

Федеральное государственное учреждение
**«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»**

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; факс: (495) 954-2732; www.fbras.ru; e-mail: info@fbras.ru

15.11.2016 № 12307-2171-1060

На № 201-БС1.4 - 786 от 26.10.16

“УТВЕРЖДАЮ”

**Директор
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,
член-корреспондент РАН**



В.О. Попов

15 » ноября 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Богданова Ивана Владимировича «Новые липид-транспортующие белки растений семейства Fabaceae», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Диссертационная работа И.В. Богданова посвящена решению одной из наиболее актуальных и важных задач современной биорганической химии – выделению новых биологически активных белков и изучению их структуры и свойств, а также механизмов их функционирования. В работе выделены и исследованы липид-транспортующие белки растений, которые участвуют в развитии аллергических реакций человека в ответ на растительные пищевые продукты, латекс и пыльцу.

Актуальность и практическая значимость подобного исследования не вызывает сомнений, как с точки зрения разработки теоретических представлений о взаимосвязи структуры и свойств растительных липид-транспортующих белков, так и в связи с необходимостью создания тест-систем нового поколения для компонентной аллергодиагностики и вакцин на основе их гипоаллергенных форм для аллерген-специфической иммунотерапии.

В связи с этим вся область исследования, а также цель настоящей работы – поиск, выделение, структурно-функциональное и иммунологическое изучение новых липид-транспортующих белков растений – важны и актуальны как с научной, так и прикладной точки зрения.

Диссертационная работа изложена на 128 страницах машинописного текста и написана по классическому образцу. Она состоит из введения, разделов «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и списка цитируемой литературы. Данный список включает 201 источник, многие из которых являются публикациями последних лет, что дополнительно свидетельствует об актуальности выбранного автором направления исследования.

Научная новизна диссертационной работы определяется тем, что впервые в семенах гороха (*Pisum sativum* L.) обнаружено подсемейство новых липид-транспортующих белков, которое состоит из трех белков, обозначенных как Ps-LTP1-3. Разработаны методы выделения и очистки природного белка Ps-LTP1 и биотехнологические способы получения рекомбинантных липид-транспортующих белков гороха, чечевицы и персика. Проведено сравнительное изучение их функциональных свойств. Впервые показано, что эти белки обладают конформационной гетерогенностью в водном растворе.

Во введении обосновывается актуальность темы, формулируются цели и задачи исследования и основные положения, выносимые на защиту,

обозначены научная новизна и практическая значимость работы, а также результаты апробации полученных данных.

Первая глава (обзор литературы) включает детальное рассмотрение имеющихся к настоящему времени данных о структурных и функциональных особенностях липид-транспортирующих белков растений и эволюции их генов, а также их биологической активности, возможных функциях и практическом применении. Особое внимание уделяется работам, в которых обсуждаются как роль этих белков в возникновении аллергических заболеваний человека, так и современные методы их лечения. Обзор написан грамотно, охватывает широкий спектр публикаций, появившихся в этой области знаний преимущественно в последние годы, и, безусловно, свидетельствует о глубоком понимании автором молекулярных основ изучаемых процессов, его широком научном кругозоре и солидной общетеоретической подготовке. К этому разделу работы можно сделать лишь замечание об отсутствии суммирующего заключения. В целом изложение материала дает подробное представление о предмете исследования и позволяет оценить важность и актуальность выбранного автором направления и место данной работы среди подобных.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны использованные в работе методы, которые включают выделение и очистку нативных, гибридных и рекомбинантных белков, электрофорез, электро- и иммуноблоттинг, масс-спектрометрический и твердофазный иммуноферментный анализы и определение N-концевой аминокислотной последовательности, а также регистрацию кругового дихроизма, флуоресцентную спектроскопию и гетерологичную экспрессию генов. Знакомство с этими методами позволяет сделать вывод, что все они адекватны решению поставленных задач, а работа И.В. Богданова выполнена на высоком экспериментальном и методическом уровне. В связи с этим достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

В третьей главе описаны полученные автором экспериментальные результаты, приводится их обобщение и обсуждение. Установлены структуры кДНК, кодирующих в семенах гороха (*Pisum sativum* L.) белки-предшественники трех липид-транспортирующих белков и соответствующие им аминокислотные последовательности. Изучение профилей дифференциальной экспрессии этих генов позволило высказать предположение о возможных биологических функциях липид-транспортирующих белков гороха. Один из этих белков, обозначенный как Ps-LTP1, был очищен до гомогенного состояния, и изучены его структурно-функциональные особенности. Показано, что этот белок с различной эффективностью связывает широкий ряд липидных молекул, который включает жирные кислоты, лизолипиды и жасмоновую кислоту, которая регулирует рост растений, осуществляет транспорт липидов между модельными мембранами *in vitro*, а также способен разрушать искусственные липосомы. Установлено, что этот белок обладает антимикробной активностью по отношению к ряду фитопатогенных бактерий и грибов.

Особый интерес представляет разработка биотехнологического метода получения рекомбинантного белка Ps-LTP1 и его ^{13}C , ^{15}N -меченного аналога путем экспрессии созданной автором плазмиды pET-His8-TrxL-Ps-LTP1 в клетках штамма *E. coli* BL-21 (DE3). Получение очищенных рекомбинантных аналогов позволило установить пространственную структуру белка в растворе методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии и обнаружить его две конформационные формы.

Установлено, что липид-транспортирующий белок гороха является новым пищевым аллергеном для человека. Высказано предположение, что в связывании липидов и специфических антител класса участвуют одни и те же консервативные аминокислотные остатки его молекулы.

Важное практическое и теоретическое значение работы определяется проведенным сравнительным изучением структурно-функциональных и иммунологических характеристик пищевых аллергенов человека у гороха,

чечевицы (*Lens culinaris* L.) и персика (*Prunus persica* L.). Анализ регуляции экспрессии и продукции членов мультигенного подсемейства липид-транспортующих белков в растениях гороха представляет интерес с точки зрения фундаментальных исследований. В то же время создание генно-инженерных плазмид для экспрессии этих белков в клетках *E. coli*, безусловно, открывает перспективы их биотехнологического применения в медицине для создания гипоаллергенных форм клинически значимых аллергенов. Полученные данные представляют безусловный интерес для широкого круга исследователей и практиков, работающих в областях биохимии, молекулярной биологии и биотехнологии.

Представленные в диссертации материалы свидетельствуют об успешном решении поставленных задач и получении новых научных данных, имеющих как фундаментальное, так и прикладное значение. Цели и задачи, поставленные в диссертации, достигнуты полностью.

Несмотря на общее очень благоприятное впечатление от работы, она не лишена и некоторых недостатков, к числу которых можно отнести некоторые огрехи терминологического характера. Например, термин «аспартильные протеиназы» уже несколько лет заменен на «аспартатные протеиназы», поскольку в активном центре этих ферментов присутствуют две отрицательно заряженные карбоксильные группы остатков аспарагиновой кислоты. В процессе аффинной хроматографии белок связывается с лигандом, а не с носителем, к которому прикреплен лиганд. В связи с этим более правильным будет выражение «иммуноаффинная хроматография на поликлональных антителах, иммобилизованных на активированной бромцианом сефарозе».

Однако эти замечания носят частный характер, не снижают ценности настоящей работы и не влияют на обоснованность положений диссертации, выносимых на защиту.

Апробация работы. Основные результаты отражены в четырех статьях в российских и зарубежных рецензируемых изданиях и двух патентах, а также доложены на 28 российских и международных конференциях.

Опубликованные работы и автореферат достаточно полно отражают основное содержание диссертации. Выводы адекватно обоснованы.

Результаты и выводы диссертации могут быть рекомендованы к использованию в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова (биологический и химический факультеты, Институт физико-химической биологии им. А.М. Белозерского), Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт биохимии им. А.Н. Баха), Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН и Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН.

Общее заключение. Знакомство с диссертацией, авторефератом и основными работами И.В. Богданова убеждает, что он является зрелым исследователем, умеющим в короткий срок осваивать и свободно оперировать всем арсеналом современных технических приемов биоорганической химии, биохимии и молекулярной биологии, обладающим достаточно глубокими знаниями в этих областях науки. Его диссертационная работа представляет собой законченное научное исследование, которое по содержанию, актуальности выбранной темы, структуре и уровню выполнения поставленных задач и степени обоснованности выносимых на защиту положений и выводов полностью удовлетворяет требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. Соискателем выполнена законченная научно-квалификационная работа, содержащая ценные результаты для биоорганической химии – проанализировано семейство растительных липид-транспортирующих белков, регуляция экспрессии его членов, а также взаимосвязь их структуры и биологической активности.

Таким образом, автор диссертационной работы «Новые липид-транспортирующие белки растений семейства *Fabaceae*» **Иван Владимирович Богданов** заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и одобрен на заседании коллоквиума трех лабораторий Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук: лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота, лаборатории биоэнергетики и лаборатории иммунобиохимии (протокол № 14 от 08 ноября 2016 г.), основное направление научно-исследовательской деятельности которых соответствует тематике диссертации.

Заведующий лабораторией биохимии азотфиксации и метаболизма азота
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук,
доктор биологических наук



Подпись *Топунова А.В.*
ВЕРЯЕТСЯ *Мажерова*
23 ноября 2016 г.

Топунов Алексей Федорович

Почтовый адрес: ФИЦ Биотехнологии РАН,
Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия
Телефон: (495) 660-34-30 (доб. 199).
Адрес электронной почты: aftopunov@yandex.ru