

Кусайкина М. И. Отзыв официального оппонента  
о диссертации Кусайкина Михаила Игоревича

**«Ферменты, катализирующие трансформацию полисахаридов бурых водорослей»**, представленной на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Представленная к защите работа Кусайкина М.И. посвящена изучению особенностей каталитического действия  $1\rightarrow 3; 1\rightarrow 6$ - $\beta$ -D-глюканаз и фукоиданаз из морских организмов, установлению их структуры, получению рекомбинантных ферментов и их использованию для деполимеризации полисахаридов.

Несмотря на широкую известность полисахаридов, вопрос о взаимосвязи их биологической активности и химической структуры до сих пор остается открытым. Отчасти это связано со сложностью установления структур гетерополисахаридов. Даже применение ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии не всегда позволяет с достаточной точностью установить структуру сложных полисахаридов. Применение химических методов для упрощения структуры часто приводит к деградации полисахарида и исчезновению информации о структуре. Например, при десульфатировании разрушается около 90% фукоидана, в результате чего становится возможным установление структуры только 10% вещества.

Специфические ферменты являются важными инструментами в структурных исследованиях полисахаридов. Ферментативная трансформация различных веществ представляет большой интерес, поскольку параметры ферментативной реакции можно легко контролировать, выход целевых продуктов, как правило, высок, а их структура постоянна, что не достигается при проведении реакций, протекающих в отсутствие ферментов. Кроме того, ферментативная трансформация полисахаридов открывает перспективы получения новых стандартных препаратов с более высокой биологической активностью. Несомненность актуальности такого исследования определяет то, что для понимания многих вопросов актуальными являются систематические исследования распространения в морских организмах ферментов, принимающих участие в деградации полисахаридов; разработка методов выделения индивидуальных ферментов; изучение их свойств, специфичности, механизма действия, и возможности их применения в

структурных исследованиях углеводов и для получения новых биологически активных веществ.

Автор достаточно эффективно провёл целый комплекс исследований, который решает фундаментальные задачи энзимологии глюканаз и фукоиданаз и гликобиологии. Результаты могут иметь и очевидное практическое применение.

Диссертационная работа построена по классическому принципу, содержит следующие разделы: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертация изложена на 185 страницах и содержит 73 рисунка и 55 таблиц, список литературы включает 265 источников.

Во «Введении» к диссертационной работе автором обоснована актуальность работы и кратко сформулированы ее задачи.

Литературный обзор в целом дает достаточно полную картину состояния данного направления научных исследований. В обзоре литературы подробно рассмотрены все известные к настоящему времени глюканазы морских беспозвоночных и фукоиданазы, их свойства, структура, классификация, а также структуры их субстратов – ламинараны и фукоиданы. Большая часть ссылок относится к работам последнего десятилетия.

Глава «Материалы и методы» содержит изложение использованных известных и разработанных и модифицированных автором методов. Глава «Результаты и обсуждение» состоит из нескольких частей. В первой части приводятся результаты исследования нескольких глюканаз, выделенных их морских беспозвоночных. Было проведено детальное изучение пяти ламинариаз из различных видов морских беспозвоночных, обитающих в Южно-Китайском и Японском морях. Все изученные глюканазы оказались ферментами эндо-типа действия, которые катализировали не только реакцию гидролиза, но и трансгликозилирования. Анализ аминокислотных последовательностей 1→3-β-D-глюканаз показал, что два остатка цистеина являются консервативными для всех 1→3-β-D-глюканаз моллюсков. Вероятно, эти остатки образуют дисульфидную связь, играющую важную роль в стабилизации молекул. Необходимо отметить, что на сегодняшний день исследовано всего около 30 1→3-β-D-глюканаз животного происхождения, из них, 5 изучены автором диссертации. Во второй части

главы автор описывает исследование нескольких фукоиданаз, полученных из морских беспозвоночных и морской бактерии. Некоторые из генов фукоиданаз были клонированы и осуществлена их экспрессия. Систематическое исследование фукоиданаз в мире фактически только начинается. Разработанный автором новый экспресс-метод обнаружения фукоиданаз позволяет осуществлять широкомасштабный поиск этих редких ферментов, катализирующих расщепление фукоиданов различной структуры.

Для получения фрагментов фукоидана применялись разные подходы – от использования высокоочищенных препаратов ферментов до гомогенных и рекомбинантных фукоиданаз. В результате были получены как высокомолекулярные фрагменты с регулярной структурой, так и сульфатированные фукоолигосахариды. Фукоиданазы FFA1 и FFA2 являются второй и третьей рекомбинантными фукоиданазами в мире и первыми, субстратная специфичность которых была установлена достаточно подробно. Впервые для установления специфичности фукоиданаз был использован широкий набор фукоиданов различной структуры и синтетических олигосахаридов. Исследование тонкой специфичности полученных фукоиданаз показало, что положение сульфатных групп сильно влияет на активность ферментов. Атака ферментом осуществляется ближе к восстанавливающему концу молекулы субстрата.

Исследование особенностей расщепления фукоиданов ферментами исследовалось с помощью методов ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии, что позволило не только точно установить специфичность ферментов, но и структуру полученных олигосахаридов.

Полученные фукоиданазы заметно отличались своей специфичностью: так фукоиданазы из *L. sitkana* катализировали расщепление  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 3-О-гликозидных связей, а фукоиданазы из *Lambis* sp. и *F. algae* катализировали расщепление  $\alpha$ -1 $\rightarrow$ 4-О-гликозидных связей. Ни одна из исследованных фукоиданаз не расщепляла фукоиданы полностью до низших олигосахаридов.

Работы по изучению механизмов трансформации фукоиданов находятся в самом начале пути. Исследование редких ферментов – фукоиданаз – открывает перспективы их использования не только как инструментов для изучения структуры фукоиданов, но и для получения

фрагментов фукоидана, которые возможно, могут быть использованы в качестве основы новых лекарственных средств.

Работу Кусайкина М. И. можно рассматривать как важный этап в развитии теоретических и экспериментальных основ структурно-функционального анализа олиго и полисахаридов различной структуры и степени полимеризации, и роли ферментов, расщепляющих эти субстраты.

К недостаткам работы следует отнести погрешности в оформлении работы. Так, некоторые методики описаны очень кратко. Например, практически отсутствует описание методов: “Определения восстанавливающих сахаров”, “Определения общих сахаров” и “Определение содержания сульфатных групп”. В этих методиках автор ограничился ссылками на первоисточники без их описания. В методике “Определение рН оптимумов ферментов” нет данных о том, какие буферы были использованы для создания растворов с различными значениями рН. В методике “Определение влияния ионов двухвалентных металлов ....” нет данных о том, какие ионы металлов были использованы. На стр. 87 приведена изоэлектрическая точка белка (6,32), но в “Экспериментальной части” нет описания метода ее определения. На рис. 4.56В приведены данные по анализу продуктов гидролиза фукоидана с помощью ТСХ, но в “Экспериментальной части” нет описания типа использованных пластин и условий проведения ТСХ. Большая часть рисунков грешат чрезмерной краткостью описания без указания в каждом отдельном случае использованных для гель-фильтрации сорбентов, использованных типов электрофореза, методов определения количества продуктов гидролиза при анализе относительной активности ферментов при определении оптимумов рН, оптимальных значений температуры, и т.д. На некоторых рисунках отсутствуют численные данные размерности оси ординат: 4.23, 4.29. Спектры над рис. 4.50 - 4.54 чрезвычайно мелкие. Все данные по множественному выравниванию последовательностей было бы правильней привести в цветном варианте. Все это затрудняет чтение и анализ работы.

Тем не менее, эти замечания не умаляют достоинств диссертационной работы

Работа Кусайкина М. И. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованным автором работам по данному вопросу. Данные работы Кусайкина М. И. имеют большое значение, для теоретического понимания структурно-функциональных

особенностей полисахаридов и расщепляющих их ферментов из водорослей и других морских организмов, так и для практических целей.

Работа Кусайкина М. И. является завершенным трудом, открывающим новые возможности в развитии теории и методологии исследований структуры и функции олиго- и полисахаридов, ферментов, катализирующих трансформацию полисахаридов бурых водорослей, а также возможности их применения в медицине.

Результаты работы Кусайкина М. И. могут быть использованы в очень большом числе институтов биохимического, молекулярно-биологического, биологического и медицинского профиля, как в России, так и за рубежом, поскольку имеют большое значение для развития передовых технологий в исследования олиго и полисахаридов самого разного происхождения и ферментов их трансформации, что важно как в теоретическом, так и в практическом планах.

По актуальности темы, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости диссертационная работа Кусайкина М. И. соответствует требованиям, изложенным в п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности «Биохимия» – 03.01.04.

Профессор, доктор химических наук  
Зав. лаборатории ферментов репарации  
ИХБФМ СО РАН Г. А. Невинский  
12.09.2017



- Невинский Георгий Александрович
- Новосибирск 630090, проспект Лаврентьева, 8  
Тел. +7-383-363-5126, ;nevinsky@niboch.nsc.ru
- Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН; Доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией.