

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию **Опарина Петра Борисовича « α -Гарпинины – защитные пептиды растений»**, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

В защитных механизмах растений и животных важное место занимают антимикробные, рибосом-инактивирующие, ингибирующие протеиназы, нейротоксические и другие пептиды. Особый интерес данные пептиды представляют в связи с их возможным использованием при решении задач медицины и сельского хозяйства. Помимо этого они являются и весьма перспективным объектом для изучения связей структуры и функций у белков. Накопленные в последнее время данные указывают на то, что при всем разнообразии строения и функций данные пептиды могут быть объединены в несколько основных структурных типов, причем некоторые из типов представлены как у растений, так и у животных. У растений среди защитных пептидов (ЗП) выявлено несколько семейств, отличающихся по пространственной структуре, а также организации и количеству дисульфидных связей. Объектом исследований диссертанта явилась весьма интересная группа пептидов растений, обладающих антимикробной или трипсин-ингибирующей активностью, содержащих 4 остатка цистеина, входящих в два мотива CXXXC и связывающих две антипараллельные спирали, которые он обозначил как α -гарпинины, а также похожие на них по структуре токсины беспозвоночных.

Целью исследования был структурный и функциональный анализ α -гарпининов – нового, по мнению автора, семейства ЗП растений, а задачами явились получение рекомбинантных аналогов пептидов исследуемой группы, изучение активности и сравнительный анализ структуры данных пептидов, а также получение путем мутагенеза новых молекул с заданной функцией. Актуальность темы и важность задач не вызывает сомнений.

Диссертация построена по общепринятой схеме. В обзоре литературы, написанном высокопрофессиональным языком, весьма детально охарактеризованы современные представления о молекулярных основах иммунитета растений, а также основные, наиболее изученные типы антимикробных защитных белков и ингибиторов ферментов, найденных у растений. Можно отметить достаточно полную представленность в обширном списке литературы (347 источников) большинства публикаций по проблемам, затрагиваемым в диссертации. При положительной, в целом, оценке литературного обзора не могу не отметить следующее. Автор не обсуждает в обзоре многочисленные работы, касающиеся антимикробных и трипсин-ингибирующих 4-Cys пептидов, и упоминает соответствующие источники лишь при обсуждении результатов. При подробном описании свойств циклического ингибитора трипсина у подсолнечника, одного из наиболее эффективных, по выражению диссертанта, природных ингибиторов растительного происхождения, приводится лишь ссылка на работу Korsinczky et al., 2001. Ингибитор SFTI-1, его пространственная структура (1SFI_I) и свойства были впервые описаны в совместных работах рецензента данной диссертации и двух групп британских исследователей (**Konarev et al.** in: *Genetics and Breeding for Crop Quality and Resistance*. Kluwer Ac.Publ, 1999; S.Luckett, R.S. Garcia, J.J.Barker, Al.V. **Konarev**, PR Shewry, AR Clarke, RL Brady., *J.Mol.Biol.*, 1999, 290; **Konarev et al.**, 2000, *Theor.Appl.Gen.*, 100). На вторую из указанных работ ссылаются Korsinczky et al, (2001) и многие другие авторы. Кроме того, на наш взгляд, список литературы выглядел бы более сбалансированным, если бы в нем были представлены хотя бы некоторые из отечественных публикаций, связанных с темой диссертации.

В заключении к обзору диссертант справедливо отмечает наличие совершенно различных функций у сходных по общей структуре молекул и, наоборот, сходство функций у

представителей разных групп белков. Ставится вопрос о дивергентном или конвергентном происхождении отдельных групп защитных белков животных и растений.

Методический раздел впечатляет набором использованных в работе и детально описанных современных методов хроматографии, масс-спектрометрии, секвенирования и синтеза пептидов, ПЦР, гетерологичной экспрессии белков в бактериях, а также анализа биологической активности пептидов.

Описание результатов диссертант начинает с проведения тонкой очистки ингибитора трипсина из семян гречихи, гомологичного пептидным ингибиторам, выявленным ранее в лаборатории проф. М.А. Белозерского. В итоге был получен и охарактеризован полипептид BWI-2c, содержащий в своем составе четыре остатка полуцистина, образующих две внутримолекулярные дисульфидные связи и формирующих мотив $CXXXCX_nCXXXC$, и была определена его пространственная структура методом ЯМР. Весьма важным и интересным оказалось выявленное диссертантом сходство BWI-2c по пространственной конфигурации с ингибитором трипсина из вероники VhTI и рибосом-инактивирующим пептидом из люффы.

На основании сопоставления полученных результатов со сведениями из литературы и баз данных диссертантом было сделано предположение о том, что все выявленные у различных растений гомологи ингибитора трипсина BWI-2c, имеющие тот же цистеиновый мотив, подобно VhTI и BWI-2c будут принимать в пространстве сходную структуру типа α -шпильки. По мнению автора, известные семейства АМП и ингибиторов протеаз не имеют представителей с подобной организацией, что указывает на возможную принадлежность BWI-2c и VhTI, а также АМП с двумя CX_3C мотивами к отдельному, еще не описанному семейству ЗП растений.

По этой части работы, составившей основание для первого вывода диссертации и пункта 2 формулировок Научной новизны, считаю необходимым высказать ряд соображений, поскольку, на наш взгляд, ситуация выглядит несколько сложнее. Идея о существовании группы или семейства защитных пептидов растений, включающих 4 остатка цистеина, с двумя мотивами $CXXXC$, что называется, витала в воздухе с конца прошлого века. Первые пептиды из данной группы, сходные по некоторым свойствам с тионинами, были выделены из зерна кукурузы еще в 1980 г Jones and Cooper. Один из этих пептидов, МВР-1, был более детально охарактеризован Duvick et al. 1992. Оказалось, что МВР-1 подавляет развитие фитопатогенных грибов и бактерий и сходен по антимикробной активности и обилию основных аминокислотных остатков с тионинами других однодольных. У МВР-1 были выявлены 2 упомянутые выше мотива $CXXXC$, α -спиральная структура (методом кругового дихроизма) и отмечено его некоторое сходство с мембрано-активными нейротоксинами - блокаторами ионных каналов из яда скорпионов и пчел (Kobayashi, Y. et al. *Biopolymers*, 1991.31).

В 1997 S.-S. Park с соавторами выделили из семян гречихи низкомолекулярный ингибитор трипсина BWI-2b с двумя мотивами $CXXXC$, в котором первый остаток цистеина был соединен с последним, второй с третьим, а последовательность оказалась гомологична белкам, транслируемым совместно с вицилином хлопка. В 1999 году K.Yamada с соавторами (1999) выделили сходный с BWI-2b ингибитор трипсина из тыквы, транслируемый совместно с вицилинами в составе белкового предшественника, и предложили объединить оба пептида с гарпиновой (hairpin), по их выражению, то есть «шпилечной» структурой, в новое семейство ингибиторов трипсина. Правда, по-видимому, в эту статью закрались ошибки, которые затруднили последующую интерпретацию ее результатов. Так, из двух обнаруженных ими 4-Cys пептидов, структура, предполагающая трипсин-ингибирующую активность (положение вероятного остатка P1, лизина, относительно остатка Cys2, сходное с таковым для аргинина у ингибиторов из гречихи и VhTI из вероники), была характерна для пептида C1, а не для C2, как указано в публикации. Также в 1999 J.Marcus с соавторами выделили ряд антимикробных белков из семян *Macadamia integrifolia* и установили сходство пептида MiAMP2c по первичной структуре с пептидом МВР-1, упомянутым выше ингибитором трипсина из гречихи и обоими вариантами 4-Cys пептидов из тыквы, а также рядом транслируемых совместно с вицилинами

пептидов из хлопка, какао, ячменя и некоторых бобовых, и, кроме того, обсудили ряд закономерностей процессинга исходных пептидов и организацию генов вицилинов. В последующей работе одного из этих исследователей MiAMP2 указывается в качестве примера фрагментов вицилина как одного из классов АМП (J.Manners, *Genome Biology* 2007, 8).

W.Bröesaert и др. в 2000 г. (In *Mechanisms of resistance to plant diseases*, Springer Netherlands, pp. 371-477) указали на сходство первичной последовательности МВР-1 с антимикробными и антивирусными белками tachyplesin-ом и polyphemusin-ом из членистоногих, которые, в отличие от МВР-1, не содержат α -структур. F.García Olmedo et al., (1998) при перечислении 8 семейств антимикробных белков растений, наряду с тионинами, дефензинами и кнотинами указывают и семейство МВР-1. Аналогичного деления придерживался и старший коллега и соавтор ряда работ диссертанта Цезий Алексеевич Егоров с соавт. в работе 2005 года (Egorov, et al., 2005, *Peptides*, 26, 2064-2073), относя ряд выявленных ими у пшеницы *Triticum kiharae* АМП с четырьмя цистеиновыми остатками к одному из перечисленных в статье 7 семейств антимикробных белков - семейству гомологов МВР-1 («МВР-1 homologs») или «4-Cys МВР-1 homologs» (Odintsova and Egorov. Wheat Antimicrobial Peptides. *Peptidomics: Methods and Applications*, 2007, 99-117). Позднее эти авторы включили пептиды пшеницы, МВР-1, ряд упомянутых выше и других антимикробных пептидов в новое, по их мнению, семейство «защитных пептидов иммунитета растений», 4-Cys пептидов («4-Cys peptides»), в тесной связи с которым они рассматривали и ингибитор трипсина VhPI из вероники (Егоров и Одинцова, Тез. V Росс. Симп. Белки и пептиды, 2011 г., с.61; Egorov and Odintsova. *Russ.J. of Bioorg.Chem.*, 2012, Vol. 38). Да и в работах самого диссертанта с соавторами говорилось о выделенных ими в последние годы из ряда растений соединениях, в т.ч. ингибиторах сериновых протеаз и АМП, относящихся «к семейству так называемых «четырёхцистеиновых» (4Cys) пептидов» со всеми упомянутыми выше характеристиками, включая α -спиральные шпильки (Опарин и др. Тез. V Росс. Симп. Белки и пептиды, 2011, с. 308).

Ингибитор трипсина из вероники с двумя мотивами CXXXC (Konarev et al., *Phytochemistry*, 2004, 65), первый ингибитор данного типа, охарактеризованный по пространственной структуре (Connors et al., 2007), в 2010 году был включен в базу данных MEROPS как представитель нового семейства ингибиторов протеиназ I73 (veronica family - семейство вероники), в которое затем был включен ингибитор трипсина из гречихи, структура которого была определена диссертантом, и ингибитор из гречихи, выделенный Park с соавторами в 1997. Это сделало данное семейство, по выражению диссертанта в одной из его публикаций, истинным ("true family"), что, конечно, вполне справедливо. На основании анализа литературы мы предложили обозначать подобные ингибиторы и АМП как VhPI-подобные пептиды (Konarev and Lovegrove. In *Affinity Chromatography*, InTech, 2012).

Таким образом, речь идет о группе защитных белков - антимикробных пептидов, пептидов, инактивирующих рибосомы, и ингибиторов трипсина с двумя мотивами CXXXC и двумя α -спиралями, соединенными дисульфидными мостиками, которые разные исследователи в тот или иной период называли «МВР-1-гомологами», «фрагментами вицилина», «4-Cys пептидами» и т.д. или, как диссертант, « α -гарпининами». Трудно возражать против использования термина « α -гарпинин», как и против других, жизнь покажет, какой больше приживется. Предыдущие версии терминов упоминались в публикациях различных авторов. Новый термин « α -гарпинин» также начали использовать другие исследователи. При этом в обзоре de Souza Cândido, et al., (2014, *Peptides*, 55) первым изученным представителем группы α -гарпининов указывается МВР-1. Добавлю, что антимикробный рекомбинантный пептид МВР-1 производится американскими фирмами bioWORLD и MyBioSource.

По нашему мнению, на самом деле заслуга диссертанта заключается в том, что он, сопоставив собственные данные с результатами других исследователей, несколько более четко сформулировал положение о единой группе ЗП растений (о существовании которой или о наличии отчетливых взаимосвязей между 4-Cys пептидами различного происхождения заявляли и раньше), подкрепил его данными анализа 3D структур нескольких пептидов и в 2012 году

(Biochem J. 2012, 446) предложил для этой группы вполне приемлемое название, отражающее структурные особенности ее представителей. Одним из преимуществ данного названия перед, например, 4-Cys пептидами, является то, что последнее, без упомянутого выше уточнения «MBP-1 гомолог», ранее использовалось рядом авторов и для обозначения пептидов Ib-AMP из *Impatiens balsamina*, имеющим отличный от MBP-1 4-Cys мотив (Tailor et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 272).

Несомненным достижением диссертанта является отработка методов получения пептидов гетерологичной экспрессией в бактериях, что позволило использовать контролируемый мутагенез. С помощью обратной трансляции *in silico* были получены нуклеотидные последовательности, кодирующие BWI-2с, Tk-AMP-X2 и Ec-AMP-1 и их фрагменты, которые позволили в дальнейшем получать синтетические гены, кодирующие соответствующие пептиды. Заслуживает одобрения удачный выбор экспрессионного вектора, обеспечивающего правильное замыкание дисульфидных связей пептидов, и получение с высоким выходом растворимой формы конечного продукта, в том числе и пригодной для анализа методом ЯМР. Последний позволил подтвердить наличие α -спиральных шпилек в изучаемых пептидах. Весьма интересными являются выявленные автором различия во взаиморасположении α -спиралей у ингибиторов трипсина и рибосом-инактивирующего пептида, с одной стороны, и АМП – с другой, а также в распределении гидрофильных и гидрофобных остатков.

При рассмотрении эволюции α -гарпининов диссертант высказывает предположение, что некие предковые растительные белки-предшественники приобрели α -гарпининовый домен, который затем мультиплицировался в некоторых растениях. При этом полагаю, не стоит рассматривать α -гарпинины совершенно обособленно относительно других АМП, например тионинов. Представители 4-Cys-пептидов с самого начала, с 1980 года, сопоставлялись с тионинами, с которыми они очень близки по ряду свойств. Имеющиеся данные позволили предположить в 2007 году Silverstein et al., что цистеин-богатые пептиды, включая тионины и MBP-1-подобные, могли эволюционировать за счет перестройки дисульфидных связей. В диссертации приводится пример из литературы одного из представителей обширной группы тионинов, который после лишения в ходе эксперимента N- и C- концов совпал по пространственной структуре с α -гарпининами и сохранил антимикробную активность. То есть минимальная функциональная структура тионина (Vila-Perello et al., 2005) во многом сходна с рассматриваемой в работе группой пептидов. Вполне возможно, что MBP-1- или VhTI-подобные пептиды или α -гарпинины эволюционно соответствуют одному из упрощенных вариантов тионинов или форме, исходной для тионинов или более широкой группы защитных цистеин-богатых белков. В связи с этим можно вполне согласиться с автором, что для установления взаимосвязей среди различных ЗП необходимы более тщательные исследования.

Автором диссертации выявлены: сходство биологической активности рекомбинантных пептидов с природными аналогами; роль аргинина R¹⁹ как остатка P₁, определяющего специфичность ингибирования (что соответствует заключению Т.А. Цыбиной с соавторами (2001, 2002) в отношении роли аргинина в реактивном центре нативного BWI-2с); сходство положения остатка аргинина P₁ с таковым у родственного VhTI, а также фунгистатическая активность рекомбинантных АМП. Анализ связывания с липосомами послужил для автора подтверждением мембранной направленности α -гарпининовых АМП.

Важным и интересным разделом работы является получение производных α -гарпининов и исследование их структуры и активности методами скаффолд-инженерии. Методами химического синтеза и гетерологичной экспрессии был получен ряд минимальных составляющих исходных и модифицированных пептидов, где определяющие активность структуры одного типа пептидов были перенесены в другие. В результате отдельные химерные пептиды, объединяющие фрагменты разных типов защитных белков растений или включающие участки последовательности нейротоксина скорпиона приобрели новые, но вполне ожидаемые функции. Диссертант совершенно обоснованно считает, что в рамках молекулы α -гарпининового

типа может реализовываться целый набор различных активностей, а замена одной функции на другую осуществима путем небольшого числа замен а.о., что открывает широкие возможности при создании новых биологически активных веществ для нужд медицины и сельского хозяйства.

Подводя итог всему сказанному, можно заключить: диссертантом проделана большая по объему экспериментов и интересная в научном плане работа и получен ряд новых, важных в практическом и теоретическом плане результатов. На наш взгляд, однако, остается и ряд дискуссионных моментов. Так, название работы « α -Гарпинины – защитные пептиды растений» представляется слишком глобальным для кандидатской диссертации и больше подходило бы для коллективной монографии или докторской диссертации, где полученные результаты и данные литературы могли бы быть рассмотрены более детально. То же справедливо и для первого вывода. Возможно, что в данном выводе было бы более оправданным объединение изучаемых диссертантом пептидов и наиболее близких их гомологов с группой защитных 4-Cys пептидов, исходные представления о которой были сформулированы ранее, с упоминанием экспериментально доказанного наличия в их структуре двух α -спиралей. Ни в коем случае не принижая заслуг диссертанта в экспериментальной части данной работы, можно отметить также некоторую чрезмерную категоричность в формулировке пункта 5 Научной новизны, так как о сходстве АМП растений с токсинами беспозвоночных упоминали и другие авторы. Остальные выводы полностью обоснованы и не вызывают возражений. Этим выводам, как и всей работе, на мой взгляд, в большей степени соответствовало бы название, отражающее изучение структуры и поиск связи структуры и функции у защитных пептидов (4-Cys-, MBP-1-подобных или α -гарпининов).

Работа написана хорошим литературным языком, а ее результаты опубликованы в солидных журналах. Текст содержит ряд ошибок, преимущественно технических. Несмотря на ряд спорных моментов, о которых говорилось выше, рассматривая работу в целом, можно еще раз отметить ее очень высокий методический уровень, а также достоверность, новизну и важность полученных диссертантом результатов для развития наших представлений о защитных пептидах у растений и животных.

Таким образом, данная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи выяснения структуры и структурно-функциональных взаимосвязей у ряда представителей группы защитных белков растений, названной в работе α -гарпининами, имеющей существенное значение для соответствующей отрасли знаний, а именно биоорганической химии, а также для медицины и сельского хозяйства.

Диссертационная работа Опарина Петра Борисовича соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия.

03.06.2014

Ведущий н.с. лаборатории
сельскохозяйственной энтомологии
Государственного научного учреждения
Всероссийский НИИ защиты растений
196608, Санкт-Петербург, Пушкин,
шоссе Подбельского, 3,
доктор биологических наук
(e-mail: al_konarev@hotmail.com,
раб.тел. (812) 4704384)




(подпись)

Конарев А.В.

Подпись руки гр. *Конарева А.В.*
УДОСТОВЕРЯЮ
Зав. канцелярией ВИЗР *А.В. Конарев*