

“УТВЕРЖДАЮ”



И.о. директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
Член-корр. РАН А.О. Терентьев

“30_” ноября 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу Зуевой Анастасии Олеговны «Изучение фукоиданаз морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T и противоопухолевой активности продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия

Диссертационная работа Зуевой Анастасии Олеговны посвящена биоинформационному анализу фукоиданаз морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T, получению четырех рекомбинантных фукоиданаз, изучению их свойств, а также исследованию противоопухолевого и канцеропреventивного действия водорослевых фукоиданов в сравнении с продуктами их ферментативного гидролиза.

Ниже рассматриваются соответствующие характеристики работы Зуевой А.О.

Актуальность темы исследования: сульфатированные полисахариды морских организмов – фукоиданы – активно изучаются в настоящее время, поскольку являются биологически активными полимерами, в частности проявляют противоопухолевое действие. Установление структуры фукоиданов сопряжено со значительными трудностями, так как большинство из них имеют

сложное строение. Перспективными инструментами исследования в данном случае могут стать фукоиданазы – ферменты, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах фукоиданов. Изучение строения получаемых в результате ферментолита низкомолекулярных производных фукоидана помогает получить информацию о структуре нативного полимера, а кроме того, зачастую эти производные (олигосахариды) обладают более высокой биологической активностью. Таким образом, поиск новых фукоиданаз и изучение их свойств являются актуальными как для совершенствования и разработки новых методов исследования структур фукоиданов, так и для получения новых биологически активных молекул.

Научная новизна и практическая значимость работы: все положения, выносимые на защиту, являются новыми. Впервые получены четыре рекомбинантных фукоиданазы из морской бактерии *Wenyingshuangia fucanilytica* CZ1127^T, представлены данные об их биохимических свойствах, субстратной специфичности и типе действия. Исследованные ферменты были классифицированы как эндо- α -1 \rightarrow 4-L-фукоиданазы. На примере двух фукоиданов – из *Fucus evanescens* и *Alaria angusta* была продемонстрирована возможность использования фукоиданаз для структурного анализа полисахаридов. С помощью выделенных ферментов были получены производные фукоидана, противоопухолевый эффект которых значительно превосходит активность нативного полимера. Показано, что некоторые из полученных производных проявляют высокую избирательность действия по отношению к определенным типам опухолевых клеток.

Достоверность и обоснованность результатов исследования и выводов: в работе использован широкий спектр всех необходимых методов и подходов, как современных, так и классических. Для оценки достоверности полученных результатов использовался метод математической статистики ANOVA. Все выводы надежно обоснованы полученными данными. По результатам исследования опубликованы 3 статьи в высокорейтинговых рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации: диссертационная работа изложена логично, литературным языком с единичными опечатками, в классическом стиле на 172 страницах, включает 49 рисунков, 7 таблиц и 5 приложений и содержит следующие разделы:

Введение (6 страниц), в котором обоснована актуальность выбранной темы, сформулированы цели и задачи, а также обозначены научная новизна и практическая значимость исследования, основные положения, выносимые на защиту, личный вклад автора и апробация работы.

Обзор литературы (42 страницы) посвящён подробному описанию фукоиданаз. В нём описаны вопросы номенклатуры и современной классификации этих ферментов, их биохимические характеристики, а также известные в настоящее время продуценты. Кроме того, рассмотрены известные субстраты фукоиданаз – фукоиданы, их структуры, биологическая активность, перспективы практического использования. Автором проведен скрупулезный анализ литературных данных по ферментативной активности известных фукоиданаз, типу действия и специфичности, а также противоопухолевой и канцеропреентивной активности продуктов ферментативной деполимеризации фукоиданов.

Результаты и их обсуждение (64 страницы) описывают данные, полученные в ходе диссертационного исследования и содержат несколько разделов. В основе успешного выполнения поставленных задач стоял грамотный и адекватный подход к результатам и данным проведенной идентификации и биоинформатического анализа генов, кодирующих фукоиданазы морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. С помощью современных компьютерных программ и подходов, а также методов молекулярной биологии, множественного выравнивания обнаруженных автором аминокислотных последовательностей было установлено наличие четырёх новых, не описанных ранее, фукоиданаз GH107 семейства, FWf1–FWf4, обладающих сложной доменной организацией. Анализ различий в их аминокислотных последовательностях и пространственной структуре

позволил сконструировать и затем получить методами молекулярной биологии генетические конструкции, провести с помощью выбранного штамма оптимизацию экспрессии, выделение и очистку четырех рекомбинантных фукоиданаз.

Автором были выявлены оптимальные условия проявления каталитической активности рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4. Установлено, что по типу действия на фукоидан из *F. evanescens*, они относятся к ферментам эндо-типа, катализирующим гидролиз гликозидных связей внутри углеводной цепи полисахаридов, проведено обширное электрофоретическое исследование субстратной специфичности фукоиданаз на фукоиданах различных видов бурых водорослей, которые различаются моносахаридным составом, структурой основной цепи, расположением сульфатных групп. Было показано, что совместное действие всех четырех ферментов на фукоидан приводит к более глубокой степени деполимеризации, чем действие каждого фермента в отдельности, что свидетельствует о наличии в геноме бактерии-продуцента нескольких генов, кодирующих разные по структуре и специфичности фукоиданазы. С помощью фукоиданаз FWf1–4 был также проведен ферментативный гидролиз 4-О-десульфатированных фукоиданов и предположено, что в основе специфичности ферментов лежат различия в локализации и степени сульфатирования фукоиданов.

Строение полученных высоко- и низкомолекулярных продуктов (ВМП и НМП) ферментативного гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, а также сульфатированных фукоолигосахаридов было частично установлено с помощью масс-спектрометрии, но, главным образом, методами ЯМР-спектроскопии. Автором определена сложная структура гомогенных олигосахаридов, содержащих как сульфатированные, так и несulfатированные остатки фукозы. Обобщая полученные данные о структуре продуктов, автор делает выводы о специфичности полученных им рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4 и их функциональной активности, то есть осуществляет структурно-функциональный анализ.

Изучение субстратной специфичности фукоиданаз FWf1–4 было проведено с помощью различных по структуре фукоиданов. Оно позволило автору также оценить специфичность исследуемых фукоиданаз по отношению к типу гликозидной связи (1→3 и 1→4) и определенному расположению заместителей при углеводных остатках. С помощью большого набора полученных автором сульфатированных фукоолигосахаридов различного строения и степени полимеризации, обладающих также различной локализацией сульфатных групп, автор впервые успешно исследовала (с помощью ПААГ-электрофореза) активность новых фукоиданаз FWf1–4 и, соответственно, специфичность их действия на те или иные фукоиданы, провела обширное сравнительное исследование структурной организации углеводсвязывающих подсайтов активного центра фукоиданаз (топологии, количества функционально значимых подсайтов), ответственных за связывание с различными фукоолигосахаридами. Ею также было обнаружено наличие структурных мотивов фукоидана, устойчивых к расщеплению FWf1–4 и, таким образом, впервые установлено, что фукоиданазы обладают комплексной специфичностью, направленной на идентификацию ими структуры субстратов, определяемой количеством и селективностью углеводсвязывающих подсайтов в активных центрах фукоиданаз.

Автором было проведено исследование противоопухолевой и канцеропреventивной активностей продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов из бурых водорослей. Это логично связано с другими частями данного раздела диссертации.

Экспериментальная часть (16 страниц) выполнена в соответствии с современными стандартами, содержит подробное описание использованных в ходе исследования материалов, реактивов и методов, необходимых для достижения поставленных целей и выполнения задач. Описание методов представляется достаточным для независимого воспроизведения.

Выводы (1 страница) лаконично сформулированы, полностью соответствуют полученным результатам исследования.

Заключение (2 страницы) обобщает главные результаты, полученные в ходе исследования, освещает перспективы их применения и помогает правильно расставить акценты в объемном массиве полученных автором экспериментальных данных.

Список литературы (24 страницы) включает 225 источников.

Апробация работы: Материалы работы были представлены на 10 международных и российских конференциях.

Вопросы и замечания, возникшие при прочтении диссертации:

1. Автор использует в качестве субстратов фукоиданы из разных видов бурых водорослей, причем структурные данные для этих полисахаридов следуют только из литературных источников. Поскольку состав и свойства фукоиданов существенно зависят от качества сырья, хотелось бы видеть данные структурного анализа, подтверждающие строение именно тех веществ, которые использовались в работе.

2. Использование в нескольких местах диссертации термина «фукоидан» в единственном числе, когда речь идет обо всей гетерогенной группе полисахаридов, представляется некорректным.

3. Непонятно, почему метод Нельсона-Сомоджи, используемый для определения количества восстанавливающих сахаров, оказался неприменим в случае исследуемых фукоиданаз.

4. Присутствие в составе продуктов ферментолиза остатков L-фукозы, связанных β -гликозидными связями, представляется сомнительным и требует дополнительного подтверждения.

5. Следовало бы указать на страницах диссертации происхождение используемого в работе фермента, эндо-4-О-сульфатазы SWF5, чтобы читателю не приходилось искать эту информацию в литературе.

6. На странице 82 упомянуты используемые в качестве стандартов 2-О-сульфо-фукоолигосахариды, которые в «Экспериментальной части» обозначены как олигосахариды, имеющие сульфаты и в других положениях.

7. Исходя из того, что в подразделе 2.6.1 описаны результаты эксперимента по изучению цитотоксической активности исследуемых соединений, корректнее было бы именно так его и назвать: «Цитотоксическое действие фукоидана...».

Указанные замечания больше относятся к будущим исследованиям в данной области, не носят принципиального характера и никак не снижают общей очень положительной оценки представленной к защите работы, которую отличают научная новизна, актуальность и практическая перспективность.

Рекомендации по использованию результатов диссертации: результаты работы могут быть использованы и развиты в исследованиях, посвящённых установлению строения и разработке путей практического применения полисахаридов морских водорослей, а также изучению ферментативных трансформаций углеводов. Такие работы проводятся в Институте органической химии имени Н. Д. Зелинского РАН, Институте биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН и ВНИИ рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) и его филиалах.

Заключение.

Диссертация Зуевой А.О. как по объёму выполненной работы, так и по новизне и значимости полученных результатов, представляет собой завершённое фундаментально-прикладное исследование, которое выполнено на высоком научном и экспериментальном уровне и отвечает всем требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года в редакции от 11.09.2021 г. № 842). Ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 - биоорганическая химия.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы, кратко резюмирует ее основные положения и соответствует требованиям ВАК Минобрнауки РФ.

Отзыв рассмотрен, обсужден и одобрен на заседании расширенного семинара лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН (Присутствовало на семинаре 20 человек, результаты голосования: «за» – единогласно, протокол № 27 от 24 ноября 2023 г.).

Отзыв подготовила старший научный сотрудник лаборатории химии гликоконъюгатов Государственного бюджетного учреждения науки Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН),

К.х.н.

М.И. Билан

Председатель научного коллоквиума лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН, заведующий лабораторией химии гликоконъюгатов,

Чл.-корр. РАН

Н.Э. Нифантьев

Секретарь научного коллоквиума лаборатории химии гликоконъюгатов ИОХ РАН, старший научный сотрудник,

к.х.н.

О.Н. Юдина

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ РАН). 119334, г. Москва, Ленинский проспект, 47. Телефон: +7 499 137-29-44. E-mail: secretary@ioc.ac.ru. Сайт: <https://zioc.ru/>

Подписи Н.Э. Нифантьева, М.И. Билан и О.Н. Юдиной заверяю.

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института органической химии им. Н.Д. Зелинского,

к.х.н.



Коршевец И.К.