

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу 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, 03.02.03 -
Микробиология

Диссертационная работа Кириенко Анны Николаевны посвящена изучению молекулярных механизмов формирования функционального ответа растительной клетки на внешние сигналы. Растения содержат специальные мембранные рецепторные киназы, необходимые для быстрого ответа на внешние воздействия. Рецепторные киназы также позволяют растениям участвовать в симбиотических взаимодействиях с микроорганизмами. Благодаря развитию геномных технологий появилась возможность идентификации рецептор-подобных киназ на основании их гомологии с уже известными. Так было показано, что растения содержат большое количество рецепторных киназ, например, у *Arabidopsis* более 600 (Haffaniet al., 2004). При этом большинство из них не охарактеризовано и в последнее время появляется все больше работ по их функциональной характеристике в том числе и работа Кириенко Анны Николаевны. В работе исследовалась функциональная роль новой рецептор подобной киназы K1. Полученные результаты позволили сделать выводы о том, что РПК K1 необходима для контроля развития симбиоза у гороха. При этом впервые у бобовых с недетерминированным типом клубеньков охарактеризован рецептор с активным киназным доменом, который в составе гетеролигомерного комплекса участвует в инициации развития симбиоза. Предложена модель работы нескольких рецепторных комплексов, участвующих в узнавании Nod-факторов у гороха. В целом полученные результаты несомненно важны для понимания функции

рецептор-подобной киназы K1 для контроля формирования симбиоза у растений.

Диссертация Кириенко А.Н. изложена на 112 страницах и включает в себя следующие разделы: Условные обозначения и сокращения, Введения, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы, содержащий 203 ссылки.

Обзор литературы состоит из двух больших разделов и посвящено рассмотрению уже известных рецепторов, необходимых растениям для роста. В первом разделе рассмотрены четыре основных типа рецепторов ранее описанных у растений - это рецепторы, связанные с G-белками, рецепторы взаимодействующие с системой убиквитирования, ионные каналы и рецепторы связанные с различными ферментами. Подробно рассмотрены известные механизмы их действия при передаче сигнала и их роль в процессе роста растений. Второй раздел посвящен более подробному описанию известной информации о LysM-содержащих рецепторах, играющих важную роль во взаимодействии растений с микроорганизмами и формирование симбиозов. В целом, стоит отметить, что в настоящее время в данной области накопился достаточно большой объем информации в данной области исследования. Тем не менее Кириенко А. Н. удалось успешно и в краткой форме изложить основные принципы передачи внешних сигналов в клетках растений и с привлечением самых последних работ в данной области. Обзор литературы, свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в проблеме и способен к критическому анализу и обобщению.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных в работе материалов и примененных методических подходов. В разделе подробно описаны используемые штаммы микроорганизмов, линии растений, приведены все последовательности используемых олигонуклеотидов, подробно описаны схемы получения

генетических конструкций используемых в работе. Подробно описаны все используемые методики используемые в работе. Все это позволяет воспроизвести поставленные эксперименты. В качестве замечания к данному разделу стоит отметить отсутствие схем создания генетических конструкций. Наличие таких рисунков облегчило бы восприятие текстовой информации по их созданию. В целом, раздел содержит всю необходимую информацию для понимания и воспроизведения проведенных работ и оставляет приятное впечатление о широте применения методических подходов.

В следующем разделе диссертационной работы последовательно описываются этапы исследования роли LysM-РПК K1 у гороха. На первом этапе с помощью количественного ОТ-ПЦР было показано, что в ходе развития симбиоза гороха с ризобиями на начальных этапах наблюдается увеличение экспрессии гена K1, а также двух других рецептор-подобных киназ *PsSym10* и *PsSym37*, для которых ранее уже было показано участие в симбиозе. В целом, полученные результаты показывают изменение экспрессии генов *PsSym10*, *PsSym37* и видно значительно увеличение транскрипции этих генов после инокуляции растений бактериями. На их фоне увеличение транскрипции гена K1 является незначительным и нестабильным, например, уровень транскрипции снижается на 5, и 21 дни даже по сравнению с исходным (рис. 2). На рисунке 2 не хватает данных об изменении транскрипции генов в одни и те же дни как в контроле, так и в инокулированной культуре. Для контроля не приведены данные на 5, 7, 9, 14 и 21 день. Интересно отметить, что исходя из приведенных данных (рис. 2) на 21 день после инокуляции транскрипция гена *PsSym10* не детектируется, что возможно является ошибкой эксперимента и в других биологических повторностях этот эффект не обнаружился бы. Поэтому в целом, для получения более убедительных результатов в этом разделе не хватает большего числа биологических повторностей эксперимента (минимум 5-7). Сделанный по результатам этой части работы вывод №1 о

том, что «На основании анализа экспрессии гена *K1* методом количественной ОТ-ПЦР показано, что этот ген необходим для развития симбиоза у гороха» необоснован. Во-первых, само изменение уровня экспрессии гена *K1* незначительно и нестабильно. Во-вторых, вообще изменение экспрессии какого-то гена под воздействием внешнего фактора не является доказательством необходимости гена для ответа на него, а может являться вторичным эффектом. Сам вывод об участии гена *K1* правильный, но следует это не из анализа экспрессии.

Далее была проведена работа по поиску мутантных линий гороха, содержащих мутации в гене *K1* с помощью TILLING подхода. В результате были выявлены три линии гороха, содержащих мутации в гене *K1* и описаны их генотип и фенотип. Для двух линий было показано, что они обладают *Nod⁻* фенотипом, и это, служит косвенным подтверждением гипотезы о том, что *K1* участвует в развитии симбиоза с ризобийными бактериями. Возможно, в этих линиях есть мутации в других частях генома, играющие ключевую роль для данного фенотипа однако этот момент в диссертации не обсуждается. На рисунке 6 приведены данные по изменению транскрипции генов-маркеров развития симбиоза и видно, что в мутантных линиях уровень транскрипции этих генов значительно ниже. На рисунке 6, не хватает контрольных данных для растений из мутантных линий, но не инокулированных, как сделано для дикого штамма.

Для мутантной линии 817 было показано, что введение полноразмерного гена *K1* из исходной линии Sameog приводит к восстановлению способности формировать клубеньки. Это является достаточно убедительным доказательством того, что *Nod⁻* фенотип этой мутантной линии вызван именно мутацией в гене *K1* и что *K1* действительно необходим для развития симбиоза.. В работе также хотелось бы увидеть данные по введению полноразмерной копии гена *K1* в мутантную линию 885, что послужило бы еще одним доказательством о роли этого гена в образовании симбиоза.

Также в работе приведены данные по изучению взаимодействия различных LysM рецептор-подобных киназ K1, Sym10 и Sym37 в гетеролгичных системах. Полученные результаты в этой части работы убедительны. В заключение предложена схема формирования рецепторных комплексов при распознавание Nod-факторов у гороха. В целом, следует отметить, что сделанные замечания носят в основном уточняющий характер и, не снижают общей положительной оценки научной и методической значимости диссертационной работы Кириенко А.Н.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 6 журналах из списка ВАК, подготовлена публикация в журнале *Planta*, а также представлены на российских и международных конференциях. Автореферат полностью отражает содержание и выводы работы.

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.Н. 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.

Заведующий лабораторией геномики микроорганизмов и метагеномики
Федерального государственного учреждения «Федеральный
исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 783-32-64

www.fbras.ru

e-mail оппонента: mardanov@biengi.ac.ru

доктор биологических наук

Марданов Андрей Владимирович

Ученый Секретарь

Федерального государственного учреждения

«Федеральный исследовательский центр

«Фундаментальные основы биотехнологии»

Российской академии наук»

Орловский Александр Федорович

