

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Балабановой Ларисы Анатольевны на тему «Геномный анализ морских гетеротрофных бактерий, продуцентов щелочных фосфатаз. Структура и свойства щелочной фосфатазы семейства PhoA», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия

1. Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Л. А. Балабановой представляет собой междисциплинарное фундаментальное исследование. В ней затронуты вопросы от идентификации уникальных морских гетеротрофных бактерий-продуцентов щелочных фосфатаз (ЩФ) и их полногеномного анализа до установления структурно-функциональных и физиологических особенностей ферментов семейства PhoA, а также демонстрации биотехнологического потенциала высокоактивной щелочной фосфатазы из бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (СмАР). В ходе сравнительного анализа представителей различных таксономических групп автором были впервые выявлены отличительные свойства гидролаз и особенности метаболизма в целом, обеспечивающие адаптацию микроорганизмов к специфическим условиям морских экосистем.

Несмотря на длительную историю изучения ЩФ как ключевых ферментов фосфорного обмена, далеко не все их метаболические и регуляторные функции известны на сегодняшний день. В современной биохимии и микробиологии данные ферменты зачастую рассматриваются лишь в контексте гидролиза фосфоэфирных связей. В рецензируемой диссертационной работе этот вопрос впервые поднят на фундаментальном уровне. Автор аргументированно доказывает, что функциональная роль ЩФ выходит далеко за рамки простого обеспечения клеток неорганическим фосфатом. В данном исследовании впервые показана универсальная регуляторная роль бактериальной ЩФ PhoA в поддержании клеточного гомеостаза и контроле уровня окислительного стресса, которая заключается в перепрограммировании живых систем различного уровня организации – от клеток до целых организмов (бактерии, растения, животные) – с про-окислительного метаболизма на режим антиоксидантной защиты. Несмотря на то, что конкретные внутриклеточные каскады у бактерий и клеточных линий эукариот, опосредующие этот регуляторный сигнал, еще предстоит детально расшифровать в будущем, обнаруженный автором феномен носит фундаментальный общебиологический характер. Так, у трансгенных растений ЩФ PhoA морской бактерии *in planta* индуцирует системный адаптационный ответ в виде активации экспрессии антиоксидантных

ферментов и биосинтеза защитных метаболитов (полифенолов, пролина). Способность ЩФ PhoA дефосфорилировать бактериальные эндотоксины (ЛПС) и регулировать внеклеточный пул пуринов (в том числе люминального АТФ), подобно кишечной ЩФ IAP, является ключевым противовоспалительным фактором в животной модели воспаления кишечника. Выявление подобной функциональной гомологии позволяет использовать бактериальный фермент ЩФ PhoA в качестве доступной и высокоэффективной модели для изучения особенностей метаболизма более сложных организмов и их микробиомов.

Изучение ферментативных систем морских организмов продиктовано необходимостью понимания механизмов их адаптации к условиям среды. В связи с этим проведение детальных структурно-функциональных исследований морских бактериальных ЩФ семейства PhoA позволяет выявить связь между пространственной организацией молекул и их каталитическими свойствами. Обладая уникальной каталитической активностью и стабильностью, ферменты морского генеза открывают широкие перспективы для биомедицины, молекулярной диагностики и фармации. Системный подход автора, сочетающий сравнительную геномику, энзимологию, верификацию метаболических функций на растительных и животных моделях *in vivo*, обеспечивает комплексное решение важной научно-практической задачи по определению биологической роли и терапевтического потенциала морских фосфатаз.

2. Научная новизна работы и полученных результатов

Научная новизна диссертации заключается в масштабном междисциплинарном подходе на стыке сравнительной геномики, биоинформатики, молекулярной биологии и энзимологии. На основе скрининга уникальной коллекции морских микроорганизмов КММ ТИБОХ автором впервые:

Установлена таксономическая новизна. Описаны новые виды и штаммы морских бактерий типов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Проведена строгая полногеномная реклассификация родов морских гамма-протеобактерий *Pseudoalteromonas* и *Cobetia*. Открыт новый род морских альфа-протеобактерий и описан его первый представитель - типовой вид *Rhodalgimonas zhirmunskyi*, названный в честь основателя Института биологии моря (ИБМ, ныне ННЦМБ ДВО РАН) Алексея Викторовича Жирмунского.

Расширена геномика морских бактериальных продуцентов. Предсказаны метаболические пути, картированы генные кластеры пигментированных фенотипов. Обоснован потенциал синтеза осмолитов, антимикробных соединений и иммуносупрессоров.

Проведено функциональное аннотирование новых генов ЩФ и других ферментов. В ходе работы были получены рекомбинантные формы целевых ферментов штаммов морских бактерий (щелочных фосфатаз, гликозидаз и протеаз), а также осуществлена их детальная биохимическая характеристика. Выявлены уникальные каталитические и кинетические свойства морских бактериальных изоформ гидролаз, в том числе щелочных фосфатаз. Полученные экспериментальные данные позволили верифицировать результаты биоинформатического анализа и валидировать аннотацию обнаруженных новых гомологов ЩФ. Кроме того, автором выполнена структурная классификация ЩФ у наиболее распространённых групп морских гетеротрофных бактерий различных таксонов (типы *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*). Согласно филогенетическому анализу, ферменты с общей функциональной аннотацией ЩФ представляют собой самостоятельные эволюционные линии, указывающие на адаптацию каталитического аппарата к утилизации фосфора в морских экосистемах.

Создан новый биоинформатический инструмент анализа генных кластеров. Разработано авторское программное приложение Syntenome для автоматического анализа генетического контекста и визуализации синтенемии генных кластеров ферментов и белков в формате GTF. С помощью приложения впервые проведен анализ генного окружения моноцистронных ЩФ морских бактерий рода *Cobetia*.

Описана уникальная геномная организация и состав генных кластеров ЩФ. В рамках изученных геномов впервые идентифицирован видо- и штаммоспецифический характер распределения и копияности моноцистронных ЩФ разных семейств PhoA, PhoD, PhoX, PafA, представляющих собой независимые гомологичные эволюционные линии в рамках суперсемейства ЩФ. При этом установлено, что присутствие ферментов семейств PhoA и PafA является исключительно штаммовой особенностью: они чаще всего представлены в виде уникальных однокопийных генов (синглтонов) на фоне мультикопийных семейств PhoD/PhoX. Картированы уникальные генные кластеры, связывающие ген ЩФ PhoA с регуляторами клеточного деления, нуклеотидного обмена и НАД⁺-зависимым Na⁺-транслоцирующим Rsx(Rfn)-комплексом, сопряженным с электрон-транспортной цепью.

Сформулирована концепция метаболической специализации ЩФ разных семейств. На основе полногеномного анализа метаболических путей предсказано участие ЩФ PhoA в биосинтезе НАД⁺(НАДН) через дефосфорилирование НАДФ⁺(НАДФН) (Запасной путь биосинтеза (реутилизации) НАД). Показана сопряженность генов других ЩФ внутри одного генома (PhoD, PhoX и PafA), представляющих собой независимые гомологичные эволюционные линии в рамках суперсемейства ЩФ, с альтернативными комплексами электрон-транспортной цепи. Выявлено, что их число коррелирует с НАД⁺-зависимыми

мембранными оксидоредуктазами разных семейств, указывая на вероятную роль ферментов как специализированных регуляторов редокс- и осмотического баланса при различных типах метаболизма бактерий.

Обоснована универсальная регуляторная роль ЩФ семейства *PhoA* в купировании про-окислительных процессов в живых системах: На основе анализа синтении хромосомных генных кластеров (ГК) морских бактерий предложен фундаментальный механизм сопряжения гена ЩФ *PhoA* с НАД⁺-зависимым Na⁺-транслоцирующим Rsx(Rfn)-комплексом, обеспечивающим поддержание редокс-гомеостаза для защиты бактериальной клетки от деполяризации мембраны при осмотическом и окислительном стрессе. Направленная верификация данной функции в эукариотических системах доказала универсальный характер потенциала фермента. Автор впервые наглядно продемонстрировал, что на уровне макрофизиологии результат действия ЩФ *PhoA* идентичен для обоих царств эукариот — и у растений, и у животных действие ЩФ меняет экспрессию генов макроорганизма, что в конечном итоге приводит к сохранению целостности клеточных и тканевых барьеров в условиях жесткого окислительного стресса. Установлено, что на животной модели патологии ЖКТ противовоспалительный эффект ЩФ семейства *PhoA* морской бактерии реализуется через дефосфорилирование ЛПС и сигнальных пуринов, убирая молекулярные триггеры активации иммунных клеток (в частности, макрофагов), что переключает их метаболизм из агрессивного про-окислительного состояния (продукция цитокинов и АФК) на режим функционального покоя. На сегодняшний день известно, что лишенные стимуляции макрофаги (фенотип M2) запускают в клетках эпителиальной ткани экспрессию генов, ответственных за регенерацию барьера и заживление повреждений. В трансгенной растительной системе (табак *Nicotiana tabacum*) этот же потенциал ЩФ *PhoA* морской бактерии экспериментально подтвержден как на молекулярно-генетическом уровне — через превентивную индукцию экспрессии стресс-индуцируемых генов и активацию систем антиоксидантной защиты, так и на уровне фенотипа, что выражается в достоверном снижении степени деструкции мембран и блокировании избыточной утечки электролитов в условиях абиотического стресса. Таким образом, ЩФ участвует в «активации регенеративных генетических программ» через модуляцию микроокружения.

3. Значимость результатов для науки и практики

Полученные данные существенно расширяют фундаментальные представления сравнительной биохимии о структурном разнообразии и каталитических механизмах

ферментов фосфорного обмена у гидробионтов. На стыке геномики и энзимологии сформирован новый массив знаний о путях адаптации морских бактериальных систем. Разработаны технологические основы для получения высокоактивных рекомбинантных ферментов и бифункциональных полипептидов на их основе. Данные продукты перспективны для разработки диагностических тест-систем (например, в онкодиагностике), создания противозндотоксиновых агентов и использования в зеленой биотехнологии.

4. Структура, объем и содержание работы

Диссертация построена по классическому принципу, изложена на высоком академическом уровне, содержит достаточный объем графического и табличного материала.

Введение четко определяет аппарат исследования, его цель, задачи и положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы демонстрирует глубокую эрудицию автора в области геномики морских микроорганизмов и биохимии фосфатаз гидробионтов.

Материалы и методы включают передовой методологический комплекс (NGS-секвенирование, направленный мутагенез, хроматографию, биоинформатический анализ, а также валидацию на моделях *in planta* и *in vivo*).

Результаты и их обсуждение логичны, аргументированы и полностью подтверждают заявленные гипотезы. Каждая глава завершается обоснованными промежуточными выводами.

5. Степень обоснованности и достоверности выводов

Достоверность результатов не вызывает сомнений. Она обеспечена использованием сертифицированного прецизионного оборудования, корректным применением методов статистического анализа, а также широким объемом экспериментальной выборки. Выводы и практические рекомендации логически вытекают из полученных данных и полностью соответствуют поставленным задачам. Результаты работы прошли масштабную апробацию на всероссийских и международных конференциях. Главные положения диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и RSCI (список ВАК РФ).

6. Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям, результатам и выводам диссертационного исследования.

7. Замечания и дискуссионные вопросы

Работа выполнена на высоком научном уровне, однако в качестве дискуссии хотелось бы уточнить следующие моменты:

1. *Биоинформатический аспект:*

- Для автоматического анализа генетического контекста автором было разработано оригинальное программное приложение Syntenome. В чем заключаются принципиальные преимущества этого инструмента при анализе хромосомных генных кластеров по сравнению с существующими мировыми платформами для поиска синтении (такими как antiSMASH или тулбоксы NCBI)?

2. *Вопрос по сравнительной геномике и адаптации:*

- Согласно проведенному филогенетическому анализу, семейства ЩФ (PhoA, PhoD, PhoX, PafA) представляют собой самостоятельные эволюционные линии. Чем экологически и физиологически обусловлено одновременное присутствие столь широкого разнообразия семейств ЩФ в одном геноме у морских гетеротрофных бактерий (в частности, у рода *Cobetia*)? Исключает ли их синтенемическая обособленность функциональную избыточность в условиях дефицита фосфора в морской среде?

3. *Эволюционно-физиологический аспект:*

- В дополнительных материалах Таблице A5 указано, что у глубоководной гамма-протеобактерии *Moritella uyanosii* регулятор транскрипции ЩФ PhoA относится к системе мембранного стресса MtrAB, а не к классическому «фосфорному» регулону PhoB, как у бактерии *E. coli*. Как, по мнению автора, соотносятся между собой трофическая функция PhoA (минерализация органического фосфора) и её мембрано-протекторная роль в экстремальных условиях океана (высокое давление, низкие температуры)? Какая из этих функций является первичной с эволюционной точки зрения?

4. *Цитологический и патофизиологический аспект:*

- Автор постулирует, что на макрофизиологическом уровне действие ЩФ семейства PhoA морской бактерии идентично для обоих царств эукариот — и у растений, и у животных фермент активирует регенеративные генетические программы. За счет каких универсальных межклеточных сигналов достигается этот эффект, учитывая принципиальные различия в организации иммунной системы и тканевых барьеров у животных и растений?

5. *Оформление:* В тексте работы, таблицах и подписях к рисункам встречаются единичные опечатки и стилистические неточности. В частности, в Табл. 10 в строке «Источник выделения» не указаны видовые названия животных, характеристики морской воды, из которой выделялись бактерии, (место, глубина и т.д). В табл. A1 источник

выделения (вторая колонка) почему-то указан по-английски. Тем не менее, все эти недочеты не снижают общую высокую научную ценность диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Балабановой Ларисы Анатольевны «Геномный анализ морских гетеротрофных бактерий, продуцентов щелочных фосфатаз. Структура и свойства щелочной фосфатазы семейства PhoA» является законченным междисциплинарным фундаментальным исследованием полного цикла, вносящим крупный вклад в отечественную биохимию и морскую биотехнологию.

По своей актуальности, научной новизне, практической значимости, объему и уровню проведенных исследований диссертация полностью отвечает требованиям пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук. Её автор, Балабанова Лариса Анатольевна, безусловно заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4 – Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук по специальности 03.00.11 - эмбриология, гистология и цитология, чл.-корр. РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, д. 17.
Тел. 8 423 2310905; E-mail: idolmatov@mail.ru

Долматов Игорь Юрьевич

Подпись И.Ю. Долматова заверяю.

Дата: 21.08.2026

