальная функция - контроль выхода ризобий из инфекционных нитей.
- 3) Впервые найдены с помощью TILLING подхода и цитологически и фенотипически описаны три линии-мутанты гороха по гену *k1*.
- 4) Предложена оригинальная модель работы нескольких олигомерных рецепторных комплексов, участвующих в узнавании Nod-факторов у гороха.

К пунктам 2 и 4 научной новизны у рецензента имеются вопросы, которые сформулированы в разделе «вопросы» отзыва.

**Теоретическая и практическая значимость работы**, на наш взгляд, состоит в том, что полученные в рассматриваемой работе данные позволяют предложить новую схему в организации работы с *LysM*-содержащими рецепторами для преодоления специфичности при развитии клубенька у бобовых и небобовых растений с ризобиями.

Диссертационная работа Кириенко А.Н. представляет собой законченную научно-квалификационную работу, прошедшую апробацию на 3-х молодежных конференциях молодых ученых в России международного и регионального уровня, представлено два постера на международных конгрессах. По теме диссертации опубликовано 6 статей, в том числе 5 статей в российских и 1 статья в англоязычном журнале с импакт-фактором более 3-х. Название работы отражает ее содержание, выводы логично вытекают из представленных данных.

Необходимо отметить, что в ходе выполнения диссертации Кириенко А.Н. значительно повысила свою квалификацию, освоив много сложных современных методик: количественную ПЦР, создание генетических конструкций для трансформации растений и дрожжей, секвенирование нуклеотидных последовательностей генов, агробактериальную трансформацию растений полученными конструкциями, вестерн-блот гибридизацию, анализ взаимодействия белков с помощью дигибридной дрожжевой системы, поиск мутантных линий с помощью метода поиска индуцированных локальных нарушений в геномах (TILLING).

## **Замечания, возникшие при чтении работы :**

1) В названии диссертации фигурирует понятие «...СУБКЛЕТОЧНЫХ структур».

Согласно различным источникам субклеточные структуры «это более мелкие, чем клетка, входящие в структуру клетки» (Википедия). Например, к субклеточным структурам относятся хромосомы, лизосомы, митохондрии и др., т.е. клубенок это, скорее, «надклеточная структура».

2) рис. 2 в разделе результаты (стр. 58 дис.; рисунок 1 в автореферате): неудобно приведены данные по экспрессии генов *PsK1*, *PsSym10* и *PsSym37* в контроле (не инокулированный горох) с помощью количественной ОТ-ПЦР. Сравнение с соответствующими данными для инокулированного гороха по дням практически невозможно. А сравнение желательнее по причине относительно незначительной разницы (как пишет автор «1,8 раза (это максимум! ЧМИ) в ответ на обработку ризобиями (2 дни)», стр.57). При этом не приводится информация, насколько эта незначительная разница достоверна (по Стьюденту, по Фишеру), хотя среднеквадратичные отклонения трех аналитических повторностей автором приводятся. Следует также иметь в виду, что погрешность измерения оптического прибора при определении концентрации ДНК при ОТ-ПЦР, которая, как правило, превышает 10%. Поэтому возникает вопрос: можно ли считать эту разницу достаточной, чтобы говорить об активации экспрессии гена?

3) В первом выводе диссертации (стр. 92) сказано: «На основании анализа экспрессии гена *K1* методом количественной ОТ-ПЦР показано, что этот ген необходим для развития симбиоза у гороха». Как уже мной отмечалось в замечании № 2, незначительное увеличение (и не показанное как статистически достоверное) экспрессии гена *K1* на 2-ой день после инокуляции является не очень сильным аргументом в пользу необходимости этого гена для развития симбиоза у гороха на ранних стадиях, а тем более на поздних, при инфицировании и выходе из инфекционной нити, когда его экспрессия незначительно отличается от таковой в корнях в соответствующий день после инокуляции.

4) В разделе 3.2. (стр. 58) результатов сразу после заголовка приводится информация о том, что «(Подбор праймеров для поиска в коллекции TILLING мутантов, подбор условий работы праймеров выполнен диссертантом самостоятельно. Фенотипическая и генотипическая характеристика мутантных линий выполнена под руководством внс Долгих Е.А.)».

Аналогично на стр. 73 в разделе 3.3.1.

На наш взгляд эта информация более уместна в разделе «Личный вклад диссертанта», который, кстати, отсутствует в диссертации и автореферате. Поэтому трудно судить (особенно тем, кто знакомится с работой по автореферату), насколько существенен вклад соискателя в представленную коллективную работу и опубликованные статьи. Например, в других экспериментальных разделах диссертации, где такие указания отсутствуют, а также в анализе литературы и написании обзора, методов, заключения и выводов диссертации. Надеюсь, в ходе представления диссертации Диссертационному Совету соискатель сможет восполнить этот пробел в докладе.

5) Для экспериментов по доказательству функции белка *K1* гороха в рецепции Nod-фактора использовали ризобии. Между тем известно, что существуют также ряд молекул (липополисахариды, полисахариды и др.), которые участвуют в инфекции и образовании клубенька. Поэтому, было бы более убедительно использовать для доказательства

функции белка K1 химически очищенные молекулы Nod-фактора. На работы такого типа автор даже ссылается (стр. 69, Kouchi et al., 2004)/

6) Нам не удалось найти в списке литературы ссылку (Долгих, 2017), на которую ссылается автор на стр. 66 диссертации.

7) стр. 29 диссертации: нет ссылки у предложения «У бобовых растений LRR-ППК участвуют в узнавании сигнальных молекул, выделяемых симбиотическими азотфиксирующими бактериями ризобиями..... и Sym19 у *Pisum sativum*».

#### **Вопросы:**

1) Ранее считалось, что на этапе инфицирования и выхода из инфекционной нити, эндоцитоза играют роль липополисахариды (ЛПС) ризобий [1,2].

1) Brewin N.J. Mechanisms of cell and tissue invasion by *Rhizobium leguminosarum* : the role of cell surface interactions // In E. W. Nester and D. P. S. Verma (eds.), *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, 1993. P. 369-380;

2) Carlson R. W. Lipopolysaccharides in *Rhizobium-Legume Symbioses* // In X. Wang, P.J. Quinn (eds.), *Endotoxins: Structure, Function and Recognition, Subcellular Biochemistry* 2010. 53, DOI 10.1007/978-90-481-9078-2\_16.

В связи с вышеизложенным, думается, что в отношении пунктов 2 и 4 раздела новизны, видимо, еще необходимы дополнительные доказательства, что рецептируется именно Nod-фактор. Отсутствие значительной разницы в экспрессии гена *PsK1*, по сравнению с контролем, говорит не в пользу модели рецептирования, изложенной в пунктах 2 и 4 раздела новизны.

**Вопрос :** Как автор разделяет действие ЛПС и Nod-факторов на этапах инфицирования, выхода из инфекционной нити, эндоцитоза при инокуляции ризобиями?

2) Автор на стр. 57 пишет, что «экспрессия гена *PsK1* увеличивалась на ранних этапах развития симбиоза в 1,8 раза в ответ на обработку ризобиями (2 дпи), но на дальнейших этапах уровень экспрессии гена мало изменялся по сравнению с контролем (неинокулированными корнями гороха на тех же сроках развития) (Рисунок 2)». **Вопрос:** как объясняет автор роль рецепторного белка K1 гороха на этапе выхода ризобий из инфекционной нити, если экспрессия гена *PsK1* в ходе инфекции не увеличивалась?

3) На рисунке 2 представлены результаты одной из двух биологической повторностей. Неясно, насколько схожи результаты этих повторностей и почему взята именно эта.

4) На стр. 67 приведены «Рисунки 6-8. Анализ экспрессии *Enod5*, *Enod12* и *NIN* (также как и других: *PR1*, *PR10*, *DNF2*, *SymCRK*) генов - маркеров развития симбиоза при инокуляции гороха исходного сорта Sameog и мутантных линий по гену *κ1* в корнях и клубеньках с помощью количественной ОТ-ПЦР». Но почему-то соискатель не провел анализ экспрессии гена *κ1* у мутантных линий гороха (817, 885, 2265), что позволило бы получить прямые доказательства его причастности к ранним этапам развития клубенька. Почему?

5) На какой день после инокуляции ризобии выходят из инфекционной нити ? В работе нам не удалось найти четкого указания.




**Мелкие замечания (опечатки, неточности) :**

- 1) Условные обозначения и сокращения (стр. 5): сокращение – дни после инокуляции (дни) написано строчными буквами (+стр. 44, 51, 55, и др.), следует писать – прописными (заглавными), как и в других случаях сокращений (см. стр.5)
- 2) Благодарности (стр. 112): почему-то имена и фамилии сотрудников INRA (Франция) написаны слитно.
- 3) стр. 15, 3-я строка снизу (*A. thaliana*был)
- 4) стр. 22, 2-я строчка сверху (*Wak*генов)
- 5) стр. 23, 12-я строка снизу («к элиститору»)
- 6) стр. 23, 1-я строка снизу (гетероолигомернй)
- 7) стр. 24, 12-я строчка сверху (Spainket al., 2001)
- 8) стр. 24, 13-я строчка сверху (2003,,)
- 9) стр. 39, 7-я строчка снизу (250мкг/мл)
- 10) стр. 39, 21-я строчка снизу (геля,проводили)
- 11) стр. 46, 2 и 12-я строчки сверху (предоставленнуюDr., 2265.Конструкции)
- 12) стр. 49, 9-я строчка сверху (*Nicotianabenthamiana*).
- 13) стр. 49, 10-я строчка сверху (*A. Tumefaciens*)
- 14) стр. 50, 21-я строчка сверху (метода(BioRad, США))
- 15) стр. 55, 5-я строчка сверху (TILLING(от англ.)
- 16) стр. 81, 16-я строчка сверху (*invivo*при)
- 17) стр. 81, 1-я строчка снизу (содержащейполноразмерную)
- 18) стр. 82, 1-я строчка сверху (Cameor.C)
- 19) стр. 82, 7-я строчка сверху (35S.Так)
- 20) стр. 83, 5-я строчка сверху (pB7WG2D::GUS(15 трансгенных корней))
- 21) стр. 85, 18-я строчка снизу (*sym37invivo*)
- 22) стр. 85, 2-я строчка снизу (*sym2(sym2A)*)
- 23) стр. 86, Рисунок 15 (описка в слове рецептор).

**Заключение:** По актуальности, научной новизне и практической значимости диссертация Кириенко Анны Николаевны соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Кириенко А.П. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 физиология и биохимия растений и 03.02.03 – микробиология, что обосновано всеми разделами диссертации, в том числе выводами и выносимыми на защиту положениями.

Зав. лабораторией биоинженерии  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Института биохимии и физиологии растений  
и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН),  
д.б.н.

  
Чумаков Михаил Иосифович

410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, 13, ИБФРМ РАН  
тел. 8-8452-970403, e-mail: chumakovmi@gmail.com

25.05.2018 г.

Подпись М.И. Чумакова удостоверяю

Ученый секретарь ИБФРМ РАН, к.б.н.  Селиванова О.Г.

