



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**  
*им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*  
Российской академии наук  
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика  
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru), [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)  
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

04.12.2023 № 4.10-48-1216

на № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФГБУН ИБХ РАН  
академик РАН



А.Г. Габибов

«24» ноября 2023 года

### ОТЗЫВ

Ведущей организации Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ИБХ РАН) на диссертационную работу соискателя диссертации Буйновской Нины Сергеевны на тему «Гибридные бифункциональные лиганд-связывающие белки на основе высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (СmAP)», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

#### Актуальность исследования

Диссертационная работа Буйновской Н.С. посвящена изучению способов получения гибридных и мутантных белков с новыми или улучшенными функциями для использования в биомедицинских технологиях. В работе изучается конструирование новых гибридных белков генноинженерными методами. Такие белки включают в себя несколько структурно независимых доменов, сохраняющих свою индивидуальную биологическую функцию, так что результирующая молекула становится мультифункциональной. Гибридные



мультифункциональные белки можно использовать для диагностики, профилактики и терапии онкологических и инфекционных заболеваний.

Щелочные фосфатазы (ЩФ) широко распространены среди морских бактерий, где они извлекают фосфаты из фосфорсодержащих соединений и могут аккумулировать их внутри себя в виде полифосфатов с последующим высвобождением из клеток в окружающую среду. То есть несут накопительную функцию по производству неорганических минералов из остатков органики. Для биохимических анализов возможность целенаправленно удалять фосфат с белков или нуклеиновых кислот имеет важное значение. Автор использовала свойство изучаемой ЩФ количественно расщеплять п-нитрофенилфосфат с образованием цветного продукта п-нитрофенила для изучения активности рекомбинантного аналога и гибридных молекул. Так что всегда могла знать удельную активность фермента в любых растворах.

Автор помимо основной активности изучаемого фермента обнаружила дефосфорилирующую активность ЩФ CmAP в отношении бактериальных липополисахаридов (ЛПС), что может далее стать основой для разработки методов борьбы с эндотоксинами, которые являются большой проблемой в индустрии биотехнологического производства белков в прокариотах.

В работе было показано, что активность фермента не пропадает при его экспрессии в составе гибридного белка с лектином морской мидии *S. grayanus* (CGL) и с неспецифическим порообразующим белком наружной мембраны возбудителя псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* (OmpF). Также автор показала, что, как лектин, так и порообразующий белок, тоже сохраняют способность узнавать / быть признанным стандартными белками партнерами при слитной экспрессии с доменом ЩФ. Такие бифункциональные агенты позиционируются автором для применения в медицинской диагностике, и в 2017 году был получен патент РФ на продукт гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF, что подтверждает намерения коллектива изобретателей в продвижении идеи, изложенной в диссертации Буйновской Н.С.

### **Структура, содержание, научная новизна**

Диссертация Буйновской Н.С. изложена на 149 страницах и написана по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, и списка процитированной литературы. Диссертация проиллюстрирована 40 иллюстративными материалами из них 9 таблицы. В обзоре литературы представлены многочисленные данные относительно ЩФ, лектинов и поринов, описаны их структуры и основные биологические функции. Описана применимость ЩФ для конверсии пролекарств в активные формы и способы борьбы с ее помощью с проблемой антибиотикоустойчивости внутрибольничных возбудителей сепсиса. Но три эти фрагмента обзора не



связаны между собой единой мыслью или любой другой связующей идеей. В разделе «Материалы и методы» дано краткое описание использованных методов и исследований. Экспериментальная часть, выполненная с помощью стандартных проверенных методов с использованием правильной методологии работы. Что в итоге подтверждает хороший уровень рассматриваемой диссертационной работы.

Новизна исследования заключается в том, что были разработаны новые генноинженерные конструкции двухдоменных слитных белков, которые далее были получены биотехнологическим способом в прокариотах. Сама ЩФ также была получена в прокариотах по оптимизированному автором протоколу. Активности всех молекул были измерены в экспериментах ТЛФА и ИФА, а также измерены в единицах удельной активности ЩФ. Для лектина автор идентифицировала важные аминокислоты, расположенные в сайтах узнавания углеводов. Новаторская идея о использовании ЩФ для снижения пирогенности образцов была предложена на основании того, что ЩФ SmAP способна практически полностью дефосфорилировать ЛПС, если он имеет полную структуру (S-форма) и растворен в щелочном буфере pH не менее 10,0.

Работа Буйновской Н.С. представляет большой интерес для исследователей в области биотехнологии, биохимии, аналитической химии и фармакологии. Используемые в работе молекулы могут быть использованы для фундаментальных исследований ферментов и ингибиторов ферментов, клинических анализах образцов крови реальных пациентов. Все задачи, поставленные в начале работы, выполнены. Выводы обоснованы и достоверно подкреплены данными экспериментов. Основные результаты работы получены автором самостоятельно.

### **Замечания**

По диссертационной работе Буйновской Н.С. имеются следующие замечания. Самым существенным замечанием является отсутствие в работе эксперимента (или указание ранее полученных данных) по определению предела обнаружения антигенов в проводимых тестах ИФА и ТЛФА, которые позволили бы более точно охарактеризовать применимость методики для диагностики и показали бы ограничения этих методик. Можно найти некоторые опечатки и необычные фразы. Так, например, автор утверждает, что «Одним из актуальных направлений белковой инженерии является генетическая модификация белков *in silico* и *in vitro*...». Цель не самая известная особенно в случае *in vitro* экспериментов. Встречается «свойств полученных гибридов белков» вместо гибридных белков. Необычно упоминание «позволяют выявить эссенциальные аминокислотные остатки». «Получение некоторых холодоактивных ЩФ..., было оптимизировано с использованием рекомбинантных ДНК-технологий» написано слишком запутанно. Термин «негибридного рекомбинантного белка SmAP» следовало бы изменить на



просто рекомбинантный аналог CmAP.

В результатах Рисунок 10С не содержит последовательности линкера между слитным белком ЩФ и белками интереса. Поэтому нельзя понять из рисунка кто идет первым из двух фрагментов и есть ли между доменами сайты ограниченного протеолиза. Так как все другие нетранслируемые области до и после целевого белка расписаны подробно, то и эти важные последовательности следует показывать на рисунке.

Таблица 3 для измерения активности ЩФ использовали лизат клеток *E. coli* написано не стандартно, для контроля активности ЩФ более понятно

Результаты пункт 5.2 Оптимизация получения. Когда получали ЩФ ранее не написано с какой продуктивности клеток продуцентов имели дело, если это те же клетки что и в этой работе, но использован улучшенный протокол выделения конечного очищенного белка, то следовало бы так про это и написать. Описано три схемы, а есть среди них старая «неоптимальная», не указано.

Графики на 27 и 29 рисунках построены для относительной активности. В подписи не указана концентрации компонентов неизменных (зафиксированных концентраций субстрата) в каждой лунке и не прописаны основные условия реакции.

## **Заключение**

Материалы, представленные в диссертации Буйновской Н.С., не оставляют сомнения в целесообразности исследования, предпринятого соискателем. Рецензируемую работу можно квалифицировать как законченное исследование. Некоторые имеющиеся неточности не затрагивают ключевые выводы работы, которые вполне обоснованы и адекватны полученным результатам. Автореферат в достаточной степени отражает содержание диссертации.

Важно отметить, что методология, использовавшаяся в диссертации Буйновской Н.С., и полученные результаты могут быть использованы в фундаментальных медицинских исследованиях, в частности, разработке тест систем. Среди учреждений соответствующего профиля следует отметить Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Российский технологический университет и др. Материалы диссертации могут представлять самостоятельную ценность для использования в учебном процессе в вузах биологического и медицинского профиля.

Изложенное выше в целом даёт основание считать, что по своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости рецензируемая диссертационная работа Буйновской Нины Сергеевны на тему «Гибридные бифункциональные лиганд-связывающие белки на основе высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (CmAP)»

полностью соответствует всем требованиям («Положение о порядке присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в действующей редакции от 11 сентября 2021 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Буйновская Нина Сергеевна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – «Биохимия».

Отзыв обсужден и одобрен на совместном семинаре лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов и отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН, протокол № 46 от 24 ноября 2023 г.

Секретарь заседания: Королькова Ю.В.

Отзыв подготовил

Козлов Сергей Александрович,

доктор химических наук,

Зав. лаб.нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН

24 ноября 2023

Подпись д.х.н. Козлова С.А. заверяю

Уч. Серг.



В. А. Олейников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) 117997, город Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10

Контактный телефон +74953350100; Электронный адрес (E-mail) [office@ibch.ru](mailto:office@ibch.ru); Официальный сайт [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)