

На правах рукописи

Зуева Анастасия Олеговна

**Изучение фукоиданаз морской бактерии *Wenyuingzhuangia fucanilytica* CZ1127^T и
противоопухолевой активности продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов**

1.4.9 – Биоорганическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Владивосток – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного отделения Российской академии наук

Научный руководитель: доктор химических наук
Ермакова Светлана Павловна

Официальные оппоненты: **Ефременко Елена Николаевна**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова», зав.
лабораторией экобиокатализа

Облучинская Екатерина Дмитриевна
кандидат фармацевтических наук, Федеральное
государственное бюджетное учреждение науки
«Мурманский морской биологический институт
Российской академии наук», ведущий научный
сотрудник научно-исследовательской группы
биохимии и технологии (гидробионтов)
водорослей и беспозвоночных

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки «Институт органической
химии им. Н.Д. Зелинского РАН», г. Москва

Защита состоится «19» декабря 2023 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.213.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423) 231-40-50, e-mail: dissovnet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ТИБОХ ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, www.piboc.dvo.ru).

Автореферат разослан « » 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.



Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Фукоиданы представляют собой биологически активные полисахариды морского происхождения, основным структурным компонентом которых являются остатки сульфатированной α -L-фукозы. Известно, что фукоиданы способны снижать пролиферацию и метастазирование клеток рака, а также стимулировать апоптоз раковых клеток, не оказывая при этом цитотоксического действия по отношению к нормальным клеткам и тканям. Считается, что противоопухолевые свойства фукоиданов обусловлены их структурными особенностями, которые варьируют в зависимости от множества эндогенных и экзогенных факторов и поражают своим разнообразием. Поэтому установление структурных элементов, ответственных за противоопухолевую активность фукоиданов, и разработка фармацевтических препаратов на их основе представляется сложной задачей.

Для решения трудностей с установлением структур и стандартизацией фукоиданов перспективными инструментами являются фукоиданазы – O-гликозидгидролазы, катализирующие гидролиз гликозидных связей в молекулах фукоиданов и фукансульфатов. В результате их действия образуются производные с молекулярными массами ниже, чем у исходного фукоидана, установление структур которых дает информацию о его строении. В зависимости от структурных особенностей такие производные могут проявлять повышенную противоопухолевую активность, чему способствует их сниженная молекулярная масса. Таким образом, поиск и изучение новых фукоиданаз являются необходимыми для совершенствования и разработки новых методов изучения структур этих сложных биополимеров, а также для получения биологически активных олигосахаридов.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось определение структурных, биохимических и каталитических различий между представителями фукоиданаз 107 структурного семейства гликозидгидролаз (GH107) морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T, а также оценка перспектив применения данных ферментов для изучения структур фукоиданов и выявления структурных элементов, ответственных за их противоопухолевую активность *in vitro*. Исходя из цели работы были поставлены следующие задачи: 1) идентифицировать гены, кодирующие фукоиданазы морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T; 2) провести биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей потенциальных фукоиданаз семейства GH107 морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T; 3) получить каталитически активные рекомбинантные фукоиданазы семейства GH107 морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T; 4) провести сравнительное изучение биохимических свойств полученных рекомбинантных фукоиданаз; 5) установить субстратную специфичность полученных рекомбинантных фукоиданаз и определить тип их действия; 7) провести деполимеризацию фукоиданов с помощью исследуемых рекомбинантных фукоиданаз и установить структуры продуктов реакции; 8) изучить противоопухолевое действие полученных продуктов ферментативной деполимеризации фукоиданов.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые подставлены данные о биохимических свойствах, детальной специфичности и типе действия рекомбинантных фукоиданаз семейства GH107 морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. Впервые показано, что гликозидгидролазы GH107 могут содержать различное количество углеводсвязывающих подсайтов в своих активных центрах, при этом их специфичность может различаться в отношении не только типа гликозидной связи, но и расположения сульфатных групп при остатках α -L-фукозы, находящихся в непосредственной близости от места расщепления гликозидной связи. Исследованные ферменты были классифицированы как эндо- α -1 \rightarrow 4-L-

фукоиданазы (шифр КФ 3.2.1.212). На примере фукоиданов из *Fucus evanescens* и *Alaria angusta* были продемонстрированы перспективы применения новых ферментов в качестве инструментов для исследования структур фукоиданов.

С помощью исследованных ферментов были получены производные, противораковый эффект которых значительно превосходит активность исходного фукоидана. Показано, что некоторые из полученных производных проявляют высокую избирательность действия по отношению к определенным типам раковых клеток. Исследование канцеропревентивной активности фукоиданов и их производных впервые показало, что важность определенных структурных элементов фукоиданов, ответственных за их усиленное противораковое действие, может различаться не только по отношению к различным типам раковых клеток, но и зависеть от определенных экзогенных факторов, воздействующих на раковые клетки.

Так, было показано, что исследованные фукоиданазы имеют перспективы использования в биомедицине для получения производных фукоиданов с повышенной противоопухолевой активностью. Такие производные имеют потенциал для использования в качестве биологически активных добавок или лекарственных препаратов.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу исследования составляют научные статьи, посвященные изучению фукоиданов и деполимеризующих их ферментов, опубликованные в отечественных и зарубежных изданиях. Методологическую основу исследования составляют: широкий спектр физико-химических методов анализа, включая хроматографию (аффинную, ионообменную, гельпроникающую), электрофорез (ПААГ-электрофорез углеводов, ПААГ-электрофорез белков в денатурирующих условиях и нуклеиновых кислот в агарозном геле), ЯМР-спектроскопию и масс-спектрометрию; классические методы белковой химии; методы молекулярной и клеточной биологии; методы геномной инженерии; методы биоинформатического анализа (анализ аминокислотных последовательностей белков, построение пространственных моделей белков). Для оценки достоверности полученных результатов был использован метод математической статистики ANOVA.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штамм морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T является продуцентом как минимум четырех фукоиданаз семейства GH107 (FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4).
2. Исследуемые фукоиданазы имеют мультидоменную организацию и содержат помимо каталитического по 3-4 дополнительных домена, состав и количество которых в фукоиданазе GH107 различается. Состав и расположение некоторых остатков аминокислот в активных центрах исследуемых фукоиданаз варьируется.
3. Фукоиданазы FWf1–4 имеют различия в оптимумах pH и температур, а также в отношении к солям различных металлов.
4. Специфичность исследуемых фукоиданаз отличается по отношению к фукоиданам различных структур и определяется топологией их углеводсвязывающих подсайтов, количество и селективность которых различается. Фукоиданазы FWf1–4 являются эндо- α -1 \rightarrow 4-L-фукоиданазами (шифр КФ 3.2.1.212).
5. Важность определенных структурных элементов (степени сульфатирования и расположения сульфатных групп) и молекулярной массы для проявления противоопухолевой активности фукоиданом из *F. evanescens in vitro* варьирует по отношению к различным типам раковых клеток.

6. Фукоидан, выделенный из бурой водоросли *F. evanescens*, и его ферментативные производные проявляют селективность противоопухолевого действия по отношению к разным типам опухолевых клеток.
7. Фукоиданы из *F. evanescens* и *A. angusta*, а также их ферментативные производные, обладают канцеропреventивной активностью *in vitro*: ингибируют формирование колоний нормальных и раковых клеток, индуцированное EGF.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: Научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова (Владивосток, 2019 г.); IX Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Сочи, 2019 г.); XVII Всероссийской молодежной онлайн школе-конференции «Актуальные проблемы химии и биологии» (Владивосток, 2020 г.); X Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Сочи, 2021 г.); Всероссийской научной молодежной конференции «Геномика и биотехнология микроорганизмов» (Владивосток, 2022 г.), VI Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Мурманск, 2023 г.).

Личный вклад соискателя. Основная часть результатов была получена автором работы лично, за исключением данных ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии и ВЭЖХ. Соискателем был выполнен анализ литературных данных по теме исследования, планирование экспериментов, написаны статьи и подготовлены доклады для представления полученных результатов на конференциях. На защиту вынесены только те положения и результаты, в получении которых роль автора была определяющей.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science (Q 1) и рекомендованных ВАК РФ, а также 10 тезисов докладов научных конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Литературный обзор, Результаты и их обсуждение, Экспериментальную часть, Выводы, Заключение и Список литературы. Список литературы включает 225 источников. Диссертация изложена на 172 страницах и содержит 49 рисунков, 7 таблиц и 5 приложений.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность и благодарность своему научному руководителю доценту, д.х.н. Ермаковой С.П. за руководство и помощь на всех этапах выполнения работы. Автор также выражает благодарность сотруднику лаборатории химии ферментов к.х.н. Сильченко А.С. за помощь в установлении моносакхаридного состава и молекулярных масс исследуемого фукоидана и его производных, а также за поддержку и ценные советы на протяжении выполнения диссертационной работы. Автор благодарит сотрудника лаборатории микробиологии к.б.н. Куриленко В.В. за культивирование штамма морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T. Автор благодарит сотрудников лаборатории химии ферментов к.х.н. Расина А.Б. и к.х.н. Усольцеву Р.В., а также сотрудников лаборатории физико-химических методов исследования д.х.н. Калиновского А.И., к.х.н. Исакова В.В. и Звягинцева Н.В. за запись, анализ и расшифровку спектров ЯМР ¹H/¹³C. Автор благодарит сотрудника лаборатории физико-химических методов исследования к.х.н. Анастюка С.Д. за проведение масс-спектрометрических исследований. Автор выражает признательность сотруднику лаборатории химии ферментов к.х.н. Маляренко О.С. за помощь в освоении некоторых методов клеточной биологии. За ценные советы и рекомендации по оформлению диссертационной работы автор благодарит сотрудника лаборатории химии ферментов доцента, д.б.н. Кусайкина М.И. и сотрудника лаборатории химии морских природных соединений д.х.н. Авилова С.А. Автор также выражает искреннюю признательность всем сотрудникам

лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН за всестороннюю поддержку и продуктивные обсуждения полученных результатов в ходе выполнения работы.

Сокращения и условные обозначения: ВМП – высокомолекулярные продукты реакции, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, НМП – низкомолекулярные продукты реакции, ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле, С. о. – стандартное отклонение, СП – степень полимеризации, ЯМР – ядерный магнитный резонанс, CAZy (Carbohydrate-Active enZYmes) – база данных углеводов-активных ферментов, EGF (Epidermal Growth Factor) – эпидермальный фактор роста, EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) – рецептор эпидермального фактора роста, L-Fucp – L-фукопираноза, Fwfl – фукоиданаза AXE80_07305 (CAZy) из морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T, Fwf2 – фукоиданаза AXE80_07310 (CAZy) из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T, Fwf3 – фукоиданаза AXE80_07420 (CAZy) из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T, Fwf4 – фукоиданаза AXE80_07425 (CAZy) из морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T, Fwf1–4 – фукоиданазы Fwf1, Fwf2, Fwf3 и Fwf4, PBS (Phosphate-buffered saline) – натрий-фосфатный буфер, PDB (Protein Data Bank) – база данных трёхмерных структур белков и нуклеиновых кислот.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Идентификация и биоинформационный анализ фукоиданаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

Ранее было показано, что морская бактерия *W. fucanilytica* CZ1127^T, изолированная из морской воды прибрежной зоны, способна расщеплять сульфатированные фукозосодержащие полисахариды, выделенные из различных источников. В результате анализа генома бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T был выявлен кластер генов, кодирующих ферменты, участвующие в деградации фукозосодержащих сульфатированных полисахаридов. В состав кластера входят четыре гипотетических последовательности фукоиданаз семейства GH107 (по классификации CAZy), названные нами Fwf1, Fwf2, Fwf3 и Fwf4 (Рисунок 1).

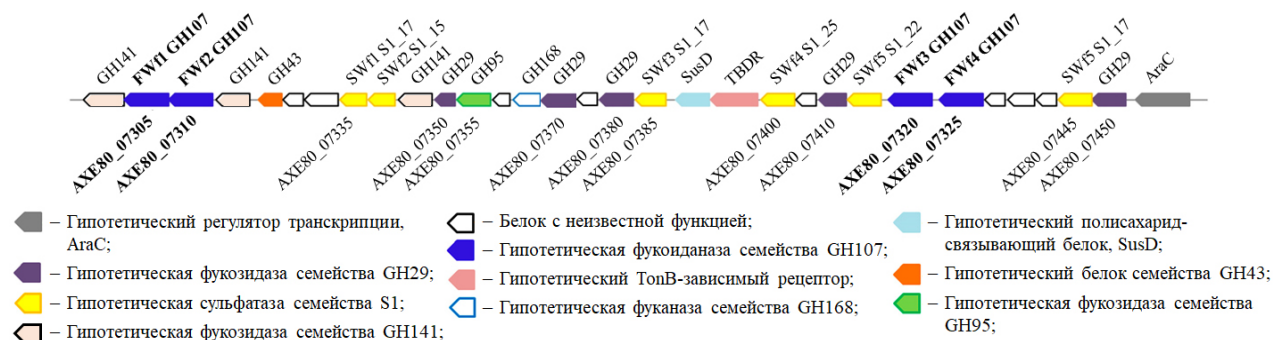


Рисунок 1 – Схематическое изображение фукоидандеградирующего кластера генов морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

Анализ доменной организации предполагаемых фукоиданаз Fwf1–4 и других охарактеризованных представителей GH107 показал, что их полипептидные цепи состоят из доменов различных типов. Помимо каталитических доменов аминокислотные последовательности фукоиданаз данного семейства содержали по 3–4 дополнительных домена, например, С-концевые домены системы секреции, сигнальные последовательности, кадгериноподобные домены и др. (Рисунок 2).

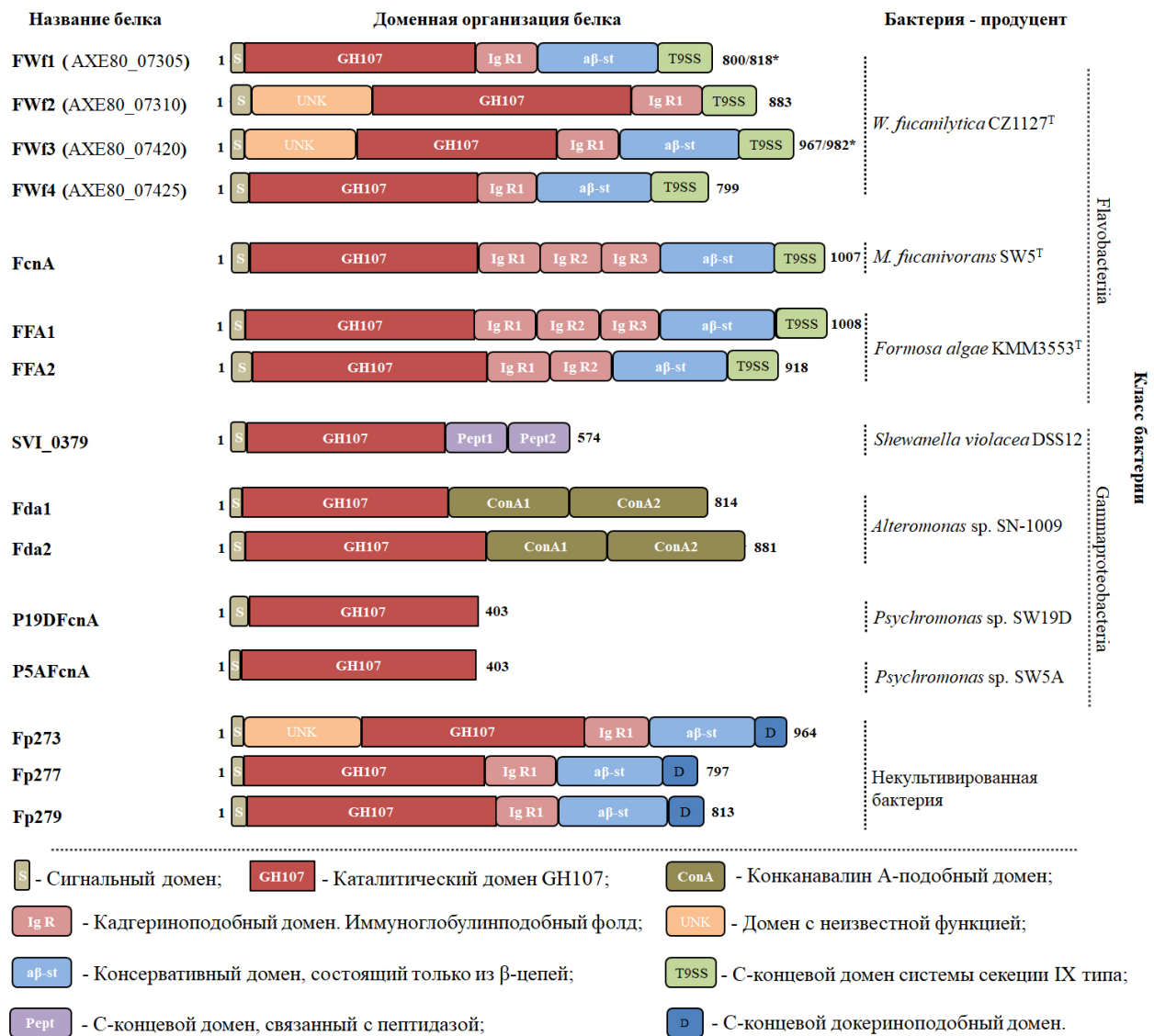


Рисунок 2 – Доменная организация полипептидных цепей FWf1–4 и охарактеризованных фукоиданаз семейства GH107. Длины аминокислотных последовательностей фукоиданаз указаны справа от схематического изображения их доменной организации. Для фукоиданаз FWf1 и FWf3 длины аминокислотных последовательностей указаны как для последовательностей с отсутствующими сигнальными последовательностями (GenBank: ANW96097.1 (FWf1) и ANW96115.1 (FWf3)), так и для последовательностей (*), в которых они присутствуют (GenBank: WP_083194609.1 и WP_083194615.1)

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей исследуемых ферментов и охарактеризованных фукоиданаз GH107 показало различные значения идентичности от 15 до 79% с другими представителями семейства и от 37 до 51% между FWf1-4. Были идентифицированы высококонсервативные для фукоиданаз 107 семейства аминокислотные мотивы. В их состав входят две каталитические аминокислоты Asp (D) и His (H), идентифицированные ранее в структуре фукоиданазы FcnA из *M. fucanivorans* и выполняющие роли нуклеофила и кислоты-основания при гидролизе O-гликозидной связи.

Структурное выравнивание пространственных моделей исследуемых фукоиданаз и охарактеризованной фукоиданазы FcnA позволило выявить некоторые отличия в организации их активных центров (Рисунок 3). Состав и расположение аминокислотных остатков в активном центре FWf4 были практически идентичными фукоиданазе FcnA, в то время как у других

исследуемых фукоиданаз в их активных центрах было отмечено большое количество переменных аминокислотных остатков, которые, вероятно, отвечают за распознавание моносахаридных остатков определенной структуры.

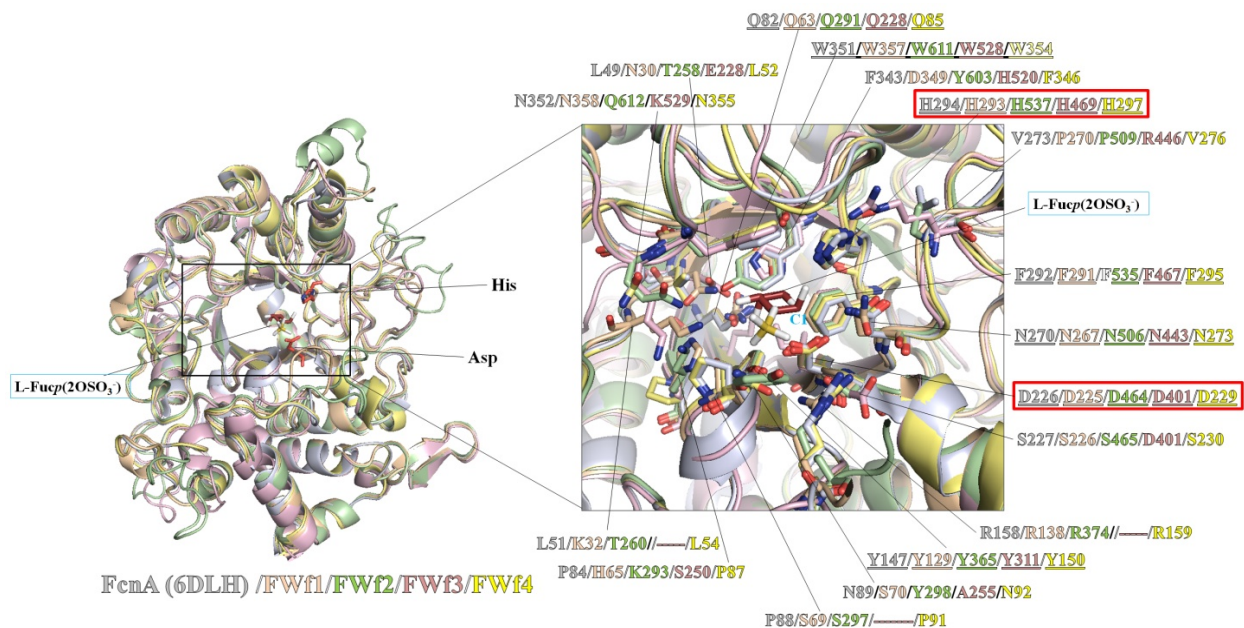


Рисунок 3 – Структурное выравнивание трехмерных моделей каталитических доменов GH107 фукоиданаз FWf1–4 и фукоиданазы FcnaA (шифр PDB: 6DLH). Остатки аминокислот активных центров FWf1–4 и FcnaA, являющиеся консервативными, подчеркнуты. Остатки Asp и His, выполняющие каталитическую функцию, выделены красными рамками

2 Получение рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

Для подтверждения предполагаемой функции генов исследуемых фукоиданаз и выяснения различий между ними, нами были получены рекомбинантные продукты этих генов в усеченных формах (Рисунок 4). Были подобраны условия для получения рекомбинантных белков FWf1–4. В качестве системы экспрессии был выбран штамм *E. coli* Arctic Express. Рекомбинантные белки были очищены с помощью Ni-аффинной хроматографии. Чистоту полученных препаратов ферментов оценивали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Все рекомбинантные фукоиданазы экспрессировались в растворимой форме и проявляли каталитическую активность.

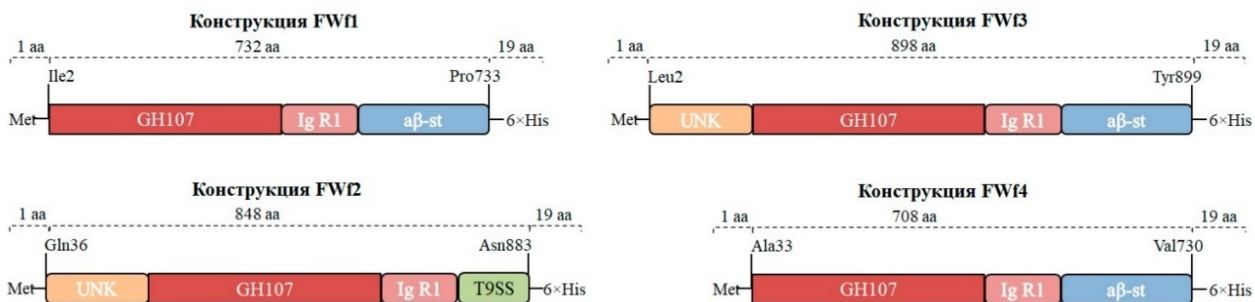


Рисунок 4 – Схематическое изображение конструкций, кодирующих FWf1–4

Молекулярные массы полученных белков были определены с помощью денситометра и составляли $\sim 84 \pm 2$ кДа для FWf1, $\sim 97 \pm 3$ кДа для FWf2, $\sim 100 \pm 2$ кДа для FWf3 и $\sim 81 \pm 3$ кДа для FWf4, что соответствовало рассчитанным молекулярным массам усеченных форм фукоиданаз FWf1–4 (Рисунок 5). Выход белков после очистки в пересчете на 1 литр LB составил 7,2 мг, 3,7 мг, 2,8 мг и 5,8 мг для FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4 соответственно.

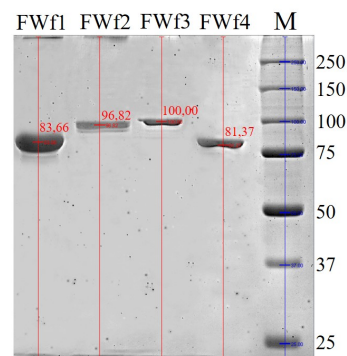


Рисунок 5 – ДСН-ПААГ-электрофореграмма фукоиданаз FWf1–4. М – маркер молекулярной массы белков

3 Оптимальные условия проявления каталитической активности рекомбинантных фукоиданаз FWf1–4

Были исследованы оптимальные условия для проявления фукоиданазми FWf1–4 каталитической активности. В качестве субстрата был использован фукоидан FeF, выделенный из бурой водоросли *F. evanescens*. Показано, что оптимумы pH и температуры исследуемых ферментов имели отличия (Таблица 1). Установлено, что из четырех исследуемых фукоиданаз только FWf3 способна проявлять каталитическую активность без добавления ионов металлов в реакционную смесь. Для исследуемых ферментов были определены активирующие и ингибирующие их каталитическую активность ионы металлов (Таблица 1).

Было показано, что добавление в реакционную смесь хлорида кальция или натрия в концентрациях 5–1000 мМ оказывало различное действие на активность фукоиданаз FWf1–4. В зависимости от концентрации солей происходили либо активирование, либо ингибирование каталитической активности данных ферментов (Таблица 1).

Таблица 1 – Оптимальные условия для проявления каталитической активности фукоиданазми FWf1–4

Фукоиданаза	Оптимум температуры	pH оптимум	Активность без добавления ионов металлов	Ингибиторы	Активаторы
FWf1	24–40 °C	6,4–7,2	нет	Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Co^{2+}	Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , CaCl_2 5–1000 мМ, NaCl 100–1000 мМ
FWf2	24–40 °C	6,0–7,2	нет	Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , CaCl_2 от 10 мМ, NaCl от 500 мМ	Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , CaCl_2 5 мМ, NaCl 100–350 мМ
FWf3	40–50 °C	6,4–6,8	да	Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , CaCl_2 от 500 мМ	Mn^{2+}
FWf4	40–50 °C	6,0–6,4	нет	Al^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , CaCl_2 от 10 мМ, NaCl от 350 мМ	Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , CaCl_2 5 мМ, NaCl 5–200 мМ

Удаление ионов металлов (ионов Ca^{2+}) из препаратов фукоиданаз FWf1, FWf2 и FWf4 с помощью гелпроникающей хроматографии приводило к их полной инактивации. Последующее добавление хлорида кальция к растворам фукоиданаз возвращало их каталитическую активность. Полученные данные могут косвенно указывать на неспособность кальцийсвязывающих участков, присутствующих в структурах фукоиданаз, прочно удерживать атомы кальция или же данные участки не принимают прямого участия в катализе.

4 Определение типа действия рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

Показано, что исследуемые фукоиданазы катализируют гидролиз фукоидана из *F. evanescens* по эндо-типу, что подтверждается образованием большого набора разнообразных сульфатированных олигосахаридов на ранних этапах ферментативного гидролиза (Рисунок 6).

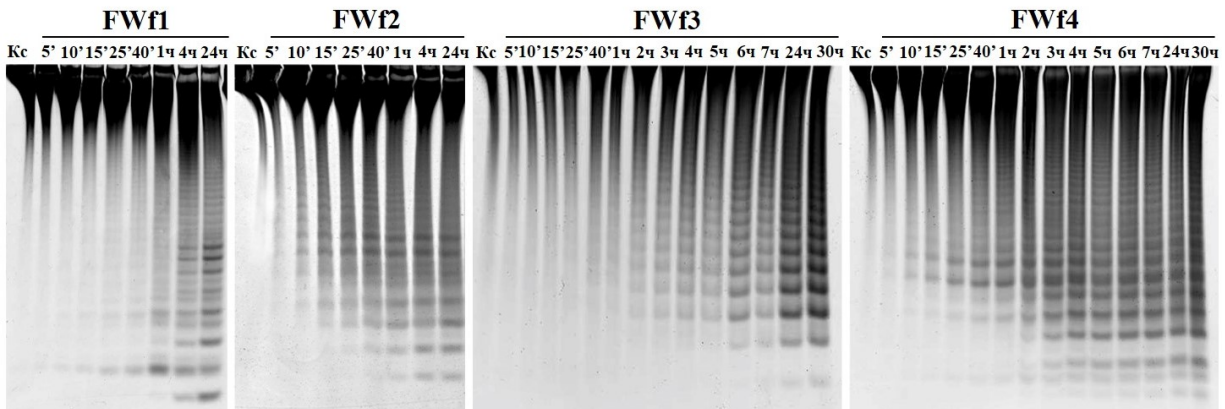
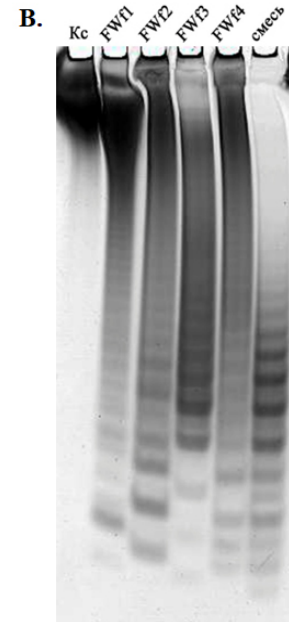
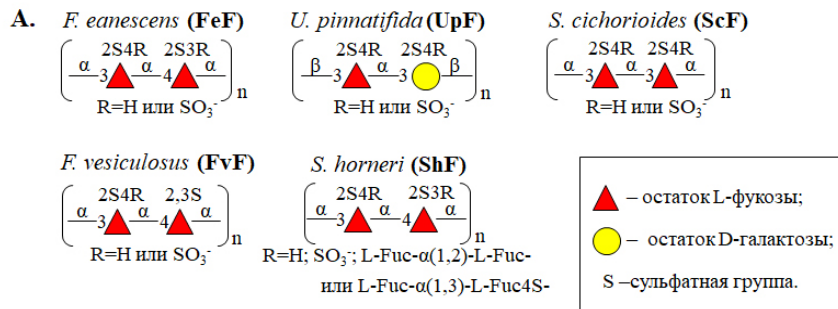


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана из *F. evanescens*, полученных с помощью фукоиданаз FWf1–4, за разное время инкубирования. Кс – фукоидан из *F. evanescens*, не подвергавшийся гидролизу

5 Определение субстратной специфичности рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T

5.1 Действие фукоиданаз FWf1–4 на фукоиданы, выделенные из различных видов бурых водорослей

Для исследования субстратной специфичности рекомбинантных фукоиданаз в качестве субстратов были использованы фукоиданы различной структуры (Рисунок 7, А).



Б.

Субстрат (фукоидан)	Тип гликозидных связей	Уровень фукоиданазной активности			
		FWf1	FWf2	FWf3	FWf4
FeF	(1→3;1→4)	++	+++	++	+++
UpF	(1→3)	-	-	-	-
ScF	(1→3)	-	-	-	-
FvF	(1→3;1→4)	+	+	-	++
ShF	(1→3;1→4)	++	++	+	++

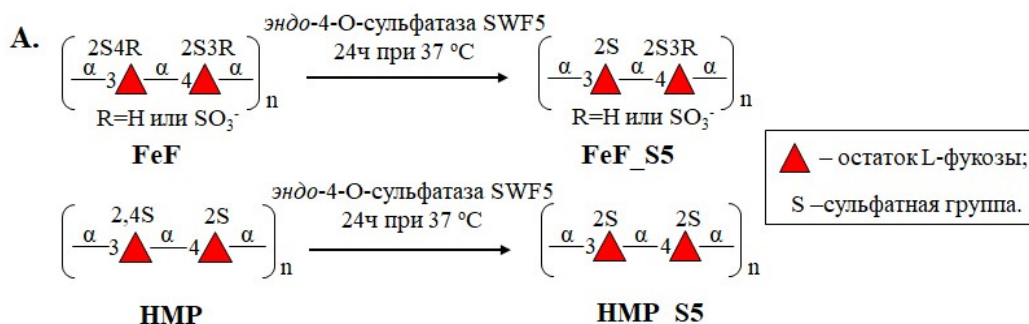
(-) – активность фукоиданазы не обнаружена; (+) – низкая активность; (++) – средняя активность; (+++) – высокая активность

Рисунок 7 – (А) Схема основных структурных мотивов, присутствующих в фукоиданах FeF, UpF, ScF, FvF и ShF. (Б) Уровень активности FWf1–4 по отношению к фукоиданам различной структуры. (В) Электрофореграмма продуктов гидролиза фукоидана FeF, полученных с помощью FWf1, FWf2, FWf3 или FWf4 и при их совместном действии. Кс – не гидролизированный фукоидан FeF

Все рекомбинантные фукоидаказы катализировали гидролиз фукоиданов, выделенных из бурых водорослей *F. evanescens* (FeF) и *S. horneri* (ShF), состоящих в основном из чередующихся 1→3-;1→4-связанных остатков сульфатированной α-L-фукозы. Исследуемые ферменты не катализировали гидролиз фукоидана из *S. cichorioides* (ScF), в котором остатки α-L-фукозы связаны преимущественно 1→3-гликозидными связями, а также галактофукана, выделенного из *U. Pinnatifida* (UpF) (Рисунок 7, Б). Полученные данные указывают на то, что исследуемые ферменты специфичны к гидролизу α-1→4-гликозидных связей между сульфатированными остатками α-L-фукозы.

Обработка фукоидана FeF всеми фукоидаказами FWf1–4 одновременно приводила к его более глубокой деполимеризации, чем каждым из ферментов по-отдельности (Рисунок 6, В). Полученные данные указывают на то, что наличие сразу четырех генов фукоидаказ в фукоидандеградирующем кластере *W. fucanilytica* CZ1127^T не является избыточным. Очевидно, что такое разнообразие фукоидаказ необходимо бактерии для более эффективной деградации фукоиданов, имеющих сложное структурное строение (Рисунок 7, В).

Для оценки влияния сульфатирования на специфичность исследуемых фукоидаказ были получены 4-О-десульфатированные производные фукоидана из *F. evanescens* и его регулярной фракции, полученной ранее в результате действия фукоидаказы морской бактерии *F. algae* (Рисунок 8, А). Фукоидаказы FWf1 и FWf3 продемонстрировали снижение активности по отношению к 4-О-десульфатированным производным по сравнению с исходными полисахаридами. В отличие от них, фукоидаказы FWf2 и FWf4 эффективнее деполимеризовали полученные производные (Рисунок 8, Б). Полученные данные указывают на различия в специфичности исследуемых ферментов по отношению к 4-О-сульфатированию в фукоиданах.



Б.

Субстрат (фукоидан)	Модификация субстрата	Уровень фукоидаказной активности			
		FWf1	FWf2	FWf3	FWf4
FeF	нет	++	++	++	++
FeF_S5	4-О-десульфатирование	+	+++	+	+++
HMP	нет	+++	+	+++	+
HMP_S5	4-О-десульфатирование	++	++	+	++

(-) – активность фукоидаказы не обнаружена; (+) – низкая активность; (++) – средняя активность; (+++) – высокая активность

Рисунок 8 – Анализ активности фукоидаказ FWf1–4 по отношению к фукоиданам FeF, HMP и их 4-О-десульфатированным производным FeF_S5 и HMP_S5. (А) Схема получения 4-О-десульфатированных производных FeF_S5 и HMP_S5 из FeF и HMP с использованием эндо-4-О-сульфатазы SWF5.

(Б) Таблица, демонстрирующая уровень активности FWf1–4 по отношению к FeF, HMP, FeF_S5 и HMP_S5

5.2 Получение продуктов ферментативного гидролиза фукоидана из *F. evanescens* и установление их строения с помощью ЯМР-спектроскопии

Детальное исследование структур продуктов ферментативного гидролиза субстрата, как правило, позволяет получить подробную информацию о специфичности ферментов. С этой целью, а также для изучения структуры фукоидана из *F. evanescens* (FeF) и получения сульфатированных олигосахаридов были получены продукты ферментативного действия фукоиданаз FWf1–4 по отношению к фукоидану FeF. Продукты деполимеризации FeF были дополнительно разделены на высоко- (ВМП) и низкомолекулярные (НМП) продукты реакции с помощью осаждения высокомолекулярных фрагментов 75%-ным водным этанолом (Рисунок 9).

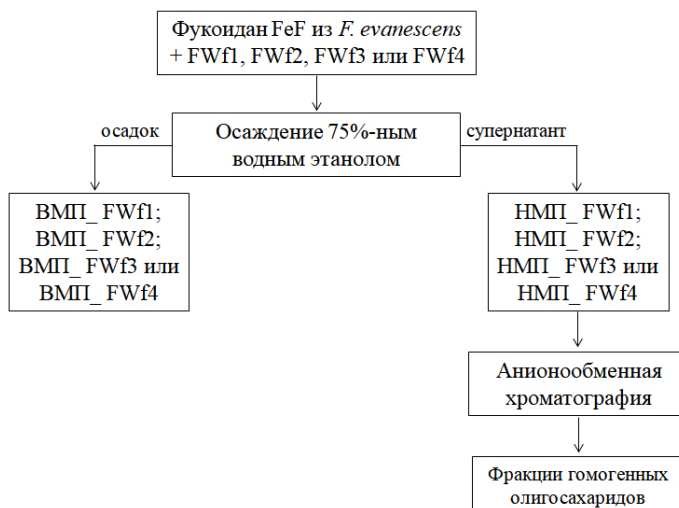


Рисунок 9 – Схема получения продуктов ферментативной деполимеризации фукоидана FeF с помощью фукоиданаз FWf1–4

Согласно данным, полученным с помощью ВЭЖХ средняя молекулярная масса FeF, ВМП_FWf3 и ВМП_FWf4 составила около 356, 73 и 69 кДа соответственно. Производные ВМП_FWf1 и ВМП_FWf2 имели полидисперсный состав, распределение молекулярных масс составило от 6 до 187 кДа для ВМП_FWf1 и от 5,5 до 210 кДа для ВМП_FWf2. Использование в качестве стандартов 2-О-сульфатированных фукоолигосахаридов различной степени полимеризации (СП) позволило оценить молекулярные массы и степени полимеризации (СП) олигосахаридов, входящих в состав фракций НМП. Рассчитанное распределение СП для олигосахаридов составило СП~2–10 (СП основного компонента ~5, Mw~1360 Да) для НМП_FWf1, СП~7–11 (СП основного компонента ~10, Mw~2400 Да) для НМП_FWf2 и СП~7–11 (СП основного компонента ~10, Mw~2570 Да) для НМП_FWf3, СП~5–10 (СП основного компонента ~9, Mw~2300 Да) для НМП_FWf4. Стоит отметить, что расчетные значения СП могут значительно отличаться от реальных, так как олигосахариды в низкомолекулярных фракциях могут иметь отличную от использованных для анализа стандартов схему сульфатирования.

Информация о структурах исходного фукоидана и высокомолекулярных фракций ВМП_FWf1, ВМП_FWf2, ВМП_FWf3 и ВМП_FWf4 (далее ВМП_FWf1–4) была получена с помощью ЯМР¹. Структуры основных компонентов приведены на Рисунке 10.

¹ Запись и анализ спектров ЯМР были проведены сотрудником лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Расиным А.Б. и сотрудником лаборатории физико-химических методов, д.х.н. Калиновским А.И.

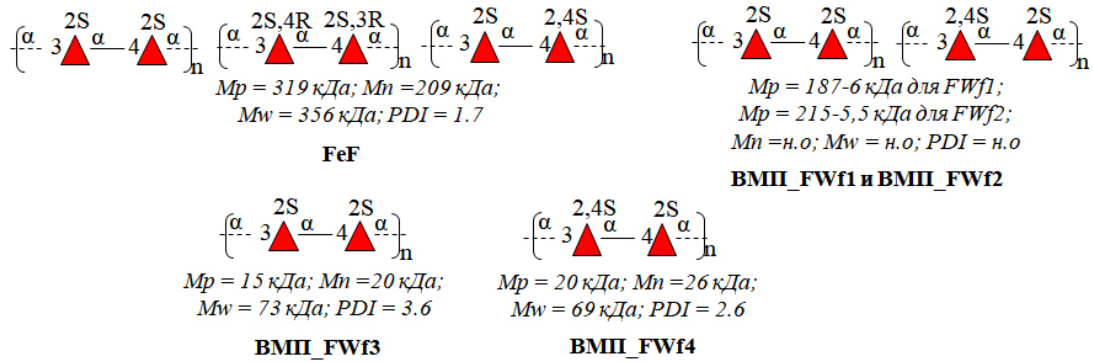


Рисунок 10 – Доминирующие структурные мотивы FeF и его ферментативных производных, полученных с использованием эндо-фукоиданаз FWf1–4. Молекулярные характеристики (M_p , M_n , M_w , PDI, СП) FeF и полученных производных представлены под структурами фукоидана или его производных

Фракции НМП_FWf1–4 подвергали анионообменной хроматографии для разделения сульфатированных олигосахаридов, входящих в их состав. Для выделения гомогенных олигосахаридов были подобраны оптимальные схемы градиентов концентраций NH_4HCO_3 и/или NaCl . В результате было получено 15 фракций гомогенных олигосахаридов (Рисунок 11, А), структуры 11 из них были полностью или частично установлены с помощью спектроскопии ЯМР¹. Олигосахариды, выделенные из НМП_FWf3, имели сложную структуру и, вероятно, большое количество изомеров, что затрудняло получение исчерпывающей информации об их строении. Полученные олигосахариды различались СП, количеством и расположением сульфатных групп при остатках α -L-фукозы (Рисунок 11, Б, В, Г и Д).

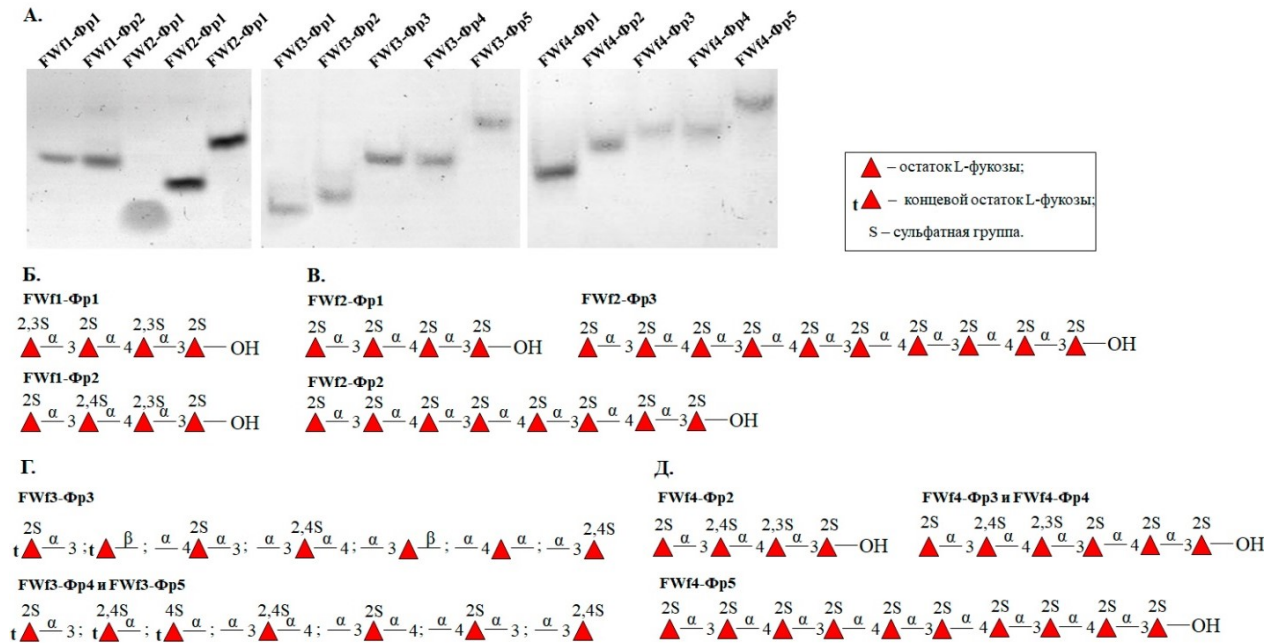


Рисунок 11 – Электрофореграмма (А) и схематическое изображение структур выделенных олигосахаридов – продуктов ферментативного гидролиза фукоидана FeF, полученных с помощью фукоиданаз FWf1 (Б), FWf2 (В), FWf3 (Г) и FWf4 (Д)

Полученные данные о структуре продуктов гидролиза фукоидана FeF позволили сделать некоторые выводы о специфичности исследуемых фукоиданаз. Так, порядок гликозидных связей 1→3-; 1→4-; 1→3- в выделенных олигосахаридах указывает на то, что все исследуемые ферменты расщепляют 1→4-гликозидные связи между остатками α -L-фукозы в фукоидане.

5.3 Действие фукоиданаз FWf1–4 на сульфатированные фукоолигосахариды различной структуры. Организация углеводсвязывающих подсайтов активного центра фукоиданаз

Активные центры гликозидгидролаз состоят из tandemных углеводсвязывающих подсайтов, которые распознают и связывают определенные углеводные фрагменты субстрата для его дальнейшего расщепления. Углеводсвязывающие подсайты определяют специфичность гликозидгидролаз. На сегодняшний день организация углеводсвязывающих подсайтов представителей семейства GH107 на экспериментальном уровне не изучена.

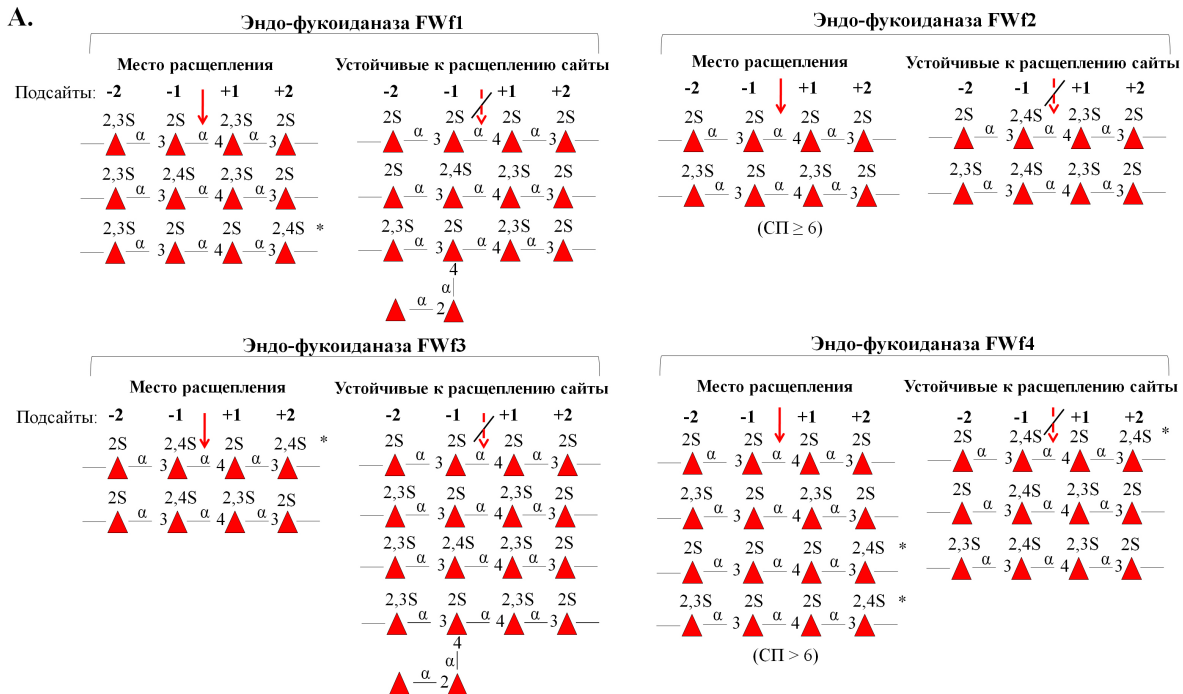
Олигосахариды различной структуры являются наиболее удобными моделями для изучения детальной специфичности и определения топологии углеводсвязывающих подсайтов О-гликозидгидролаз. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы сульфатированные фукоолигосахариды различной структуры были использованы в качестве субстратов для изучения специфичности и топологии углеводсвязывающих подсайтов фукоиданаз. Показано, что активность FWf1–4 по отношению к полученным сульфатированным фукоолигосахаридам значительно различалась и зависела от определенного расположения сульфатных групп, а также степени полимеризации олигосахаридов (Рисунок 12). Вместе с информацией о структуре продуктов ферментативного гидролиза фукоидана FeF это позволило определить детальную специфичность, а также топологию и селективность углеводсвязывающих подсайтов фукоиданаз FWf1–4. Структурные фрагменты фукоиданов, которые распознают и расщепляют фукоиданазы FWf1–4, а также предполагаемая топология их углеводсвязывающих подсайтов представлены на Рисунке 13.

Схематическая структура олигосахаридов	Обозначение	Уровень фукоиданазной активности			
		FWf1	FWf2	FWf3	FWf4
	4F2,3,4S(6S)	-	-	++	-
	4F2,3,4S(7S)	+++	-	-	-
	4F2S(4S)	-	-	-	-
	6F2S(6S)	-	+	-	-
	8F2S(8S)	-	++	-	++
	10F2S(10S)	-	++	-	+++
	4F2,3S(6S)	+++	-	-	-
	6F2,3S(6S)	-	-	-	-
	8F2,3S(12S)	+++	++	-	++
	10F2,3S(15S)	+++	++	-	+++

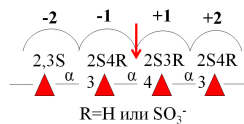
Рисунок 12 – Таблица, демонстрирующая уровень активности FWf1–4 по отношению к сульфатированным олигосахаридам: (-) – активность фукоиданазы не обнаружена; (+) – низкая активность; (++) – средняя активность; (+++) – высокая активность

Так, полученные данные впервые показывают, что специфичность фукоиданаз семейства GH107 может различаться в отношении не только типа гликозидной связи, но и расположения

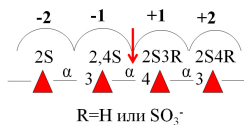
сульфатных групп при остатках α -L-фукозы, находящихся в непосредственной близости от места расщепления. Такая специфичность фукоиданаз предопределяется количеством и селективностью углеводсвязывающих подсайтов в их активных центрах. Установлено, что исследуемые фукоиданазы FWf1–4 являются ферментами эндо-типа действия специфичными к гидролизу 1→4-гликозидных связей между сульфатированными остатками α -L-фукозы, что позволяет классифицировать их как эндо- α -1→4-L-фукоиданазы (шифр КФ 3.2.1.212).

**Б.**

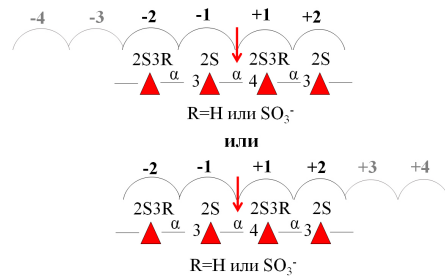
Углеводсвязывающие подсайты эндо-фукоиданазы FWf1



Углеводсвязывающие подсайты эндо-фукоиданазы FWf2



Углеводсвязывающие подсайты эндо-фукоиданазы FWf3



Углеводсвязывающие подсайты эндо-фукоиданазы FWf4

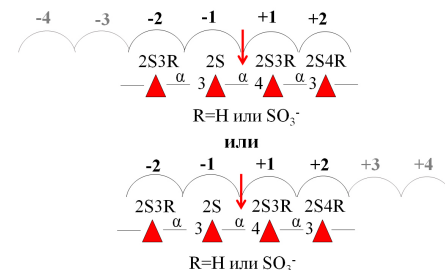


Рисунок 13 – (А) Предполагаемые сайты расщепления фукоидана, распознаваемые фукоиданазы FWf1–4, и структурные мотивы фукоидана, устойчивые к расщеплению фукоиданазы FWf1–4.

(Б) Топология предполагаемых углеводсвязывающих подсайтов фукоиданаз FWf1–4. Цифры над структурными мотивами указывают на углеводсвязывающие подсайты FWf1–4. (*) – сайт расщепления, предполагаемый на основании структур олигосахаридов, полученных в результате гидролиза фукоидана FeF с помощью FWf1, FWf3 или FWf4

6 Исследование противоопухолевой активности продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов из бурых водорослей

Известно, что некоторые фукоиданы обладают выраженной противоопухолевой активностью в отношении различных типов раковых клеток, однако взаимосвязь между структурными элементами фукоиданов и проявлением противоракового действия сложно установить. Это связано с особенностями строения молекул фукоиданов, такими как разветвленность, степень сульфатирования и нерегулярность распределения отдельных структурных элементов вдоль цепи биополимера.

Для выявления взаимосвязи между структурой фукоиданов и их противоопухолевым действием были использованы фукоидан FeF из *F. evanescens* и его ферментативные производные НМП_FWf1–4 и ВМП_FWf1–4, полученные с помощью исследуемых эндо-фукоиданаз.

Показано, что ни фукоидан FeF, ни его ферментативные производные не проявляли выраженного цитотоксического эффекта по отношению к нормальным эпидермальным клеткам мыши JB6 C141, а также различным линиям раковых клеток (MCF7, MDA-MB-231, DLD-1, NuTu 80 и SK-MEL-28) в диапазоне концентраций 200–800 мкг/мл.

С помощью метода «мягких агаров» было исследовано *in vitro* влияние фукоидана FeF и полученных ферментативных производных в концентрации 200 мкг/мл на рост и развитие колоний различных линий раковых клеток. Показано, что высокая молекулярная масса фукоидана имела ключевое значение для ингибирования роста колоний клеток рака молочной железы MCF7 и карциномы толстого кишечника DLD-1 человека. Так, фукоидан FeF (Mw~365 кДа) ингибировал образование колоний клеток MCF7 на 40%, в то время как его производные были практически неактивны. Фукоидан FeF ингибировал рост колоний клеток DLD-1 на 50%, высокомолекулярные производные ВМП_FWf1–4 (Mw от 5,5 до 215 кДа) на 30–40%, а низкомолекулярные производные НМП_FWf1–4 (Mw от 1,4 до 2,5 кДа) были практически не активны. Степень сульфатирования и расположение сульфатных групп в фукоидане FeF и его производных, очевидно, не имели решающего значения для проявления ими противораковой активности по отношению к клеткам DLD-1 и MCF7. (Рисунок 14).

Название фракции	Mw, кДа	OSO ₃ , %	F2,4S, %	Ингибирование роста колоний, %				
				NuTu 80	SK-MEL-28	MDA-MB-231	DLD-1	MCF7
FeF	365	26	21	52	48	23	50	40
ВМП_FWf1	187-6	25	19	61	28	44	39	4
ВМП_FWf2	215-5,5	25	21	63	33	44	30	7
ВМП_FWf3	73	23	13	53	39	16	40	13
ВМП_FWf4	69	31	31	69	89	46	40	7
НМП_FWf1	1,4	26	13	54	20	42	1	10
НМП_FWf2	2,4	20	9	53	22	13	0	4
НМП_FWf3	2,5	30	24	84	85	40	10	7
НМП_FWf4	2,3	28	18	64	37	44	3	13

Рисунок 14 – Таблица, демонстрирующая некоторые структурные характеристики фукоидана FeF и его производных, а также их ингибирующее действие по отношению к росту колоний различных типов раковых клеток: NuTu 80, SK-MEL-28, MDA-MB-231, DLD-1 или MCF7. Данные об ингибирующем действии исследуемых фукоиданов по отношению к различным раковым клеткам соответствуют результатам из Рисунков 36 и 37. Цветовая маркировка применена по отношению ко всем значениям, представленным в таблице, где красный – максимальное значение в таблице, а зеленый – минимальное значение в таблице

Иной эффект при обработке исследуемыми соединениями был отмечен по отношению к клеткам трижды негативного рака молочной железы MDA-MB-231 (Рисунок 14). Фукоидан FeF ингибировал образование колоний этих клеток на 23%, в то время как большинство его производных, со сниженными по сравнению с FeF молекулярными массами и высоким содержанием сульфатных групп, ингибировали рост колоний в среднем на 42–46%. Исключением являлись производные ВМП_FWf3 и НМП_FWf2, которые, несмотря на сниженную молекулярную массу, ингибировали рост колоний MDA-MB-231 лишь на 13–16%. Полученные данные указывают на то, что клетки MDA-MB-231 более восприимчивы к низкомолекулярным фукоиданам со степенью сульфатирования более 23%.

Как и в случае с линиями клеток DLD-1 и MCF7, снижение молекулярной массы фукоидана негативно сказывалось на его противораковой активности относительно клеток меланомы SK-MEL-28 (Рисунок 14). Наибольший ингибирующий эффект по отношению к росту колоний клеток SK-MEL-28 проявляли производные ВМП_FWf4 и НМП_FWf3, обогащенные 2,4-ди-О-сульфатными группами. В фукоидане FeF и других производных содержание данных остатков не превышает 21%. Таким образом, производные фукоиданов, обогащенные 2,4-ди-О-сульфатированием, могут являться эффективными ингибиторами роста колоний данного типа клеток.

Клетки HuTu 80 так же, как и клетки SK-MEL-28, были более восприимчивы к производным, обогащенным 2,4-ди-О-сульфатированием (Рисунок 14). При этом олигосахариды НМП_FWf3 ($M_w \sim 2,5$ кДа) на 15% эффективнее ингибировали рост колоний HuTu 80, чем фракция ВМП_FWf4 с более высокой молекулярной массой ($M_w \sim 69$ кДа). Таким образом, для более эффективного ингибирования роста колоний HuTu 80 производное фукоидана должно быть обогащено 2,4-ди-О-сульфатированием и иметь небольшую молекулярную массу.

Полученные данные свидетельствуют о том, что молекулярная масса, степень сульфатирования и расположение сульфатных групп являются важными элементами для проявления противораковых эффектов фукоиданом FeF из *F. evanescens*. В то же время важность вышеописанных структурных особенностей фукоидана оказалась различной для разных типов раковых клеток. При этом некоторые из полученных производных фукоидана продемонстрировали высокую селективность по отношению к определенным типам раковых клеток. К сожалению, полученные данные пока не позволяют выявить молекулярные основы, приводящие к таким эффектам. Можно предположить, что раковые клетки, использованные в экспериментах, имеют различные число, уровень экспрессии и/или регуляции потенциальных мишеней, с которыми способны взаимодействовать фукоиданы. При этом для взаимодействия с каждой из таких потенциальных мишеней важны определенные структурные элементы фукоиданов.

7 Действие фукоидана FeF и продуктов его ферментативного гидролиза на образование колоний опухолевых клеток и неопластическую трансформацию нормальных клеток, индуцированные эпидермальным фактором роста

Роль эпидермального фактора роста (EGF) и его рецептора в процессе регуляции клеточной пролиферации хорошо известна. Связывание рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) с лигандом (EGF), который индуцирует фосфорилирование тирозина и димеризацию рецептора с другими членами семейства тирозинкиназных рецепторов ERBB, приводит к усиленной неконтролируемой пролиферации. Путь эпидермального фактора роста (EGF) играет важную роль в процессе эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) раковых

клеток и метастазировании и, соответственно, способствует прогрессированию и разрастанию опухоли. Поэтому поиск соединений, снижающих влияние опухолевого промотора EGF на клетки злокачественных образований, является перспективным направлением в терапии рака.

Нормальные эпидермальные клетки мыши JB6 представляют собой уникальную модель, характеризующуюся их дифференциальной реакцией на неопластическую трансформацию, индуцированную промоторами опухоли, такими как EGF. Клетки JB6 C141 самопроизвольно не формируют колонии в мягком агаре. При обработке клеток JB6 C141 EGF (20 нг/мл) происходит их трансформация и, как следствие, формирование колоний. Показано, что фукоидан FeF и его ферментативные производные в концентрации 200 мкг/мл способны эффективно подавлять этот процесс (Рисунок 15). При этом действие фукоидана FeF и его производных на формирование колоний клеток JB6 C141, индуцированное EGF, сильно различалось. Полученные данные позволяют предположить, что высокое содержание 2,4-ди-О-сульфатирования и сниженная до определенного предела молекулярная масса (в пределах от 150 до 5 кДа) фукоиданов являются важными структурными детерминантами для эффективного подавления неопластической трансформации нормальных эпидермальных клеток мыши, индуцированной EGF. Вместе с тем нельзя исключать возможное влияние других структурных детерминант, присутствующих в полученных производных. Например, определенного распределения сульфатных групп в их основных цепях.

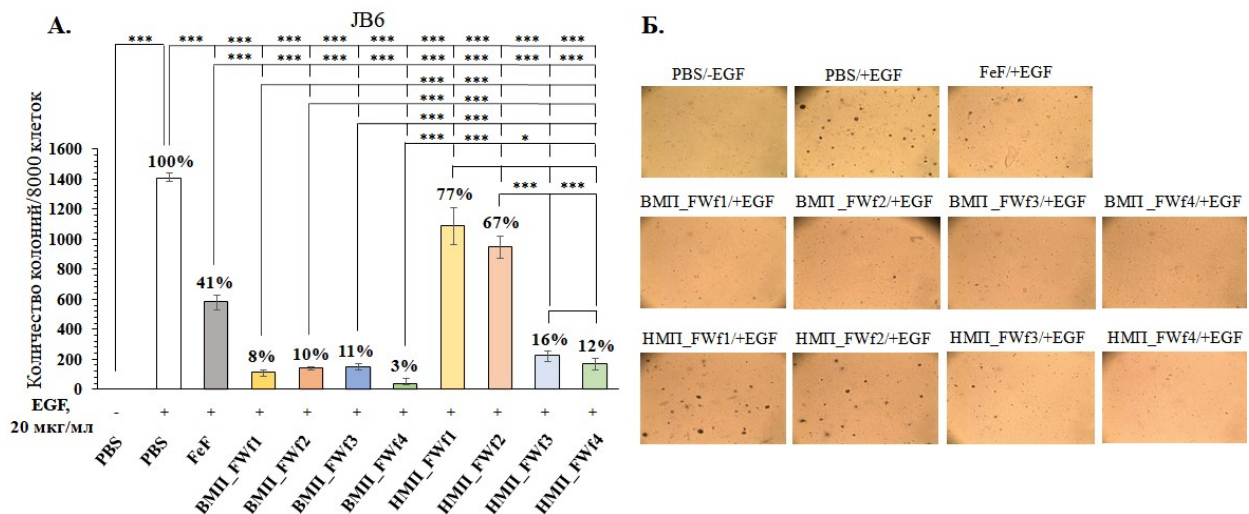


Рисунок 14 – (А) Влияние фукоидана FeF и его высоко- и низкомолекулярных ферментативных производных (ВМП_FWf1–4 и НМП_FWf1–4) (200 мкг/мл) на EGF-индуцированное формирование и рост колоний клеток JB6 C141 после обработки либо PBS (контроль), либо EGF (20 нг/мл), либо EGF и FeF, либо EGF (20 нг/мл) и ферментативными производными FeF. (Б) Изображения колоний клеток JB6 C141 после вышеописанной схемы обработки. Статистические данные представлены как \pm с.о., где $n=3$ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Следующим этапом работы было изучение действия фукоидана и его производных на рост колоний опухолевых клеток, индуцированный EGF. Раковые клетки обладают способностью самопроизвольно формировать колонии на поверхности агара. Показано, что при обработке EGF раковых клеток наблюдается увеличение количества и размера их колоний. При этом увеличение количества колоний было разным для различных типов раковых клеток (Рисунок 16). Наибольшую восприимчивость к обработке EGF продемонстрировали клетки DLD-1 и SK-MEL-28, в то время как клетки NuTu80 и MCF7, вероятно, подвержены воздействию EGF в меньшей степени.

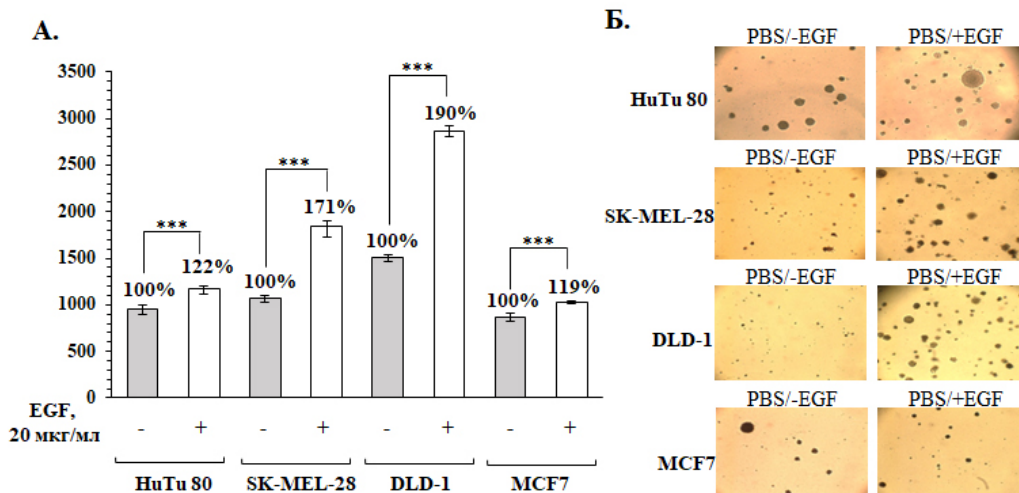


Рисунок 16 – (А) Влияние EGF (20 нг/мл) на формирование и рост колоний клеток аденокарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80, меланомы человека SK-MEL-28, аденокарциномы толстого кишечника человека DLD-1 и фиброаденомы молочной железы человека MCF7.

(Б) Изображения колоний клеток HuTu 80, SK-MEL-28, DLD-1 и MCF7 после обработки либо PBS (контроль), либо EGF (20 нг/мл). Статистические данные представлены как \pm с.о., где $n = 3$ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Обработка клеток фукоиданом FeF и его ферментативными производными в концентрациях 200 мкг/мл во всех случаях приводила либо к полному, либо к значительному снижению количества колоний различных типов раковых клеток, обработанных EGF (Рисунок 17). Таким образом, фукоиданы, как и в случае с нормальными клетками JB6 Cl41, способны снижать эффект от воздействия опухолевого промотора EGF по отношению к различным типам раковых клеток.

Название вещества	Mw, кДа	OSO ₃ , %	F2,4S, %	Ингибирование роста колоний, %							
				HuTu 80		SK-MEL-28		DLD-1		MCF7	
				(+EGF)*	(-EGF)*	(+EGF)*	(-EGF)*	(+EGF)*	(-EGF)*	(+EGF)*	(-EGF)*
FeF	365	26	21	72	65	31	н.а.	70	43	23	8
ВМП_FWf1	187-6	25	19	62	53	26	н.а.	62	28	23	8
ВМП_FWf2	215-5,5	25	21	65	57	27	н.а.	69	41	18	2
ВМП_FWf3	73	23	13	67	59	47	9	57	19	28	14
ВМП_FWf4	69	31	31	70	63	41	н.а.	69	41	41	30
НМП_FWf1	1,4	26	13	53	42	37	н.а.	28	н.а.	27	13
НМП_FWf2	2,4	20	9	58	46	48	10	22	н.а.	30	17
НМП_FWf3	2,5	30	24	81	76	64	37	37	н.а.	28	14
НМП_FWf4	2,3	28	18	66	58	59	29	20	н.а.	27	13

Рисунок 17 – Таблица, демонстрирующая ингибирующую активность фукоидана FeF и его производных по отношению к различным линиям раковых клеток: HuTu 80, SK-MEL-28, DLD-1 и MCF7, обработанным EGF (20 нг/мл). (+EGF)* – значения ингибирующей активности по отношению к контрольным клеткам, обработанным EGF. (-EGF)* – значения ингибирующей активности по отношению к контрольным клеткам без обработки EGF. Цветовая маркировка применена по отношению ко всем значениям, представленным в таблице, где красный – максимальное значение в таблице, а зеленый – минимальное значение в таблице, «н.а.» – нет активности

Сравнительный анализ действия фукоидана и его производных по отношению к раковым клеткам до и после их обработки EGF позволил выявить некоторые различия в проявляемых исследуемыми соединениями эффектов. Показано, что характер и степень ингибирования некоторых типов раковых клеток фукоиданом FeF или его производными после обработки EGF значительно изменились (Рисунок 18).

Название вещества	Mw, кДа	OSO ₃ ⁻ , %	F2,4S, %	Ингибирование роста колоний, %							
				HuTu 80		SK-MEL-28		DLD-1		MCF7	
				1*	2*	1*	2*	1*	2*	1*	2*
FeF	365	26	21	52	65	48	н.а.	50	43	40	8
ВМП_FWf1	187-6	25	19	61	53	28	н.а.	39	28	4	8
ВМП_FWf2	215-5,5	25	21	63	57	33	н.а.	30	41	7	2
ВМП_FWf3	73	23	13	53	59	39	9	40	19	13	14
ВМП_FWf4	69	31	31	69	63	89	н.а.	40	41	7	30
НМП_FWf1	1,4	26	13	54	42	20	н.а.	1	н.а.	10	13
НМП_FWf2	2,4	20	9	53	46	22	10	0	н.а.	4	17
НМП_FWf3	2,5	30	24	84	76	85	37	10	н.а.	7	14
НМП_FWf4	2,3	28	18	64	58	37	29	3	н.а.	13	13

Рисунок 18 – Таблица, демонстрирующая различия в характере ингибирующего действия фукоидана FeF и его производных (200 мкг/мл) по отношению к различным линиям раковых клеток с (2*) и без (1*) обработки EGF (20 нг/мл). Данные об ингибирующем действии фукоиданов по отношению к раковым клеткам без обработки EGF (1*) взяты из Рисунка 14. Данные об ингибирующем действии фукоиданов по отношению к раковым клеткам после обработки EGF (2*) взяты из Рисунка 17, столбец (-EGF)*. Относительная цветовая маркировка применена для столбцов 1* и 2* для каждого из типов раковых клеток, где красный – максимальное значение в столбцах 1* и 2*, а зеленый – минимальное значение в этих столбцах, «н.а.» – нет активности

Так, клетки MCF7 без обработки EGF были наиболее восприимчивы к действию только нативного фукоидана FeF (Рисунок 18). После обработки данного типа клеток EGF фукоидан FeF, так же, как и большинство его производных, лишь незначительно снижали количество колоний клеток. Однако производное ВМП_FWf4, не проявляющее активность до обработки клеток EGF, достоверно снижало на 30% количество колоний клеток MCF7 после обработки EGF. Схожее, но менее выраженное изменение характера ингибирования производными фукоидана наблюдалось в отношении клеток DLD-1 и Hutu 80, обработанных EGF. Изменения характера ингибирования образования колоний раковых клеток, индуцированного EGF, различными производными фукоидана указывает на то, что EGF способен модулировать восприимчивость раковых клеток к тем или иным структурным детерминантам фукоиданов. Такие изменения, вероятно, могут быть обусловлены процессами, протекающими в клетках после обработки эпидермальным фактором роста (EGF). Это, в свою очередь, может влиять на уровень экспрессии потенциальных мишеней, с которыми могут взаимодействовать фукоиданы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что важность определенных структурных элементов фукоиданов, ответственных за их усиленное противораковое действие, может различаться не только по отношению к различным типам раковых клеток, но и зависеть от определенных экзогенных факторов, воздействующих на раковые клетки.

8 Применение фукоиданазы FWf1 для изучения структуры фукоидана из *A. angusta*

Перспективность применения фукоиданаз с установленной субстратной специфичностью для установления основных структурных фрагментов фукоиданов была показана на примере фукоидана из бурой водоросли *A. angusta* (1AaF2)². Фукоидан 1AaF. был гидролизован с помощью фукоиданазы FWf1, в результате были получены высоко- и низкомолекулярные продукты (ВМП_1AaF2 и НМП_1AaF2) с выходами 45 и 42% относительно веса исходного фукоидана. Анализ моносахаридного состава фракций 1AaF2 и ВМП_1AaF2 показал, что они представляют собой галактофуканы. Для установления структур олигосахаридов, входящих в

² Фракция 1AaF2 была выделена и предоставлена для исследований сотрудниками лаборатории химии ферментов ТИБОХ ДВО РАН, к.х.н. Усольцевой Р.В. и Сурицем В.В.

состав НМП_1AaF2, данная фракция была подвергнута разделению на колонке с анионообменным носителем. В результате разделения были получены пять гомогенных олигосахаридов, для трех из них с помощью ЯМР спектроскопии установлена структура (Рисунок 19). Показано, что полученные олигосахариды отличались друг от друга количеством и расположением сульфатных групп при остатках α -L-фукозы. Полученные данные позволили установить, что фукоидан 1AaF2 из бурой водоросли *A. angusta* состоит из двух структурно различающихся полисахаридов: сульфатированного 1 \rightarrow 3-;1 \rightarrow 4- α -L-фукана и фукогалактана³. Таким образом, применение фукоидаз позволило достоверно установить некоторые структурные фрагменты, входящие в состав фракции фукоидана 1AaF2.

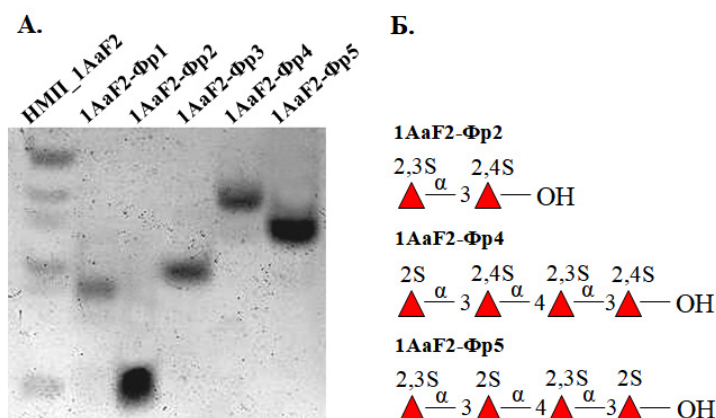


Рисунок 19 – Электрофореграмма (А) и схематическое изображение (Б) структур выделенных олигосахаридов – продуктов ферментативного гидролиза фукоидана 1AaF2, полученных с помощью фукоидазы FWf1

Анализ противоопухолевой активности нативного фукоидана 1AaF2 и его ферментативного производного ВМП_1AaF2 с помощью метода мягкого агара показал, что ВМП_1AaF2 является более эффективным ингибитором самопроизвольного образования колоний клеток SK-MEL-28 (Рисунок 20).

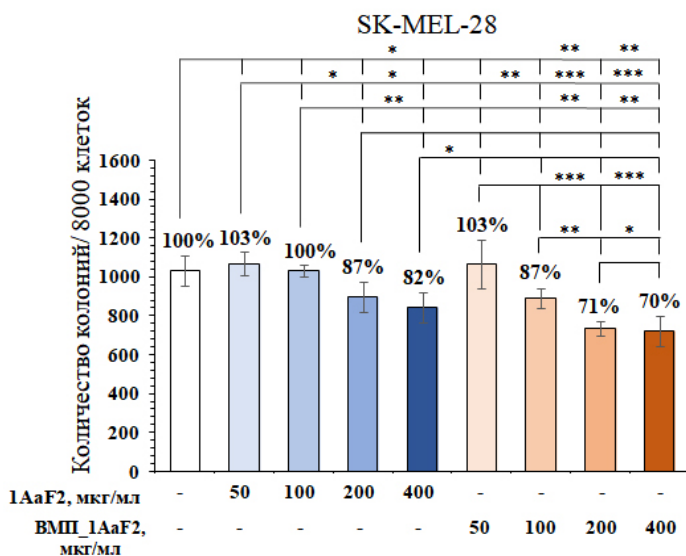


Рисунок 20 – Влияние фукоидана 1AaF2 и его высокомолекулярного ферментативного производного (ВМП_1AaF2) в различных концентрациях на самопроизвольное формирование и рост колоний клеток меланомы человека SK-MEL-28. Статистические данные представлены как \pm с.о., где $n = 3$ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

Исследуемые фракции также обладали дозозависимым канцеропреventивным действием и эффективно подавляли процесс неопластической трансформации клеток JB6 C141 и SK-MEL-28, вызванный EGF (Рисунок 21, Б и В). Различия в проявляемых противоопухолевых эффектах, вероятно, обусловлены структурными особенностями исследуемых соединений. В отличие от

³ Структурная характеристика была выполнена сотрудниками лаборатории химии ферментов Сурицем В.В., к.х.н. Усольцевой Р.В., к.х.н. Расиным А.Б., а также сотрудником лаборатории физико-химических методов исследования к.х.н. Анастюком С.Д.

устойчивой к действию фермента FWf1 фракции фукогалактана ВМП_1AaF2 исходный 1AaF2 представляет собой смесь структурно различных полисахаридов, и необходимо учитывать вклад в биологический эффект 1→3-;1→4- α -L-фукана.

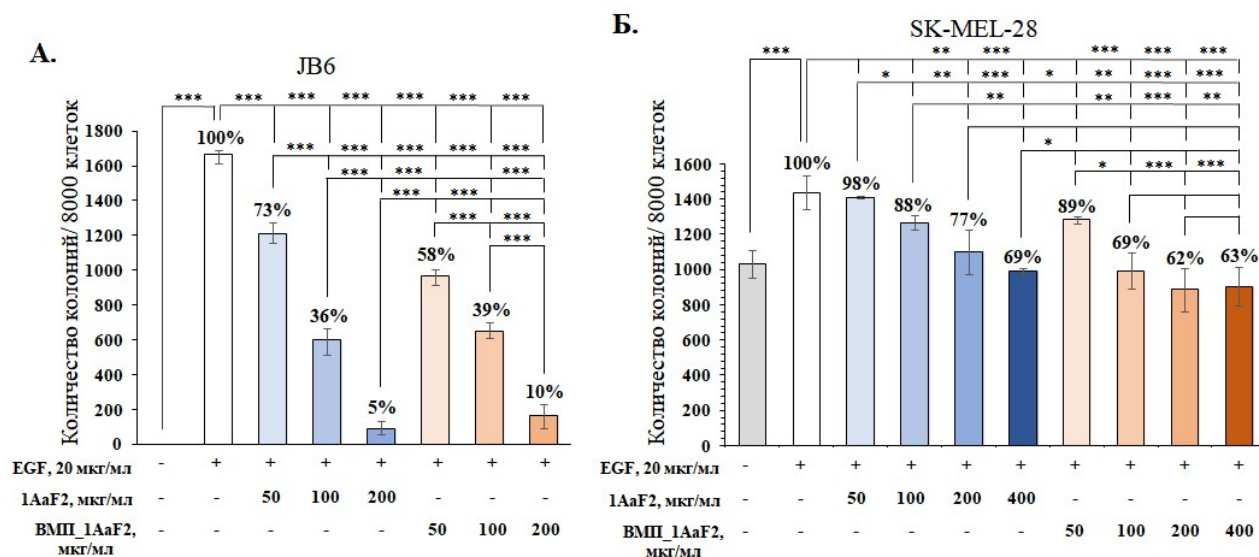


Рисунок 21 – Влияние фукоидана 1AaF2 и его высокомолекулярного ферментативного производного (ВМП_1AaF2) в различных концентрациях на формирование и рост колоний эпидермальных клеток мышцы JB6 C141 (А) и клеток меланомы человека SK-MEL-28 (Б), индуцированные EGF. Статистические данные представлены как \pm с.о., где $n = 3$ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фукоиданы обладают множеством биологических активностей, однако детали структуры, ответственные за проявляемые ими биологические эффекты, трудно установить из-за сложного и многообразного строения этих полисахаридов. Ферменты с установленным механизмом действия и субстратной специфичностью могут являться эффективными инструментами для направленного редактирования структур углеводов. Однако ферменты, действующие на фукоиданы, слабо изучены.

В данной работе для четырех фукоиданаз (FWf1–4) 107 структурного семейства гликозидгидролаз морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T были впервые изучены биохимические свойства, доменная организация их полипептидных цепей, строение их активных центров. Были впервые получены данные, демонстрирующие, что фукоиданазы семейства GH107 имеют комплексную специфичность и могут содержать различное количество углеводсвязывающих подсайтов, распознающих остатки α -L-фукозы с определенным сульфатированием в молекулах фукоиданов. Была продемонстрирована перспективность применения фукоиданаз в качестве молекулярных инструментов для установления сложных структур фукоиданов на примере фукоидана из бурой водоросли *A. angusta*.

В рамках данной работы впервые было проведено комплексное исследование противоопухолевой активности большого набора структурно различающихся продуктов ферментативного гидролиза фукоиданов, что позволило выявить некоторые элементы структур фукоиданов, обуславливающие наблюдаемые противораковые эффекты *in vitro*. Было показано, что некоторые производные проявляют высокую избирательность действия по отношению к определенным типам раковых клеток. Исследование канцеропреventивной активности

фукоиданов и их производных впервые показало, что важность определенных структурных элементов фукоиданов, ответственных за их усиленное противораковое действие, может различаться не только по отношению к различным типам раковых клеток, но и зависеть от определенных экзогенных факторов, воздействующих на раковые клетки.

Полученные результаты дают новые знания о функционировании ферментов семейства GH107 и демонстрируют перспективность применения данных ферментов как для определения сложных структур фукоиданов, так и для получения их структурных производных с улучшенными биологическими свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Штамм морской бактерии *W. fucanilytica* CZ1127^T является продуцентом как минимум четырех фукоиданаз GH107, названных нами как FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4.
2. Фукоиданазы FWf1–4 имеют мультидоменную организацию. Помимо каталитического домена исследуемые ферменты содержат по 3–4 дополнительных домена. Состав и количество этих доменов в фукоиданазе семейства GH107 различается. Состав и расположение некоторых остатков аминокислот в активных центрах фукоиданаз FWf1–4 варьируется. Эти переменные аминокислотные остатки могут отвечать за связывание в их активных центрах фрагментов фукоидана различной структуры.
3. Рекombинантные фукоиданазы имели отличия в оптимумах pH и температур. Соли различных металлов оказывали как активирующий, так и ингибирующий эффекты на ферментативную активность фукоиданаз FWf1, FWf2, FWf3 и FWf4.
4. Специфичность исследуемых фукоиданаз к различным структурам в фукоиданах обусловлена топологией их углеводсвязывающих подсайтов, количество и селективность которых различается. Рекombинантные фукоиданазы FWf1–4 катализируют гидролиз 1→4-гликозидных связей в фукоиданах, построенных преимущественно из 1→3; 1→4-связанных остатков сульфатированной α-L-фукозы. На основании анализа специфичности и типа действия исследуемые фукоиданазы классифицированы нами как эндо-α-1→4-L-фукоиданазы (шифр КФ 3.2.1.212).
5. Молекулярная масса, степень сульфатирования и расположение сульфатных групп являются важными элементами в противоопухолевых эффектах, проявляемых фукоиданом из *F. evanescens* *in vitro*. Важность вышеописанных структурных элементов переменна для различных типов раковых клеток.
6. Фукоидан, выделенный из бурой водоросли *F. evanescens*, и его ферментативные производные проявляют селективность противоопухолевого действия по отношению к разным типам опухолевых клеток.
7. Фукоиданы из *F. evanescens* и *A. angusta*, а также их ферментативные производные обладают канцеропреентивной активностью: ингибируют индуцированные EGF формирование и рост колоний нормальных и раковых клеток.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Zueva, A.O. Expression and biochemical characterization of two recombinant fucoidanases from the marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T / A.O. Zueva, A.S. Silchenko, A.B. Rasin, M.I. Kusaykin, R.V. Usoltseva, A.I. Kalinovskiy, V.V. Kurilenko, T.N. Zvyagintseva, P.D. Thinh, S.P. Ermakova // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Vol. 164. – P. 3025–3037.

2. **Zueva, A.O.** Structure and chemopreventive activity of fucoidans from the brown alga *Alaria angusta* / A.O. Zueva, R.V. Usoltseva, O.S. Malyarenko, V.V. Surits, A.S. Silchenko, S.D. Anastyuk, A.B. Rasin, H.H. N. Khanh, P. D. Thinh, S. P. Ermakova // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – Vol. 225. – P. 648–657.
3. **Zueva, A.O.** Production of high-and low-molecular weight fucoidan fragments with defined sulfation patterns and heightened *in vitro* anticancer activity against TNBC cells using novel endo-fucanases of the GH107 family / A.O. Zueva, A.S. Silchenko, A.B. Rasin, O.S. Malyarenko, M.I. Kusaykin, A.I. Kalinovsky, S.P. Ermakova // Carbohydrate Polymers. – 2023. – P. 121128.

Материалы конференций

1. **Zueva A.O.**, Silchenko A.S. Novel recombinant fucoidanase from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* // 2nd International symposium: Marine Enzyme and Polysaccharides (NhaTrang, Vietnam, Dec. 1–6, 2017). Vladivostok: Publ. House of the Far Eastern Federal University, 2017. – P. 35.– ISBN 978-5-7444-4168-5.
2. **Зуева А.О.**, Сильченко А.С., Ермакова С.П. Субстратная специфичность двух новых рекомбинантных фукоиданаз из морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* // Региональная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам (Владивосток, 16–30 апр. 2018 г.). Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2018. — С. 433–435. – ISSN 2500-3518.
3. **Zueva A.O.** The study of some catalytic properties of recombinant fucoidanases from marine bacterium *Wenyngzhuangia fucanilytica* // THE 5th ANNUAL STUDENT SCIENTIFIC CONFERENCE IN ENGLISH (Vladivostok, May. 21–24, 2018). Vladivostok: Publ. House of the Far Eastern Federal University, 2018. – P.66–67. –ISBN 978-5-7444-4316-0.
4. **Zueva A.O.**, Silchenko A.S., Ermakova S.P. Study of substrate specificity of two recombinant fucoidanase from marine bacteria *Wenyngzhuangia fucanilytica* //The 3rd International Symposium on Life Sciences (Vladivostok, Sept. 4–8, 2018). Vladivostok: Vestnik FEB RAS, 2018. – № 6. – P. 95–96. –DOI 10.25808/08697698.- 2018.202.6S.043.
5. **Зуева А.О.**, Сильченко А.С., Расин А.Б., Ермакова С.П. Фукоиданазы морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T // Объединенный научный форум, VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 1–6 окт. 2019 г.). Москва: Издательство «Перо», 2019. – научные труды том 2 – С. 271. – ISBN 978-5-00150-519-8.
6. **Зуева А.О.**, Сильченко А.С., Ермакова С.П. Изучение некоторых каталитических свойств рекомбинантных фукоиданаз морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T // Конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова (Владивосток, 11-15 сент. 2019 г.). Владивосток, 2019. – С. 91. – ISBN 978-5-91849-148-5.
7. **Зуева А.О.**, Сильченко А.С., Расин А.Б., Ермакова С. П. Сравнительная характеристика фукоиданаз из морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127^T // XVII Всероссийская молодёжная онлайн школа-конференция «Актуальные проблемы химии и биологии» (Владивосток, 7–10 сент. 2020 г.). Владивосток, 2020. – С. 13.– ISBN 978-5-91849-159-1, – DOI 10.47471/17_2020_ - 09_07_10_8.
8. **Зуева А.О.**, Сильченко А.С., Расин А.Б., Ермакова С.П. Эндо- α -1,4-L-фуканазы морской бактерии *Wenyngzhuangia fucanilytica* CZ1127 // X Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 3-8 окт. 2021 г.). Москва: Издательство «Перо», 2021. – научные труды том 2 – С. 125. – ISBN 978-5-00189-678-4.
9. **Зуева А.О.**, Сильченко А.С., Расин А.Б., Маляренко О.С., Ермакова С.П. Влияние продуктов ферментативной трансформации фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens* на энергетический метаболизм опухолевых клеток // Геномика и биотехнология микроорганизмов: Всероссийская научная молодежная конференция (Владивосток, 19–23 сент. 2022 г.). Владивосток: Изд-во ДВФУ, 2022. – С. 62. – ISBN 978-5-7444-5358-9. – DOI 10.24866/7444-5358-9.
10. **Зуева А.О.**, Сильченко А.С., Ермакова С.П. Структура и противоопухолевая активность *in vitro* ферментативных производных фукоидана из *Fucus evanescens* // VI Всероссийская конференция Фундаментальная гликобиология (Мурманск, 11–15 сент. 2023 г.). Мурманск: Изд-во МАУ, 2023. – С. 35.