

«УТВЕРЖДАЮ»:

Директор Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Ботанический  
институт им. В.Л. Комарова Российской академии  
наук (БИИ РАН)

д.б.н.

Д.В. Гельтман

05 июня 2018 г.

## ОТЗЫВ

**ведущего учреждения на диссертацию Кириенко Анны Николаевны  
«ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РЕЦЕПТОР-ПОДОБНОЙ КИНАЗЫ K1 ГОРОХА В  
КОНТРОЛЕ ФОРМИРОВАНИЯ СИМБИОТИЧЕСКИХ СУБКЛЕТОЧНЫХ  
СТРУКТУР»**

**представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальностям: 03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»; 03.02.03 –  
«Микробиология».**

### **Актуальность темы и ее обоснование**

Формирование на корнях бобовых растений особых органов – клубеньков, обеспечивающих симбиоз между растением и азотфиксирующими бактериями – представляет собой сложный процесс, который со стороны растительного организма находится под многоуровневым контролем. Выявление механизмов, контролирующих развитие клубенька, имеет важное значение для фундаментальной науки о растениях, а также для прикладных исследований и разработок в области селекции и сельского хозяйства. Особый интерес, а также наиболее обширные перспективы с точки зрения потенциальных практического приложений, представляет изучение механизмов обмена сигналами между растениями и бактериями в процессе взаимного распознавания, установления и функционирования симбиотических взаимодействий. Данный процесс запускается бактериальными липохитоолигосахаридами - Nod-факторами, а со стороны растений ключевую роль в распознавании Nod-факторов играют рецептор-подобные киназы, содержащие LysM-мотивы. Они были впервые выявлены и охарактеризованы на модельном объекте лядвенце, формирующем клубеньки детерминированного типа. У растений с клубеньками недетерминированного типа, к которым относится такая важная сельскохозяйственная культура, как горох посевной, ранее были выявлены две такие киназы – PsSym10 и PsSym37, и показана их роль, соответственно, в инициации симбиоза и развитии инфекции; однако, киназный домен этих белков оказался неактивным. Как известно, для восприятия сигнала такие киназы должны образовать с другими компонентами сигнального пути, также относящимися к группе рецептор-подобных киназ, но с активным киназным доменом. Таким образом, возникает вполне закономерный вопрос о партнерах PsSym10 и PsSym37, которые критически необходимы для успешной инициации и развития азотфиксирующих клубеньков на корнях гороха. Необходимо отметить, что для бобового растения, формирующего недетерминированные клубеньки

(каковым является горох), до сих пор не были описаны рецепторы с активным киназным доменом в составе инициаторного олигомерного комплекса. Очевидно, что решение данного вопроса представляет большой интерес не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения. В связи с вышеизложенным диссертационная работа Анны Николаевны Кириенко, посвященная выявлению и характеристике рецептор-подобной киназы K1 – партнера PsSym10 и PsSym37, является **высоко актуальным исследованием**. **Целью** рецензируемой диссертационной работы стало изучение роли LysM-содержащей рецептор-подобной киназы K1 гороха при развитии симбиоза с клубеньковыми бактериями. **Объектами** исследования стали горох посевной, растения дикого типа и ряд гомозиготных мутантных линий, полученных автором самостоятельно на основе семян из коллекции TILLING-мутантов в центре INRA (Франция). На этих объектах автором проведены экспериментальные исследования, и на основе обобщения результатов построена модель работы рецепторов к Nod-факторам у гороха посевного.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертация изложена на 112 стр. машинописного текста, содержит 7 таблиц, иллюстрирована 15 рисунками и состоит из: Введения, 3-х глав, заключения, выводов и списка цитируемой литературы; библиографический указатель включает 203 наименования источников, в т. ч. 198 – зарубежных авторов. Работа написана правильным языком, с относительно небольшим количеством опечаток, и аккуратно оформлена. Работа предваряется **Введением**, в котором убедительно показана актуальность исследования; кроме того, во Введении сформулированы цель и задачи исследования.

### **Глава 1. Обзор литературы (стр. 10-38)**

В обзоре литературы, изложенном на 29 страницах, дан подробный анализ современного состояния исследований в области выявления и характеристики растительных рецепторов, в первую очередь рецепторов, регулирующих растительно-микробные взаимодействия. Обзор состоит из двух частей. В первой части рассмотрены основные группы рецепторов, с фокусом на группе рецептор-подобных киназ, к которой относится исследуемый автором белок. Эта часть обзора ставит проводимые автором исследования в широкий научный контекст; в ней кратко, но емко суммируются современные представления о разнообразии растительных рецепторов. Несмотря на ее достоинства, в данной части встречаются и некоторые неточности. Так, в разделе, описывающем ионные каналы с рецепторной функцией, несколько раз упоминается, что растения обладают специализированными кальциевыми каналами плазмалеммы, однако, как раз у растений кальций поступает в клетки через неселективные катионные каналы, не обладающие специфичностью к кальцию (Demidchik, Davenport, Tester, Annu Rev Plant Biol 2002). Вторая часть обзора литературы посвящена подробному анализу современных данных о роли LysM-содержащих рецепторов растений в распознавании микроорганизмов. Приводятся и анализируются современные данные об организации рецепции Nod-факторов у растений с детерминированным и недетерминированным типами клубеньков, полученные на двух молекулярных моделях для каждого типа – лядвенца и люцерны, соответственно. Из данной части логично вытекает гипотеза о существовании еще одного ключевого компонента рецепторных комплексов, осуществляющих инициацию ранних симбиотических реакций и ряд поздних этапов, связанных с инфекционным процессом, и необходимость поиска кандидатного белка

среди LysM-рецептор-подобных киназ. Примечательно, что подобные исследования на люцерне (модельном объекте с секвенированным геномом и коллекцией мутантов) не привели к результату, что приводит А.Н. Кириенко к выводу о возможном успехе поиска с использованием модели гороха. Именно в этом заключается диссертационное исследование, результаты которого представлены в соответствующей главе.

## **Глава 2. Объект и методы исследования (стр. 39-56)**

В главе Материалы и методы приводятся данные об использованных в работе методах, где применялись подходы молекулярной биологии, биохимии, цитологии. Спектр методик широк, и полностью соответствует масштабу решаемой диссертантом задачи. Он включает как стандартные методики, например, выделение нуклеиновых кислот и методы на основе ПЦР, так и достаточно сложные, такие, как получение трансгенных корней (*hairy roots*) и визуализация бактерий и тонких структур растительных клеток, например, инфекционных нитей. Также впечатляет и круг живых систем, с которыми пришлось работать автору: помимо стандартных клонирований в *E. coli*, автору пришлось работать с рядом штаммов агробактерий (как *tumefaciens*, так и *rhizogenes*), дрожжей, проводить трансформацию и изучать транзientную экспрессию белков интереса в листьях табака, а также отработать гистологические и молекулярные подходы для основных объектов исследования – линий гороха.

## **Глава 3. Результаты и обсуждение (стр. 57-86)**

Полученные данные приводятся и обсуждаются в одноименной главе. Залогом успеха в решении автором поставленной сложной задачи стало то, что А.Н. Кириенко удалось среди выявленных мутантных по K1 линий, потенциально имеющих фенотип, связанный с формированием полноценных азотфиксирующих клубеньков, с помощью *in silico* анализа обнаружить линии-кандидаты с фенотипом  $Nod^-$ , что и подтвердили дальнейшие исследования. В соответствии с гипотезой автора, у мутантных линий не происходило деформации корневых волосков в ответ на инокуляцию ризобиями, что красиво и убедительно демонстрирует роль K1 в инициации симбиоза. Также показаны дефекты в росте инфекционных нитей. Была проанализирована и исключена возможная роль K1 в иммунном ответе гороха, что еще раз подтвердило узкоспецифичную роль данного белка в симбиозе. Наконец, с помощью дрожжевой двугибридной системы были продемонстрированы прямые взаимодействия между белками PsSym10, PsSym37 и K1. После этого автор выполнил комплементацию изучаемых линий полным клоном кДНК K1. В результате  $Nod^+$  фенотип был успешно восстановлен; к сожалению, в работе не приводится количественной оценки числа клубеньков на корень у дикого типа, позволяющей сравнить уровень восстановления. Кроме комплементации линий-мутантов по K1 проведена комплементация K1 линий, дефектных по PsSym10 и PsSym37.

В результате выполненных на высоком научном и методическом уровне исследований А.Н. Кириенко удалось убедительно показать, что рецептор-подобная протеинкиназа K1, предположительно идентифицированная как кандидат на роль второго ключевого компонента сигнальных рецепторных комплексов у гороха, действительно играет эту роль и регулирует у гороха (1) совместно с PsSym10: инициацию формирования недетерминированных клубеньков, и (2) совместно с не идентифицированным пока белком: выход бактерий из инфекционных нитей.

После обсуждения полученных результатов диссертант переходит к **Заключению (стр. 87-91)**. Следует согласиться с А.Н. Кириенко, что изученная ею К1 киназа может стать одним из ключевых генов-инструментов решения задачи расширения круга растений, способных образовывать симбиоз с азотфиксирующими микроорганизмами, путем трансгеноза. Далее следуют **Выводы (стр. 92)**, полностью подтвержденные экспериментальными данными.

При общем положительном впечатлении от диссертационной работы хотелось бы обсудить ряд вопросов:

1. Если построить филогенетическое древо LysM-рецепторов и LysM-рецепторных киназ, то какое положение займет К1-киназа гороха?
2. Предполагает ли автор исследовать возникновение в ядре кальциевых спайков в ответ на Nod-факторы у мутантов гороха, лишенных функциональной К1-киназы?
3. Почему для подтверждения взаимодействия исследуемых киназ была выбрана двухгибридная дрожжевая система, а не метод FRET?

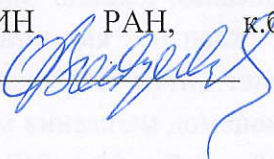
Приведенные вопросы не подвергают сомнению новизну и оригинальность представленной диссертационной работы. Она является целостным и завершенным исследованием.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы. Результаты исследования были доложены А.Н. Кириенко на нескольких международных и российских конференциях. Они опубликованы в 7ми публикациях в изданиях, рекомендованных ВАК.

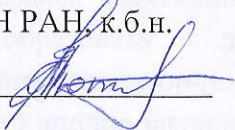
Суммируя все выше сказанное, следует заключить, что диссертационная работа А.Н. Кириенко **«Изучение роли рецептор-подобной киназы К1 гороха в контроле формирования симбиотических субклеточных структур»** соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым ВАК Минобрнауки России к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ее автор А.Н. Кириенко заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.05 - физиология и биохимия растений и 03.02.03 – микробиология.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории молекулярной и экологической физиологии (протокол № 8 от 04 июня 2018 г.).

Отзыв подготовлен:

Зав. лаб. молекулярной и экологической физиологии БИН РАН, к.б.н.  
Войцеховская О.В. 

С.н.с. лаб. молекулярной и экологической физиологии БИН РАН, к.б.н.

Тютерева Е.В. 

Санкт-Петербург, 04 июня 2018 г.