

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Буйновской Нины Сергеевны «Гибридные бифункциональные лиганд-связывающие белки на основе высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (СтАР)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия

В настоящей работе представлены результаты получения и анализа гибридных белков, состоящих из двух доменов. Такого рода белки в настоящее время исследуются в мировой науке как перспективные средства для диагностики и лечения различных заболеваний человека. Их преимущества заключаются в том, что повышается специфичность будущих рекомбинантных лекарств. Н.С. Буйновская использовала для конструирования первого домена ген высокоактивной щелочной фосфатазы (ЩФ) морской бактерии *Cobetia amphilecti*, а для второго домена, то есть соответствующего лиганда, ген лектина морской мидии *Crenomytilus grayanus* (CGL), либо порина бактериального патогена *Yersinia pseudotuberculosis* (OmpF). В этой работе привлекает то, что использовались гены морских организмов, которые кодируют белки, зачастую обладающие уникальными свойствами, не встречающимися у наземных организмов. Представленные в диссертации материалы свидетельствуют об актуальности, научной новизне, а также теоретической и практической значимости исследования для биотехнологии и биомедицины.

Диссертация Н.С. Буйновской имеет стандартную структуру и состоит из введения, обзора данных литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 149 страницах, включает 30 рисунков, 9 таблиц. Список литературы включает 203 источника. Материалы, изложенные в диссертации, адекватно отражены в публикациях.

Обзор данных литературы является интересным, позволяющим оценить состояние проблемы исследования. Хорошо описана история разработки и свойства щелочной фосфатазы, лектинов мидии и поринов иерсинии, свойства кодирующих этих белки генов. Для фосфатаз подчеркнута роль посттрансляционных модификаций, а также отмечен важный факт, что эти белки могут работать при низких температурах. Подробно описана их роль в диагностике и терапии заболеваний. Такие же хорошие разделы по лектинам морских беспозвоночных и поринам иерсинии; все данные иллюстрированы моделированием трехмерной структуры белков. Язык автора сочный и интересный. Автор также уделяет внимание разработке средств против вирусов, в том числе с использованием наноструктур. В связи с обзором данных литературы необходимо отметить следующее обстоятельство. Следовало бы кратко описать достижения

российских ученых в области конструирования гибридных белков, в частности группы академика С.М. Деева. Эта группа работает на мировом уровне, имеет интересные методические находки и разрабатывает наноструктурированные средства доставки. Сотрудничество с коллективом Деева могло бы быть полезным в дальнейшем.

Методологический подход автора адекватен для выполнения поставленной задачи. Широко использовались биохимические и молекулярно-биологические методы исследования, а также компьютерное моделирование белковых структур. Этот раздел – Материалы и методы – сомнений в достоверности полученных данных не вызывает. Автор владеет большим набором методик. Три описанных метода получения рекомбинантных белков важны для последующего биотехнологического получения продукта. Однако я не увидел автоматизации методов выделения с помощью каких-либо автоматических хроматографических систем. Успеху работы во многом способствовало то обстоятельство, что она выполнена в лаборатории, имеющей большой опыт работы в этой области.

Результаты и обсуждение.

Первые разделы диссертации посвящены созданию экспрессирующих векторов. Н.С. Буйновской удалось успешно получить и экспрессировать довольно большой вектор pET40CmAP/OmpF размером 8767 пар оснований с вставкой рекомбинантной ДНК размером 2577 п.о. Так же успешно была клонирована плазида pET40CmAP/CGL. Идентифицированы наиболее продуктивные продуценты гибридных рекомбинантных белков. В результате проведенной оптимизации схемы очистки рекомбинантных белков получены высокие выходы продукта без потери активности фосфатазы на единицу массы белка.

Мне представляется важным, что автор впервые обнаружил активность щелочной фосфатазы CmAP в отношении ЛПС бактерий для нейтрализации эффектов бактериальных эндотоксинов; это направление надо развивать, тем более в свете справедливого утверждения о понижении эффективности антибиотиков. То же самое касается в отношении аденокарциномы молочной железы (глава 5.4.). В поисках возможных механизмов противоопухолевого действия Н.С. Буйновская сделала несколько интересных предположений. Тем не менее, поиск надо расширить, зная например, что человеческая ALP1 (alkaline phosphatase, intestinal) физически взаимодействует с большим кругом возможных мишеней, включая белки RAB (семейство RAS онкогенов), PTOV1 (prostate tumor overexpressed 1), рецептором G белков и некоторыми шаперонами (<https://thebiogrid.org/106749>).

В отношении гибридного белка *SmAP/OmpF* автором установлено, что он способен образовывать комплексы с антителами присутствующими в сыворотке крови больных псевдотуберкулезом, то есть может использоваться в качестве диагностического антигена. В этом случае также работал второй домен - щелочная фосфатаза - в качестве маркера для иммуноферментной реакции, что несомненно можно отнести к успехам автора (так как позволяет создать диагностический тест на псевдотуберкулез).

В отношении лектина работу я считаю успешной. В этом случае автором проведен скрининг наиболее продуктивных штаммов бактерий, а далее решались проблемы с низкой специфичностью гибридного белка *SmAP/CGL*. Для этого *in silico* проведен молекулярный докинг с последующим сайт-направленным мутагенезом. Для лектина CGL были определены варианты нескольких аминокислотных замен для связывания со специфическими лигандами, разрушающие углевод-связывающие сайты. Методом сайт-направленного мутагенеза подтверждена структура активного центра тримерного галактозосвязывающего лектина CGL. Установлено, что лектинную активность гомотримера CGL обеспечивают одновременно три углевод-связывающих сайта НPY/KGG, имеющих разный уровень активности. Степень афинности лектина CGL к лигандам муцинового типа зависела от состава трисахарида, образующего специфический эпитоп. Отдавая дань уважения автору в процессе этой масштабной работы, и несомненному вкладу в фундаментальные проблемы структурно-функциональных свойств лектинов, всё же хочется заметить, что возможно надо было вернуться назад (глава 5.6.) и провести более подробную оптимизацию взаимодействия. Возможно с большим количеством субстратов, а не только с эпитопом со структурой Gal α 1-4Gal β 1-4Glc.

В итоге необходимо отметить, что работа Н.С. Буйновской занимает важное место в этой конкурентной и «горячей» области исследований. В работе обоснована и показана перспективность создания бифункциональных рекомбинантных белков, в том числе с использованием генов представителей дальневосточной биоты.

Замечания.

Слово «оптимальный» всё-таки предполагает использование методов математического планирования эксперимента, например, в координатах температура-время в случае изучения эффективности дефосфорилирования. Лучше использовать словосочетание «наиболее эффективный способ».

Некоторые замечания, а скорее предложения были сделаны в соответствующих разделах отзыва.

Материалы диссертационной работы апробированы на отечественных и международных научных конференциях и опубликованы в 7 научных статьях, в журналах, включенных в «перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук», рекомендованных ВАК и индексируемых в отечественных и международных базах данных.

Положения, выносимые на защиту, обоснованы полученными результатами. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность выводов.

Заключение: Диссертационная работа Буйновской Нины Сергеевны «Гибридные бифункциональные лиганд-связывающие белки на основе высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (СтАР)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой представлено решение научной задачи, соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 11.09.2021 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Буйновская Н.С. заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 – биохимия.

Главный научный сотрудник
лаборатории биоинженерии
ФГБУ Федеральный научный центр
биоразнообразия наземной биоты
Восточной Азии
Дальневосточного отделения
Российской академии наук,
д.б.н. (специальность 03.00.26 - биотехнология),
член-корреспондент РАН
27 ноября 2023 г.



В.П. Булгаков

690022, Владивосток, Проспект Столетия Владивостоку, 159,
тел. (423)2375279, bulgakov@biosoil.ru. Федеральное государственное бюджетное
учреждение Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной
Азии ДВО РАН.