

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Ивана Владимировича Богданова «Новые липид-транспортующие белки растений семейства *Fabaceae*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

Система защиты растений против фитопатогенов устроена своеобразным образом. Это своеобразие заключается в том, что растения не обладают индивидуальными химическими соединениями, способными подавить развитие патогена. Защита от фитопатогена в растениях обеспечивается набором различных химических соединений, к которым относятся и антибактериальные белки. В геноме растения закодированы сотни различных антигрибных пептидов и белков, таких как гевеин-подобные пептиды, дефензины, липид-переносящие белки и др. При контакте с фитопатогеном индуцируется синтез коллектива антибактериальных белков и пептидов, которые и блокируют его развитие. Для понимания способа коллективного ингибирующего действия необходимо знание о механизме действия каждого участника, что естественно подразумевает его выделение и изучение структурно-функциональных свойств. Не менее, а возможно более важным является медицинский аспект диссертации, заключающийся в поиске и изучении новых аллергенов в растениях, принадлежащих к классу липид-переносящих белков, и разработке на их основе превентивной иммунотерапии.

Диссертационная работа И.В. Богданова написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, методической части, описания научных результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, состоящим из 201 источников. Материал диссертации изложен на 128 страницах и иллюстрирован 2 таблицами и 30 рисунками. Рецензируемая работа представляет собой экспериментальное исследование, отличающееся актуальностью поставленной проблемы и четкой логикой экспериментальных подходов.

Во введении рассмотрена актуальность темы и сформулированы цели и задачи исследования. Литературный обзор фактически разбит на две части. В первой части литературного обзора рассмотрены структурно-функциональные особенности липид-переносящих белков (LTP), во второй их роль в возникновении аллергических заболеваний и перспективы применения. Особенно хотелось бы отметить, что в обзоре литературы использованы данные последних лет, что свидетельствует о том, что диссертант свободно ориентируется в новейшей литературе. Обзор литературы написан хорошим литературным языком, дает ясное представление о разнообразии LTP, их структуре и функциях в растениях. Вторая часть обзора, в два раза большая по объему, посвящена проблемам, связанным с развитием аллергических реакций и роли в данных

процессах LTP. Мне представляется, что второй раздел обзора можно было бы уменьшить. Например, не следовало в обзоре подробно останавливаться на механизмах возникновения аллергической реакции и также я не вижу большого смысла в объемном изложении современных методов лечения аллергии. Вместо этого, освободившееся пространство желательно было бы заполнить более подробным рассмотрением структурного разнообразия LTP и анализом биологических функций LTP с учетом их локализации в растении. С моей точки зрения диссертационная работа выиграла бы, если бы автор при написании заключительной части литературного обзора исходил бы из необходимости подвести читателя к целям работы, далее изложил бы их подробно, а не ограничился только перечислением целей во введении.

В главе «Материалы и методы» на первых 1,5 стр. перечисляются использованные в работе приборы, на последующих 4,5 – реактивы и расходные материалы. Обилие различных приборов и расходных материалов указывает, что диссертационная работа И.В.Богданова, во-первых методически очень разнообразна, и во-вторых, что она не могла бы быть выполнена без серьезного финансового обеспечения, что безусловно является заслугой УНЦ ИБХ РАН. Несмотря на отмеченное разнообразие использованных методов диссертанту удалось тем не менее кратко и понятно все их описать. Единственное несущественное замечание – ошибка при указании оптического пути кюветы при измерении КД: 0.01 см вместо 0.1 см.

Центральная часть диссертационной работы «Результаты и обсуждение». Объект исследования горох посевной *Pisum sativum*. Для достижения поставленных целей на самом начальном этапе работы был разработан метод выделения LTP из семян гороха, включающий в себя экстракцию, ультрафильтрацию и две последовательные хроматографии, катионную и ОФ-ВЭЖХ. Отличительная особенность во фракционировании белков заключалась в том, что поиск нужной фракции был произведен не путем измерения биологической активности, а путем поиска белка с искомой молекулярной массой. Далее, сходство установленной N-концевой аминокислотной последовательности с известными последовательностями растительных LTP, измеренное количество дисульфидных связей в изолированном белке и спектр его кругового дихроизма свидетельствовали в пользу того, что выделенный белок, названный Ps-LTP1, вероятно относится к липид-переносимым белкам.. В результате последующего секвенирования кДНК с использованием метода RACE-PCR была установлена полноразмерная структура Ps-LTP1, еще одного белка Ps-LTP2 и частичная структура Ps-LTP3. С использованием метода MALDI-TOF масс-спектропии триптических

фрагментов Ps-LTP1 было получено подтверждение соответствия транслированной последовательности аминокислотной последовательности выделенного белка.

Диссертантом был выполнен необходимый этап работы по наработке Ps-LTP1 в количестве, необходимом как для исследования биологической активности, так и для изучения аллергенных свойств Ps-LTP1. Хочу отметить при этом изобретательность И.В. Богданова, проявленную им при создании генетических конструкций для гетерологичной экспрессии Ps-LTP1 гороха, а также Lc-LTP1,3 чечевицы и Pru p 3 персика. С использованием метода КД для оценки вторичной структуры рекомбинантных белков удалось избежать получения ошибочных результатов при исследовании биологической активности из-за того, что один из белков Lc-LTP1 оказался неструктурирован. Используя набор различных методов, была доказана гомогенность образцов белков и идентичность рекомбинантных аналогов природным белкам. Эта часть работы выполнена безукоризненно и замечаний к ней у меня нет.

Безусловной заслугой диссертанта можно считать разработку способа получения Ps-LTP1, тотально меченого стабильными изотопами  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$ , что позволило совместно с лабораторией биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН установить пространственную структуру Ps-LTP1. Важным результатом для понимания биологических функций Ps-LTP1 является обнаруженная гетерогенность Ps-LTP1 в растворе, а найденные отличительные особенности структуры Ps-LTP1 указывают на его вероятную специфичность действия.

Следующий этап работы – изучение функциональности выделенного белка, как и все предыдущие, выполнен очень тщательно и всесторонне. Не возникает никаких сомнений, что Ps-LTP1 способен эффективно связывать разнообразные липидные молекулы и осуществлять транспорт липидов между мембранами. Очень интересным результатом на мой взгляд можно считать показанную в диссертации способность Ps-LTP1 разрушать некоторые виды искусственных липосом, поскольку такая способность видимо непосредственно может быть связана с антибактериальной активностью Ps-LTP1. Антибактериальная активность Ps-LTP1 исследована вместе с тремя другими белками аналогичного семейства Lc-LTP1,2,3, выделенными ранее из чечевицы в УНЦ ИБХ. Несмотря на структурное сходство этих 4-х белков проявилась специфичность их антигрибной активности, что вполне соответствует представлениям о том, что против каждого фитопатогена растение «направляет» свой определенный набор пептидов и белков.

Диссертантом успешно проведено иммунологическое исследование выделенных белков, в результате которой было показано, что Ps-LTP1 действительно является

перекрестным пищевым аллергеном, имеющим сходство с пищевыми аллергенами бобовых и персика, что закономерно привело во включение Ps-LTP1 в международную базу данных по аллергенам WHO/IUIS. Близкий результат был также получен И.В. Богдановым по перекрестной реактивности всех трех изоформ LTP чечевицы, что свидетельствует в пользу сходства эпитопов Ps-LTP1, Lc-LTP1-3 и Pru p 3. Полученные автором диссертации результаты вселяют надежду, что выделенные белки семейства LTP найдут практическое применение в медицине при создании гипоаллергенных форм клинически важных аллергенов.

А теперь несколько замечаний по поводу построения диссертации и обсуждения результатов. Излагаемые ниже замечания сделаны мною исключительно для того, чтобы показать, что можно еще было сделать, чтобы результаты работы выглядели более выигрышно.

1. В работе не хватает раздела «Заключение», в котором следовало бы более подробно чем в выводах подвести итоги своей исследовательской работы.

2. Автором показано, что в растении гороха синтезируется предшественник Ps-LTP1, несущий на своем N-конце сигнальный пептид. Этот факт нигде не обсуждается, а из него следует между прочим локализация Ps-LTP1 в апопласте, и все рассуждения о механизме действия этого белка должны исходить с учетом этого факта.

3. Когда идет разговор о сродстве белка к разным лигандам, то лучше оперировать константами диссоциации, для чего требуется измерять концентрационные зависимости связывания, а не проводить измерения взаимодействия белок-лиганд при фиксированных концентрациях того и другого, как это сделано в диссертации.

4. Диссертантом показано, что белок Ps-LTP1 экспрессируется в зародыше, тогда как Ps-LTP2,3 экспрессируются практически во всех исследованных им органах растения. На основании этих данных можно было бы сделать вывод о том, что ген Ps-LTP1 находится под управлением тканеспецифичного промотора, а гены Ps-LTP2,3 – под управлением конститутивных.

5. Основываясь на установленной способности Ps-LTP1 разрушать фосфолипидные мембраны, следовало обсудить возможное участие этого белка в защите от вирусов, имеющих оболочку (enveloped viruses). Эта оболочка представляет собой фосфолипидную мембрану, в которую погружены гликопротеины, определяющие в конечном счете проникновение вируса внутрь клетки. Типичный представитель таких вирусов – вирус гриппа. В растениях, например, это рабдовирусы. Привлекательно здесь то, что защита абсолютно понятна - разрушение мембраны вируса под действием LTP и, как следствие, блокирование проникновения вируса в растение.

Сделанные замечания не изменяют общей благоприятной оценки работы И.В. Богданова, которая выполнена на очень высоком профессиональном уровне. Автореферат диссертации И.В. Богданова соответствует требованиям ВАК РФ и полностью передает основное содержание диссертационной работы. Основные результаты работы И.В. Богданова адекватно отражены в опубликованных печатных работах.

По актуальности, по методическому решению поставленных задач, по объему выполненной работы, по научно новизне и практической значимости, достоверности и важности основных выводов диссертационная работа Богданова Ивана Владимировича отвечает самым высоким требованиям, предъявляемым кандидатским диссертациям и несомненно соответствует критериям, установленным «Положением 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), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия".

Официальный оппонент  
главный научный сотрудник  
лаборатории стрессоустойчивости растений  
ФГБНУ ВНИИСБ

доктор биологических наук,  
профессор

Бабаков Алексей Владимирович

Адрес: 127550, Москва, ул. Тимирязевская 42  
Телефон: 8(499)976-65-44  
E-mail: [avb@iab.ac.ru](mailto:avb@iab.ac.ru)



Подпись д.б.н. Бабакова А.В. удостоверяю  
Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ  
к.б.н. Федина Е.И.  
М.П.