

**"УТВЕРЖДАЮ"**

**Проректор федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего профессионального образования  
"Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова",  
профессор А.А. Федянин**



«9» июня 2014 г.

### **ОТЗЫВ**

**ведущей организации - Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения высшего  
профессионального образования "Московский  
государственный университет имени М.В. Ломоносова"  
о диссертационной работе ОПАРИНА ПЕТРА  
БОРИСОВИЧА « $\alpha$ -Гарпинины – защитные пептиды  
растений», представленной на соискание ученой степени  
кандидата химических наук по специальности 02.00.10 –  
биоорганическая химия**

Среди множества биологически активных веществ растительного происхождения особое место занимают соединения пептидной природы. Пептиды растений чрезвычайно разнообразны по структуре и спектру действия. Особенно интересны т.н. защитные пептиды, обладающие антимикробной активностью в отношении фитопатогенов различной природы, а также растительные ингибиторы протеаз и амилаз, мишенями которых являются внеклеточные ферменты патогенов или пищеварительные пептидазы травоядных насекомых-вредителей. В настоящее время известно порядка двух десятков семейств защитных пептидов растений, сгруппированных на основании наличия у их представителей общих признаков. Вместе с тем, большое количество пептидов, участвующих в системе защиты растений, не могут быть отнесены к уже известным

семействам. Это обусловлено, прежде всего, их многообразием, множественностью выполняемых функций, отсутствием или недостаточностью сведений об их структурной организации. В связи с этим диссертационная работа П.Б. Опарина, посвященная установлению существования нового семейства защитных пептидов растений -  $\alpha$ -гарпининов и их целенаправленному структурно-функциональному изучению, безусловно, актуальна.

Представленная работа имеет важное научное и практическое значение как с точки зрения изучения взаимосвязи между структурой и функциональной активностью исследованных пептидов, так и в связи с возможным использованием представителей нового семейства пептидов для получения трансгенных растений с повышенной устойчивостью к фитопатогенам, а также разработки новых пептидных агентов с заданными свойствами.

Диссертация Опарина П.Б. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части («Материалы и методы»), изложения результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 347 наименований.

Обзор литературы, непосредственно связанный с темой исследования, состоит из нескольких подразделов, в которых последовательно рассматриваются основные семейства антимикробных пептидов, пептидных ингибиторов  $\alpha$ -амилаз и протеаз. Проводится исчерпывающий анализ известных литературных данных, сопровождающийся наглядными иллюстрациями. В целом, представленный в обзоре материал служит необходимым введением в проблему, которая была поставлена и успешно решена в диссертации П.Б. Опарина.

Задачами экспериментальной работы П.Б. Опарина по исследованию нового семейства защитных пептидов растений являлись получение аналогов пептидов исследуемой группы с помощью методов генной инженерии, структурно-функциональное исследование полученных пептидных

производных, дизайн и получение новых химерных молекул пептидов с заданной функцией.

В экспериментальной части «Материалы и методы» содержится подробное и тщательное описание всех использованных в работе методических подходов.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из шести глав. Первая глава посвящена очистке и установлению первичной структуры ингибитора трипсина из семян гречихи. Было показано присутствие в составе молекулы ингибитора двух характерных цистеиновых мотивов, обнаруживаемых также в ряде других защитных пептидов растений.

Две последующие главы описывают стратегию получения искусственных аналогов ингибитора из гречихи и трех антимикробных пептидов, его гомологов, из различных растительных источников и результаты структурного анализа полученных пептидов. По итогам сравнения полученных структурных данных между собой и с известными из литературы, был сделан вывод о принадлежности данных пептидов к отдельному семейству защитных пептидов растений, названному автором  $\alpha$ -гарпинины. Далее рассматриваются особенности биологического синтеза  $\alpha$ -гарпининов и делается предположение о возможных путях эволюции данной группы.

Наиболее интересными с экспериментальной точки зрения являются последние две главы данного раздела. Автором было проведено исследование активности изучаемых пептидов в отношении целого ряда фитопатогенных грибов и протеолитических ферментов различной субстратной специфичности. На основании полученных данных были проведены дизайн и синтез нескольких производных  $\alpha$ -гарпининов с целью установления минимальной функциональной детерминанты и привнесения новой активности путем минимального мутагенеза. В результате было показано, что пептиды  $\alpha$ -гарпининового типа являются достаточно универсальными в функциональном плане, и могут быть использованы в так называемой скаффолд-инженерии для получения новых молекул с заданной

функцией. Все главы разделы сопровождаются обсуждением полученных результатов и их сравнением с литературой.

Резюмируя вышеизложенное, можно сделать заключение, что П.Б. Опарин успешно решил поставленные перед ним задачи по структурно-функциональным исследованиям нового семейства защитных пептидов растений -  $\alpha$ -гарпининов и при этом проявил себя как высококвалифицированный специалист, владеющий широким арсеналом современных методов исследования в области биоорганической химии, биохимии, молекулярной биологии.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений и подтверждена данными экспериментов, приведенными в диссертации, и сопоставлением их с имеющимися литературными сведениями.

Выводы, сформулированные в диссертации, обоснованы и аргументированы.

В рецензируемой работе имеются некоторые недостатки:

- Диссертантом показано, что химерные пептиды Ec-AMP-M и BWI-X1 обладают ингибиторной активностью по отношению к трипсину. Для количественной оценки взаимодействия этих пептидов с ферментом было бы целесообразно привести не только молярное соотношение фермент : субстрат, при котором наблюдается 50% потеря активности, но и измерить константы ингибирования трипсина исследованными ингибиторами. Это позволило бы дать более корректную оценку их ингибирующей активности и сравнить с действием известных подобных ингибиторов из растений - BWI-2c и VhTI (стр.73).
- К недочетам относится отсутствие списка сокращений. Расшифровка сокращений, которых в диссертации очень много, дается только один раз, при первом упоминании. Это сильно затрудняет восприятие изложенного материала, особенно в ситуации, когда использованное сокращение используется редко и содержится в различных разделах работы (например, ИПТГ на стр.39 и 59, DOPC DOPE/DOPG на стр. 39 и 71).

Отмеченные недостатки, безусловно, не затрагивают существа основных выводов диссертации и носят частный характер.

В целом, диссертация П.Б. Опарина представляет актуальное завершённое научное исследование, в результате которого получены новые данные, имеющие как существенное теоретическое, так и важное практическое значение.

Основные результаты работы опубликованы в международных высокорейтинговых рецензируемых журналах и доложены на российских и международных конференциях.

Автореферат полно и правильно отражает основное содержание диссертации.

Полученные автором результаты могут быть использованы в лабораториях, осуществляющих дизайн, получение и структурно-функциональные исследования биологически активных веществ, в том числе защитных пептидов растений: в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки - Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институте белка РАН, Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Всероссийском институте защиты растений, на химическом факультете и в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова".

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. В работе решены задачи, имеющие существенное значение для биоорганической химии и биохимии.

Диссертационная работа Опарина П.Б. « $\alpha$ -Гарпинины – защитные пептиды растений», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия, заслушана, и отзыв утвержден на заседании кафедры химии

природных соединений химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", протокол № 7 от 3 июня 2014 года.

**Зав. кафедрой химии природных соединений  
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова,  
доктор химических наук, профессор  
чл.-корр. РАН**

**Донцова О.А.**

**Секретарь заседания кафедры,  
кандидат химических наук, доцент**

**Баландина Г.Н.**

**Зам. декана химического факультета  
МГУ имени М.В. Ломоносова,  
доктор химических наук, профессор**



**Бучаченко А.А.**