

Директору Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
органической химии им. Н. Д. Зелинского
Российской академии наук, председателю
Диссертационного совета 24.1.092.01
Действительному члену РАН
Егорову Михаилу Петровичу

Я, Бовин Николай Владимирович, д.х.н., Заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов, главный научный сотрудник лаборатории углеводов ГНЦ ФГБУН Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, согласен быть официальным оппонентом диссертационной работы Науменко Олеси Игоревны на тему **«Установление строения и характеристика генных кластеров биосинтеза О-специфических полисахаридов нового вида энтеробактерий *Escherichia albertii*, близкородственного *Escherichia coli*»**, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия в диссертационный совет 24.1.092.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук».

Профессор, Заведующий отделом химической
биологии гликанов и липидов


д.х.н. Н.В. Бовин

Подпись Н.В. Бовина заверяю:
ученый секретарь ГНЦ ФГБУН
Института биоорганической химии имени
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН




д.ф.-м.н. В.А. Олейников

24.04.2023

Сведения об официальных оппонентах

1. ФИО оппонента: Бовин Николай Владимирович

2. Ученая степень и наименование отрасли науки, по которым им защищена диссертация: д.х.н., 1.5.6 – биотехнология

3. Список публикаций оппонента:

1. Pazynina G.V., Tsygankova S.V., Sablina M.A., Chizhov A.O., Bovin N.V. Synthesis of Sug1-4GalNAc α disaccharides and their interaction with human blood antibodies // *Mendeleev Communications*, 2023, 33(1), pp. 107–108
2. Sharif M., Hickl V., Juarez G., Bovin N., Miller D.J. Hyperactivation is sufficient to release porcine sperm from immobilized oviduct glycans // *Scientific Reports*, 2022, 12(1), 6446
3. Shilova N., Bovin N., Maltseva D., Hushpulian D., Tonevitsky A. Specificity of viscumin revised. As probed with a printed glycan array // *Biochimie*, 2022, 202, pp. 94–102
4. Slivka E.V., Tuzikov A.B., Khaidukov S.V., Bovin N.V., Rapoport E.M. Influence of the Lipid Moiety Structure on the Insertion/Release of Glycolipids in/from the Cell: A Study with Synthetic Analogs // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2022, 48(5), pp. 932–936
5. Nikiforova, A.V., Golovchenko, V.V., Mikshina, P.V., Bovin, N.V., Shilova, N.V. Plant Polysaccharide Array for Studying Carbohydrate-Binding Proteins // *Biochemistry (Moscow)*, 2022, 87(9), pp. 890–902
6. Tsygankova S.V., Pazynina G.V., Paramonov A.S., Chizhov A.O., Bovin N.V. Synthesis of Disaccharide Xyl β 1-2Man β , the Core Fragment of Plant N-Glycoproteins // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2022, 48(3), pp. 513–518
7. Olivera-Ardid S., Bello-Gil D., Tuzikov A., Bovin N., Mañez R. Poly-L-Lysine-Based α Gal-Glycoconjugates for Treating Anti- α Gal IgE-Mediated Diseases // *Frontiers in Immunology*, 2022, 13, 873019
8. Ziganshina M.M., Shilova N.V., Khasbiullina N.R., Bovin N.V., Sukhikh G.T. Repertoire of glycan-binding placenta-associated antibodies in healthy pregnancy and in preeclampsia // *Scandinavian Journal of Immunology*, 2022, 95(6), e13157
9. Орлова А.В., Лаптинская Т.В., Бовин Н.В., Кононов Л.О. Различия в реакционной способности п-ацетил- и п,п-диацетилсиалилхлоридов, вызванные их разной

супрамолекулярной организацией в растворе // Известия Академии наук. Серия химическая. 2017. № 11. С. 2173-2179.

10. Шилова Н.В., Зиганшина М.М., Хасбиуллина Н.Р., Нокель А.Ю., Липатников А.Д., Новаковский М.Е., Полякова С.М., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Изучение иммунного ответа к гликанам и пептидам s-белка у больных, перенесших covid-19 // Акушерство и гинекология. 2021. № S3-1. С. 32.

4. Полное наименование организации, являющейся основным местом работы на момент написания отзыва: Государственный Научный Центр Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

5. Занимаемая должность: Профессор, Доктор наук, Заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов, главный научный сотрудник лаборатории углеводов ГНЦ ФГБУН Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Профессор, Заведующий отделом химической биологии гликанов и липидов



д.х.н. Н.В. Бовин

Подпись Н.В. Бовина заверяю:
ученый секретарь ГНЦ ФГБУН
Института биоорганической химии имени
М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН



д.ф.-м.н. В.А. Олейников

24.04.2023

ОТЗЫВ

на диссертационную работу **Науменко Олеси Игоревны** «Установление строения и характеристика генных кластеров биосинтеза O-специфических полисахаридов нового вида энтеробактерий *Escherichia albertii*, близкородственного *Escherichia coli*», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия.

Представленная диссертационная работа относится к области исследования бактериальных полисахаридов – их структуры и генетики биосинтеза. Фундаментальная ее ценность заключается, в первую очередь, в продвижении к пониманию связи структуры полисахаридов инфекционных бактерий с одной стороны, и их антигенных и патогенных свойств – с другой. Это определяет и практическую ценность исследования: для обоснованной классификации серотипирования бактериальных штаммов (что особенно важно с учетом огромного разнообразия и наблюдаемой в реальном времени изменчивости бактерий), а также для разработки вакцин других терапевтических средств. Конкретный объект данного исследования *Escherichia albertii* относится к энтеробактериям, близкородственным кишечной палочке, является возбудителем в том числе эпидемических кишечных инфекций у людей. Штаммы этой бактерии часто ошибочно идентифицируют как *E. coli* и другие бактерии, что затрудняет не только диагностику заболевания, но ее лечение и эпидемиологические исследования.

Для установления строения полисахаридов (оказавшихся сложными, в основном с пентасакхаридным повторяющимся звеном, а иногда нерегулярными) использовали в первую очередь спектроскопию ЯМР в различных ее вариантах. В ряде случаев, когда этого оказывалось недостаточно для уверенности найденной структуры, дополнительно применялись методы химической деградации полисахарида с последующим разделением олигосахаридов, установлением их структуры, и, наконец, «конструированием» из найденных структур самого полисахарида. Применялись также менее жесткие химические модификации, такие как O-дезацетилирование и дефосфорилирование, не разрушающие полисахаридную цепь, но облегчающие интерпретацию ЯМР-спектров. С установлением структуры полисахаридов из *E. albertii* O1, O2, O3 (даже несмотря на гетерогенность последнего), O6, O7, O8 особых проблем не возникло, в то время как расшифровка структуры полисахаридов из *E. albertii* O4, *E. albertii* O5 и *E. albertii* O9 потребовала включения всей мощи современной ЯМР-спектроскопии в сочетании с химическим расщеплением, хроматографией и масс-спектрометрией. Автору пришлось преодолевать проблему нерегулярности полисахаридов; в частности, в случае *Escherichia albertii* O2

обнаружено нестехиометрическое O-ацетилирование, а также наличие двух типов остатков фукозы с соотношением интенсивностей сигналов H-6 ~1,5:1, на основании чего был сделан обоснованный вывод о том, что остаток один из типов остатков фукозы присутствует как боковая цепь не во всех повторяющихся основных фрагментах структуры полисахарида; природу нерегулярности подтверждали с помощью дегградации по Смитту.

Необходимо отметить методические находки данной диссертационной работы, которые, несомненно, будут полезны другим исследователям, занимающимся установлением структуры сложных гетерополисахаридов, особенно по применению сольволиза полисахаридов в среде трифторуксусной и трифторметансульфокислоты.

В результате, в общей сложности было установлено строение полисахаридов из всех девяти известных O-серогрупп *Escherichia albertii*; подтверждена обоснованность отнесения изученных штаммов к отдельным O-серогруппам, что было совсем непросто из-за сходства некоторых из полисахаридов *Escherichia albertii* с полисахаридами *Escherichia coli* (это объясняет неправильные отнесения некоторых штаммов *Escherichia albertii* к *Hafnia alvei*, или *Escherichia coli*, что имело место до данного исследования).

Вторая часть диссертации посвящена выявлению функции генов биосинтеза полисахаридов, структура которых определена в первой части; функцию искали путем сравнения генов в секвенированных генных кластерах с последовательностями в доступных базах данных, в том числе с генами с известными функциями, что, по-видимому, облегчало интерпретацию. В результате, были найдены состав и организация генных кластеров для всех девяти изученных полисахаридов *Escherichia albertii*.

До выполнения настоящего исследования, когда структура полисахаридов *E. albertii* оставалась неизученной, не было нужной для медицины надежной классификации этих бактерий. В результате проведения структурных исследований и на основе биоинформатических изысканий, такая классификация, основанная на согласованном сочетании химических и генетических данных, была разработана. Более того, сравнением с последовательностями из базы данных GenBank с учетом полученных данных о строении полисахаридов, в генных кластерах полисахаридов *E. albertii* обнаружены все гены, участвующие в биосинтезе полисахаридов этих бактерий, в том числе гены, кодирующие ферменты путей биосинтеза специфических компонентов полисахаридов, и гены гликозилтрансфераз сборки конечной полисахаридной цепи. На основании гомологии с представленными в упомянутой базе данных функционально охарактеризованными ферментами, гликозилтрансферазы были отнесены к соответствующим гликозидным связям.

Обзор литературы «Химические методы избирательного расщепления гликозидных связей в структурном анализе бактериальных полисахаридов» является исчерпывающим в отношении покрытия известных химических методов специфического и неспецифического расщепления полисахаридов. В Обзоре не только констатируется наличие того ли иного метода, а обсуждаются сферы его применимости, ограничения и особенности по сравнению с другими, похожими подходами; в заключительной его части даны обобщающие выводы. Обзор после некоторой доработки (см. ниже «Замечания») рекомендуется к опубликованию, так как обзоров на эту тему не встречалось уже давно. Отметим также, что химическое расщепление полисахаридов использовалось диссертантом в экспериментальной работе, то есть, выбор темы обзора был весьма рациональным.

К представленной диссертации есть **замечания**.

1. Автор скупно расставляет запятые (в результате, есть типичные «казнить нельзя помиловать»), в нескольких местах что-то неладно с падежами, и т.п.. Есть курьезные опечатки, например написание слова «периодат», некоторые из обнаруженных неудачных выражений приведены ниже: «и другими биологическими объектами системами», «для терапии вызываемых инфекционных заболеваний», антигенность называется функцией (это из обзора литературы), «тогда как неспецифические методы не вызывают разрушения сахаров», «Присутствие ... как мягкий способ», «в сочетании химических методов анализа компонентного анализа».
2. На стр. 67 (раздел Результаты) написано следующее: «Индийские ученые осуществили химический синтез 2-аминоэтилгликозида пентасахарида, соответствующего повторяющемуся звену ОПС *E. albertii* O2, являющегося потенциальным компонентом конъюгатной вакцины [89]». Возникает вопрос: чем они руководствовались в выборе структуры для синтеза, ведь структура полисахарида установлена автором.
3. Некоторые части Обзора написаны излишне подробно (например, приводить известный школьникам механизм периодатного окисления излишне), а в других отсутствует необходимый комментарий диссертанта (например, не объяснено, почему в щелочных условиях происходит расщепление полисахаридов со структурным фрагментом 3-амещенных 2,5-ангидрогексоз, или почему гидролиз и ацетолиз приводят к разнонаправленным результатам). На Рис. 2.9 и 3.24 применяется какое-то странное изображение углеводов, некий издевательский вариант формул Фишера; кроме этого, в Обзоре попеременно используются формулы Хеуорса и формулы в виде кресел, что нельзя отнести к достоинствам оформления. Нет единства времен: одно предложение пишется в настоящем времени, а соседнее в прошедшем. Обзор литературы имеет подраздел Выводы, в котором

обозрѐнный материал логичным образом обобщен. Казалось бы, чего еще желать? Но для заинтересованного читателя значительно интереснее и полезнее было бы подать эти выводы наизнанку, то есть, написать «гид», позволяющий тем, кто только входит в данную область, исходя из данных ЯМР по структуре полисахарида, выбрать подходящий его задаче метод расщепления.

4. Как известно, при проведении гидролиза полисахаридов, в результате химической деградации выход «информирующего» олигосахарида бывает низким, что снижает уверенность вывода, когда структура олигосахарида приписывается структуре исходного полисахарида. Поэтому, при обсуждении результатов нужно приводить выходы, чего не сделано. Выходы вынимаются из Экспериментальной части диссертации, они высокие - и это отменяет поставленный выше вопрос, но тем не менее некоторое неудобство для читателя есть.
5. Генетическая часть работы выполнена совместно с генетиками Китайского центра контроля и предотвращения болезней (Пекин, КНР) и Нанькайского университета (Тянь-дзинь, КНР), в основном, усилиями партнера, о чем сказано не в главе 3.2, а только в Заключение. Ее описание в диссертации, в отличие от замечательно описанной структурной части, оставляет желать лучшего. Жанр этих глав похож скорее на обзор литературы, чем на раздел Результаты; о методологии исследования сказано вскользь; нет аргументов, убеждающих читателя в том, что идентифицированный ген кодирует гликозил-трансферазу (или, что отнесение данного гена к переносчику данного моносахарида высоковероятно).
6. На стр. 106 читаем: «На основании молекулярного типирования китайские партнеры выявили девять типов *E. albertii* [1].» Ссылка 1 на самом деле – книга Y. A. Knirel // *Bacterial lipopolysaccharides: Structure, chemical synthesis, biogenesis and interaction with host cells*, где нет китайских авторов.

Замечания, которые приведены выше, нельзя квалифицировать как недостатки проделанной и осмысленной работы, их следует отнести к шероховатостям, которые привередливый оппонент всегда обнаружит в любой диссертации; иными словами – несколько не умаляют положительную оценку этой замечательной работы.

Цель настоящей работы была сформулирована как «создание химической основы для классификаций бактерий *E. albertii* на основе ОПС и изучение генетического контроля их биосинтеза», эта цель безусловно была выполнена.

Так как среди эшерихий встречаются вирулентные для человека штаммы, вызывающие гастроэнтериты, воспаления мочеполовой системы, геморрагические колиты, гемолитический уремический синдром, и даже менингит у новорожденных,

практическая ценность выполненного исследования очевидна – его результаты востребованы инфекционной диагностикой.

Проделанная работа не просто хорошо, а замечательно **опубликована**: в двух обзорных и девяти экспериментальных статьях.

Выводы диссертации сформулированы лаконично и точно, полностью отражая суть проделанной работы.

В диссертации имеется раздел «**Заключение**», очень удачно вписавшийся в ее ткань, являющийся фактически концентрированным обсуждением всех результатов в их совокупности.

Считаю, что диссертационная работа Науменко Олеси Игоревны «Установление строения и характеристика генных кластеров биосинтеза O-специфических полисахаридов нового вида энтеробактерий *Escherichia albertii*, близкородственного *Escherichia coli*» 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 Науменко О. И. решены задачи создания молекулярной основы для классификации штаммов нового вида энтеробактерий *Escherichia albertii*, а также оптимизации метода установления строения сложных гетерополисахаридов. Автор диссертации, Науменко Олеся Игоревна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая 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 – биоорганическая 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.
Ученый секретарь ИБХ РАН



д.ф.н. В.А.Олейников

24.04.2023