

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Мизгиной Татьяны Олеговны «Структурные и функциональные характеристики лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Актуальность исследования, на мой взгляд, связана с тем, что морские моллюски используют лектины как антибактериальное орудие, лектины есть у всех моллюсков (что подчеркивает важность и действенность этого орудия), моллюски из-за особенности их жизнедеятельности сталкиваются с огромным разнообразием патогенных микроорганизмов, и, наконец, структура этих лектинов, как правило, в значительной степени оригинальна, что открывает возможности их медицинского применения, что особенно востребовано на фоне возрастающей антибиотико-резистентности.

Цель диссертационной работы была сформулирована как «выделение и исследование новых лектинов (GYL, GYLman, GYL-R) из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*», и включала следующие четыре задачи:

1. Разработать схемы эффективного выделения новых лектинов из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis*, определить их основные физико-химические свойства и тонкую углеводную специфичность.
2. Изучить структурные характеристики лектинов.
3. Исследовать биологические свойства лектинов в качестве паттерн-распознающих рецепторов.
4. Выяснить роль лектинов в системе врожденного иммунитета двустворчатого моллюска *G. yessoensis*.

Сразу скажем, что поставленная цель, включая все названные задачи, диссертантом была полностью выполнена. Отметим следующие находки, точки дальнейшего роста и хорошо обоснованные выявленные автором факты.

- Найдено, что лектин GYL из гемолимфы *G. yessoensis* термоллабилен и Ca^{2+} -зависим. Про его структурные особенности выяснено, что это одиночный углевод-связывающий домен, содержащий консервативные мотивы, характерные для некоторых лектинов С-типа. Про его специфичность выявлено следующее: связывается с гликанами муцинового типа, проявляет довольно широкую углеводную специфичность, которую можно охарактеризовать как лактозаминный кор с дополнительным заместителем, таким как галактозамин, фукоза или сульфат.
- Найдены данные, предполагающие существование у этого моллюска не только упомянутого выше белка GYL, но мультигенного семейства GYL-подобных лектинов.
- Другой лектин, GYLman, выделенный из того же источника, в отличие от первого - термостабильный, и так же, как первый Ca^{2+} -зависимый, проявил принципиально иную специфичность – связывался с маннанами.
- Третий лектин, GYL-R, выделенный из того же источника, по термостабильности похож на второй, но в отличие от первых двух оказался Ca^{2+} -независимым. Его

специфичность отличается от первых двух, а именно, он связывается с L-рамнозой и α -галактозидами.

Обзор литературы (список цитированных статей включает 192 наименования) «поликлонален», то есть, затрагивает несколько разных тем (поэтому не имеет общего названия), и построен таким образом, чтобы максимально облегчить читателю Результаты данной работы понимание сделанного; эту задачу обзор литературы успешно решил.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы и Список литературы. Список литературы включает 192 источника. Диссертация изложена на 145 страницах и содержит 33 рисунка и 11 таблиц.

Содержание Автореферата хорошо передает содержание самой диссертации. Выводы в целом соответствуют полученным результатам, за исключением того, что связывание исследованных лектинов с молекулярными паттернами – это предположение, а не доказанный факт.

К диссертационной работе есть ряд замечаний, перечисленных ниже.

1. Диссертация и автореферат написаны хорошим научным языком практически без опечаток, но тем не менее, некоторые огрехи этого рода удалось обнаружить, в частности:
 - ни в списке сокращений, ни в тексте не сказано, к какому ряду относятся моносахариды, в частности, по-видимому, фукоза была L-Fuc, галактоза была D-Gal, и т.д.;
 - фраза во Введении *«Кроме того, свойства, описанные для одних и тех же или разных лектинов в различных биологических системах, могут привести к иным интерпретациям существующих данных и способствовать разработке новых идей в этой области»* поразила мое воображение глобальной степенью обобщения;
 - вместо *«со всеми исследуемыми»* должно бы быть исследованными;
 - несколько странно звучит «спектрам связывания лектинов».
2. Широко использован модный термин «молекулярные паттерны», который определен как *«углеводных структур, находящихся на клеточной поверхности микроорганизмов»*. На самом деле, МП – это устойчивые комбинации ковалентно несвязанных молекул. В диссертации этим термином называют индивидуальные молекулы, такие как ЛПС или пептидогликаны, что в принципе неверно. К сожалению, это несоответствие вошло даже в Выводы.
3. Во Введении есть такая фраза: *«лектины обладают огромным потенциалом для применения в современной биотехнологии и медицине, что делает данную работу, несомненно, актуальной»*. Хотелось бы также, в разговоре об актуальности, видеть слова о тех конкретных лектинах или конкретной группе лектинов, которые изучал диссертант (например, лектинах морских организмов), а не об этом обширном классе молекул в мировом масштабе.

4. В разделе Научная новизна написано «*Основные физико-химические свойства, структурные характеристики и функции выделенных лектинов были исследованы с использованием оригинальных методик*». Здесь непонятен смысл слова «оригинальных» - имеется в виду «полностью нативных» или «разработанных диссертантом»?
5. «*Уникальная углеводная специфичность этих лектинов делает их особенно ценными для использования как в структурном углеводном анализе полисахаридов*» - с этим утверждением нельзя согласиться, так как, во-первых, эта задача обычно решается другими методами, а во-вторых, специфичность изученных лектинов широкая, что автор в своей работе и написал.
6. «*На поверхности клеток лектины выполняют роль белковых рецепторов для чужеродных антигенов*» (страница 21 и аналогично попадает в других местах) – понятие «антиген» должно использоваться только в контексте пары к антителу или В-клетке, а не к любой чужеродной молекуле.
7. На странице 34 (и не только) «*совпадает с ориентацией гидроксильной инвертированной формы D-галактозы в положениях C4, C3 и C2*» - что имел в виду автор, можно догадаться, но формулировка неправильная.
8. Раздел 2.3.10 говорит о том, что лектин с аффинной колонки смывали при pH=2.9. А далее (см. Рис. 14) есть результаты, согласно которым его устойчивость стремится к нулю при этом значении pH. Как это объяснить? Определялась ли степень денатурации лектина в результате такой процедуры (например, с помощью повторной аффинной хроматографии уже очищенного белка)?
9. Раздел 2.5.1. «*Конъюгат инкубировали 2 ч при комнатной температуре и добавляли 0,05 мл раствора NaBH₄*». В составе лектина есть дисульфидные связи; проверялось ли их разрушение в этих восстанавливающих условиях?
10. В работе использовались конъюгаты лектинов с пероксидазой хрена, которая как известно, гликозилирована. Я не нашел в диссертации данных, где на это делается поправка (например, использование соответствующих жестких контролей) в экспериментах, в которых изучается взаимодействие лектин-пероксидазных конъюгатов с углеводными объектами.
11. Раздел 2.5.5., про гликоэпэпэ: «*609 образцов N- и O-связанных природных и синтетических гликанов*». Непонятно, что имеется в виду под «N- и O-связанных».
12. Раздел 2.7.5. «*По 0,1 мл клеточных суспензий наносили на 96-луночный планшет*». Это методика, но в ней не сказано, какие клетки и не даны ссылки на раздел Результаты.
13. Для выделения GYL-R, то есть рамноза-специфического белка, использовался аффинный сорбент с лактозой в качестве лиганда. Почему не вполне доступная рамноза?
14. Необходимо было объяснить причину сильного взаимодействия муцин-специфического GYL с маннозой и маннаном, ведь в типичных муциновых гликанах маннозы нет.
15. Аналогично: почему GYLman прекрасно связывается с PSM?

16. Раздел 3.4.2. «Та же высокая аффинность связывания наблюдается при наличии у соседних сахаров объёмных заместителей, таких как Вп (бензил), NAc (N-ацетил)»
Почему не рассматривается более очевидное объяснение – что усиление происходит благодаря контакту близко расположенных гидрофобных заместителей (ацетил, бензил, метил фукозы) с гидрофобным участком гликан-связывающего участка лектина? Объёмные заместители скорее убивают взаимодействие, чем способствуют ему.
17. Тот же раздел. «Принимая во внимание все указанные особенности, можно реконструировать гликопептид для GYL как «Gal β 1-4GlcNAc β », который обязательно содержит дополнительный контактирующий с лектином фрагмент», - неубедительно, так как величины RFU в гликоэссе низкие, и это говорит о том, что «хорошего» гликана в этом эссе нет, то есть, истинный природный гликан (или молекулярный паттерн в моем (Н.Б.) понимании) – лиганд этого лектина еще не найден.
18. Почти половина раздела 3.5.5 – это литературные сведения общего характера, которые смотрятся (на мой вкус) как «вставная челюсть» в главе Результаты. Аналогично – концовка раздела 3.7.1.
19. «Предсказание сайтов гликозилирования GYL, по данным аминокислотной последовательности, проводили с использованием сервера NetNGlyc-1.0, который предсказывает сайты N-гликозилирования в белках, используя искусственные нейронные сети». Это как-то неловко читать в отлично сделанной и написанной работе. Мне хватило 15 секунд, чтобы прийти к тому же выводу «глазомерически».
20. «Таким образом, на субъединицу GYL приходится два сайта гликозилирования». Здесь правильнее говорить о потенциальном сайте гликозилирования.
21. Рисунок 26 сильно бы выиграл (и дал бы пищу для размышлений о функциональности лектина), если на нем обозначить сайт узнавания гликана и потенциальный сайт гликозилирования.
22. Раздел 3.7.1. «была изучена их способность связываться с основными видами ПАМП (ЛПС *E. coli* O111:B4)». А как хорошо было бы привести структуру полисахарида и связать ее со специфичностью лектина!
23. Раздел 3.7.2. «GYL-R высокоспецифично связывался с грамотрицательной бактерией *E. coli* (рисунок 29)». Что Автор считает «высокоспецифичным»? какие критерии высоты? И там же про те же объекты Автор пишет про «широкий спектр» взаимодействия. А это взаимоисключающие понятия.
24. В разделе 3.7.3 очень просится сравнение найденных как эффективные концентраций биологической активности лектинов с их природной концентрацией в гемолимфе моллюска.

Многочисленность приведенных замечаний обусловлена скорее повышенной вездливостью оппонента, чем признаком неаккуратности написания диссертации. Большинство замечаний относится к оформлению, неточности формулировок, разной (у диссертанта и оппонента) интерпретации научных терминов, и т. п. Они не сказываются на качестве проведенного исследования и сделанных на его основе выводах.

Считаю, что диссертационная работа Мизгиной Татьяны Олеговны «Структурные и функциональные характеристики лектинов гемолимфы двусторчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*» полностью соответствует квалификационным критериям, установленным постановлением Правительства Российской Федерации № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 355. В диссертации Мизгиной Т.О. решены задачи характеристики лектинов из гемолимфы моллюска, как с точки зрения структуры белка, так и углевод-связывающей специфичности. Автор диссертации, Мизгина Татьяна Олеговна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия.

Заведующий лабораторией Углеводов
Федерального государственного
бюджетного учреждения «Институт
биоорганической химии РАН им. академиков
М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» доктор
химических наук (специальность
02.00.10 – биорганическая химия)

Николай Владимирович Бовин

Почтовый адрес: 117997, г. Москва,
ул. Миклухо-Маклая, дом 16/10
ФГБУ Институт биоорганической химии РАН
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

тел. 8(916) 474-9382
e-mail: professorbovin@yandex.ru

Подпись зав. лаб. д.х.н. Н.В. Бовина заверяю.
Заместитель директора
ИБХ РАН
по научной работе



член.-корр. РАН, д.х.н. РАН
И.В. Смирнов

02.05.2023