

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи



Балабанова Лариса Анатольевна

**ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МОРСКИХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ,
ПРОДУЦЕНТОВ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ.
СТРУКТУРА И СВОЙСТВА ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ СЕМЕЙСТВА PhoA**

1.5.4 – Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Владивосток – 2026

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

Официальные оппоненты:

Долматов Игорь Юрьевич, доктор биологических наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, член-корреспондент РАН, директор федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук (ННЦМБ ДВО РАН)

Ильина Елена Николаевна, доктор биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, член-корреспондент РАН, профессор РАН, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией геномных исследований и вычислительной биологии федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора)

Нижников Антон Александрович, доктор биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика, профессор РАН, заведующий кафедрой, профессор кафедры генетики и биотехнологии биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (ФГБОУ ВО СПбГУ)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ФИЦ СНЦ РАН).

Защита состоится «17» сентября 2026 г. в 10.00 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: dissovet@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 « » 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
к.б.н.



Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Морские гетеротрофные бактерии широко распространены в различных таксонах и экологических нишах Мирового океана и характеризуются внутривидовым генотипическим и фенотипическим разнообразием. Способность к существованию в условиях с разной аэрацией, температурой, соленостью и источниками питания ведет к расширению их местообитаний и арсенала альтернативных метаболических путей. Исследование геномов и метаболических путей морских микроорганизмов, структурного разнообразия и функций их ферментов является актуальным, поскольку дает представление об основных механизмах адаптации к быстро меняющимся условиям окружающей среды. Особого внимания заслуживают психрофильные и галотолерантные ферменты морских бактерий. В их числе – бактериальные щелочные фосфатазы (ЩФ, КФ 3.1.3.1), полифилетическая группа неспецифичных внеклеточных ферментов, катализирующих гидролиз сложных эфиров фосфорной кислоты по механизму образования ковалентной связи между каталитическим остатком Ser и субстратом с высвобождением PO_4^{2-} и спирта или фенола в качестве продуктов реакции при pH 6,0-11,0. Они играют важную роль во многих клеточных процессах, включая деградацию и синтез биомолекул. Последние исследования ЩФ направлены на выявление молекулярных механизмов их действия и биологических функций. Особый интерес представляют ЩФ патогенов, поскольку они являются потенциальными мишенями в борьбе с инфекциями. Существенным пробелом остается понимание зависимости свойств ЩФ от структуры, локализации и регуляции их генов, а также их влияния на организм хозяина и его микробиом. Кроме того, представление о разнообразии и распространении бактериальных ЩФ ограничено, поскольку у многих штаммов отсутствуют полногеномные исследования генов ЩФ и метаболических путей, в которых эти ферменты участвуют.

Бактериальные ЩФ катализируют гидролиз фосфомоноэфирных связей в ДНК, РНК, нуклеотидах, углеводах, липидах, белках, полифосфатах и пирофосфатах. Благодаря общему происхождению, сходству 3D-структур и механизмов действия представители суперсемейства ЩФ могут проявлять перекрестную каталитическую специфичность в отношении сульфатов, фосфоди- и триэфиров, включая нейротоксины (P-O-C). Показано, что ЩФ способствуют конкуренции бактерий с грибами посредством регуляции метаболических путей, инициируют разрушение бактериальных биопленок и минерализацию экзоскелета беспозвоночных, а также участвуют в биоремедиации тяжелых металлов и органических загрязнений. Кроме того, реминерализация органофосфатов в условиях дефицита биодоступного неорганического фосфата (P_i) необходима морским бактериям для осморегуляции, осуществляемой, по последним данным, за счет взаимодействия с хемиосмотическими катионами Na^+/H^+ в периплазме и запасания P_i в виде полифосфатов (polyP) в цитозоле. Индуцированный синтез polyP и активность ЩФ способствуют кристаллизации апатитов и фосфоритов, формирующих геологические породы. Таким образом, микробные ЩФ имеют глобальное биогеохимическое значение, являясь одними из самых распространенных ферментов в почвах и водах Мирового океана.

На сегодняшний день бактериальные ЩФ классифицируют по первичной структуре на семейства PhoA, PhoX, PhoD и PafA. К семейству PhoA относятся классические Mg^{2+}/Zn^{2+} -зависимые ЩФ *Escherichia coli* и человека. Структуры, подобные Ca^{2+} -активируемой ЩФ PhoX из *Vibrio cholerae*, оказались наиболее распространенными среди различных таксонов морских бактерий. Ферменты PhoD с преобладающей фосфодиэстеразной активностью и биметаллическим кофактором $Ca^{2+}(Co^{2+}, Cu^{2+})/Fe^{3+}$ считаются экологическими маркерами почвенных бактерий. Ca^{2+} -зависимая ЩФ PafA, обнаруженная у флавобактерий (*Bacteroidota*), выделенных из растений, может проявлять фосфодиэстеразную активность, но отличается от ортологов нечувствительностью к высоким концентрациям P_i . По метагеномным данным, ЩФ PhoA редко встречается в морских изолятах *Bacteroidota* и

гамма-протеобактерий, однако, согласно другим источникам, обнаруживается во всех зонах океанических бассейнов в периоды цветения фитопланктона.

ЩФ PhoA широко распространены в природе; их структурные аналоги у человека кодируются четырьмя паралогами, экспрессирующимися в различных тканях. Они отличаются по степени идентичности (50–98 %) и типу гликозилирования, однако их физиологические функции до конца не выяснены. Важнейшими задачами наиболее древнего по происхождению кишечного изофермента IAP являются связывание и дефосфорилирование липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий и других медиаторов воспаления, а также поддержание барьерной функции эпителия и микробного гомеостаза. Дефицит ЩФ у человека служит причиной ряда патологий, включая метаболический синдром, фиброз печени, ишемическую болезнь сердца и остеопороз; повышенный уровень ЛПС коррелирует с риском развития рака печени и колоректального рака. Несмотря на консервативность механизма, ЩФ млекопитающих характеризуются более высокой каталитической эффективностью за счет снижения аффинности к фосфату (K_m), а также более щелочным рН-оптимумом в сравнении с бактериальными ферментами. Однако ЩФ PhoA морской бактерий *Cobetia amphilecti* (CmAP) и ее структурный прототип из *Vibrio splendidus* (VAP) обладают сопоставимыми показателями, при этом сохраняя высокую активность в мономерной форме и при пониженных температурах. Простота получения рекомбинантных белков, не требующих гликозилирования, делает ЩФ морских бактерий перспективными функциональными аналогами для медико-биотехнологических задач.

Таким образом, объектом исследования выступает ЩФ семейства PhoA морских гетеротрофных бактерий, обладающая значительным регуляторным и биотехнологическим потенциалом. Вопросы её структурного разнообразия, филогенетического распределения и функциональной роли не могут быть в полной мере раскрыты без сравнительного и пангеномного анализа различных таксонов, выявившего избыточность паралогов всего многообразия семейств ЩФ в составе единого генома. В работе впервые реализован комплексный подход: от идентификации продуцентов гидролаз и реконструкции метаболических путей до получения рекомбинантных форм PhoA и установления их свойств *in silico*, *in vitro*, *in planta* и *in vivo*. Выявление молекулярных механизмов их действия и специфической роли в регуляции метаболического статуса и редокс-гомеостаза позволяет обосновать потенциал их применения в биомедицине и агrobiотехнологиях.

Целью настоящей работы является сравнительное полногеномное исследование морских гетеротрофных бактерий – продуцентов гидролитических ферментов и множественных гомологов щелочных фосфатаз (на примере представителей *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*), а также комплексная характеристика щелочных фосфатаз семейства PhoA, направленная на установление их метаболической функции и создание рекомбинантных аналогов для использования в биотехнологии, сельском хозяйстве и медицине.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие задачи:

1. Выполнить полногеномное секвенирование новых изолятов и типовых штаммов морских гетеротрофных бактерий из различных акваторий Тихого океана, провести комплексный таксономический анализ для уточнения их классификации.
2. Проанализировать метаболические пути, провести поиск гомологов и ортологов ЩФ структурного семейства PhoA для их функциональной аннотации в геномах исследуемых штаммов представителей морских *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*.
3. Провести филогенетический анализ кодирующих последовательностей (CDS) генов ЩФ для исследуемых штаммов морских бактерий *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*.
4. Выполнить анализ генных кластеров и оперонной структуры различных структурных семейств ЩФ для прогнозирования их функциональной роли.
5. Получить рекомбинантные аналоги ключевых гидролитических ферментов (ЩФ, нуклеазы, протеазы, гликозидазы) из некоторых штаммов морских бактерий для подтверждения функциональной аннотации и исследования их свойств.

6. Получить рекомбинантные и трансгенные продуценты референтной высокоактивной ЩФ структурного семейства PhoA из морской гамма-протеобактерии *C. amphilecti*.
7. Изучить физико-химические, ферментативные и биохимические свойства ЩФ PhoA *C. amphilecti* в экспериментах *in vitro*, *in vivo* и *in silico*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплексный анализ фенотипических и полногеномных данных позволил охарактеризовать более 100 изолятов морских аэробных гетеротрофных бактерий, в том числе описать новые виды представителей *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Обнаруженные признаки геномной и фенотипической диверсификации морских бактерий послужили обоснованием пересмотра таксономической классификации гамма-протеобактерий родов *Pseudoalteromonas* и *Cobetia*, и флавобактерий рода *Arenibacter*. Впервые описан новый род альфа-протеобактерий *Rhodalgimonas*, ассоциированный с красной водорослью *Ahnfeltia tobuchiensis*.
2. На основе сравнительного анализа геномов и пангеномов морских протеобактерий (*Pseudomonadota*) и флавобактерий (*Bacteroidota*) определены ключевые и уникальные метаболические пути, наборы углеводов-активных ферментов (CAZymes) и биосинтетические генные кластеры (БГК), ответственные за фенотипические отличия и адаптацию близкородственных штаммов к морским эконишам. Установлено, что биотехнологический потенциал исследуемых бактерий связан с синтезом гидролитических ферментов, метаболитов антимикробного, иммуносупрессивного и осморегуляторного действия, а также защитных пигментов (арилполиенов и меланинов).
3. Функциональная аннотация кодирующих последовательностей (CDS) гидролитических ферментов – щелочных фосфатаз, нуклеаз, протеаз и гликозидаз – подтверждена каталитической активностью их рекомбинантных аналогов. Определен биотехнологический потенциал психрофильных и галотолерантных ферментов морских бактерий. Разработанные системы гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli*, псевдомонад, микромицетов и растениях табака обеспечивают эффективный биосинтез целевых белков, обладающих высоким потенциалом для использования в молекулярной биологии и биотехнологии.
4. Полногеномный анализ морских представителей *Pseudomonadota* и *Bacteroidota* выявил множественность генов щелочных фосфатаз (от 2 до 9 копий), представленных независимыми гомологичными линиями PhoA, PhoD, PhoX и PafA, а также их внутригеномными паралогами. Распределение и разнообразие систем щелочных фосфатаз коррелирует с таксономической принадлежностью и экологической нишей штаммов, достигая максимума у флавобактерий, ассоциированных с макрофитами. Установлено, что щелочная фосфатаза семейства PhoA является штаммо- или видоспецифическим признаком морских аэробных гетеротрофов, ассоциированных с эукариотами. Структурные особенности морских гомологов PhoA (конформационная пластичность) обеспечивают адаптацию бактерий к условиям среды за счет сохранения каталитической эффективности при низких температурах и высокой ионной силе.
5. Разработанное веб-приложение Syntenome для визуализации и сравнительного анализа генетического контекста позволяет идентифицировать локализацию целевых последовательностей и прогнозировать функции белков на основе их синтенного окружения. Установлено, что ген rhoA в хромосомах морских гетеротрофов локализован в составе кластера мембранного R_{sx}-комплекса (Na⁺-транслоцирующей ферредоксин:НАД(+)-оксидоредуктазы). На основе биоинформатического анализа метаболических путей обоснована гипотеза об участии внеклеточной ЩФ PhoA в регенерации пула кофермента НАД⁺ для обеспечения работы R_{sx} комплекса, что указывает на вовлеченность фосфатаз в регуляцию окислительно-восстановительного баланса и энергетического метаболизма клетки.

6. Установлено, что гены гомологов ЩФ PhoD, PhoX и PafA локализованы в окружении генов альтернативных оксидоредуктаз и мембранных белков, участвующих в различных стратегиях получения энергии. Обнаруженная корреляция между количеством генов ЩФ в геноме и числом биосинтетических кластеров, ответственных за разные типы энергетического обмена, указывает на участие ЩФ в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза. Моноцистронная организация генов ЩФ предполагает наличие сложных систем дифференциальной регуляции этих ферментов в ответ на изменение редокс-условий среды. Кроме того, установлено, что ЩФ PhoA морской бактерии способна подавлять формирование биопленок, регулируя плотность популяции патогенов. Данный эффект подтверждает роль ЩФ как ключевых медиаторов адаптационной пластичности, координирующих метаболизм и коллективное поведение бактерий.

7. Высокоактивная ЩФ семейства PhoA морских бактерий является перспективным биотехнологическим инструментом благодаря высокой каталитической эффективности и технологичности получения рекомбинантных форм. В составе химерных конструкций фермент эффективно выполняет роль репортерной метки для мониторинга очистки и анализа свойств специфических лиганд-связывающих белков. Применимость ЩФ PhoA в качестве высокочувствительного детектора подтверждена при разработке диагностических систем для детекции иерсиниозов методом ИФА, а также при скрининге онкомаркеров в твердофазном лектин-ферментном анализе (ТЛФА).

8. Установлено высокое функциональное сходство ЩФ PhoA морской бактерии *S. amphilecti* (SmAP) и тканеспецифических ЩФ млекопитающих по каталитическим параметрам, субстратной специфичности и чувствительности к низкомолекулярным ингибиторам (5 азаиндолам). Способность SmAP к детоксикации липополисахаридов (ЛПС) и снижению уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6) обосновывает её применение в качестве функционального аналога кишечной ЩФ человека в экспериментальных моделях патологий, связанных с нарушением барьерной функции кишечника и системной эндотоксемией. Биохимическое подобие прокариотических и эукариотических ЩФ семейства PhoA позволяет рассматривать морской фермент как перспективный агент для выявления метаболических путей ЩФ в реакциях иммунного ответа, а также для разработки методов профилактики и терапии процессов, ассоциированных с дефицитом эндогенных фосфатаз.

9. На основании общности происхождения и функций ЩФ семейства PhoA предложен универсальный механизм их противовоспалительного действия, основанный на метаболическом перепрограммировании клеток. Механизм включает каскадное дефосфорилирование внеклеточных медиаторов воспаления – пуринов (АТФ, АДФ, АМФ) до антивоспалительного аденозина и детоксикацию PAMP/DAMP (в частности, ЛПС). Это приводит к блокированию TLR-NF-kB-зависимых путей и ингибированию НАДФН-оксидаз (NOX1, NOX2), что подавляет оксидативный стресс и обеспечивает переход клетки от анаэробного гликолиза к окислительному фосфорилированию. Данный процесс способствует восстановлению целостности биомембран и снижению проницаемости тканевых барьеров.

10. Гетерологичная экспрессия гена ЩФ PhoA морской бактерии *S. amphilecti* в растениях табака обеспечивает выраженный ростостимулирующий эффект и повышает устойчивость к абиотическим стрессам (дефициту фосфата, засолению, оксидативному стрессу). Установлено, что бактериальная ЩФ индуцирует биосинтез антиоксидантных ферментов и защитных вторичных метаболитов, предотвращая деградацию биомембран и неконтролируемую утечку электролитов. Полученные результаты обосновывают применимость морских ЩФ для разработки биотехнологических стратегий повышения стрессоустойчивости и продуктивности сельскохозяйственных культур.

Научная новизна и практическая ценность работы.

Впервые реализован комплексный подход к масштабному скринингу продуцентов ЩФ коллекции морских микроорганизмов (КММ ТИБОХ). Открыты и описаны новый род и ряд новых видов морских аэробных гетеротрофных бактерий *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*.

Проведена полногеномная таксономическая реклассификация исследованных штаммов и актуализация данных в NCBI.

Впервые установлены профили метаболических путей, выявлены штаммоспецифические биосинтетические генные кластеры (БГК) арилполиенов и резорцина, ответственные за каротиноидный фенотип штаммов, а также родоспецифичные БГК осмолитов, антимикробных метаболитов и иммуносупрессоров. Получены и охарактеризованы новые рекомбинантные ферменты морских бактерий (ЩФ, гликозидаз, протеаз), подтвердившие точность геномных аннотаций; выявлены их уникальные физико-химические свойства и обоснован биотехнологический потенциал.

Впервые проведено сравнительное полногеномное исследование разнообразия семейств ЩФ у морских *Pseudomonadota* и *Bacteroidota*. Установлено, что семейство PhoA является штаммоспецифическим признаком бактерий, ассоциированных с эукариотами, а его кластеризация отражает таксономическую иерархию. Разработано оригинальное программное веб-приложение Syntenome для анализа синтении геномного окружения целевых последовательностей в формате GTF. На основе анализа генетического контекста впервые обоснована регуляторная роль ЩФ PhoA в обеспечении осмотического и редокс-гомеостаза (Rsx-комплекс), регуляции клеточного цикла и участии в альтернативном пути генерации НАД⁺(Н) из НАДФ⁺(Н). Показано, что моноцистронные гены других семейств ЩФ локализованы в хромосомных кластерах альтернативных оксидоредуктазных комплексов. Впервые обнаружено участие ЩФ PhoA в механизмах регуляции социального поведения бактерий: дозозависимое влияние фермента на процессы формирования биопленок, плотность клеточной популяции и хемотаксис.

Впервые на модели трансгенных растений *Nicotiana tabacum* обнаружен ростостимулирующий эффект бактериального гена *phoA*; показано повышение устойчивости растений к фосфатному голоданию, солевому и окислительному стрессам. Раскрыты молекулярные механизмы участия ЩФ в модуляции антиоксидантного статуса и экспрессии стресс-индуцируемых генов; доказано, что фермент инициирует переход клеток на адаптивный метаболизм. Экспериментально подтверждено противовоспалительное действие рекомбинантной ЩФ *S. amphilecti* (SmAP) на модели хронического колита у мышей; на основе анализа структуры и лигандов обоснована концепция общего происхождения и функциональной аналогии ЩФ семейства PhoA прокариот и эукариот. Впервые показано дозозависимое ингибирующее действие ЩФ PhoA на линии карциномы (T-47D) и аденокарциномы (MDA-MB-231) молочной железы. Обоснована возможность использования высокоактивных ЩФ семейства PhoA морских бактерий в качестве универсальной ферментативной модели для скрининга ингибиторов aberrантной активности ЩФ человека.

На основе высокоактивной ЩФ PhoA предложен метод мониторинга очистки белков и разработаны чувствительные тест-системы для детекции маркеров онкологических заболеваний и бактериальных инфекций. Результаты исследования обосновывают использование морских ЩФ в качестве перспективных агентов для разработки новых биофармацевтических препаратов и систем адресной диагностики. Созданы генетические конструкции и штаммы-продуценты для получения препаратов ЩФ, свободных от эндотоксинов. Разработанное программное обеспечение и методология комплексного исследования ферментов внедрены в образовательный процесс Передовой инженерной школы ДВФУ и могут быть интегрированы в профильные учебные курсы по биохимии, микробиологии, биотехнологии и биоинформатике для вузов РФ.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых научных журналах: *Biomedicines*, *Biomolecules*, *International Journal of Molecular Sciences*, *Molecules*, *Microorganisms*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *Marine Biotechnology (NY)*, *Agronomy*, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *Frontiers in Microbiology*, *Horticulturae*, *Plants*, *Journal of Plant Growth Regulation*, *Life*, *Journal of Fungi*, *Fish & Shellfish Immunology*, *Applied Sciences*, *Marine Drugs*, *Environmental Science: Processes and Impacts*, *Plasmid*, *Food Control*, *Critical Reviews in Biotechnology*, *Data in Brief*, *Acta*

Naturae, Биология моря, Биоорганическая химия, Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, Хранение и переработка сельхозсырья, Вестник ДВО РАН. Общий список работ автора включает 207 публикаций (РИНЦ), включая 60 статей, индексируемых в Web of Science и Scopus, в том числе по теме диссертации опубликовано 55 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Апробация работы. Основные результаты диссертации представлены и обсуждены на международных и всероссийских форумах, в том числе: на съездах биохимиков России и физиологов СНГ (Сочи-Дагомыс, 2016) и биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); на международных конференциях FEBS-EMBO (Париж, 2014), Clinical Proteomics (Москва, 2017) и Marine Diversity (MDPI, Базель, Швейцария, 2024); симпозиумах Marine Enzyme and Polysaccharides (Нячанг, Вьетнам, 2018, 2023), Life Sciences (Владивосток, 2018) и Biodiversity (Буон Ма Тхуот, Вьетнам, 2021); форуме по компьютерному моделированию FIT-M (Москва, 2022); конференциях имени Д.И. Менделеева (Тюмень, 2025), академиков Г.Б. Елякова (Владивосток, 2019) и Л.К. Эрнста (Дубровицы, 2019). Материалы работы докладывались на профильных симпозиумах «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015) и «Фундаментальная гликобиология» (Владивосток, 2016); на всероссийских школах-конференциях по генетическим ресурсам, углеводным детерминантам и технологиям микроорганизмов (Санкт-Петербург, Саратов, Владивосток, 2014–2025 гг.). Исследования, вошедшие в диссертацию, выполнены в ТИБОХ ДВО РАН в рамках государственного задания по теме «Исследование молекулярно-генетических механизмов действия и терапевтического потенциала бактериальных ферментов морского происхождения», а также гранта Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-1052) по развитию биоресурсной коллекции «Коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН» для реализации Федеральной программы развития генетических технологий. Соискатель являлся руководителем и основным исполнителем грантов программ фундаментальных исследований ДВО РАН (проекты № 12-III-A-05-064, 12-III-A-05-059) и РФФИ (№ 12-04-00825-а, 14-04-00696), посвященных изучению механизмов адаптации термолабильных ферментов и структурно-функциональных особенностей морских лектинов. Результаты работы ежегодно докладывались на отчетных сессиях ТИБОХ ДВО РАН. Значительная часть результатов получена на базе молодежной лаборатории «Рекомбинантные ДНК-технологии» ПИШ ДВФУ в ходе выполнения государственного задания Минобрнауки России (№ ФЗНС-2022-0015) по разработке препаратов на основе высокоактивной щелочной фосфатазы для *in vitro* диагностики и прототипов противовоспалительных лекарственных средств.

Личный вклад автора. Работа выполнена в Лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН. Личный вклад автора является определяющим на всех этапах исследования – от постановки фундаментальной проблемы, разработки концепции и программы экспериментальных работ до обобщения полученных результатов и формулировки научных выводов. Автором лично обоснованы методологические подходы к структурно-функциональному анализу морских белков и их гетерологической экспрессии. В ряде междисциплинарных исследований автор выступал постановщиком задач и руководителем работ, что отражено в соавторстве. Под научным руководством автора сформировано направление по изучению молекулярного разнообразия и биотехнологического применения морских гидролаз и успешно защищены диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук: В. А. Голотиным (2014 г.) и Н. С. Буйновской (2023 г.), что подтверждает преемственность исследований в области морской биохимии и биотехнологии.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю ТИБОХ ДВО РАН академику РАН В.А. Стонику за всестороннюю поддержку на всех этапах работы. Особую благодарность автор выражает д.х.н. О.Д. Новиковой за неоценимую помощь и внимание к работе. Автор искренне благодарен руководителю Лаборатории морской биохимии к.м.н. В.А. Рассказову и всем коллегам лаборатории (к.б.н. С.Н. Ковальчук, к.м.н. М.П. Исаевой, к.б.н. Ю.А. Носковой, к.б.н. А.В. Сейткалиевой, Н.Ю.

Отставных, Е.П. Быстрицкой) за многолетнее плодотворное сотрудничество. Автор признателен д.б.н. Ю.Н. Шкрылю и к.б.н. Ю.А. Югай (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН), д.б.н. О.И. Недашковской и д.х.н. И.Ю. Бакуниной (ТИБОХ ДВО РАН) за ценные советы, совместные исследования и помощь в характеристике объектов. Автор признателен за помощь в проведении специализированных исследований коллегам из ТИБОХ ДВО РАН: к.ф.-м.н. Г.Н. Лихацкой (*in silico* анализ), к.б.н. О.Ю. Портнягиной, к.б.н. С.И. Бахолдиной и к.х.н. И.В. Чикаловец (иммунохимия), д.х.н. Т.Н. Макарьевой, д.х.н. Н.И. Федорову и к.х.н. А.Г. Гузий (химия природных соединений). Особая благодарность выражается к.б.н. М.Г. Елисейкиной (ННЦМБ ДВО РАН) за проведение электронной микроскопии и интерпретацию полученных данных. Автор выражает особую признательность руководителю ПИШ ДВФУ к.т.н. Л.А. Текутьевой, а также коллегам из ПИШ ДВФУ и R&D центра «Арника» г. Владивосток (к.м.н. А.Б. Подволоцкой, к.т.н. О.М. Сон, PhD Ю.К. Пентехиной) за содействие в реализации совместных исследований. Глубокую благодарность автор выражает сотрудникам НМИЦ эндокринологии (к.б.н. О.А. Колпаковой и А.С. Глебусу) за разработку веб-приложения и помощь в биоинформатическом анализе. За экспертную помощь в проведении испытаний на моделях *in vivo* автор благодарит коллектив ИЦ «ИФАР» и СибГМУ (г. Томск): д.м.н., профессора В.А. Хазанова, д.с.-х.н. Н.А. Шмыкову, к.м.н. В.В. Быкова и к.м.н. С.А. Станкевича.

Используемые сокращения. Микробиология и геномика: КММ / VKPM – коллекции морских (ТИБОХ ДВО РАН) и промышленных (НИЦ «Курчатовский институт») микроорганизмов; МА / КОЕ – морской агар; колониеобразующие единицы; ЭД₅₀ – доза фермента, ингибирующая рост 50% клеток (био пленки); CDS / БГК – кодирующая последовательность; биосинтетический генный кластер; МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование; AAI / ANI / dDDH – индексы аминокислотной, нуклеотидной идентичности и цифровая ДНК-ДНК гибридизация. **Биоинформатика:** COG / ML – кластеры ортологичных групп; метод максимального правдоподобия; КГ – кластеры генов; GTF – формат разметки генов и белков; CAZymes – углеводов-активные ферменты; GH / NRPS / T1PKS / RiPP – гликозидгидролазы, нерибосомальные пептид-синтетазы, поликетидсинтазы I типа, посттрансляционно модифицированные пептиды. **Ферменты и белки:** ЩФ (AP) – щелочная(ые) фосфатаза(ы) семейств PhoA, PhoX, PhoD, PafA; CmAP / rCmAP – рекомбинантная ЩФ *C. amphilecti* КММ 296 (из *E. coli* / из *N. tabacum*); ECAP / CIAP / IAP / TNAP – ЩФ *E. coli*, кишечника теленка, человека (кишечная и тканеспецифичная); hrecAP – рекомбинантная IAP человека из клеток моркови; CGL / OmpF – лектин мидии *S. grayanus*; порин *Y. pseudotuberculosis*; RxsA-D – субъединицы Rxs(Rnf)-комплекса ЭТЦ. **Методы и моделирование:** ДСН-ПААГ – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия; MOE / RMSD – пакет молекулярного моделирования; среднеквадратичное отклонение атомов; CGL/CmAP (OmpF/CmAP) – гибридные (химерные) белки. **Механизмы действия и иммунология:** P_i / ЛПС – неорганический фосфат; липополисахарид; НАД(Ф)Н / АМФ – никотинамидадениндинуклеотид(фосфат); аденозинмонофосфат; PAMP / DAMP – молекулярные паттерны патогенов и поврежденных клеток; АФК (ROS) – активные формы кислорода; PI3K / Akt / mTOR – сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы; CD36 / TLR4 – рецептор жирных кислот; толл-подобный рецептор 4; NF-κB / NOX – ядерный фактор каппа-Би; НАДФН-оксидазы. **Модели in vivo и воспаление:** ДСН-колит – колит, индуцированный декстрансульфатом натрия; ИЛ-1, -6 / ФНО-α – интерлейкины 1, 6; фактор некроза опухоли альфа; СОП – стандартные операционные процедуры. **Трансгенез и стресс растений:** pHREAC / pEff – рекомбинантные экспрессионные векторы; Nt-CaAP1 и 2 – трансгенные линии *N. tabacum*; DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил; MSI / RWC / МДА – индексы стабильности мембран, содержания воды, малондиальдегид. **Кинетика и прочие методы:** K_m / K_i / IC₅₀ – константы Михаэлиса, ингибирования; концентрация полумаксимального ингибирования; п-НФФ – пара-нитрофенилфосфат; GitC, GitD – гитаррины С и D (5-азаиндолы); ИФА / ТЛФА – иммуноферментный и твердофазный лектин-ферментный анализы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Выделение и идентификация бактерий. Объектами исследования послужили штаммы морских аэробных гетеротрофных бактерий типов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota* – представителей доминирующих и экологически значимых таксонов мирового океана. Штаммы были отобраны по результатам масштабного скрининга на наличие уникальных гликозидгидролаз, щелочных фосфатаз и других биотехнологически значимых ферментов (Балабанова и др., 2015, 2016; Бакунина и др., 2020; Терентьева и др., 2020; Plisova et al., 2005; Balabanova et al., 2010, 2020; Nedashkovskaya et al., 2014, 2018, 2022, 2023, 2024; Pentekhina et al., 2023; Noskova et al., 2019, 2023, 2025). Штаммы выделены из различных экологических ниш Тихого океана: морской воды, донных отложений, а также ассоциированных с морскими беспозвоночными (губки, кораллы, иглокожие, моллюски) и макрофитами (красные водоросли), с использованием стандартного метода разведения (Nedashkovskaya et al., 2018, 2023) и депонированы в КММ ТИБОХ ДВО РАН. В работе также использованы типовые штаммы родов из международных коллекций (NRIC, ATCC, BCCM, LMG). Штамм *C. amphilecti* КММ 296 выделен из мидии *Crenomytilus grayanus* Японского моря (3 м), б. Троица; *C. amphilecti* NRIC 0815^T (КММ 1561^T), *Cobetia litoralis* NRIC 0814^T (КММ 3880^T), *Cobetia pacifica* NRIC 0813^T (КММ 3879^T) и *Cobetia marina* LMG 2217^T предоставлены коллекциями NODAI (Япония) и BCCM (Бельгия) (Nedashkovskaya et al., 2024). *Pseudoalteromonas distincta* КММ 638^T (ATCC 700518^T) выделен из морской губки Берингова моря (350 м) (Командорские о-ва); *P. distincta* 16-SW-7 (КММ 701) – из морской воды Охотского моря, о. Парамушир; *P. distincta* КММ 3548 (ранее *P. paragorgicola* КММ 3548^T) – из коралла *Paragorgia arborea* Охотского моря (202 м), о. Онекотан; *P. distincta* 2-2A-13 (КММ 6257) – из морской звезды *Leptasteria* sp. Охотского моря (584 м) (Курильские о-ва) (Balabanova et al., 2023). Штамм *Rhodalgimonas zhirmunskiyi* 10Alg 79^T (КММ 6723^T) выделен из красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* о. Парамушир (Курильские о-ва). Штамм *A. latericius* КММ 426^T (VKM В 2137D^T, LMG 19694^T, SIP 106861^T) выделен из морских отложений Южно-Китайского моря. Для морфологической, биохимической, физиологической и хемотаксономической характеристики штаммы выращивали при 28 °C 24 ч на МА и тестировали с использованием стандартных методов и наборов реагентов. Состав жирных кислот, полярных липидов и хинонов дыхательной цепи определяли по стандартным протоколам (Nedashkovskaya et al., 2018, 2023, 2024). ДНК выделяли из клеток (0,1-0,2 г) набором NucleoSpin Microbial DNA Mini kit (Macherey-Nagel, Germany). Амплификацию генов 16S рРНК проводили с использованием праймеров: 11F (5'-GTTTGATCMTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACSTTGTGTTACGACTT-3') на термоциклере GeneAmp 2720, секвенирование – с набором BigDye Terminator v.3.1. Секвенирование по Сэнгеру проводили на анализаторе ABI Prism 3130xL, сборку – в SeqScape 2.6 (Applied Biosystems, USA). Полученные последовательности депонированы в GenBank (NCBI). Идентификацию проводили путем сравнения полученных данных с последовательностями типовых штаммов из баз данных NCBI GenBank, EzBioCloud и сервиса TYGS (Noskova et al., 2021; Nedashkovskaya et al., 2022, 2024; Pentekhina et al., 2023; Balabanova et al., 2023).

Полногеномное секвенирование и биоинформатический анализ. Полногеномное секвенирование проведено с использованием библиотек Nextera DNA Flex (платформа Illumina MiSeq, 2×150 п.н., покрытие 52х–70х). Контроль качества и фильтрацию ридов осуществляли в FastQC и Trimmomatic, сборку *de novo* – в SPAdes, аннотирование – в NCBI PGAP. Геномы депонированы в GenBank (табл. 1): *P. distincta* 2-2A-13 (JANIHL010000000), *P. elyakovii* VKPM В-3905^T (JANJFO010000000), *Cobetia* spp. (JASCSA000000000–JASCSB000000000, JARWKQ000000000–JARWKV000000000). Для геномного анализа извлекали все доступные геномы изучаемых родов из базы RefSeq с помощью NCBI-genome-download (на 16.03.2023). Идентификацию и таксономический анализ проводили с использованием баз данных EzBioCloud, TYGS и LPSN (Balabanova et al., 2016, 2023, 2024a; Noskova et al., 2021; Nedashkovskaya et al., 2022, 2023, 2024).

Таблица 1 – Номера доступа NCBI и характеристики секвенированных геномов *Cobetia* spp.

| Штамм | Код доступа ID | Размер генома, п.н. | Г+Ц (mol%) | Количество контигов | Полнота сборки (%) | Контаминация (%) | Источник выделения |
|---|----------------|---------------------|------------|---------------------|--------------------|------------------|------------------------------|
| <i>Cobetia</i> sp. 2AS1 | GCF_014876835 | 4248424 | 62,5 | 49 | 95,96 | 0,9 | Прибрежные осадки |
| <i>Cobetia</i> sp. 2AS | GCF_029846355 | 4247060 | 62,5 | 39 | 99,15 | 1,3 | |
| <i>Cobetia</i> sp. 1AS1 | GCF_029846435 | 4235090 | 62,5 | 43 | 99,27 | 1,71 | Морская вода |
| <i>C. litoralis</i> NRIC 0814 ^T | GCF_029846315 | 4621254 | 62,5 | 51 | 99,15 | 2,93 | Морской песок |
| <i>Cobetia</i> sp. 29-18-1 | GCF_029846405 | 4117019 | 62,5 | 70 | 99,35 | 1,48 | <i>Esperiopsis digitata</i> |
| <i>C. amphilecti</i> NRIC 0815 ^T | GCA_030010415 | 4171304 | 62,5 | 112 | 98,54 | 1,34 | <i>Amphilectus digitatus</i> |
| <i>C. amphilecti</i> KMM 296 | GCF_000754225 | 3965007 | 62,5 | 97 | 98,29 | 1,28 | <i>C. grayanus</i> |
| <i>Cobetia</i> sp. 10Alg 146 | GCF_029846385 | 4095141 | 62,5 | 33 | 99,44 | 1,68 | <i>A. tobuchiensis</i> |
| <i>Cobetia</i> sp. 3AK | GCF_029846335 | 4073243 | 62,5 | 58 | 99,44 | 1,71 | Прибрежные осадки |
| <i>C. pacifica</i> NRIC 0813 ^T | GCA_030010515 | 4066371 | 62,5 | 42 | 99,44 | 1,3 | Морской песок |
| <i>C. marina</i> JCM 21022 ^T | GCF_001720485 | 4176400 | 62 | 1 | 99,51 | 1,51 | Литораль, морская вода |

Пангеномный анализ и филогеномную реконструкцию проводили в среде Anvi'o 7.1. Сходство геномов оценивали по индексам ANIm (pyANI), AAI (ANI/AAI Matrix) и dDDH (TYGS, формула d4). Для построения филогенетического дерева из пангенома выделены 1432 однокопийных коровых гена. После выравнивания и фильтрации в trimAl 1.4.1, дерево реконструировали методом максимального правдоподобия в IQ-TREE 2.2.0.3 (модель WAG, 100 бутстреп-реплик). Упорядочивание геномов в пангеноме выполняли на основе распределения генных кластеров (алгоритм MCL).

Реконструкцию метаболизма проводили в gapseq 1.2 (базы PubChem, BioCyc) для предсказания путей биосинтеза каротиноидов и ключевых кофакторов (Averianova et al., 2020; Balabanova et al., 2021, 2023, 2024a). Идентификацию углеводов-активных ферментов (CAZymes) и биосинтетических генных кластеров (БГК) проводили в dbCAN2 и antiSMASH 6.1.1. Сравнительный анализ синтенных локусов выполняли в Geneious Pro 4.8, EasyFig 2.2.5 и clinker. Статистическую обработку и визуализацию данных осуществляли в среде R (пакеты pheatmap, ggplot2, plotly, rtracklayer, dplyr), редактирование – в Inkscape.

Ввиду отсутствия исходной аннотации генов щелочных фосфатаз (ЩФ) в исследуемых геномах, их идентификацию проводили методом направленного поиска гомологов (алгоритмы BLAST, скрипты R и bash). В качестве референтных последовательностей использовали верифицированные гены семейств PhoA (включая *C. amphilecti* KMM 296 (NCBI: KGA01942), *E. coli*, патогенов, моллюсков и человека), PhoD и PhoX (*Bacillus* spp., *Vibrio* spp.), а также PafA (*Flavobacterium* spp.) (Балабанова и др., 2023; Golotin et al., 2015, Balabanova et al., 2024a). Филогенетическую реконструкцию белков ЩФ отдельных таксонов выполняли в MEGA 11 (метод ML). Оперонную структуру определяли в Operon-mapper и LOFI. Для глобального эволюционного анализа ЩФ проведен поиск гомологов в базе NCBI CDD среди 37 таксономических групп ($E < 10^{-10}$). Неукорененные деревья (ML) реконструировали в IQ-TREE с автоматическим подбором модели (LG+G32). Достоверность топологии оценивали тестами SH-aLRT, aBayes и ультрабыстрым бутстрэпом (UFBoot, 1000 реплик). Визуализацию деревьев проводили в iTOL v6. Анализ и визуализацию генного окружения ЩФ проводили с помощью авторского интерактивного приложения Syntenome (на базе R/Shiny; <https://github.com/glebus-sasha/Syntenome>) для обработки данных геномной

аннотации в формате GTF (Balabanova et al., 2024a). Программа позволяет выполнять фильтрацию CDS и центрирование локусов по заданному продукту или гену.

Получение и исследование рекомбинантных белков. Для функциональной верификации аннотированных генов ПЦР-продукты CDS зрелых белков (табл. 2) клонировали в векторе pET-40b(+).

Таблица 2 – Олигонуклеотиды для конструирования рекомбинантных плазмид

| Гены NCBI | Прямой праймер (5'→3') | Обратный праймер (5'→3') |
|-----------------------------|--|--|
| PhoA (CmAP) WP_245163010 | ТТААССАТGGСAGАGАТСААGААТGТСАТТ СТGАТ | ТТААGААТТСТТТСGCTACCАСТGТСТТСАGА ТАСТGТСС |
| PhoX WP_043336117 | ТААТGТСGАСАТGТСТСАGСGТGТСАТТСТ TGTCG | ТААТСТСGAGСТАТСАСТТGAGGССТСGСGТG GСА |
| PhoD1 WP_043333989 | ТАТАССАТGGАAGGACGGСGСССGСGСАТ GCCСТС | ТАТАGAGСТСТТАGАСАСТGGСGGСGGСGGG GGTC |
| PhoD2 WP_052384691 | ТААТССАТGGGССТGССССGСGТGТGТG | ТААТGAGСТССТАТСАGСGACGGGGСАСААА GT |
| PafA WP_043332298 | ТААТССАТGGTGTCCСGСССТGGССТGАТС С | ТААТGТСGАССТАТСАGТТСАСТСТTGAAGA ТСAGG |
| OmpF WP_038824054 | ТТААGAGСТСССGАААТСТАТААСААAGАТG GСАСА | ТТААGТСGАСТТАGААСТGАТАААССАAGСС ААС |
| MBL-AJ AAT42221 | AGСТGAGСТСТGТСТGACGGСТTGTCCGGA GТТТG | САGТGТСGАССТССАААТGАТАСТСGАТАСАG GGAAG |
| CGLJQ314213 | AGСТGAGСТСGАТGACGАТGАСАAGАТGА СААСGТТСТТАТСАААСАСАAGGCCAGTГ | AGСТGТСGАСТТАGGСАТАААСТААААСGСG СТTGTCTTT |
| CGL _{Asn27Ala} | AGTAGСААСССТGCTAACGССАСТАAGТТG | GCAGGАССААСТТАGТGGСGТТАGСАGGGT |
| CGL _{His37Ala} | GTCСТGСАТАGСGАТАТСGТGAAAGAATG | GGAAGТАСАТТСТTТСАGСGАТАТСGСТАТ |
| CGL _{Glu75Ala} | AGCTAАТССАССАААТGCCАССААТАТGGT TC | TGATGСАGААССАТАТТGGTGGСАТТTGGTG |
| CGL _{His85Ala} | GТTCTGСАТСАAGАТСGТGCTGАТСGGGСА | GAАТАGТGСССGАТСАGСАСGАТСТTGAТ |
| CGL _{Asn119Ala} | АТССССGААТССАССGААТGCTACCГAAAC AG | GTATAАСТGТTТСGGТАGСАТТСGGTGGAT |
| CGL _{Asp127Ala} | САGТТАТАСАТGGAGСТАААСАТGСАGССА | GAАТТССАТGGСТGСАТGТTТАGСТССАТGТА |
| CGL _{His129Ala} | АТАСАТGGAGАТААAGСТGСАGССАТGGA А | САААААТGААТТССАТGGСТGСАGСТTТАТСТ |

Примечание – ПЦР-продукты полноразмерных генов получали с использованием полимеразы Encyclo (Евроген, Россия) на термоциклере Eppendorf (Германия). Режимы подбирали индивидуально (температура отжига 63,5–72,0 °С, 35–38 циклов). Гены порина OmpF (*Y. pseudotuberculosis*), лектинов трепанга (MBL-AJ) и мидии (CGL) амплифицировали для конструирования бифункциональных белков с активностью ШФ CmAP (Буйновская и др., 2018; Balabanova et al., 2014; 2024a; Kovalchuk et al., 2015; 2018). Точечный мутагенез гена CGL проводили методом двухэтапной ПЦР: первичный отжиг мутагенных праймеров (4 цикла) с последующей амплификацией полноразмерного продукта (35 циклов) (Kovalchuk et al., 2018). Визуализацию проводили методом электрофореза в 1,2% агарозном геле. Точность введения мутаций и отсутствие нецелевых замен во всех конструктах подтверждали контрольным секвенированием по Сэнгеру.

Экспрессию генов в клетках *E. coli* Rosetta (DE3) индуцировали 0,2 мМ IPTG (18 ч, 18 °С). После дезинтеграции клеток ультразвуком (Bandelin, Германия) целевые белки выделяли из супернатанта методом металло-аффинной хроматографии на Ni-IMAC-Sepharose (Cytiva, Великобритания) в градиенте имидазола. Дальнейшую очистку проводили методами ионообменной хроматографии на колонках Source 15Q и Mono Q. Для удаления аффинной метки вместе с шапероном использовали энтерокиназу, с последующей негативной хроматографией на HisTrap HP. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд. Ферментативную активность ШФ оценивали по скорости гидролиза *n*-НФФ в 0,1 М Трис-НСl буфере (рН 10,0), 0,2 М КСl, при 37 °С. Концентрацию продукта реакции (*n*-НФ) измеряли спектрофотометрически (405 нм). За единицу активности (U) принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль *p*-НФ за 1 мин (Буйновская и

др., 2018; Balabanova et al., 2014; 2024a; Golotin et al., 2015; Kovalchuk et al., 2015; 2018). Активность других гидролаз определяли согласно их специфичности по ранее описанным методикам оценки биохимического и биотехнологического потенциала ферментов (Балабанова и др., 2015; Balabanova et al., 2010, 2017; Bakunina et al., 2018–2020; Noskova et al., 2019, 2021, 2024, 2025; Pentekhina et al., 2023). Разработку новых векторных систем и штаммов-продуцентов рекомбинантных белков для использования в фармакологии, пищевой промышленности и сельского хозяйства проводили по протоколам, описанным в работах (Balabanova et al., 2019, 2022; Adedibu et al., 2024; Yugay et al., 2025).

Разработка диагностических тест-систем. Гены лектина CGL (*C. grayanus*) и порина OmpF (*Y. pseudotuberculosis*) лигировали с геном ЩФ CmAP в векторе pET-40b(+) (табл. 2). Полученные химерные белки экспрессировали в *E. coli* Rosetta (DE3) и очищали методами аффинной и ионообменной хроматографии. Сайт-направленный мутагенез применяли для изучения структурно-функциональных особенностей активного центра ЩФ и её молекулярных партнеров (Balabanova et al., 2014, 2015; Golotin et al., 2015; Kovalchuk et al., 2015; 2018). Лиганд-связывающие свойства гибридных белков исследовали методом ТЛФА и ИФА (405 нм) при взаимодействии с онкомаркерами (РЭА, ПСА, АФП, СА 19-9, СА 125, СА 72-4), муцином (PSM) и специфическими антителами к порину (OmpF) *Y. pseudotuberculosis*. Прогнозирование функционально значимых аминокислотных остатков и расчет энергии связывания (докинг) проводили в программном комплексе МОЕ 2018.01 (Голотин и др., 2015; Буйновская и др., 2018; Balabanova et al., 2014; Kovalchuk et al., 2015; 2018).

Ингибиторный анализ и молекулярное моделирование. Изучение влияния природных 5-азаиндолов (гитарринов С и D) из морской губки *Guitarra fimbriata* на активность CmAP проводили *in silico* и кинетическими методами в сравнении с кишечной ЩФ (CiAP, IAP). Тип ингибирования, значения IC₅₀ и константы и определяли по методу Ченга–Пруссоффа; визуализацию данных выполняли в Origin 7.0. Трехмерные структуры ингибиторов и гомологичные модели ЩФ (CmAP, IAP, TNAP) строили в МОЕ 2020.09 на основе кристаллических структур прототипов из базы PDB (3E2D, 3mk1, 7yiv). Молекулярный докинг проводили с использованием функций скоринга London dG и GBVI/WSA dG. Анализ межмолекулярных контактов в комплексах «фермент-ингибитор» выполняли в модуле Ligand Interaction (Seitkalieva et al., 2024).

Оценка цитотоксичности. Цитотоксическое действие рекомбинантной ЩФ CmAP (в диапазоне 0,0046–2,3 Ед) оценивали MTS-методом по метаболической активности клеток (инкубация 24–48 ч). Количество образовавшегося формазана измеряли спектрофотометрически (492 нм, фон–690 нм) на ридере μ Quant BioTek (США). Жизнеспособность клеток рассчитывали относительно контроля (буферный раствор); цитотоксическую активность выражали через показатель IC₅₀ (ингибирующая 50% клеток).

Оценка биологической активности и терапевтического потенциала.

Антибиопленочную активность ферментов оценивали методом окрашивания кристаллическим фиолетовым (CV) в 24-луночных планшетах (600 нм) и методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Терентьева 2015, 2020; Balabanova et al., 2017). Изучали влияние различных концентраций α -галактозидазы, ДНКазы, нуклеазы и ЩФ (PhoA, PhoD) на формирование и деструкцию зрелых биопленок при температурах 2–22 °С. Для СЭМ-анализа зрелые биопленки на агаре фиксировали глутаральдегидом и OsO₄, обезвоживали в серии спиртов и высушивали в критической точке. После напыления хрома образцы исследовали на микроскопе Evo 40 (Carl Zeiss, Германия) при ускоряющем напряжении 29 кВ.

Для верификации регуляторной функции ЩФ CmAP изучали влияние экспрессии целевого гена на фенотип растений *Nicotiana tabacum* в условиях абиотического стресса (солевого, осмотического, оксидативного и дефицита фосфатов). Трансгенные линии получали методом агробактериальной трансформации (штамм *A. tumefaciens* EHA105, вектор pHREAC) с последующей регенерацией на селективных средах Мурасиге – Скуга и проверкой статуса методом ПЦР (Adedibu et al., 2024; Yugay et al., 2025). Влияние ЩФ

СтАР на всхожесть семян, развитие корней, антиоксидантную активность и целостность мембран в условиях стресса оценивали по методикам, описанным в (Yugay et al., 2025). Уровень экспрессии мРНК определяли методом qPCR (система Bio-Rad CFX96, реагенты SYBR Blue, «Биолабмикс», Россия) в трех биологических повторностях; относительную экспрессию рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с использованием референтного гена β -актина.

Исследование протективного действия очищенного препарата СтАР проводили на самцах мышей линии CD-1 (SPF-статус) в модели хронического ДСН-индуцированного колита. В качестве препарата сравнения использовали рекомбинантную кишечную ЩФ человека (hrecAP), полученную в системе экспрессии клеток моркови (ИЦ «Ифар», Россия). Предварительно оценивали дефосфорилирующую активность СтАР в отношении ЛПС *E. coli* O55:B5 (Sigma) количественным методом с использованием молибдатного реагента (Balabanova et al., 2024a). Воспаление индуцировали 3% раствором декстрансульфата натрия (ДСН) по циклической схеме (5–5–5 дней). Мыши опытных групп ежедневно (7 дней) получали инкапсулированную ЩФ (100 Ед/животное), контрольная группа – пустые альгинатные капсулы. Системный иммунный ответ оценивали по гематологическим показателям (Abacus Junior Vet) и уровню цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α) в крови и тканях кишечника (ИФА, «Вектор-Бест»). Патоморфологические изменения изучали на микроскопе Axio Lab.A1 (Carl Zeiss) с полуколичественной оценкой повреждений. Статистическую обработку проводили по критерию Манна-Уитни в соответствии с СОП.

Статистическая обработка данных. Эксперименты проводили в трех и более независимых биологических и технических повторностях. Результаты представлены как среднее значение и его стандартная ошибка ($M \pm SE$). Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро–Уилка. Для сравнения двух групп использовали t-критерий Стьюдента или U-критерий Манна–Уитни. Множественные сравнения проводили методом дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением LSD-теста Фишера. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Расчеты и визуализацию выполняли в программах Origin 7.0, Bio-Rad CFX Manager и среде R.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Геномный, пангеномный и фенотипический анализ продуцентов биотехнологических ферментов и новых штаммов морских гетеротрофных бактерий

Высокая вариативность морских гетеротрофов ограничивает эффективность классической таксономии и анализа 16S рНК при идентификации близкородственных изолятов (Noskova et al., 2021; Nedashkovskaya et al., 2022, 2023, 2024; Balabanova et al., 2023, 2024a). Полногеномное секвенирование позволило верифицировать статус штаммов и выявить механизмы их адаптации к морской среде через альтернативные метаболические стратегии: использование специфических субстратов, биосинтез пигментов, витаминов и антимикробных метаболитов (Балабанова и др., 2016, 2019; Balabanova et al., 2016, 2021, 2023, 2024a; Averianova et al., 2020; Nedashkovskaya et al., 2023). Лабильность морских сапрофитов обусловлена широким спектром гидролаз: фосфатаз, нуклеаз, протеаз, полисахарид-деградирующих ферментов (Бакунина и др., 2020; Балабанова и др., 2023; Plisova et al., 2005; Bakunina et al., 2013; Nedashkovskaya et al., 2014; 2018; Balabanova et al., 2018; Noskova et al., 2019, 2023; 2025; Pentekhina et al., 2023). Уникальные структуры данных белков могут выступать таксономическими маркерами (Балабанова и др., 2010, 2015; Noskova et al., 2021; Balabanova et al., 2024a).

Гамма-протеобактерии. По результатам скрининга коллекции ТИБОХ ДВО РАН выбран продуцент уникально высокоактивной ЩФ – штамм КММ 296 (из мидии *S. grayanus*). Ранее отнесенный к *S. marina* (Балабанова и др., 2016; Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2016), на основании полифазного анализа (16S рНК, МЛСТ, филогения, хемотаксономия) штамм реклассифицирован как *S. amphilecti* (табл. 1, 3; рис. 1).

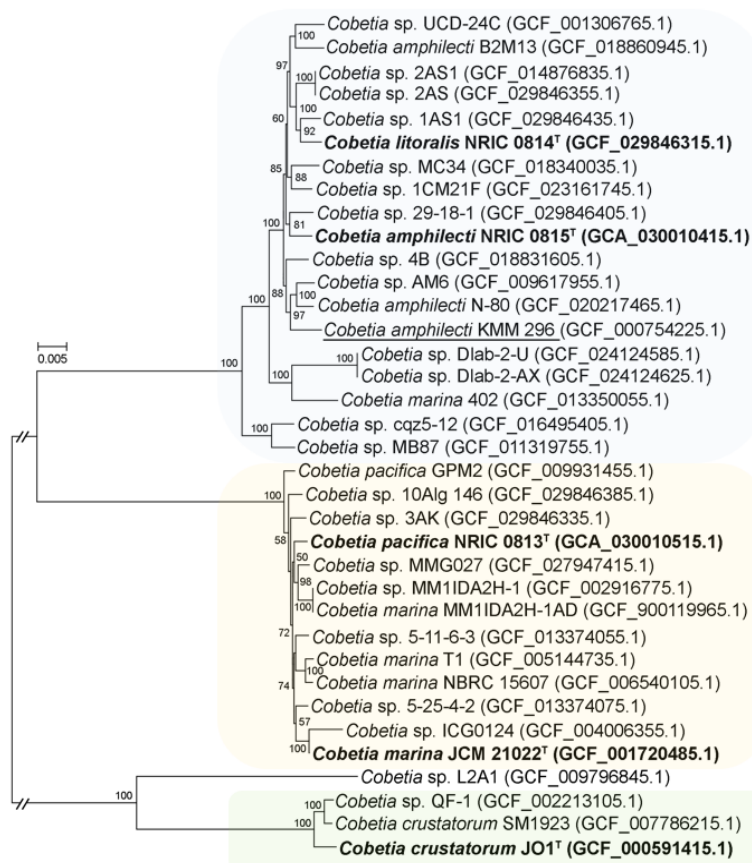


Рис. 1 – Филогеномное дерево (ML) рода *Cobetia* (1432 гена корового генома). Значения бутстрэп-поддержки – ≥ 50 %. Выделены: кластеры валидных видов – разным тоном; типовые штаммы — жирным; штамм KMM 296 — подчёркиванием (Nedashkovskaya et al., 2024)

Таблица 3 – Сравнительная характеристика штаммов KMM 296 и *C. amphilecti* NRIC 815^T

| Характеристика | KMM 296 | NRIC 815 ^T |
|---|--|---|
| Источник и место выделения | Мидия <i>C. grayanus</i> , Японское море | Губка <i>A. digitatus</i> , Аляска, Тихий океан |
| Температура роста (°C) | 4–42 | 4–42 |
| Содержание NaCl для роста (% NaCl) | 0,5–19 | 0–20 |
| Восстановление нитратов | - | + |
| Гидролиз: Твин 80 | - | + |
| ДНК | - | + |
| Получение кислот из: D-фруктоза, D-лактоза | - | + |
| L-арабиноза, D-мелибиоза, L-рамноза | + | - |
| Ассимиляция: амигдалин, мальтоза, малонат натрия, гликоген, каприновая кислота, валериановая кислота, 3-гидроксibuтириновая кислота, L-пролин | + | - |
| N-ацетилглюкозамин, L-серин | - | + |
| Валин-ариламидаза, цистеин-ариламидаза | - | + |
| Трипсин | + | - |
| Содержание Г+Ц (%) | 62,5 | 62,2–62,4 |

Штаммы *C. amphilecti* KMM 296 и NRIC 815^T характеризуются фенотипическим сходством: аэробным метаболизмом, подвижностью, температурным оптимумом 4–42 °C и

идентичным набором ферментов (каталаза, оксидаза, ЩФ, эстеразы, гликозидазы). Оба штамма проявляют одинаковую субстратную специфичность при утилизации углеводов (галактоза, глюкоза, манноза и др.) и сходный профиль чувствительности к широкому спектру антибиотиков (аминогликозиды, тетрациклины, фторхинолоны). Штаммы инертны в отношении гидролиза полисахаридов (агар, хитин, крахмал), белков (казеин, желатин) и продукции H_2S /индола. Ряд отличительных признаков представлен в табл. 3.

Анализ 36 геномов *Cobetia* spp. выявил до 7 копий генов 16S рРНК (идентичность 99,86–100 %) в каждом, что затрудняло таксономию рода. На основании расчетных индексов (ANI 96,4–98,2 %, AAI 97,6–99,9 %, dDDH 70,1–100 %) обосновано объединение 14 штаммов *C. amphilecti/litoralis* и 13 штаммов *C. pacifica/marina* в единые виды (Noskova et al., 2021; Balabanova et al., 2024a; Nedashkovskaya et al., 2024). Показатели для *Cobetiat* sp. L2A1 ниже порогов демаркации, что свидетельствует об открытии нового вида (рис. 1). Для подтверждения филогенетического родства видов *Cobetia* проведен пангеномный анализ (рис. 2).

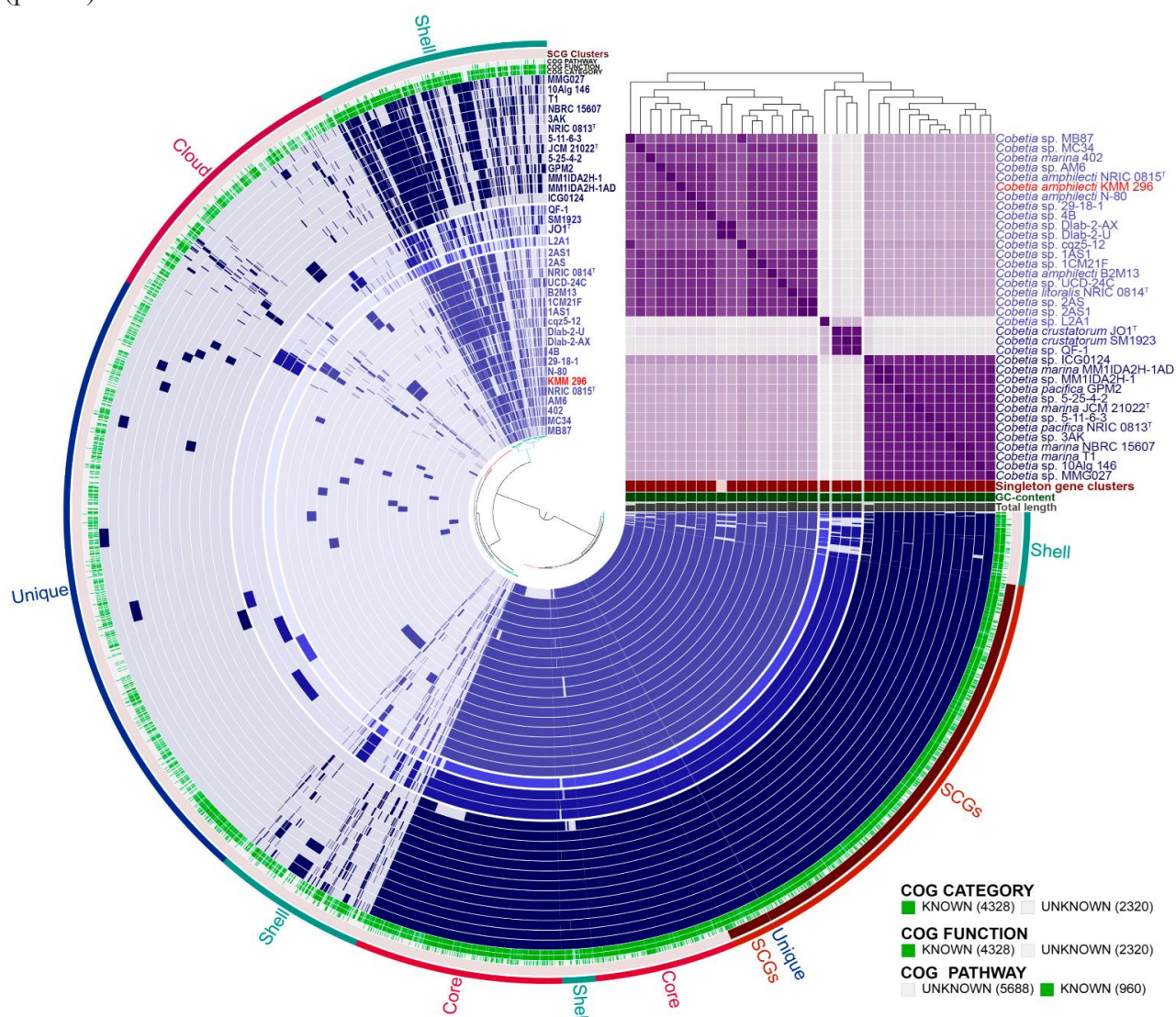


Рис. 2 – Пангеном *Cobetia* spp (6648 генных кластеров). Показано распределение генов ядра (Core), оболочки (Shell) и облачных генов (Cloud). Штамм KMM 296 выделен цветом. На тепловой карте: значения ANI (%), содержание Г+Ц (%), размер геномов и синглтоны. Цветом обозначены функции COG: известные (зеленый) и неизвестные (белый) (Nedashkovskaya et al., 2024)

Установлено, что род обладает открытым пангеномом, включающим коровые гены (когнитивная основа таксона), гены оболочки и облачные штаммоспецифичные гены (синглтоны). Выявлено 62 уникальных кластера генов (КГ) у *C. crustatorum* JO1^T, 20 КГ – в

группе *C. pacifica/marina* и 1 КГ – в группе *C. amphilecti/litoralis*, что отражает высокую скорость реорганизации геномов при видовой диверсификации. Согласно COG-классификации, в коре *Cobetia* spp. преобладают гены биогенеза рибосом (10,5 %), метаболизма аминокислот (9,6 %) и мембранных структур (7,4 %). Доля генов прочих функциональных категорий варьирует от 1,2 до 7,0 %. Максимальное количество синглтонов (208) отмечено у *Cobetia* sp. Dlab-2-U; их основные функции связаны с биогенезом мембран (14,1 %), репликацией и защитными механизмами (рис. 2).

Видоспецифичность структуры БГК эктоина и генов синтетазы капсульного полисахарида, НАД⁺-оксидоредуктазы SDR, поликетидсинтазы I и оксидоредуктазы DsbA (БГК T1PKS) согласуется с новой классификацией *Cobetia* spp. (рис. 3, 4).

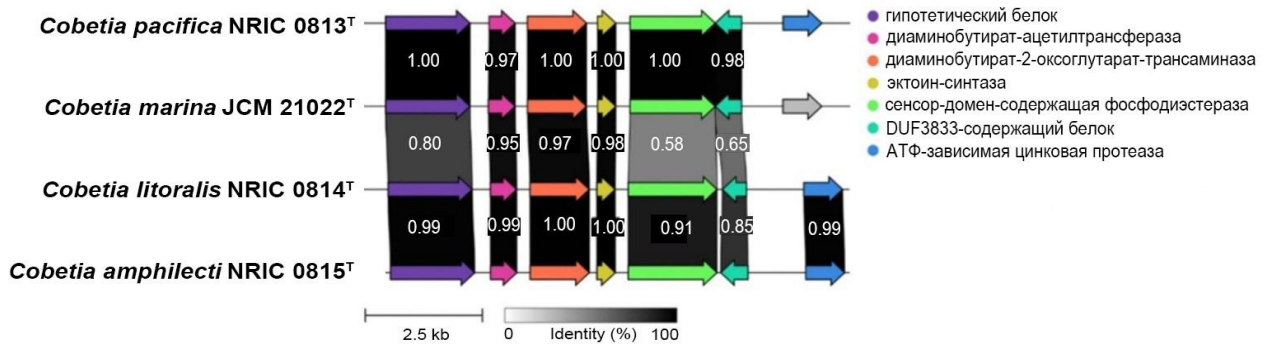


Рис. 3 – Синтения БГК эктоина типовых штаммов *Cobetia*. Идентичность CDS (%) передана градиентом; идентичные гены – чёрным, неизвестные – серыми стрелками (Balabanova et al., 2024a)

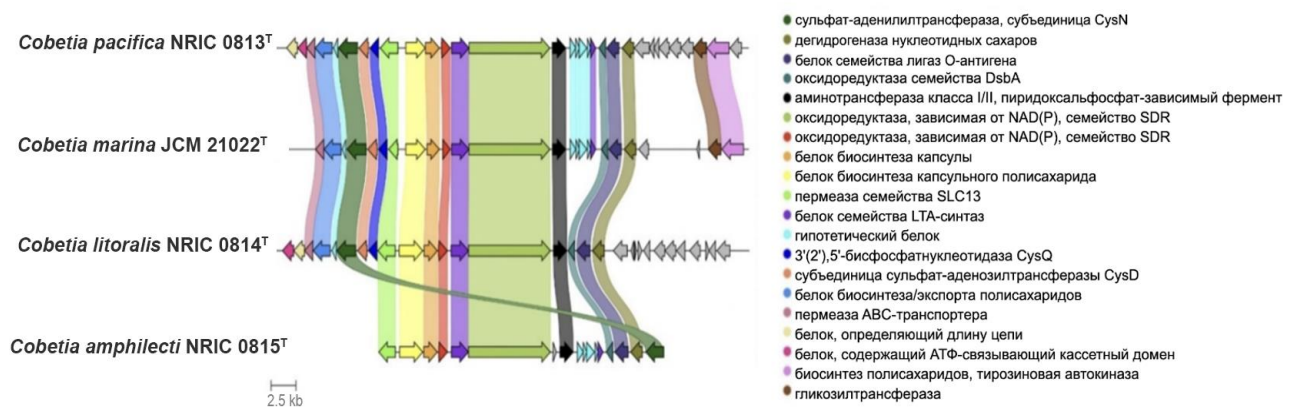


Рис. 4 – Синтения БГК T1PKS (сульфатированные полисахариды) типовых штаммов *Cobetia*

БГК Ni-сидерофоров родоспецифичны, что указывает на ключевую роль железа для *Cobetia* (в т. ч. для ЩФ PhoD; Noskova et al., 2019). Кластеры RiPP, NRPS, арилполиенов (PKS) и сульфатированных полисахаридов (T1PKS) штаммоспецифичны. Ранее в ТИБОХ ДВО установлено, что O-полисахариды *C. pacifica* KMM 3789^T/3878 и *C. litoralis* KMM 3880^T содержат сульфатированные остатки D-глюкозы, D-галактозы и КДО. Капсульный полисахарид *C. pacifica* подавляет пролиферацию клеток DLD-1 и MCF-7, а ЛПС и деацетилированный полисахарид *C. litoralis* KMM 3880^T – колониеобразование линий SK-MEL-28 и HCT-116 (Balabanova et al., 2024a).

На основании полученных данных предложена синонимизация: изоляты *C. pacifica* и *C. litoralis* отнесены к видам *C. marina* и *C. amphilecti* соответственно. При этом выявленная внутривидовая гетерогенность позволяет рассматривать их как перспективные подвиды. В расширенные описания *C. amphilecti* (Romanenko et al., 2013) и *C. marina* (Cobet et al., 1970; Arahal et al., 2002) внесены дополнения: клетки оксидазоположительны, подвижны (1–2 полярных и/или 2–5 латеральных жгутиков); доминируют ЖК C16:1 ω7c, C12:0 3-ОН, C16:0, C18:1 ω7c, C17:0-цикло и C12:0 (>5 %). Полярные липиды включают ФЭ, ФГ, ФК,

аминолипид, два фосфо- и четыре неидентифицированных липида; основной хинон – Q-8. Содержание Г+Ц в ДНК – 62,5 % и 62,2–62,4 % (табл. 1, 3).

Другой представитель гамма-протеобактерий – штамм *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 (16-SW-7) – выбран благодаря высокому биотехнологическому потенциалу как продуцент уникальной α -галактозидазы, трансформирующей группу крови В(III)→О(I) (Balabanova et al., 2010, 2020; Vakunina et al., 2016, 2018). Анализ 16S рРНК показал его близость к *P. distincta*^T, *P. paragorgicola*^T и *P. arctica*^T (Nedashkovskaya et al., 2022; Balabanova et al., 2023). Несмотря на фенотипические различия, высокая идентичность 9–12 паралогов 16S рРНК (99,87–100 %) и, соответственно, слабая генотипическая дифференциация видов обусловили необходимость ревизии классификации рода (рис. 5, 6).

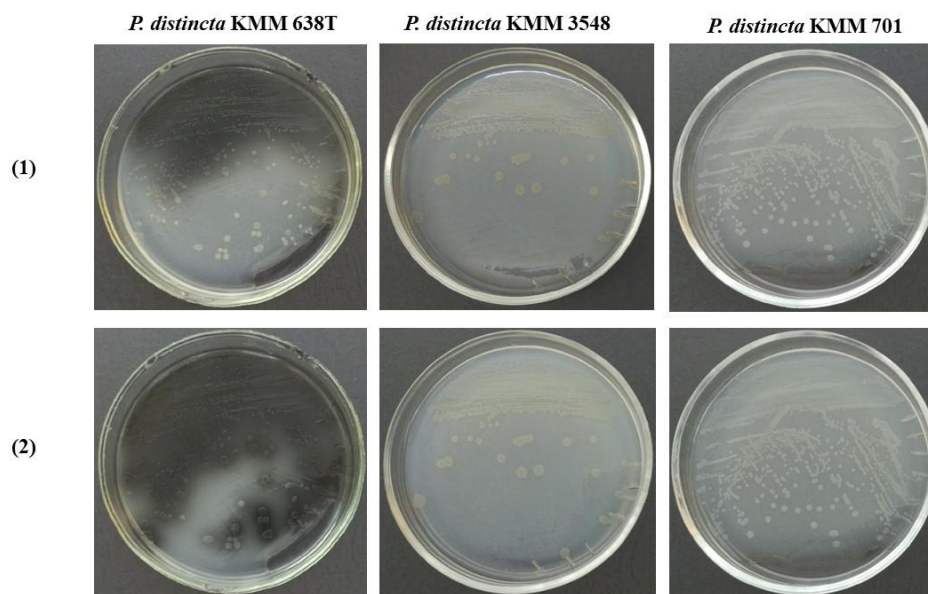


Рис. 5 – Пигментация штаммов *P. distincta* КММ 638^T (диффузный чёрный), КММ 3548 (светло-жёлтый) и КММ 701 (белые колонии) при культивировании на МА (24 °С, естественное освещение): (1) – 7 суток; (2) – 9 суток (Balabanova et al., 2023)

Исследуемые штаммы характеризуются аэробным метаболизмом, подвижностью, гидролизом эскулина и продукцией кислот из сахарозы. Большинство изолятов *P. distincta* и *P. arctica* обладают активностью оксидазы, каталазы, ЩФ, эстеразы, липазы (С8), ариламидаз и фосфогидролаз; способны гидролизовать казеин, желатин, утилизировать цитрат и продуцировать кислоты из целлобиозы и мальтозы. Общими отрицательными признаками являются отсутствие редукции нитратов, гидролиза агара, мочевины, хитина, целлюлозы, а также неспособность к ассимиляции большинства протестированных сахаров (арабинозы, фукозы, рамнозы и др.) и органических кислот. Жирнокислотный состав исследуемых штаммов идентичен (Nedashkovskaya et al., 2022; Balabanova et al., 2023).

Топология филогеномного дерева (65 типовых штаммов) подтверждает принадлежность КММ 701, ATCC 700518^T и нового изолята 2-2А-13 к *P. distincta* (Balabanova et al., 2023). Для уточнения таксономии реконструирован пангеном клады *P. distincta* (10045 кластеров; 84968 генов). Значения ANI (95,67–100 %), AAI (94,57–100 %) и dDDH (63,6–100 %) для *P. distincta* и *P. paragorgicola* КММ 3548^T послужили основанием для их синонимизации. При сравнении с *P. arctica* А 37-1-1^T значения снизились до 93,29–94,25 %, 94,70–95,51 % и 52,7–56,9 % соответственно. Таким образом, *P. arctica* и *P. distincta* представляют собой отдельные виды с признаками недавней диверсификации от предковой клональной популяции (рис. 6А).

Представители *Pseudoalteromonas* известны как продуценты антибиотиков, противоопухолевых соединений и холодоактивных ферментов (Balabanova et al., 2023). В исследуемых геномах предсказаны БГК рибосомальных и нерибосомальных пептидов, арилполиенов и аденозинов, ортологических метаболитам *Streptomyces calvus* и *Nocardia*

terpenica (рис. 6 Б). Пигментированный фенотип штаммов (рис. 5) обусловлен гибридным кластером T1PKS/NRPS (путь этерификации резорцином), аналогичным таковому у энтомопатогена *Xenorhabdus doucetiae* (рис. 6 В).

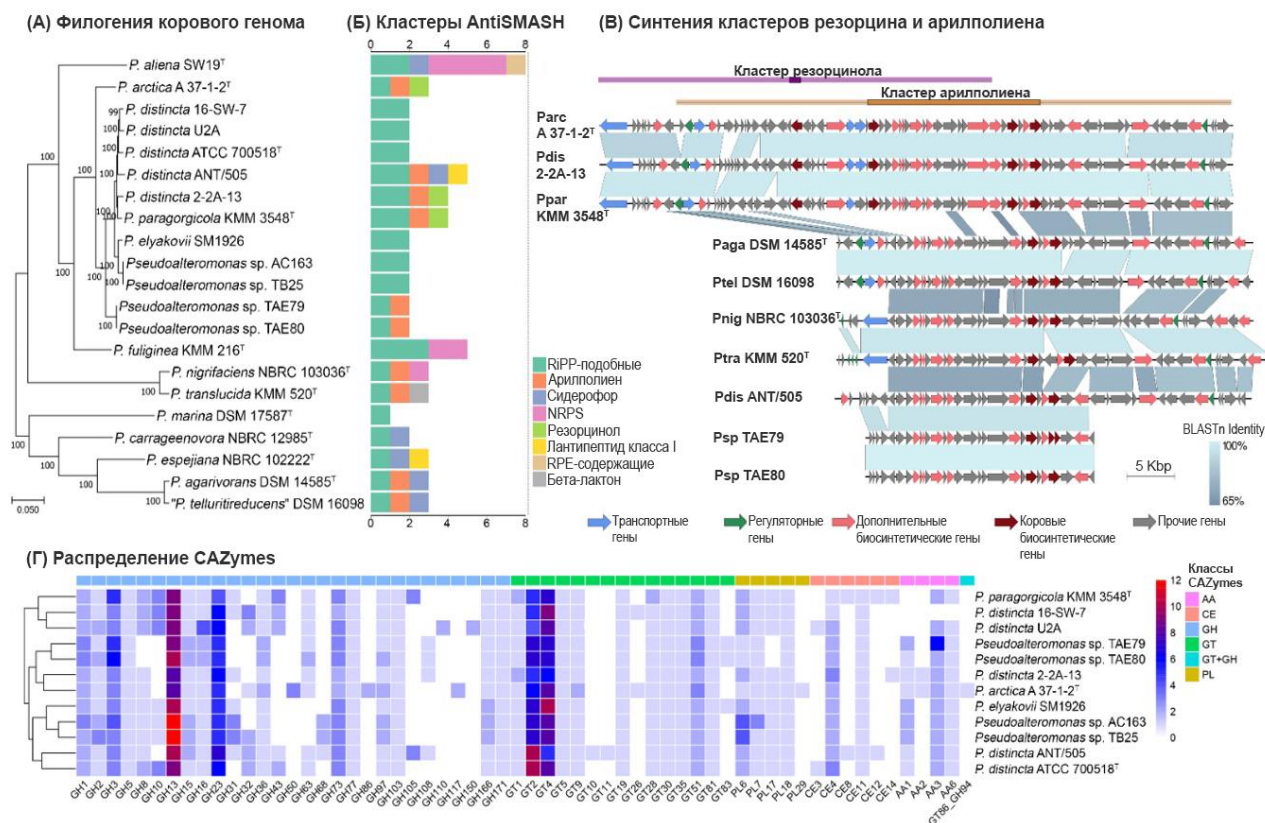


Рис. 6 – Сравнительный геномный анализ *Pseudoalteromonas* spp. (А) Филогеномное дерево (ML, 21 штамм). (Б) БГК вторичных метаболитов (AntiSMASH): RiPP (зелёный), арилполиены (оранж), сидерофоры (голубой), NRPS (розовый), резорцин (салатовый), лантипептид I (жёлтый), беталактон (серый). (В) Синтения гибридных БГК арилполиена и резорцина (T1PKS/NRPS): гены транспорта (голубой), регуляции (зелёный), вспомогательные (розовый), биосинтеза (бордовый); идентичность (%) – на шкале. (Г) Тепловая карта распределения семейств CAZy в геномах *P. distincta*

Непигментированные *Pseudoalteromonas* spp. отличаются расширенным репертуаром ферментов деградации полисахаридов (рис. 6 Г). Так, штаммы *P. distincta* ATCC 700518^T, KMM 3548 и 16-SW-7 обогащены ксиланазами и ксилозидазами, а штамм U2A – дополнительными генами α-галактозидаз (GH110) и ι-каррагиназ (GH150). В 11 геномах *P. distincta* идентифицировано 59 семейств CAZy (29 GH, 15 GT, 5 PL, 6 CE, 4 AA) с преобладанием GH13, GH23, GT4 и PL6 (рис. 6 Г).

Для *P. distincta* характерен высокий процент синглтонов и разнообразие метаболических путей (анализ gapseq), что обуславливает внутривидовые фенотипические различия (Balabanova et al., 2023). В геномах *P. distincta* и *P. arctica* идентифицирован БГК стрепторубина В – антибиотика группы продигинина с широким спектром биологической активности. Максимальное число уникальных путей (19) выявлено у штамма KMM 701, включая деградацию крахмала, полифосфатов и биосинтез сукциногликанов.

В описание вида *P. distincta* (Romanenko et al., 1995; Ivanova et al., 2000) внесены дополнения: диапазон температуры роста (4–37 °C); ассимиляция D-глюкозы, сахарозы, органических кислот и аминокислот; вариабельность продукции ацетона. Содержание Г+Ц в ДНК составляет 39,1–39,3 моль%. Типовой штамм – KMM 638^T (=ATCC 700518^T), номер доступа GCA_000814675.1 (Balabanova et al., 2023).

Альфа-протеобактерии. Исследование профилей ферментных систем и распространенности ЩФ у альфа-протеобактерий проводили на представителях нового рода

*Rhodalgimonas*¹ (*Rhodobacteraceae*) и его филогенетического окружения. Типовой штамм *Rhodalgimonas* KMM 6723^T (10A1g 79^T), выделенный из красной водоросли, как и близкие роды *Marimonas*, *Lentibacter* и *Aquicoccus*, является аэробным неподвижным гетеротрофом (Nedashkovskaya et al., 2023). Общие фенотипические признаки: активность ЩФ, эстераз (С4, С8), ариламидаз, фосфогидролаз, оксидазы, каталазы и широкий спектр гликозидаз (α/β -галактозидазы, α/β -глюкозидазы, агаразы и др.). Репертуар CAZymes и БГК штамма KMM 6723^T типичен для указанных родов (рис. 7).

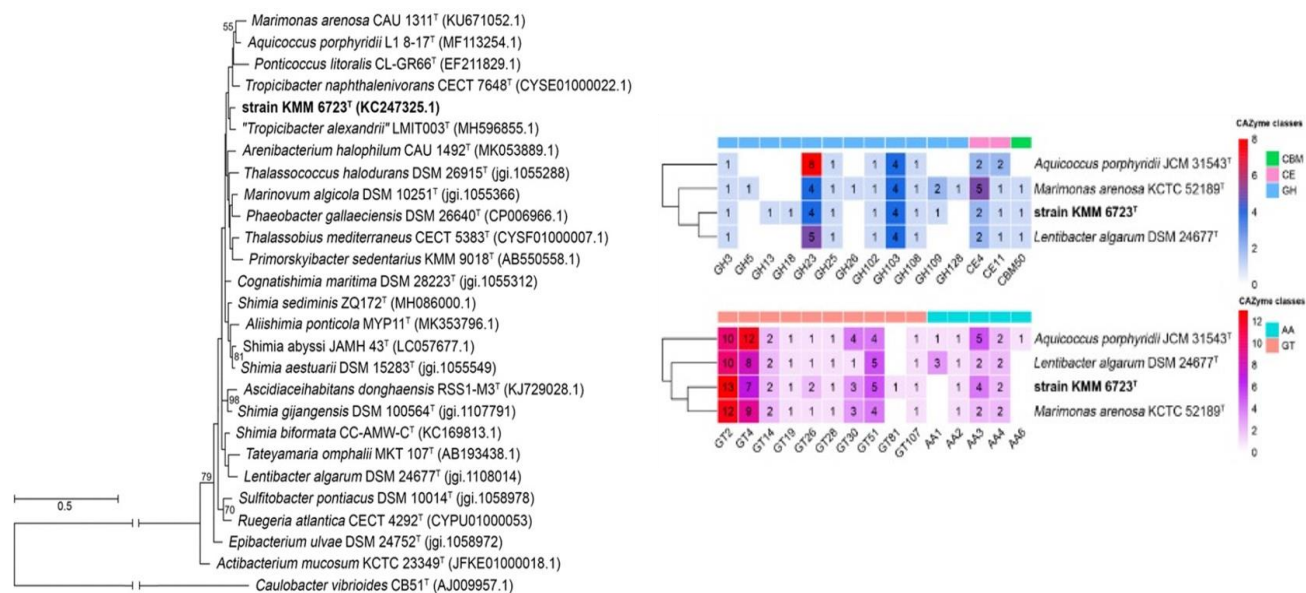


Рис. 7 – Филогения (ML) 16S рРНК штамма *Rhodalgimonas* KMM 6723^T (10A1g 79^T) и представителей семейства *Roseobacteriaceae* (слева). Распределение семейств CAZy в геномах KMM 6723^T и типовых штаммов близких родов (тепловая карта, справа) (Nedashkovskaya et al., 2023)

Rhodalgimonas KMM 6723^T отличается способностью к росту при низких температурах и без NaCl, продукции амилазы, продукции H₂S и ацетоина, редукции нитратов и гидролизу тирозина. В геноме выявлены БГК NRPS, RiPP (метанобактина), эктоина и гомосериновых лактонов. Из 16163 генов пангенома 60 % не имеют ортологов. Родоспецифичными для *Rhodalgimonas* являются семейства CAZy GH13, GH18 и GT81 (рис. 7). Все исследованные геномы содержат гены фосфатного обмена (*pstSCAB*, *phnCDE*, *phnG–M*, *ugpBAEC*, *ppx*, *ppa*, *ppk*), однако штамм KMM 6723^T уникален наличием 6 синглетных генов ЩФ (у близких родов – от 1 до 5 ортологов). В описание рода *Rhodalgimonas* gen. nov. включены: ЖК C18:1 ω 7c и C16:0; липиды ФЭ, ФГ, ФХ; хинон Q-10. Типовой вид – *Rhodalgimonas zhirmunskyi*, названный в честь академика А.В. Жирмунского (Nedashkovskaya et al., 2023).

Флавобактерии. Для геномного анализа профиля ЩФ выбран род *Arenibacter* (сем. *Flavobacteriaceae*) в качестве перспективного продуцента уникальных гликозидаз и метаболитов (Вакунина et al., 2013). Установлено, что α -N-ацетилгалактозаминидаза штамма *A. Latericius* KMM 426 эффективно инактивирует серологическую активность A₁- и A₂-эритроцитов без гемолиза, что выгодно отличает её от известных гомологов (Балабанова и др., 2015; Бакунина и др., 2020).

Проведен сравнительный анализ 34 доступных геномов *Arenibacter* spp. из базы NCBI. Построенная ML-филогения и анализ пангенома выявили таксономическую неоднородность рода: топология древа соответствует 12 валидным видам, при этом показана идентичность *A. Amylolyticus* AK53^T и *A. Lacus* JC631^T. Выделено пять кластеров, соответствующих новым видам, а штамм GZD-96 обоснован как представитель нового рода (dDDH \leq 17,9 %). Пангеном *Arenibacter* spp. (16419 ГК) характеризуется малым размером коровой части (2 118 ГК) и обилием генных сингтонов (12572), что указывает на высокую адаптивность рода. С

¹ Название *Rhodalgimonas* исправлено на официально утвержденное *Rhodalgimonas* (по данным LPSN, 2024 г.).

помощью antiSMASH и BAGEL идентифицировано 165 БГК, включая 11 NRPS и 91 PKS. Выявлено, что БГК штаммов *A. latericius* KMM 426 и *A. Certesii* DSM 19833 имеют 70 % сходства с кластерами антибиотиков (севадицина и термоактиноамида А), ингибирующих синтез клеточной стенки патогенов.

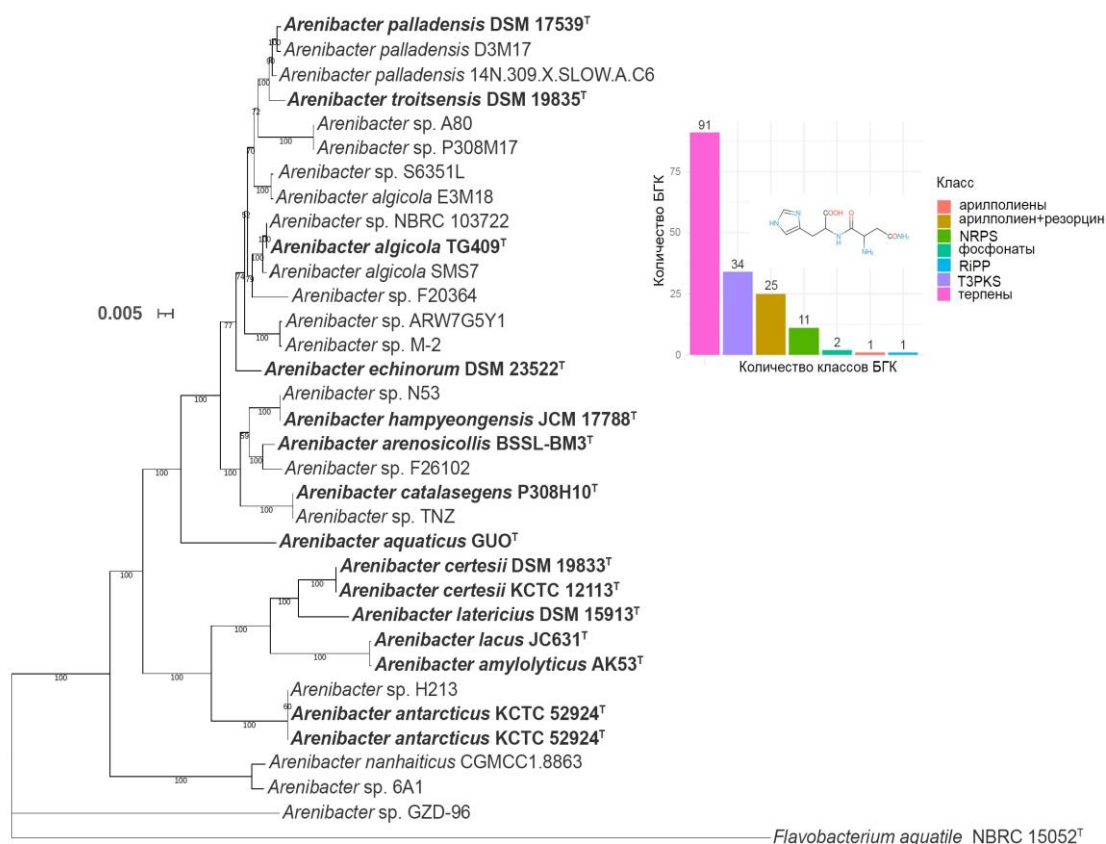


Рис. 8 – Филогеномное дерево (ML) и распределение БГК вторичных метаболитов у представителей рода *Arenibacter*. Типовые штаммы выделены жирным шрифтом. Классы БГК: арилполиены (оранжевый), арилполиены+резорцин (желтый), NRPS (зеленый), фосфонаты (голубой), RiPP (синий), ТЗРКС (фиолетовый), терпены (розовый). Коровая структура NRPS *A. latericius* DSM 15913^T (справа)

2. Полногеномный анализ щелочных фосфатаз (ЩФ) морских бактерий

Проведен сравнительный поиск CDS-гомологов и ортологов референтной ЩФ SmAP (Golotin et al., 2015) в аннотированных геномах 36-ти штаммов *Cobetia* spp. (Balabanova et al., 2024a). Идентифицированы три группы последовательностей («alkaline phosphatase», «alkaline phosphatase D» и «alkaline phosphatase family protein») послужившие основой для филогенетического анализа и получения рекомбинантных форм (рис. 9, табл. 4). Филогенетическая кластеризация с привлечением референтных структур позволила верифицировать аннотацию неидентифицированных генов у *Cobetia* spp. (рис. 9, табл. 4).

Установлено, что геномы исследованных штаммов характеризуются мультикопийностью генов ЩФ (от 2 до 5) различных семейств: PhoA, PhoD, PhoX и PafA. Выявлено, что два из них – дивергентные видоспецифичные паралоги PhoD или PhoX (рис. 9). Так, у *C. amphilecti* KMM 296 идентифицированы два PhoD на разных ветвях древа, а у *C. marina* и *C. pacifica* состав ЩФ ограничен тремя представителями семейств PhoD и PhoX (рис. 9, табл. 4). Наличие в одном микроорганизме ортологов и паралогов ЩФ свидетельствует о функциональной диверсификации ферментов для адаптации к дефициту P_i, колебаниям солености, pH и температуры (Балабанова и др., 2023). Использование в анализе структур PafA позволило идентифицировать видоспецифичные гомологи *C. amphilecti* и *C. litoralis* (рис. 9, табл. 4). Способность PafA расщеплять фосфодиэфирные связи существенно расширяет их экологическую роль в микробных сообществах (Балабанова и др., 2023).

Присутствие ЩФ PafA, специфичных для растительных флавобактерий, может указывать на способность *C. amphilecti* к колонизации корней (штамм UCD-24C выделен из *Zostera* sp.) (рис. 9).

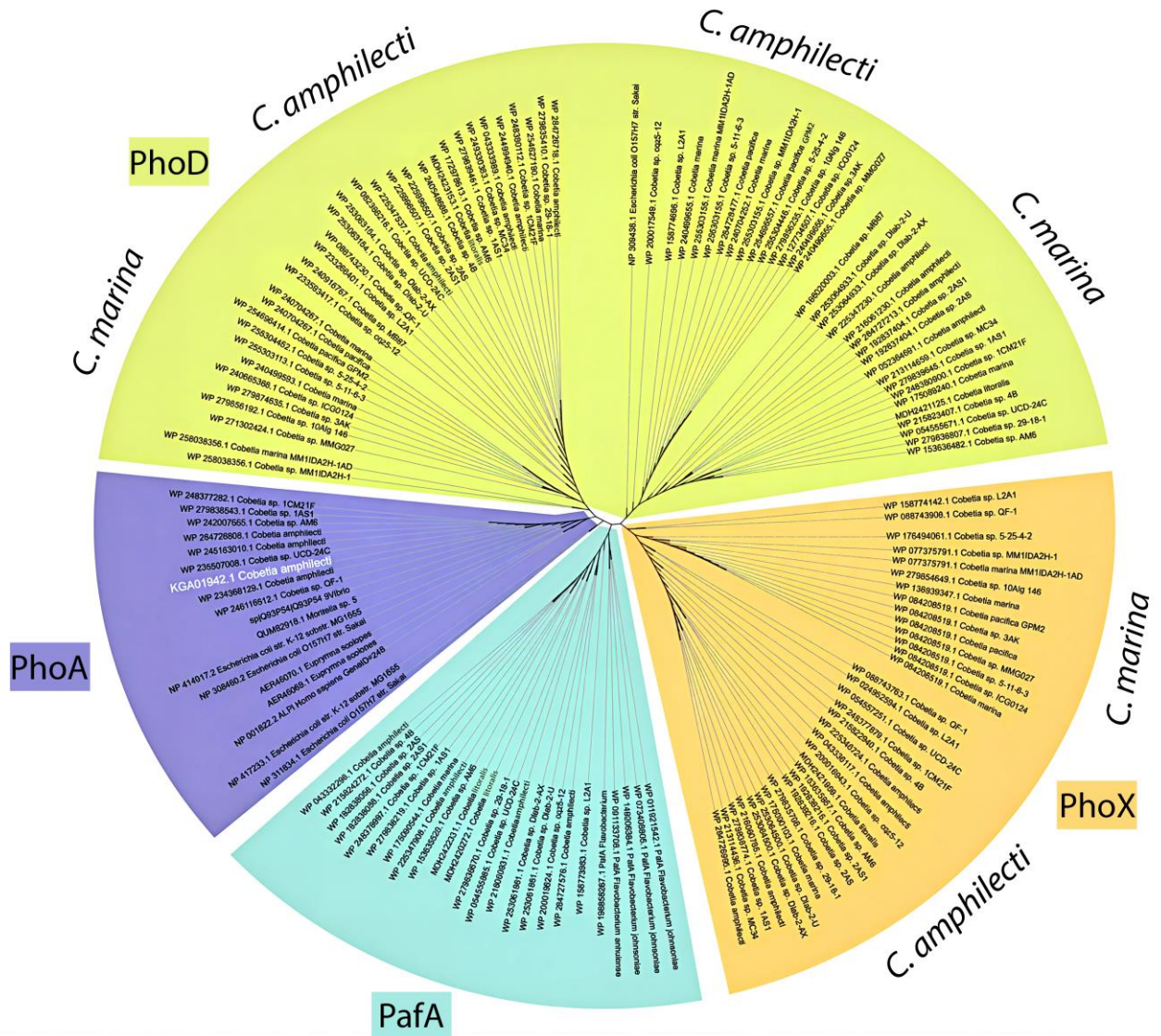


Рис. 9 – Результаты филогенетического анализа (ML) зрелых белков ЩФ *Cobetia* spp. и гомологов (бутстрэп $\geq 50\%$, масштаб 1,0). Номера NCBI указаны перед штаммами. Группы: PhoD, PhoA, PafA, PhoX. Референтные объекты: PhoA – CmAP (KGA01942), *V. splendidus* (VAP), *Moritella* sp. 5, человека, кальмара; PafA – *Flavobacterium* spp.; PhoD – *C. amphilecti* KMM 296 (Noskova et al., 2019). Результаты использованы для уточнения аннотации генов (Balabanova et al., 2024a)

Предполагается, что структурная классификация ЩФ носит условный характер и отражать прежде всего принадлежность белков к независимым линиям функциональных гомологов (рис. 9). Так, активность PhoA *C. Amphilecti* KMM 296 (CmAP), подобно PafA флавобактерий, не ингибируется избытком P_i , а PhoA *Alteromonas mediterranea* проявляет активность в отношении фосфоди-, триэфиров и сульфатов (Балабанова и др., 2023; Plisova et al., 2005). Общее количество ЩФ и наличие PhoA являются штаммоспецифичными признаками вида *C. amphilecti*, коррелирующими с источником выделения (рис. 9, табл. 4). Штаммы из ассоциатов с беспозвоночными (*C. amphilecti* KMM 296, NRIC 0815^T) содержат 5 ЩФ, включая PhoA, тогда как штаммы из морской воды и грунта (Noskova et al., 2021) кодируют лишь 4 белка семейств PhoD, PhoX и PafA. Гены PhoA с уровнем дивергентности до 11% выявлены также у филогенетически удаленных штаммов *C. crustatorum* (табл. 4).

Таблица 4 – Распределение генов ЩФ различных семейств в геномах *Cobetia* spp.

| Штамм NCBI | Вид | Геном NCBI | Белок NCBI | ЩФ | Источник |
|--|-----------------------|-----------------|--|--------------------------------------|--|
| <i>C. marina</i> JCM 21022 ^T | <i>C. marina</i> | GCF_001720485.1 | WP_240499655.1 WP_084208519.1 WP_240499593.1 | PhoD PhoX PhoD | Прибрежная вода, США |
| <i>C. pacifica</i> NRIC 0813 ^T | <i>C. marina</i> | GCA_030010515.1 | WP_284728477.1 WP_240704267.1 WP_084208519.1 | PhoD PhoX PhoX | Морской песок, Россия Японское море |
| <i>C. litoralis</i> NRIC 0814 ^T | <i>C. amphilecti</i> | GCF_029846315.1 | WP_249330383.1 WP_279830791.1 WP_279833222.1 WP_279832006.1 | PhoD PafA PhoX PhoD | Морской песок, Россия, Японское море |
| <i>C. amphilecti</i> NRIC 0815 ^T | <i>C. amphilecti</i> | GCA_030010415.1 | WP_284726718.1 WP_284726808.1 WP_284726995.1 WP_284727213.1 WP_284727576.1 | PhoD PhoA PhoX PhoD PafA | Губка <i>A. digitatus</i> , Охотское море (о. Сахалин) |
| <i>C. amphilecti</i> KMM 296 | <i>C. amphilecti</i> | GCF_000754225.1 | WP_043332298.1 WP_043333989.1 WP_245163010.1 WP_043336117.1 WP_052384691.1 | PafA PhoD PhoA PhoX PhoD | Мидия <i>C. grayanus</i> , Россия, Японское море |
| <i>C. crustatorum</i> JO1 ^T | <i>C. crustatorum</i> | GCF_000591415.1 | WP_248623642.1 WP_282705494.1 WP_282705495.1 WP_024952594.1 | PhoA PhoD PhoD PhoX | Ферментированная креветка, Южная Корея |

Примечание – Приведены названия согласно базе NCBI и новой классификации (Nedashovskaya et al., 2024).

Филогенетический анализ показал, что структуры PhoA *Cobetia* spp. локализованы в едином кластере с ЛПС-детоксицирующими ЩФ человека и кальмара, указывая на их общее происхождение (рис. 9) (Балабанова и др., 2023, Balabanova et al., 2024б). Прокариотическая PhoA характерна для симбионтов и патогенов (*Vibrio* spp., *E. coli*, *Enterobacter roggenkampii*, *Moritella* spp.), тогда как эукариоты используют гомологичные ЩФ для модуляции микробиома и купирования ЛПС-индуцированного воспаления. Наличие иммуномодулирующей ЩФ PhoA у *Cobetia* spp. может рассматриваться как стратегия колонизации тканей макроорганизмов (Балабанова и др., 2023, Balabanova et al., 2024а, б).

Использование ЩФ *Cobetia* spp. в качестве референтных структур позволило выявить аналогичное штаммоспецифическое распределение четырех семейств ферментов у представителей *Pseudoalteromonas*, *Moritella* и *Vibrio* (рис. 9). Установлено, что патоген лососевых *M. viscosa* кодирует ЩФ PhoD, PhoA и PhoX, тогда как непатогенный вид *M. marina* по составу ЩФ идентичен свободноживущим *C. marina* (отсутствие PhoA) (табл. 4). Геномы патогенных хитинолитиков *V. splendidus* и *V. jasicida* (Pentekhina et al., 2023) содержат до пяти ЩФ, включая PhoA в обеих хромосомах, но лишены семейства PafA. Напротив, *V. cholerae* кодирует лишь одну ЩФ PhoX с доменом вирулентности, что является следствием адаптивной редукции генома. Большинство штаммов *Pseudoalteromonas* spp. кодируют одновременно PhoA и PafA, аналогично *C. amphilecti* (рис. 9, табл. 4), что коррелирует с их космополитичностью и способностью к симбиозу с морскими беспозвоночными. У неподвижных флавобактерий *Arenibacter* spp., ассоциированных с макрофитами, обнаружено до 9 ЩФ на геном, включая специфичные для *Bacteroidota* семейства PafA и YncE (с доменом сульфатазы). Несмотря на выявленное разнообразие ЩФ, в аннотированных геномах альфа-протеобактерий *R. zhirmunskyi* и *M. arenosa* KCTC 52189 (рис. 7) достоверно идентифицированы лишь два гена семейств PhoX и PhoD. Низкая степень корреляции предсказанных и аннотированных последовательностей, вероятно, обусловлена высокой

дивергенцией новых таксонов и дефицитом данных об изученных продуктах генов ЩФ у данных групп бактерий (Nedashkovskaya et al., 2023).

Генетическое окружение и локализация генов ЩФ *Cobetia* spp. С помощью программы Syntenome в геномах *Cobetia* spp. впервые выявлена синтенемия гена *phoA* в составе кластера Na^+ -транслоцирующего ферредоксин:НАД⁺-оксидоредуктазного комплекса (Rnf/Rsx). Анализ геномов *Cobetia* spp. выявил консервативную хромосомную локализацию *phoA* вблизи *metG* (± 2 позиции), кодирующего метионин-тРНК-лигазу (рис. 10). В состав идентифицированного кластера входят компоненты архаичной ЭТЦ (*rsxABCDG*), системы детоксикации (*terB*), железосерного кластера (*apbC*) и регуляторы синтеза нуклеотидов и клеточного деления. Такая архитектура указывает на интеграцию PhoA в пути, сопряженные с транспортом H^+/Na^+ , запасанием энергии и поддержанием клеточного гомеостаза (рис. 10).

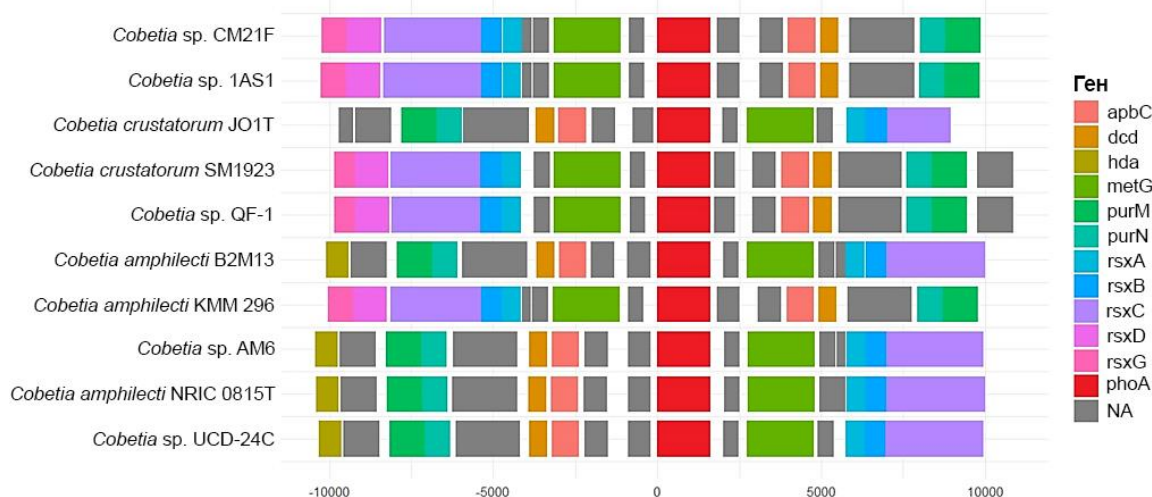


Рис. 10 – Синтенемия генных кластеров *phoA* у штаммов *C. amphilecti* и *C. crustatorum*. В центре (красный) – ген *phoA*; цветовая индикация соответствует компонентам ЭТЦ (*rsxABCD*), биосинтеза нуклеотидов (*purN, M, dcd*), трансляции (*metG*), регуляции клеточного деления (*hda*) и гомеостаза (*apbC*). NA – неидентифицированные функции. Масштаб в кодонах (Balabanova et al., 2024a)

Известно, что гены *rsx*-оперона *E. coli* кодируют компоненты мембранных комплексов ЭТЦ, функционально связанных с защитой от окислительного стресса. Регуляторное влияние PhoA на метаболизм клеток подтверждается экспериментальными данными: ЩФ *SmAP* проявляла дозозависимое ингибирующее действие (ЭД_{50} 1,1–4,0 Ед/мл) на формирование биопленок *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *S. aureus* и *B. subtilis* (Balabanova et al., 2016, 2017). Кроме того, *SmAP* подавляла пролиферацию клеток карциномы Т-47D и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 с IC_{50} 20 Ед/мл. Выявленные эффекты указывают на наличие универсального механизма регуляторного действия ЩФ PhoA на метаболизм клеток прокариот и эукариот.

Реконструкция метаболических путей *Cobetia* spp. С использованием программы *gapsec* предсказана нетипичная роль ЩФ PhoA *Cobetia* spp. в регенерации пула НАД(Н) из НАДФ(Н), необходимого для обеспечения катаболизма и компенсации окислительного стресса (Balabanova et al., 2024a, б). Выявлено уникальное разнообразие альтернативных НАД-зависимых систем, включая пути биосинтеза никотинамидных кофакторов, и пяти типов дыхательных комплексов: конститутивной менахинон-оксидоредуктазы и цитохром *b_o*-оксидазы (аэробноз), *b_d*-оксидазы (микроаэробноз), а также Rnf(Rsx)-комплекса и фумарат-редуктазы (анаэробноз). Обнаруженная локализация гена *phoA* в составе генного кластера Rnf-комплекса (рис. 10) позволяет предположить механизм функционального переключения систем (ко-регуляции) для обеспечения жизнеспособности в анаэробных условиях. Реконструирован широкий спектр путей анаэробной деградации ароматических соединений, пуринов и жирных кислот (β -окисление), а также системы продукции H_2 , окисления H_2S , нитратредукции и фиксации CO_2 . Наличие глиоксалатного шунта, путей

синтеза офтальмата и деградации акрилата указывает на высокую метаболическую пластичность и биотехнологический потенциал *Cobetia* spp.

Функциональная модель системы ЩФ PhoA *C. amphilecti*. Генетическое окружение *phoA* (рис. 10), субстратная специфичность (Plisova et al., 2005; Seitkalieva et al., 2024) и реконструированные метаболические пути позволяют позиционировать ЩФ PhoA как регулятор окислительно-восстановительных реакций, биосинтеза и клеточного цикла. Предложена схема организации мембранного комплекса Rsx и ЩФ PhoA, где ЭТЦ Rsx обеспечивает сопряжение переноса электронов с восстановленного ферредоксина на NAD^+ с генерацией натриевого потенциала для синтеза АТФ (рис. 11).

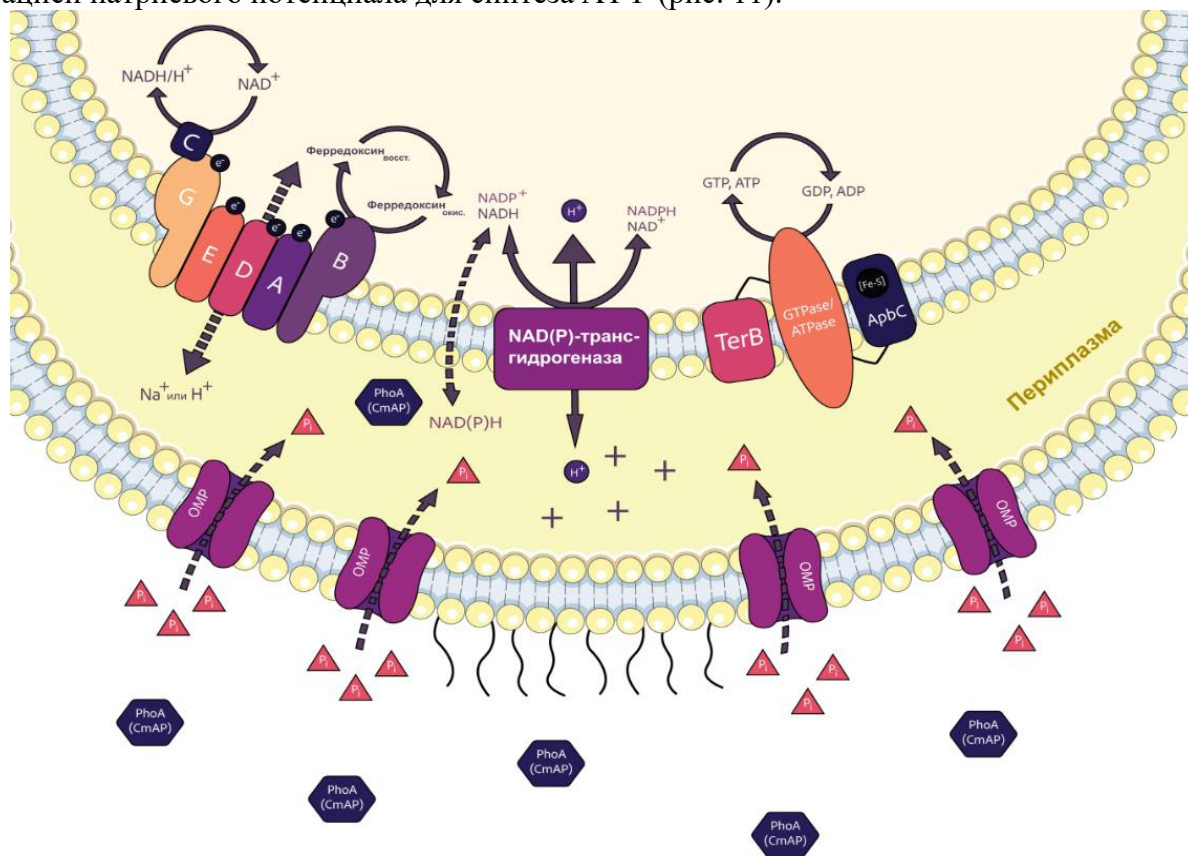


Рис. 11 – Схема организации мембранных белков, сопряженных с комплексом ЭТЦ Rsx ABCD(E)G, и предполагаемое участие ЩФ PhoA в поддержании окислительно-восстановительного баланса и осмолярности у морских бактерий *Cobetia* spp.: PhoA (CmAP) (темно-синий шестиугольник) – ЩФ семейства PhoA; P_i (красные треугольники) – неорганические фосфат-анионы; OMP (фиолетовые каналы) – порины; ABCDEG (разноцветные фигуры) – субъединицы ЭТЦ Rsx, связанные с $\text{NAD(H)}/\text{NAD}^+$ и ферредоксин-редуцированным/окисленным взаимопревращением; NAD(P)⁽⁺⁾-трансгидрогеназа (фиолетовый прямоугольник) – гипотетический DUF3465 домен-содержащий белок мембраносвязанной Si-специфической НАД(Ф)⁽⁺⁾-трансгидрогеназы; NAD(P)H (в периплазме) – внеклеточный НАД(Ф)H; GTPase/ATPase (оранжевый овал) - белковый комплекс ГТФазы/АТФазы; TerB (красный прямоугольник) – семейство ГТФ-зависимых белков (репарация ДНК, детоксикация биоцидов и пр.) (Balabanova et al., 2024a)

Регуляторная роль PhoA реализуется через контроль соотношения пулов $\text{НАД(Ф)H}/\text{НАД(Ф)}^+$, где дефосфорилирование НАДФН запускает катаболические процессы и дыхание (рис. 11). Данная реакция может выступать лимитирующей стадией, определяющей скорость окислительного фосфорилирования в анаэробных условиях за счет регуляции доступности пула НАД(H) для работы дыхательных комплексов. Наличие путей аэробного окисления H_2 указывает на сопряжение дегидрогеназ с дыхательной цепью или фиксацией CO_2 в цикле Кальвина. ГТФ/АТФазный комплекс в окружении *phoA* обеспечивает энергозависимую репарацию ДНК и детоксикацию. Кроме того, гидролиз фосфатов ЩФ

PhoA способствует регуляции осмолярности периплазмы за счет формирования пар фосфат-анионов с хемиосмотическими катионами (Na^+ или H^+) и обеспечивает депонирование полифосфатов в цитозоле (рис. 11).

Регуляторная роль изоформ ЩФ в различных типах метаболизма. Отсутствие оперонной структуры генов *phoA*, *phoD1*, *phoD2*, *phoX*, *pafA* у *Cobetia* spp. и состав их генных кластеров (локусов) указывают на специализацию каждого семейства ЩФ в различных типах окислительного метаболизма. Кластеры PhoD1 и PhoD2 содержат паралоги каталаз *katE* (НРП), сенсоры окислительного стресса *DJ-1/Pfp1* и стрессовые белки *GlsB/YeaQ/YmgE*, что связывает эти фосфатазы с защитой от H_2O_2 и Na^+ -зависимым транспортом субстратов. Для PhoX/PafA выявлено четыре типа кластеров, регулирующих переключение между гликолизом и глюконеогенезом (через регулятор *Cra*), ответ на абиотический стресс (оксидоредуктазы *GMC*), адаптацию к гипоксии (*TauD/TfdA*) и переход к биопленочному фенотипу (синтез сульфатированных полисахаридов и SDR-редуктаз).

Очевидно, что данные локусы кодируют системы, предотвращающие деполаризацию мембран и гибель клеток при интенсивном хемоосмотическом процессе. Примечательно, что пять CDS фосфатаз (*phoD1*, *phoD2*, *phoX*, *pafA* и *phoA*) соответствуют пяти типам энергетических систем, сопряженных с пулом НАД: путь *bd*-оксидазы (микроаэрофилия), путь менахинон-оксидоредуктазы (аэробное дыхание), путь *bo*-оксидазы (высокая аэрация), путь фумарат-редуктазы (анаэробное дыхание) и Rxs(Rnf)-комплекс (прямое сопряжение окисления ферредоксина с пулом НАД).

Филогенетическое родство и происхождение изоформ ЩФ. На основе анализа гомологов из 37 таксономических групп предположено, что бактериальные PhoA имеют общего предка с аэробными галоалкалифильными археями; в ходе дивергенции эти формы дали начало ЩФ пресноводных альфа-протеобактерий и эукариот. В отличие от PhoA, изоформы PhoD1, PhoD2, PhoX и PafA практически не встречаются у высших эукариот (беспозвоночных и млекопитающих), но широко представлены у микроорганизмов и растений. PhoD1 преобладают у грибов, растений и метаногенных архей; PhoD2 – у актиномицетов и бацилл. PhoX формируют кластеры альфа-, бета- и гамма-протеобактерий, а PafA идентифицированы у аскомицетов, флавобактерий и протеобактерий. Выявленное эволюционное родство бактериальных и эукариотических PhoA-подобных белков, а также их общие регуляторные функции, послужили основой для сравнительного анализа действия PhoA *C. amphilecti* в модельных системах высших организмов.

3. Структурно-функциональные особенности ЩФ PhoA *C. amphilecti*, использование в скрининге ингибиторов и генно-инженерных белках

Анализ первичной структуры ЩФ PhoA *C. amphilecti* KMM 296 CmAP (UniProt: Q1W622) показал, что ближайшим прототипом для построения 3D-модели служит кристаллическая структура *V. splendidus* VAP (PDB: 3E2D) (Golotin et al., 2015; Likhatskaya et al., 2018; Seitkalieva et al., 2024). Высокое качество модели (RMSD $\text{C}\alpha$ -атомов 0,43 Å) позволяет использовать ее в исследованиях *in silico* механизмов связывания фермента с лигандами (рис. 12, 13). Экспериментальный мутагенез подтвердил роль консервативных остатков: каталитического нуклеофила Ser65 (соотв. Ser102 у *E. coli* / Ser92 у человека), субстрат-связывающего Arg129 (Arg166) и ансамбля остатков, координирующих два иона Zn^{2+} (Zn1 и Zn2) в активном центре (рис. 12). Установлено, что специфическая функциональная замена Trp274 (соотв. His331 у *E. coli* / His317 у человека) в окружении Zn2- и Mg-сайтов обуславливает уникальную «разрыхленную» архитектуру активного центра морских ЩФ. В сочетании с гибкостью локальных областей в молекулах CmAP и VAP – длинная неструктурированная область интерфейса («большая петля») – это объясняет рекордную скорость оборота (k_{cat}) и высокую каталитическую эффективность морских ЩФ при низких температурах (Балабанова и др., 2023; Golotin et al., 2015) (рис. 12, 13).

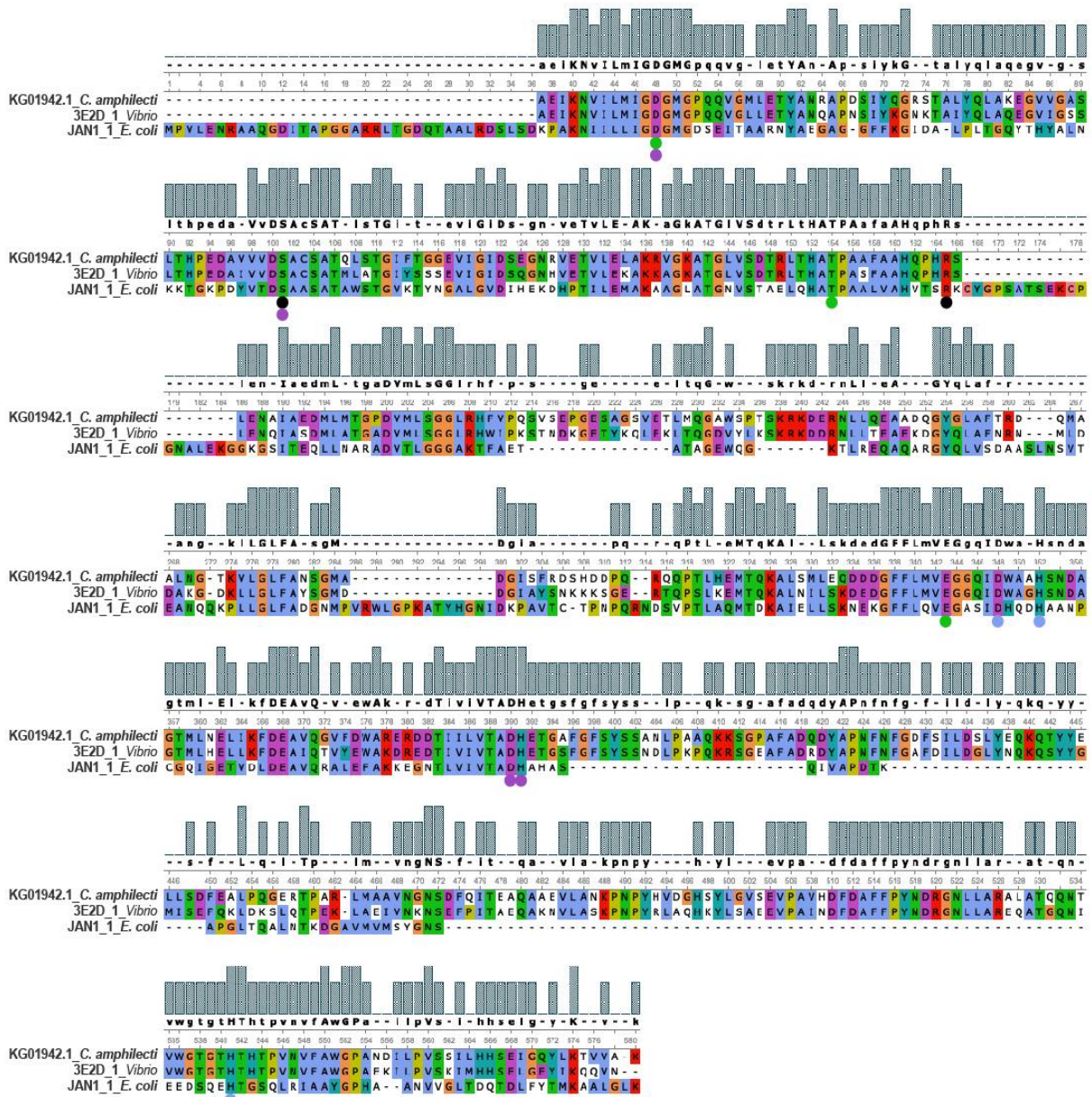


Рис. 12 – Выравнивание аминокислотных последовательностей PhoA морских бактерий *C. amphilecti* (СтАР) и *V. splendidus* (ВАР) относительно ЩФ *E. coli* (ЕСАР): Каталитический (S) и субстрат-связывающий (R) остатки обозначены черным цветом; ион-связывающие центры: Zn1 – голубым, Zn2 – розовым, и Mg – зеленым. Холодоактивные СтАР и ВАР имеют укороченную N-терминальную последовательность относительно мезофильной ЕСАР. «Большая петля» в пространственной структуре морских ЩФ формируется на участке 472–534 а.о. Рисунок получен с использованием программы *T-Coffee*

Структура ЩФ PhoA относится к (α - β - α)-типу: центральный β -лист из 9 тяжей окружен α -спиралями (рис. 13). При идентичности 82% с ВАР, фермент СтАР характеризуется повышенным содержанием Pro и элементов вторичной структуры. Олигомерное состояние СтАР зависит от pH среды, при этом фермент сохраняет стабильность в диапазоне 6,0–11,0 (Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015). Так, при pH 7,7 он функционирует как активный мономер (55 ± 6 кДа), а в области щелочного оптимума (pH 10,0–10,4) – димеризуется. Такая пластичность четвертичной структуры в сочетании с гибкостью "большой петли" обеспечивает рекордную скорость оборота (k_{cat}) и эффективную работу фермента в широком диапазоне внешних условий (рис. 13 А). Фермент СтАР термоллабилен ($T_{1/2}$ при 40°C – 27 мин), но превосходит по стабильности ВАР. Морские ЩФ PhoA отличаются от гомолога *E. coli* аномально высокими значениями константы Михаэлиса (K_m) и каталитической

эффективности (10^6 - 10^7 $M^{-1} \cdot c^{-1}$). Фосфат-ион (P_i) является конкурентным ингибитором (K_i 1,7 мМ). Существенные изменения в структуре (укорочение N-конца, наличие "большой петли") (рис. 12) отражаются на физико-химических свойствах ферментов, определяя их холодовую адаптацию. Интерфейс димера стабилизирован 12 внутримолекулярными H-связями, формирующимися вблизи основания петель (рис. 13 Б).

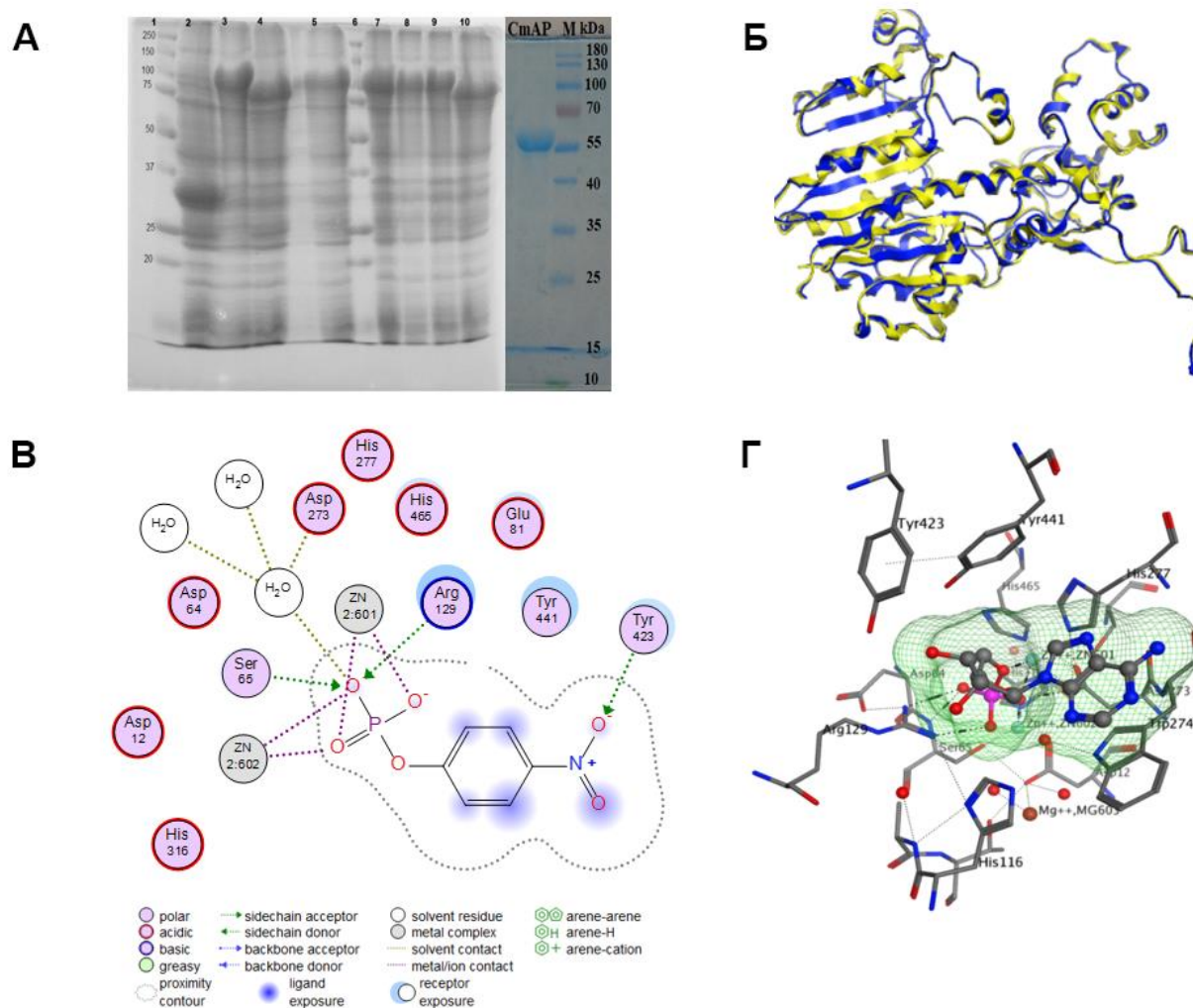


Рис. 13 – А (слева) Электрофореграмма белковых лизатов рекомбинантных культур *E. coli* Rosetta (DE3)/CmAP: 1 и 6 – маркеры молекулярной массы, кДа; 2 – контрольный лизат *E. coli* Rosetta (DE3)/pET-40b(+) (32,5 кДа – шаперон плазмиды DsbC); 3-5 и 7-10 – *E. coli* Rosetta (DE3)/CmAP (87,5 кДа – рекомбинантные белки DsbC/CmAP; 104,5 кДа – рекомбинантные бифункциональные лектины DsbC/CmAP/CGL). А (справа) Электрофореграмма рекомбинантной CmAP после удаления шаперона DsbC; М – маркеры молекулярной массы, кДа. Б – Суперпозиция CmAP и VAP (ленточная диаграмма). «Большая петля» участвует в формировании димера. В – 2D-диаграмма контактов активного центра CmAP и *n*-НФФ. Символы контактов из МОЕ v.2020.09. Г – Выделенная область контактов активного центра CmAP с природным субстратом 5'-АМФ

Высокая скорость оборота морских ЩФ RhoA обусловлена специфической конформацией активного центра при высоких значениях рН и ионной силы. Установлено, что NaCl оказывает двойственное влияние: ускоряет высвобождение P_i из активного центра и стабилизирует димерную структуру при рН \approx 8,0, что приводит к термической активации фермента и смещению температурного оптимума до 40–50 °С. Методом 3D-моделирования показано, что при рН \geq 10,0 остаток Tyr441, расположенный над входом в активный центр, приобретает отрицательный заряд, что способствует электростатическому выталкиванию продукта (PO_4^{-3}) и повышению k_{cat} (рис. 13 В, Г). Снижение сродства к субстрату и

ингибитору (P_i) при щелочных значениях pH связано с изменением состояния протонирования Arg129 (рис. 13 В). Значительная зависимость активности SmAP (VAP) от ионной силы по сравнению с наземными аналогами свидетельствует о коэволюции галофильной и психрофильной адаптаций, обеспечивающих стабильность и каталитическую эффективность фермента в условиях морской среды. При высоком значении pH активность SmAP повышается вне зависимости от ионной силы (Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015).

Механизм ингибирования ЩФ PhoA 5-азаиндолами. Несмотря на эволюционную удаленность, ЩФ PhoA морских бактерий и млекопитающих характеризуются высокой удельной активностью (до 20 000 Ед/мг) и эффективностью в отношении широкого спектра субстратов, в частности АМФ (рис. 13 Г) (Plisova et al., 2005; Seitkalieva et al., 2024; Balabanova et al., 2024б). Высокая консервативность активного центра (сходство каталитических доменов до 80 %) позволяет рассматривать SmAP как модельный фермент для скрининга ингибиторов ЩФ человека при тяжелых метаболических нарушениях (рис. 14–15).

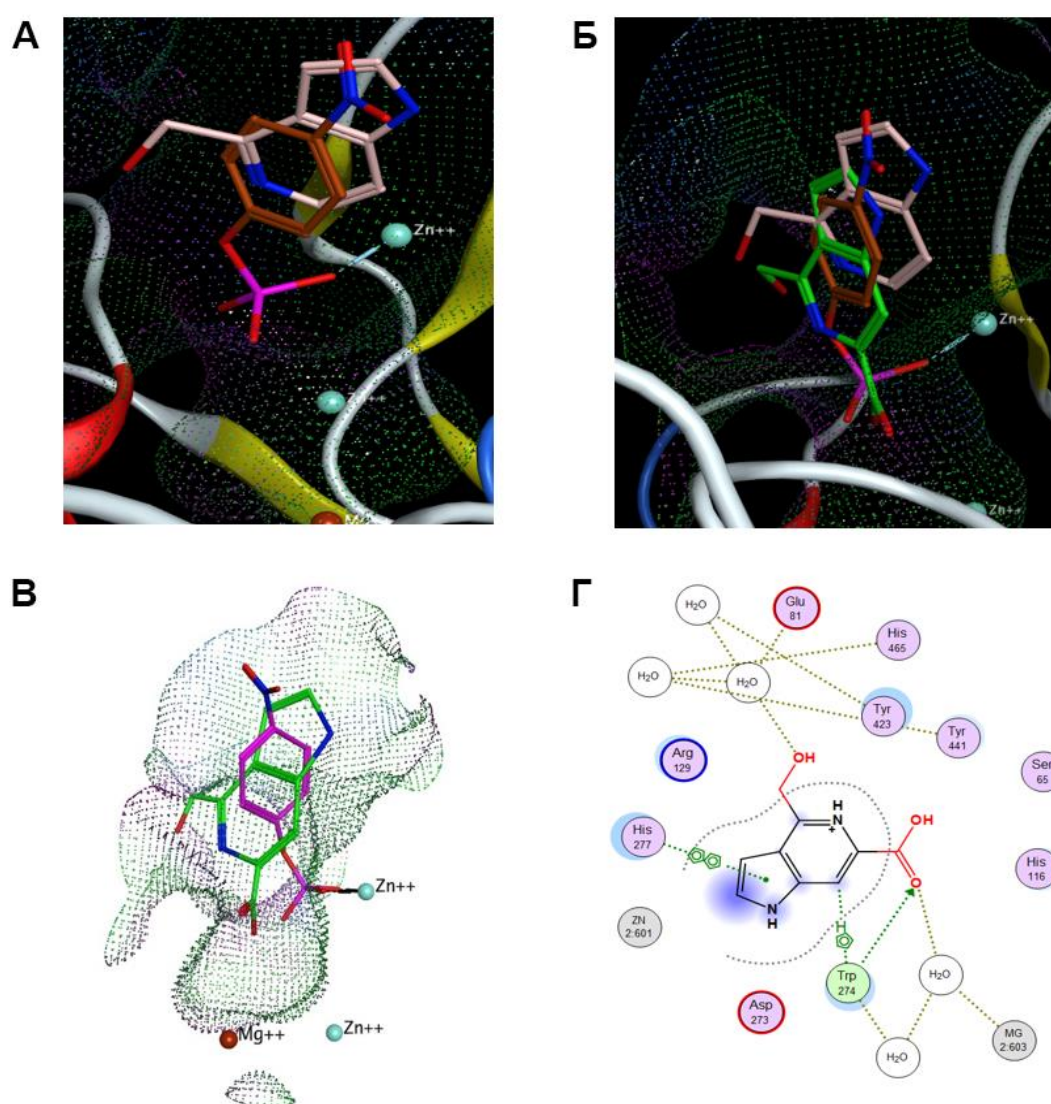


Рис. 14 – Суперпозиция комплексов активного центра SmAP с субстратом (*n*-НФФ) и лигандами (гитаррины В, С). А–В – пространственное наложение гитарринов на каталитический сайт: А – неактивный В (розовый) и *n*-НФФ (красный); Б – гитаррин С (зеленый), гитаррин В и *n*-НФФ. В – гитаррин С и *n*-НФФ. Ионы Zn^{2+} и Mg^{2+} представлены сферами (голубой и красный). Сетка отображает молекулярно-электростатический потенциал активного центра. Г – 2D-диаграмма контактов гитаррина С с аминокислотными остатками; красным выделены реакционноспособные группы (Seitkalieva et al., 2024)

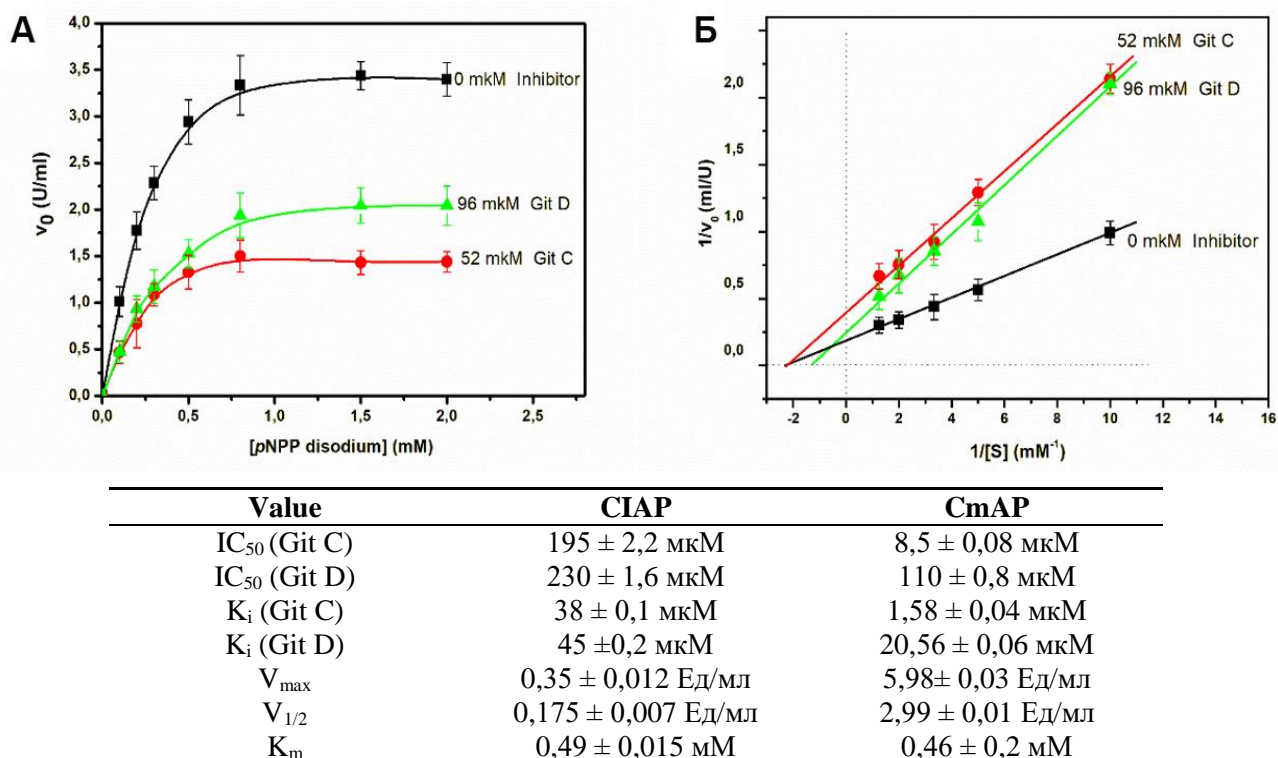


Рис. 15 – А. Влияние гитарринов С (Git C) и D (Git D) на V_{\max} каталитического гидролиза *n*-НФФ (2 мМ) под действием CmAP. Б. Реципрокный анализ Лайнвивера-Берка. Величины параметров кинетики и ингибирования ЩФ CIAP и CmAP указаны в таблице (Seitkalieva et al., 2024)

Так, в клетках рака молочной железы (линия MDA-MB-231) на фоне отсутствия транскриптов тканенеспецифической ЩФ TNAP наблюдается гиперэкспрессия плацентарной изоформы PLAP, которая инициирует формирование кальцификатов через сигнальный путь PI3K-Akt. Наряду с эктогидролазами CD39 и CD73, неспецифическая ЩФ играет ключевую роль в пуринергической регуляции, метаболизме фосфоинозитидов и контроле активности протеинкиназ. Таким образом, изучение специфического связывания лигандов с высокоактивной CmAP (как структурным аналогом ЩФ человека) служит эффективной основой для разработки селективных регуляторов aberrантной активности ЩФ (Balabanova et al., 2024б).

Впервые получены данные о структурных особенностях 5-азаиндолов из морской губки *G. fimbriata* (гитаррины А–Е), определяющих их ингибирующую активность в отношении ЩФ CmAP и кишечника теленка CIAP (рис. 14, 15). Методом молекулярного докинга установлено, что наличие карбоксильной группы при С6 и гидроксильной группы при С8 гетероцикла является критическим условием для связывания лигандов в активном центре. Гитаррин С, обладающий в десятки раз более высокой активностью, конкурирует с субстратом за места связывания благодаря пространственному сходству карбоксильной группы с фосфатной группой *n*-НФФ. Стабилизация комплекса происходит через сеть Н-связей, в том числе с ключевым остатком Trp274, участвующим в координации магниевого центра и димеризации субъединиц (рис. 14 Г). Напротив, отсутствие группы COOH у гитаррина В меняет его ориентацию в активном центре, что делает взаимодействие с Arg129 недостаточным для ингибирования (рис. 14 А, Б). Выявленные закономерности подтверждают адекватность модели CmAP для поиска специфических регуляторов ЩФ.

Согласно данным докинга, гитаррин С способен имитировать субстрат, препятствуя образованию фермент-субстратного комплекса (рис. 14). Однако экспериментальный кинетический анализ выявил неконкурентный тип ингибирования для гитаррина С (снижение V_{\max} при неизменной K_m) и смешанный тип для гитаррина D (рис. 15). Установлено, что чувствительность CmAP к гитарринам С и D значительно выше (IC₅₀ 8,5 и

110 мкМ), чем у кишечной ЦФ теленка (IC_{50} 195 и 230 мкМ соответственно). Это указывает на вероятность аллостерической регуляции высокоактивной PhoA *C. amphilecti* в консорциуме бактерий морской губки (табл. 4), при которой лимитирующей стадией становится высвобождение продукта реакции. При моделировании комплексов с ЦФ человека TNAP выявлено, что гитаррин D взаимодействует с теми же ключевыми остатками (Asp294, Glu342, Arg335, His171), что и гитаррин С. Данные остатки критически важны для координации металлов и субстрата в активном центре TNAP (рис. 16).

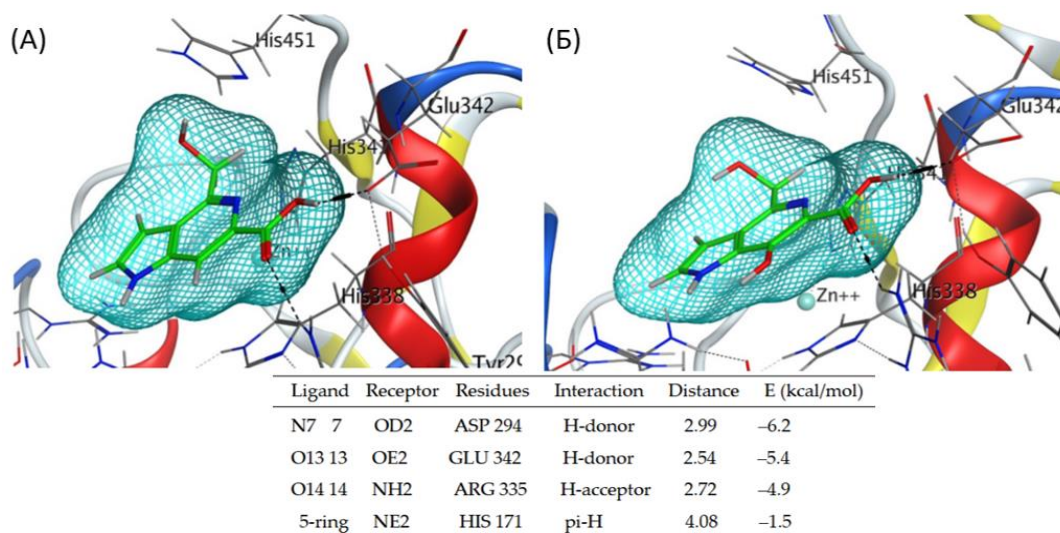


Рис. 16 – Молекулярный докинг гитарринов С (А) и D (Б) в активный центр ЦФ человека (TNAP): Сетка отображает контур молекулярно-электростатического потенциала каталитического сайта. В таблице МОЕ приведены типы взаимодействий лигандов с ключевыми аминокислотными остатками и расчетные значения свободной энергии связывания (ΔG) (Seitkalieva et al., 2024)

Выявленный неконкурентный механизм действия является преимуществом для разработки селективных препаратов, так как их эффективность сохраняется даже при высоких концентрациях эндогенных субстратов в патологическом очаге. Таким образом, 5-азаиндолы (гитаррины) представляют значительный интерес как потенциальные ингибирующие регуляторы ЦФ человека (рис. 16).

Бифункциональные диагностические белки на основе ЦФ PhoA. Высокая активность рекомбинантной мономерной ЦФ PhoA морской бактерии SmAP позволяет использовать её в составе гибридных белков для ферментативного мечения. Это применимо, например, при создании тест-систем для диагностики рака на основе лектинов морских беспозвоночных с уникальной углеводной специфичностью или для выявления антител к порину OmpF *Y. pseudotuberculosis* (Буйновская и др., 2018; Balabanova et al., 2014; Kovalchuk et al., 2015).

Использование лектинов в диагностике рака эффективнее иммунохимических методов (ИФА), так как углеводные детерминанты позволяют точнее дифференцировать опухоли на ранних стадиях и прогнозировать метастазирование. На основе маннан-связывающего лектина голотурии *A. japonicus* (MBL-AJ), специфичного к онкомаркерам (АФП, РЭА и др.), разработан неинвазивный метод ранней диагностики рака шейки матки (специфичность 93,6 %). Создание бифункционального белка MBL-AJ/SmAP с активностью ЦФ исключает этап использования меченых антител, сокращая процедуру ТЛФА до прямого связывания с маркерами вагинального секрета и их визуализации (Balabanova et al., 2014).

Бифункциональный белок SmAP/OmpF позволяет выявлять специфические антитела в сыворотках больных псевдотуберкулезом методом прямого ИФА, исключая этап вторичных антител. Это упрощает диагностику острых и вторично-очаговых форм заболевания (рис. 17).

Для получения растворимых бифункциональных белков в клетках *E. coli* Rosetta (DE3) со стороны С-конца лектинов или поринов присоединяли ЩФ СмАР через гибкий линкер (G)₄S(G)₄S(G)₄ с использованием вектора рЕТ40b(+) (рис. 17, 18).

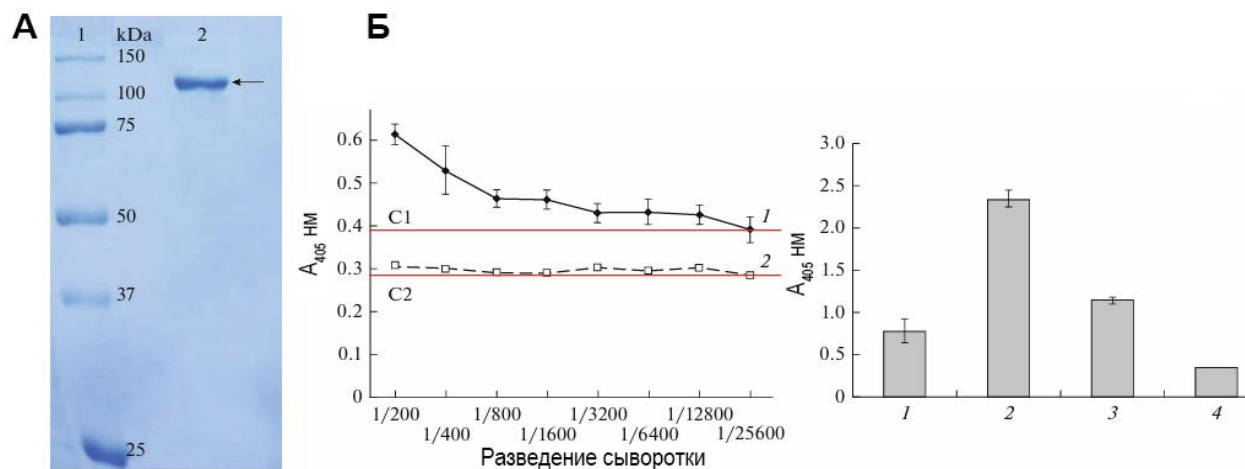


Рис. 17 – Характеристика и функциональная активность бифункционального белка СмАР/OmpF. А. Электрофореграмма в SDS-ПААГ: 1. маркеры молекулярных масс; 2. очищенный препарат зрелого гибридного белка (127,5 кДа), состоящего из шаперона DsbC (32,5 кДа), ЩФ СмАР (55 кДа), порина *Y. pseudotuberculosis* OmpF (40 кДа). Б. Результаты ИФА (детекция по собственной ферментативной активности СмАР): *слева* – взаимодействие СмАР/OmpF (0,5 мкг/лунку) со специфическими антителами к порину OmpF в двукратных разведениях; C1 и C2 – контроли активности гибрида и индивидуальной ЩФ в отсутствие антител; *справа* – специфичность взаимодействия СмАР/OmpF: 1. сыворотки неиммунных мышей; 2. антитела к OmpF; 3. пуловая сыворотка больных псевдотуберкулезом; 4. контроль (СмАР/OmpF + *n*-НФФ). Время инкубации с субстратом – 25 и 40 мин соответственно (Буйновская и др., 2018)

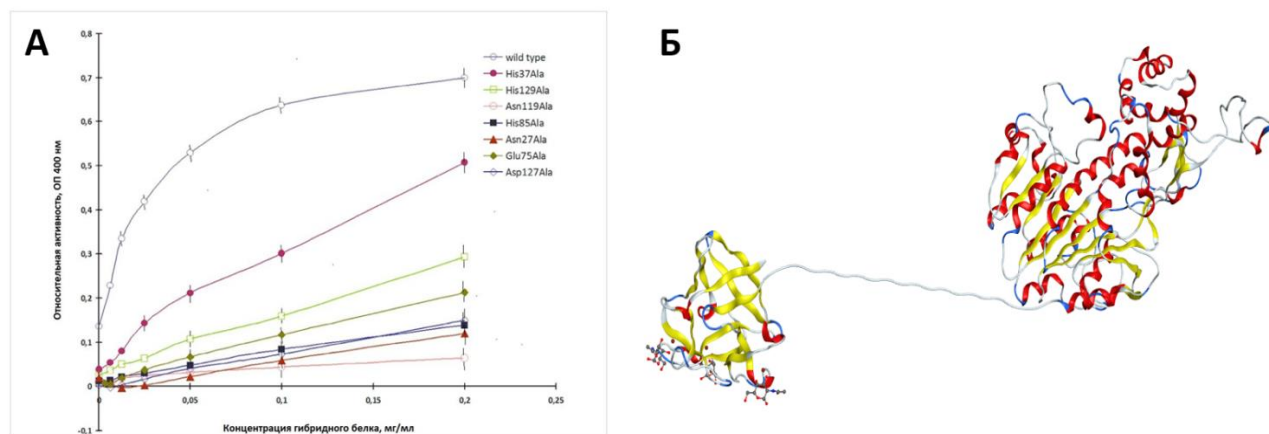


Рис. 18 – Исследование гибридного белка CGL/СмАР. А. Определение углевод-связывающей активности рекомбинантного лектина мидии CGL/СмАР с точечными мутациями по ферментативной активности ЩФ СмАР. Количество лектин-связанных комплексов оценивали по выходу хромогенного *n*-НФ (ОП ось Y) (Kovalchuk et al., 2018). Б. 3D-модель гибридного комплекса CGL/СмАР: *слева* — гомотример GalNAc/Gal-специфичного лектина CGL (желто-красные ленты), связанный с тремя углеводными детерминантами муцина (представлены в виде стержневых моделей); *справа* — мономер СмАР (желто-красные ленты), соединенный с CGL гибким линкером (серая нить) (Likhatskaya et al., 2018)

Использование высокоактивной ЩФ СмАР в составе бифункциональных белков позволяет не только усовершенствовать диагностические тест-системы, но и эффективно мониторировать этапы их очистки, а также исследовать структурно-функциональные свойства лиганд-связывающих партнеров, в том числе методом мутагенеза (Голотин и др.,

2015; Балабанова и Исаева, 2015; Балабанова и др., 2019; Kovalchuk et al., 2018). Таким образом была определена роль трех консервативных мотивов НРК(Y)G в углевод-связывающих сайтах 1–3 гомотримерного GalNAc/Gal-специфичного лектина мидии CGL (Kovalchuk et al., 2015). Способность CGL распознавать и связывать глоботриозу Gb3 и другие детерминанты гликопротеинов муцинового типа на поверхности клеток делает структурные исследования крайне значимыми для понимания его биологической роли и молекулярных основ онкогенеза (рис. 19).

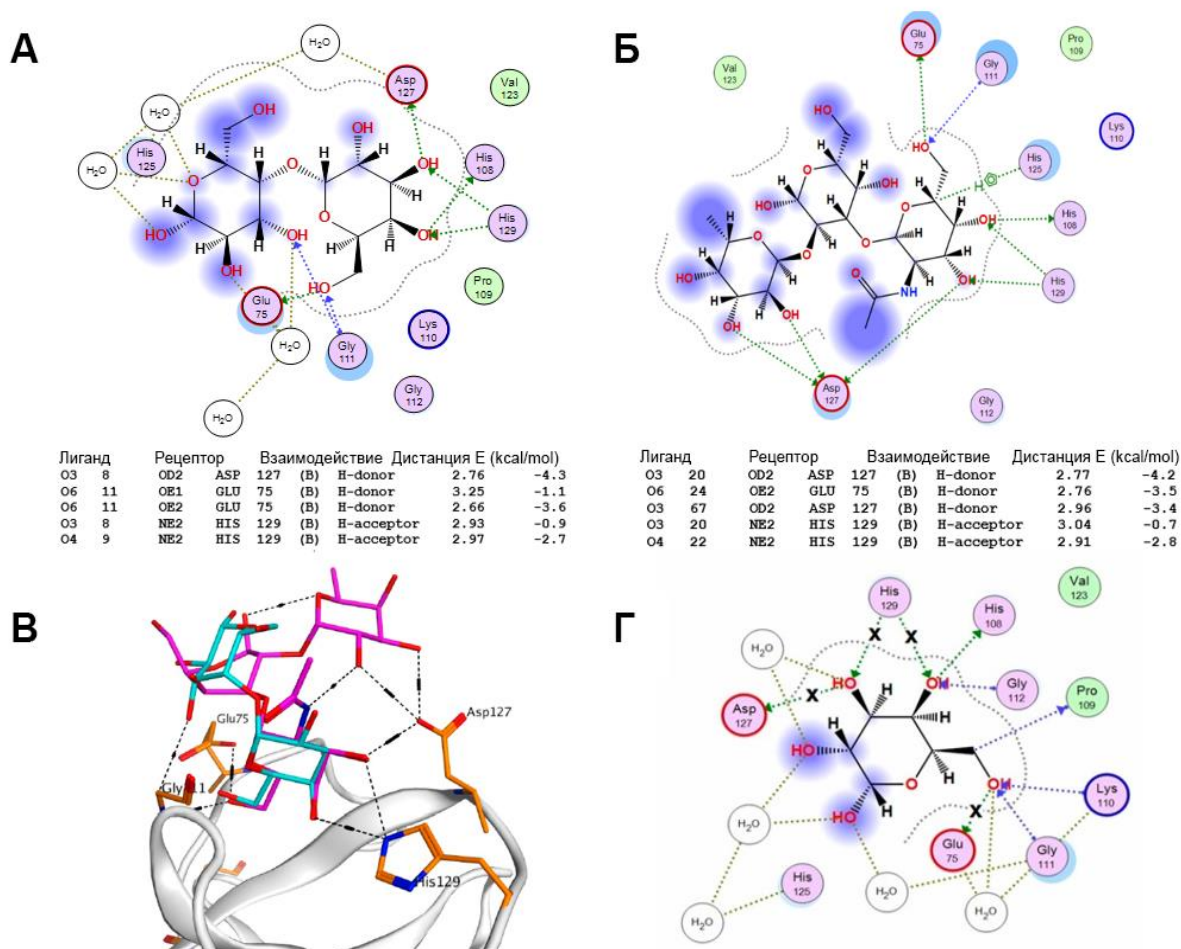


Рис. 19 – Анализ углевод-связывающего сайта 3 лектина CGL: 2D-диаграммы контактов Gb3 (А), трисахарида муцина (Б) и Gal (Г) в активном центре. В. Суперпозиция Gb3 и трисахарида муцина (розовый); Asp127 образует две Н-связи с остатком Fuc в составе муцина. На панели Г крестом (X) отмечено отсутствие связей с Gal у мутантных форм (Kovalchuk et al., 2018)

С использованием ферментативной активности CmAP оценен вклад отдельных остатков, предсказанных *in silico*, в формирование углевод-связывающих сайтов тримера CGL (рис. 19 Г). Было установлено, что экспериментальная лектинная активность мутантных форм CGL в отношении муцина не соответствовала расчетной энергии связывания глоботриозы с сайтом 3 (рис. 19 А, Б). Молекулярный докинг показал, что лектин не только связывает два концевых остатка Gal в олигосахариде муцина, но и проявляет специфичность к третьему остатку – Fuc (рис. 19 Б, В). Поскольку в структуре Gb3 в аналогичной позиции находится остаток Glc, расчетная энергия связывания CGL с муцином значительно ниже, чем с глоботриозой или моносахаридом Gal (рис. 19). Кроме того, для аланиновых замен по гомологичным положениям Н37 (сайт 1), Н85 (сайт 2) и Н129 (сайт 3) предсказано повышение специфичности CGL к сиаловым кислотам при одновременном снижении аффинности к Gal (рис. 18, 19). Способность мутантных форм CGL распознавать сиалированные онкомаркеры позволит повысить чувствительность диагностических тест-систем на основе гибрида CGL/CmAP.

4. ЛПС-дефосфорилирующая активность и противовоспалительный эффект ЩФ PhoA *C. amphilecti* в модели хронического ДСН-индуцированного колита

Целью исследования стало определение протекторного потенциала высокоактивной ЩФ СтАР морской бактерии *C. amphilecti* в мышинной модели колита, индуцированного декстрансульфатом натрия (ДСН). Эффект перорального введения СтАР сопоставляли с действием рекомбинантной кишечной ЩФ человека (hrecAP), полученной в растительной системе, для оценки перспектив лечения патологий, связанных с гиперпроницаемостью кишечного барьера (Balabanova et al., 2024б). Нарушение барьерной функции эпителия ведет к транслокации эндотоксина (ЛПС) в кровоток и запуску системного воспаления. ЛПС, как ключевой паттерн PAMP, активирует комплекс TLR4, что через фактор NF-κB стимулирует экспрессию мембранных НАДФН-зависимых оксидаз: NOX2 в фагоцитах и NOX1 в эпителиоцитах. Это инициирует «окислительный стресс» (выработку АФК, H₂O₂, HOCl), активацию металлопротеиназы MMP9 и выброс провоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-6, TNF-α) (Balabanova et al., 2024б). Установлено, что ЩФ кишечника (IAP) является компонентом врожденного иммунитета: дефосфорилирование ЛПС снижает его эндотоксическую активность, купирует локальное воспаление и восстанавливает целостность барьера. Таким образом, высокоактивная СтАР рассматривается как перспективное средство для профилактики и комплексной терапии патологий, вызванных aberrантной активацией TLR4.

Дефосфорилирование липида А (удаление одной из двух фосфатных групп в положениях 1 или 4') снижает эндотоксичность ЛПС в 100 раз. При этом дефосфорилированный ЛПС сохраняет сродство к TLR4, но выступает уже в роли антагониста, блокируя внутриклеточную сигнализацию и активацию NF-κB. Это предотвращает каскад иммунных реакций, включая выброс провоспалительных цитокинов. Примечательно, что защитное действие ЩФ IAP не ограничивается только детоксикацией ЛПС: фермент ингибирует высвобождение TNF-α и IL-6 лейкоцитами даже в отсутствие эндотоксина, ослабляет окислительный стресс, регулирует экспрессию белков плотных контактов (tight junctions) и модулирует микробиоту кишечника. Подобные эффекты, наряду со смягчением инсулинорезистентности, подтверждают многогранный механизм противовоспалительного действия ЩФ (Balabanova et al., 2024б).

Известно, что ЩФ участвует в поддержании pH поверхности двенадцатиперстной кишки, абсорбции длинноцепочечных жирных кислот и нейтрализации внеклеточных нуклеиновых кислот, флагеллина и нуклеотидов. Образующийся при ферментативной деградации пуринов сигнальный аденозин снижает доступность пуринергических рецепторов и ингибирует сигнальные пути NF-κB, TNF и PI3K-Akt (Balabanova et al., 2024б). Фермент способен инактивировать компоненты поврежденных клеток и митохондрий (DAMPs). Недавно была обнаружена IAP-индуцированная и TLR4-зависимая экспрессия генов аутофагии, приводящая к подавлению активации NF-κB и снижению уровня мРНК IL-1β. Кроме того, эктофермент TNAP обнаруживается в перинуклеарном пространстве остеогенных клеток-предшественников и миобластов в процессе аутофагии, регулируя митохондриальное дыхание и уровень АТФ. Дефицит TNAP в прогениторных клетках приводит к гиперфункции митохондрий, что нарушает процессы пролиферации и дифференцировки. Таким образом, ЩФ может быть ассоциирована с митохондриальными или прилегающими к ним лизосомальными мембранами и совместно с пирофосфатазой ENPP1 влиять на функцию митохондрий. Генерируя высокий уровень P_i, она предотвращает деполяризацию мембран и участвует в регуляции сигнальных путей воспаления (Balabanova et al., 2024б). Подобную роль может выполнять ЩФ PhoA морских бактерий, поддерживая осмоляльность и окислительно-восстановительный баланс (рис. 11) (Balabanova et al., 2024а). Кроме того, ЩФ способна дефосфорилировать ключевые трансмембранные регуляторы (фосфоинозитиды, киназы, фосфатазы), предотвращая их избыточную активацию, что ведет к восстановлению биоэнергетической функции и снижению гликолитической зависимости клеток. В совокупности такие многогранные эффекты ЩФ открывают перспективы для

разработки митохондриально-направленных препаратов для борьбы с ожирением, диабетом, раком и системным воспалением Balabanova et al., 2024б). В данной работе предложен универсальный механизм, объясняющий разносторонние эффекты эндогенной и экзогенной рекомбинантной ЩФ PhoA (рис. 20).

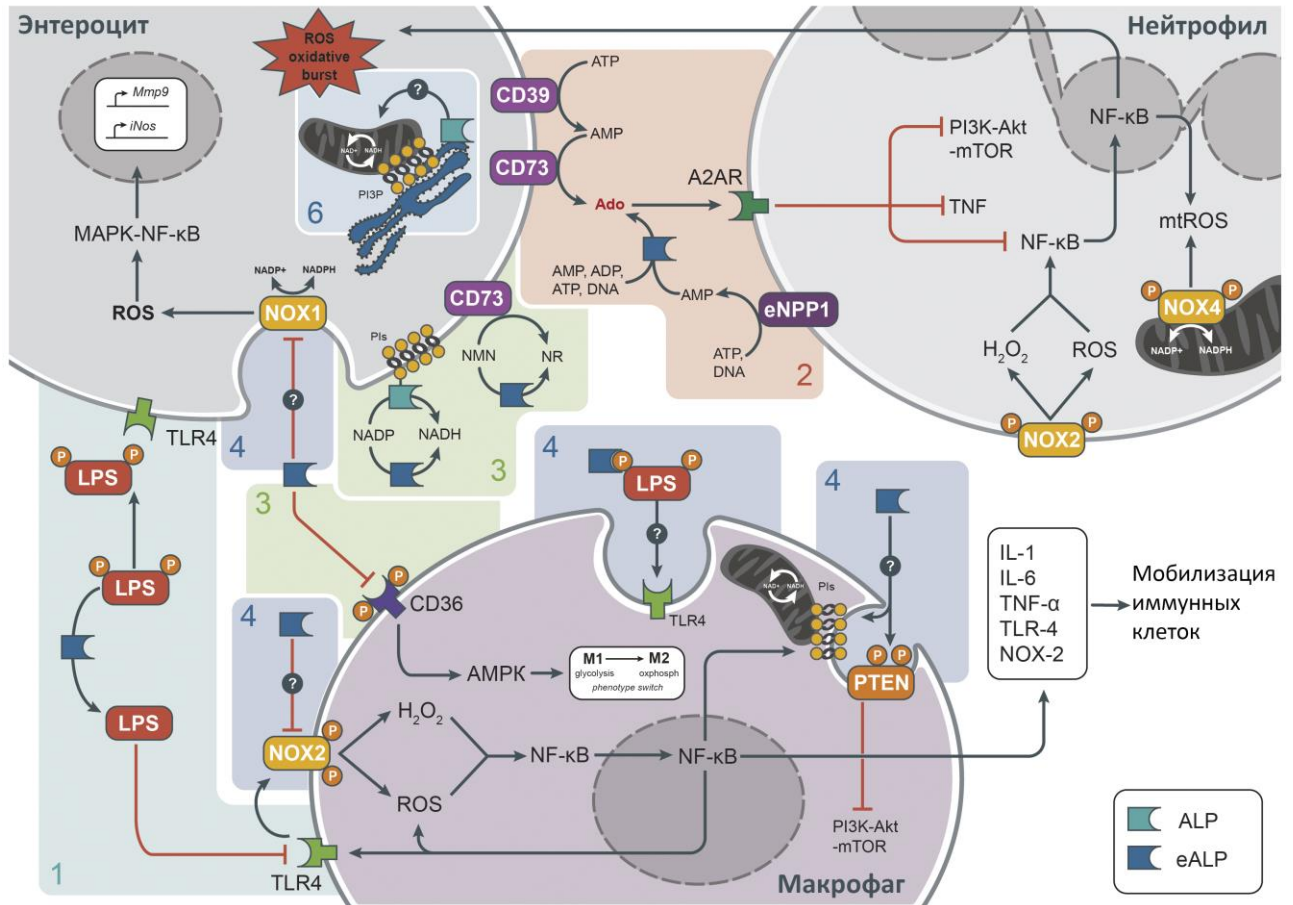


Рис. 20 – Механизмы противовоспалительного действия клеточной (ALP) и внеклеточной (eALP) ЩФ. **1.** Ингибирование взаимодействия LPS–TLR4 и блокирование NF-κB-зависимых путей (IL-1, IL-6, TNF-α, NOX2), подавление продукции АФК (внеклеточных и митохондриальных) и рекрутирования иммунных клеток. **2.** Дефосфорилирование внеклеточных пуринов (ATP, ADP, AMP) и пиримидинов совместно с эктоферментами CD39, CD73 и eNPP1 до аденозина (Ado). Ado через рецепторы A2AR ингибирует пути NF-κB, PI3K/Akt/mTOR и TNF-α. **3.** Дефосфорилирование никотинамидмононуклеотида (NMN) до никотинамидрибозида (NR) и НАДФН (NADPH) для биосинтеза НАД⁺ (NAD⁺) *de novo* и в путях реутилизации. **4.** Предполагаемая (?) индукция интернализации комплексов (ALP-LPS-TLR4, eALP-PTEN) в фосфоинозитидных сайтах (PI3P) для кавеоларного эндоцитоза. **5.** Дефосфорилирование рецептора CD36 (транслоказы длинноцепочечных жирных кислот, активация β-окисления), способствующее переключению метаболизма макрофагов с гликолиза (анаболизм) на окислительное фосфорилирование (катаболизм) (поляризация M1→M2). **6.** Вероятное участие в формировании ауто(мито)фагосомы. Дополнительно: NOX1, NOX2, NOX4 – НАДФН-оксидоредуктазы; PTEN – регулятор пути PI3K/Akt/mTOR; ALP/eALP – формы ЩФ; P – фосфат-ион (Balabanova et al., 2024б)

Производство рекомбинантных ЩФ млекопитающих осложнено их зависимостью от посттрансляционных модификаций, тогда как высокоактивная ЩФ CmAP успешно экспрессируется в *E. coli* (Golotin et al., 2015; Seitkalieva et al., 2024; Balabanova et al., 2024а). Прокариотические ЩФ PhoA обладают сходной структурой и специфичностью, что при простоте биотехнологического получения делает их перспективными для биомедицины. Хотя удельная активность большинства бактериальных ЩФ значительно уступает ферментам млекопитающих, высокоактивные ЩФ морских бактерий сопоставимы с ними, что позволяет использовать их в терапевтически допустимых концентрациях (Golotin et al., 2015;

Balabanova et al., 2017). Рекombинантная ЩФ CmAP проявила высокую активность в отношении ЛПС *E. coli*: эффективность гидролиза составила 80 % при предварительной солиubilизации субстрата в буфере с ТЭА (рис. 21 А).

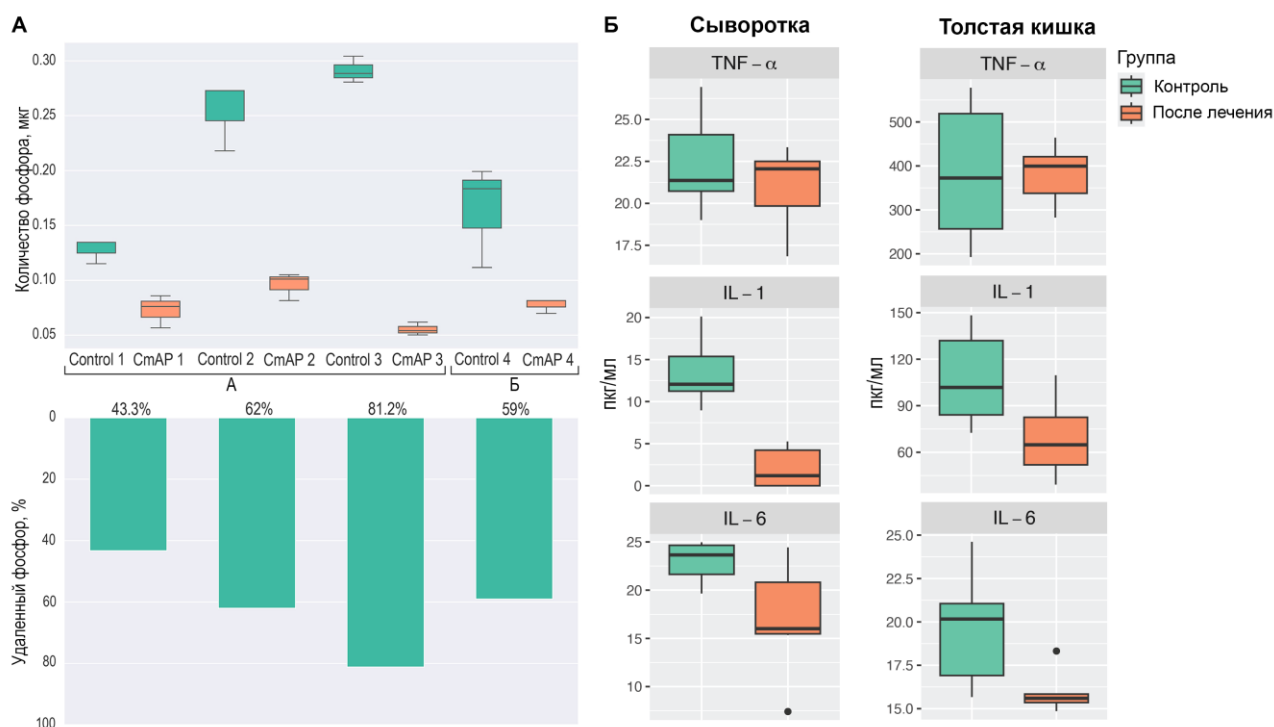


Рис. 21 – Оценка дефосфорилирования ЛПС *in vitro* и противовоспалительного эффекта *in vivo*. **А.** Содержание фосфора (мкг) в образцах ЛПС *E. coli* O55:B5 до (контроль) и после обработки ЩФ CmAP (1 ч, 37 °C). Условия подготовки ЛПС (12 ч): 1 – 24 °C; 2 – 37 °C; 3 – 24 °C + ТЭА (1 мкл/мл); 4 – pH 10,0 (24 °C). Указан процент гидролизованного P_i (%) относительно контроля (Balabanova et al., 2024a). **Б.** Влияние рекомбинантных ЩФ CmAP и hссАР на уровни провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1β, IL-6) в сыворотке крови (слева) и тканях толстой кишки (справа) в модели ДСН-индуцированного колита. Различия статистически значимы (p < 0,05)

Повышение температуры до 37 °C также способствовало растворимости ЛПС и росту ферментативной активности (рис. 21 А). Таким образом, физиологические условия в кишечнике млекопитающих благоприятны для дефосфорилирования липида А ферментом CmAP, что снижает активацию TLR4-зависимого пути воспаления (рис. 20, 21).

Проведен сравнительный анализ эффектов рекомбинантных CmAP и hссАР в мышинной модели хронического ДСН-индуцированного колита (рис. 21–23). В контрольной группе (без лечения) наблюдалось снижение массы тела (с 37,8 ± 1,0 до 36,9 ± 0,9 г) и 20%-я смертность животных. В группах, получавших CmAP или hссАР, гибель животных отсутствовала, а масса тела имела тенденцию к росту (с 38,7 ± 0,6 до 39,3 ± 0,6 г) (p = 0,058). Несмотря на наличие отдельных клинических признаков (диарея, примесь крови), применение ферментов предотвращало истощение организма. Индукция колита сопровождалась выраженным лейкоцитозом – четырехкратное увеличение лимфоцитов и гранулоцитов, двукратным увеличением фракции моноцитов и эозинофилов, а также характерными изменениями тромбоцитарного звена: снижением общего количества тромбоцитов на фоне роста их среднего объема (MPV), что косвенно указывает на компенсаторный ответ при кишечных кровотечениях (рис. 22). Рост численности гранулоцитов и лимфоцитов свидетельствует об активации неспецифического и специфического звеньев иммунитета, характерной для воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК) и ДСН-индуцированного колита. При этом значимых изменений уровней эритроцитов и гемоглобина зафиксировано не было (рис. 22). Введение CmAP приводило к выраженному снижению общего количества лейкоцитов

(преимущественно за счет лимфоцитарной и гранулоцитарной фракций), сопоставимому с эффектом человеческой ЦФ hresAP (рис. 22).

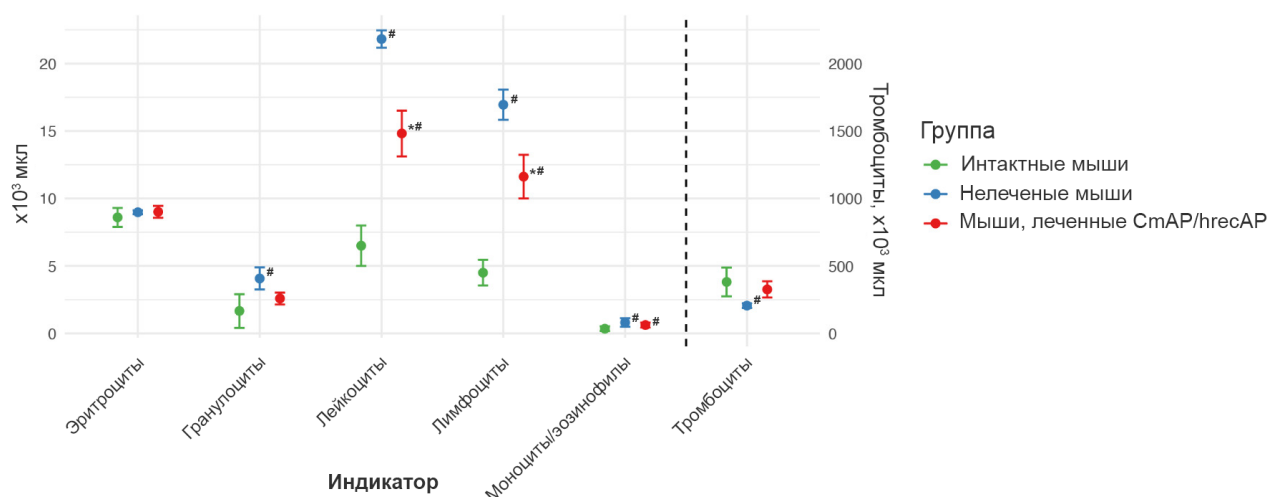


Рис. 22 – Гематологические показатели периферической крови мышей CD-1 при пероральном введении ЦФ СтАР и hresAP (100 Ед). Экспериментальный колит индуцировали 3% ДСН (циклы: 5 дней – ДСН, 5 дней – вода, 5 дней – ДСН). Ферменты вводили с 16-го по 22-й день. Группы ($n = 10$): интактная (вода), контроль (нелеченый колит), опытные (СтАР/hresAP). Данные представлены как $M \pm SE$; $p < 0,05$ (# – относительно интактной группы; * – контрольной группы)

Кроме того, в группах, получавших ферменты, наблюдалось восстановление численности тромбоцитов. Таким образом, пероральное применение СтАР способствует купированию системного воспаления и уменьшению интенсивности кишечных кровотечений (рис. 22). По данным теста Манна-Уитни, средний вес ткани толстой кишки в группах с ДСН-индуцированным колитом (контроль и опыт) составил 93 ± 7 и 89 ± 4 мг соответственно, что ниже показателя интактных животных (107 ± 3 мг). Хотя применение СтАР и hresAP существенно не влияло на массу органа, ферменты снижали выраженность морфологических изменений (рис. 23 А-В).

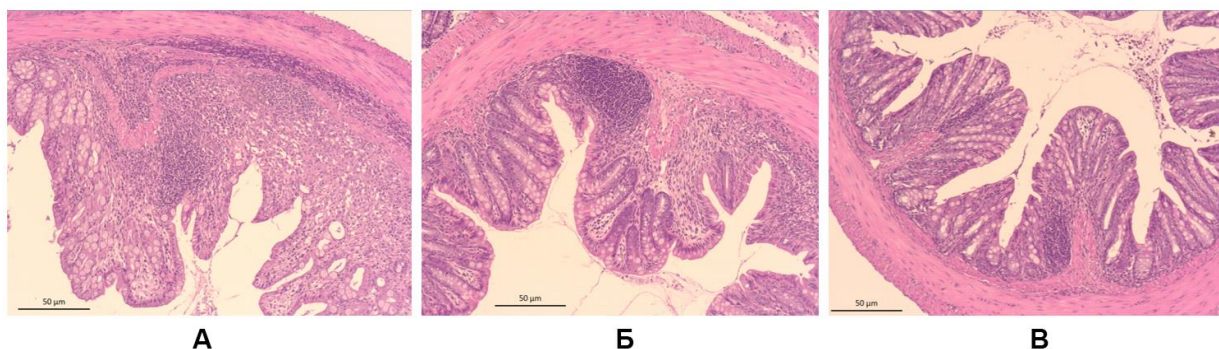


Рис. 23 – Патоморфологические изменения тканей толстой кишки при ДСН-колите.

А. Контроль (нелеченый колит): выраженный отек стромы, массивная клеточная инфильтрация, изъязвление слизистой оболочки с поражением *muscularis mucosae*. **В, С** – Группы, получавшие СтАР (**В**) и hresAP (**С**): умеренная регенерация эпителия, заживление язвенных дефектов на фоне остаточной инфильтрации ($M \pm SE$; $p < 0,05$ относительно контроля)

В контрольной группе наблюдалась характерная картина для модельного острого язвенного колита (суммарный балл повреждений 14,9 из 24,0), проявлявшаяся в деструкции эпителия, потере бокаловидных клеток, отеке стромы и формировании крипт-абсцессов (рис. 23 А). В группах, получавших ЦФ, патологические изменения слизистой сохранялись лишь в виде умеренной остаточной инфильтрации и криптита (рис. 23 Б, В).

ДСН-индуцированное воспаление сопровождалось значительным ростом концентрации цитокинов в тканях кишечника и сыворотке крови, что подтверждает развитие системного ответа (рис. 21 Б, 23). Гиперпродукция IL-1 β , IL-6 и TNF- α инициирует острую фазу воспаления, стимулируя хемотаксис, пролиферацию и инфильтрацию иммунокомпетентных клеток (преимущественно гранулоцитов) в очаг поражения. Установлено, что пероральное введение CmAP, аналогично hrecAP, статистически значимо снижает уровни IL-1 β и IL-6 как локально, так и системно (рис. 21 Б). Отсутствие выраженного влияния на концентрацию TNF- α , вероятно, обусловлено кратким курсом терапии (7 дней) или спецификой кинетики снижения этого показателя. Снижение уровня интерлейкинов приводило к нормализации клеточного состава крови, в частности к уменьшению лимфоцитоза (рис. 22), что способствовало выживаемости животных. Учитывая размер ферментативно активных димеров, CmAP и hrecAP, вероятно, оказывают локальное действие в просвете кишечника. Дефосфорилирование ЛПС (рис. 21 А) позволяет снижать антигенную нагрузку, блокируя TLR4-опосредованную активацию сигнальных путей NF- κ B (рис. 20). Полученные данные обосновывают перспективность курсового применения рекомбинантной ЩФ PhoA морских бактерий для коррекции системного воспаления при патологиях кишечного барьера (Balabanova et al., 2024b).

5. Экспрессия ЩФ PhoA *C. amphilecti* в растениях табака и её влияние на рост в условиях абиотического стресса

Молекулярное фермерство на базе *N. tabacum* и *N. benthamiana* является эффективной альтернативой бактериальным системам благодаря высокой производительности и отсутствию эндотоксинов человека. В данной работе осуществлена гетерологическая экспрессия ЩФ CmAP в растениях *N. tabacum*. Проведен сравнительный анализ выхода рекомбинантного фермента (rCmAP) в каллусных и листовых тканях при использовании различных векторов и генетических конструкций. Физико-химическая характеристика rCmAP, выделенного из трансформированного табака (Adedibu et al., 2024), подтвердила сохранение его каталитических свойств. Получение высокоочищенного фермента, свободного от ЛПС, открывает перспективы его применения в ветеринарии и медицине. Для транзитной трансформации и получения трансгенных каллусов использованы высокоэкспрессионные векторы pHREAC-CmAP и pEff-CmAP (рис. 24).

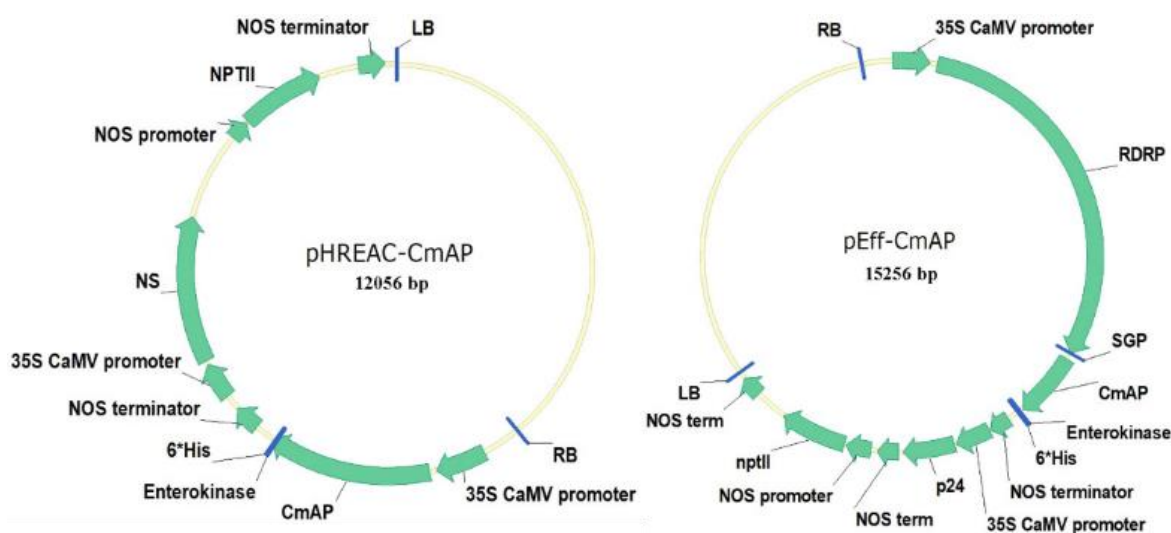


Рис. 24 – Генетические конструкции для экспрессии гена *alp* ЩФ PhoA (rCmAP) в *N. tabacum*. 35S CaMV – промотор; NOS – терминатор транскрипции; NPTII – селективный маркер (устойчивость к канамицину); LB, RB – левая и правая пограничные области Т-ДНК. Вирусные элементы векторов pHREAC и pEff: супрессоры сайленсинга (p24, NS), субгеномный промотор (SGP) и РНК-полимераза (RDRP). Конструкции содержат 6 \times His-tag и сайт рестрикции энтерокиназы для очистки и процессинга rCmAP (Adedibu et al., 2024)

Максимальный выход активной ЩФ (rCmAP) отмечен в листьях табака (1,1–3,7 мг/г сырой массы). Удельная активность фермента в листовой ткани и каллусе составила 11,2 и 0,34 Ед/мг соответственно (Adedibu et al., 2024). Применение репликативного вирусного вектора pEff-CmAP обеспечило двукратное увеличение выхода и ферментативной активности rCmAP в листьях по сравнению с вектором pHREAC (рис. 24). Уровень экспрессии целевого белка в каллусных тканях *N. tabacum* был вдвое ниже, чем в листьях (рис. 25).

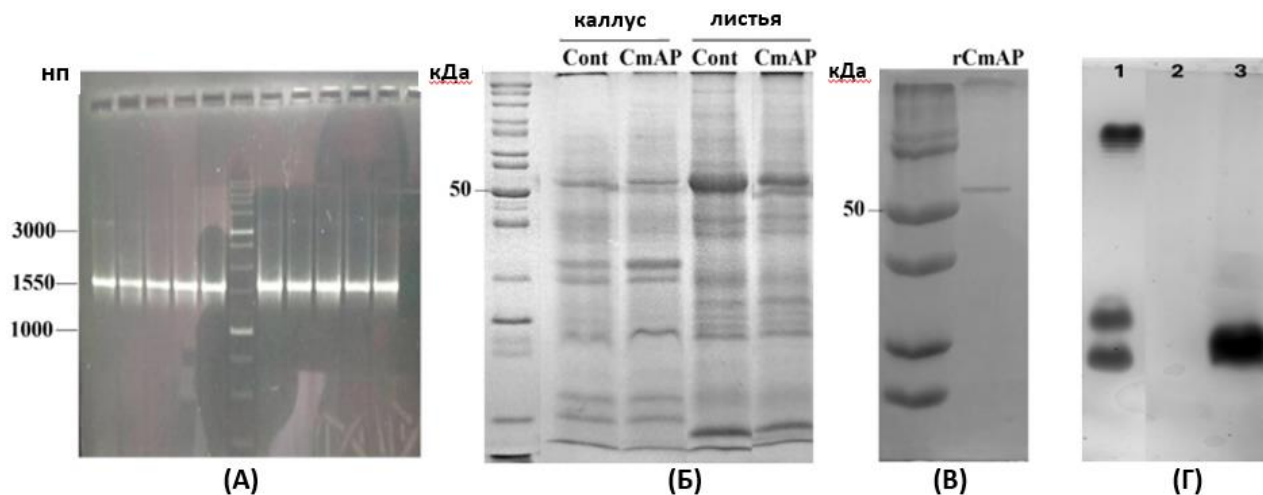


Рис. 25 — Молекулярно-генетический анализ экспрессии и очистки rCmAP в *N. tabacum*. **А.** ПЦР-анализ гена *alp* (1550 п.н.) в геномной ДНК каллуса *N. tabacum* (маркер длин ДНК — слева). **Б.** Электрофоретический анализ (SDS-ПААГ) суммарных белковых экстрактов контрольных (Cont) и трансформированных (CmAP) тканей каллуса и листьев. **В.** Фракции белка rCmAP после аффинной очистки на Ni-NTA-агарозе (маркер молекулярных масс белков — слева). **Г.** Сравнительный анализ чистоты препаратов rCmAP, выделенных из *E. coli* (3) и *N. tabacum* (2). Контроль (1) — ЛПС *E. coli* O55:B5 (Adedibu et al., 2024)

Из 2 г трансформированных листьев табака получено 0,227 мг очищенного rCmAP с удельной активностью (у. а.) 733,3 Ед/мг. Хотя у. а. бактериального аналога выше (4052,6 Ед/мг), доля целевого белка в суммарном экстракте растений составила 5,2 %, что значительно превышает выход из *E. coli* (0,37 %) (Adedibu et al., 2024; Seitkhalieva et al., 2024). Окрашивание ПААГ серебром выявило в препарате из бактериального продуцента высокий уровень контаминации ЛПС, тогда как растительный rCmAP был свободен от эндотоксинов (рис. 25). Снижение удельной активности растительного фермента может быть обусловлено специфическим N-гликозилированием в клетках растения, что требует дальнейшего изучения влияния посттрансляционных модификаций на конформацию белка. Таким образом, транзиторная экспрессия в листьях табака является более эффективным методом получения функционально активной ЩФ CmAP, сохраняющей термостабильность и солеустойчивость природного аналога (Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015; Adedibu et al., 2024). Культуры каллуса показали низкую продуктивность, несмотря на высокое содержание общего белка в тканях (рис. 25).

Изучено влияние гетерологической экспрессии полноразмерного гена *alp* на физиологические и биохимические реакции *N. tabacum* в условиях абиотического стресса. В контрольных условиях всхожесть семян дикого типа (WT) и трансгенных линий (Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2) составила 100 %, при этом линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 достигали полной всхожести на сутки раньше контроля (рис. 26). Преимущество трансгенных растений стало более выраженным в условиях дефицита фосфатов: на 10-й день эксперимента всхожесть линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 составила 88 % и 84 % соответственно, тогда как в группе WT — лишь 68 %. В условиях избытка фосфатов все исследуемые линии демонстрировали высокую скорость прорастания, достигая 100 % всхожести к 9-му дню (рис. 26).

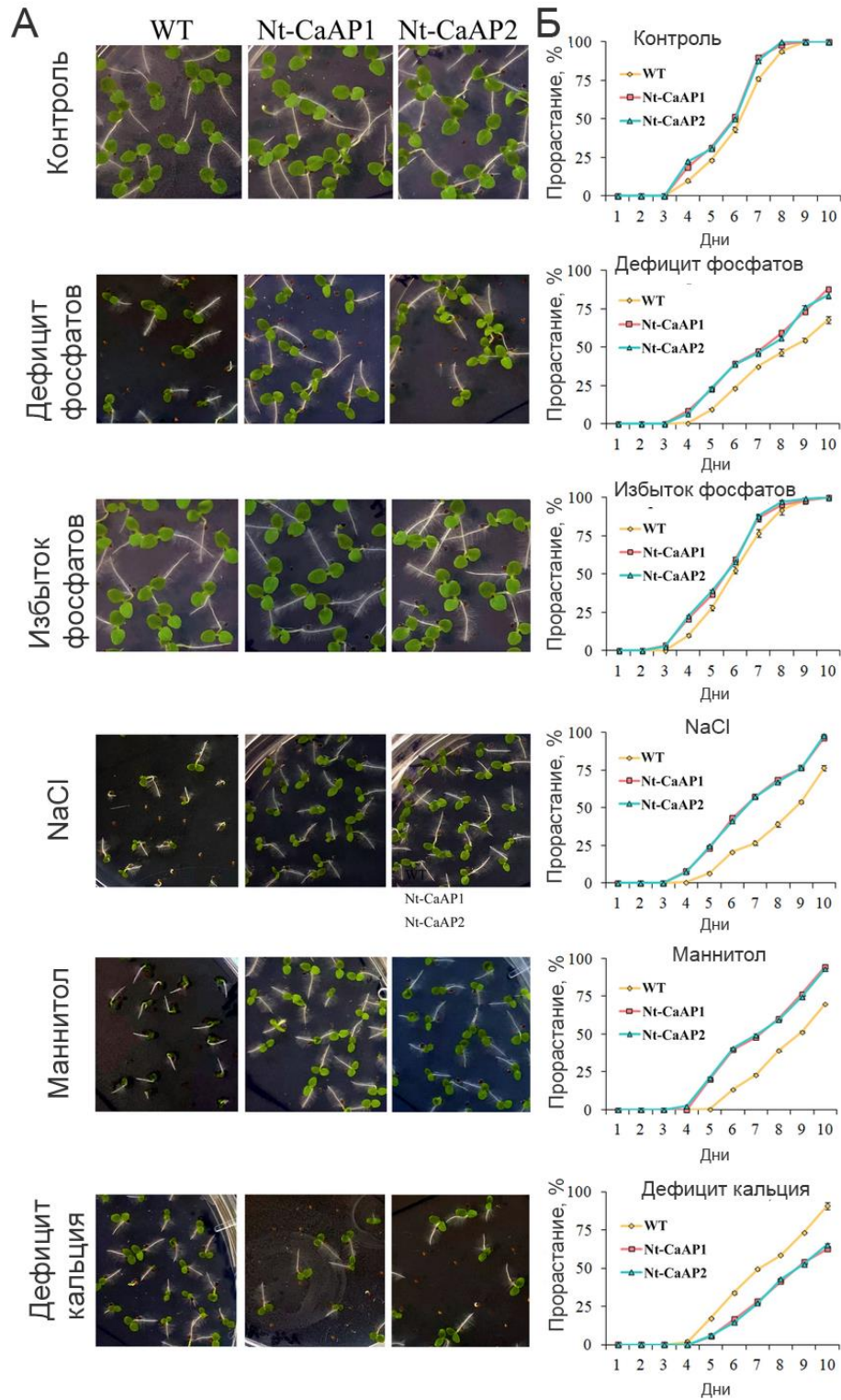


Рис. 26 – Влияние экспрессии гена ЩФ rSmAP на всхожесть семян *N. tabacum* в условиях абиотического стресса. **А.** Морфология проростков дикого типа (WT) и трансгенных линий (Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2). **Б.** Динамика всхожести семян (статистический анализ). Данные представлены как $M \pm SE$; $n \geq 50$ семян в каждом из трех независимых биологических повторов (Yugay et al., 2025)

Солевой и осмотический стрессы приводили к выраженному снижению всхожести семян WT (до 70–76 %), в то время как трансгенные линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 сохраняли высокую жизнеспособность (93–98 %). На ранних стадиях прорастания (7-е сутки) линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 вдвое превосходили контроль по скорости появления проростков (50 % против 25 % у WT). Напротив, в условиях дефицита кальция адаптивность трансгенных растений снижалась: на 10-й день эксперимента их всхожесть составила 63 %, тогда как у

WT – 90 % (рис. 26). В контрольных условиях обе линии, экспрессирующие *rSmAP*, демонстрировали тенденцию к увеличению длины корней по сравнению с диким типом (рис. 27).

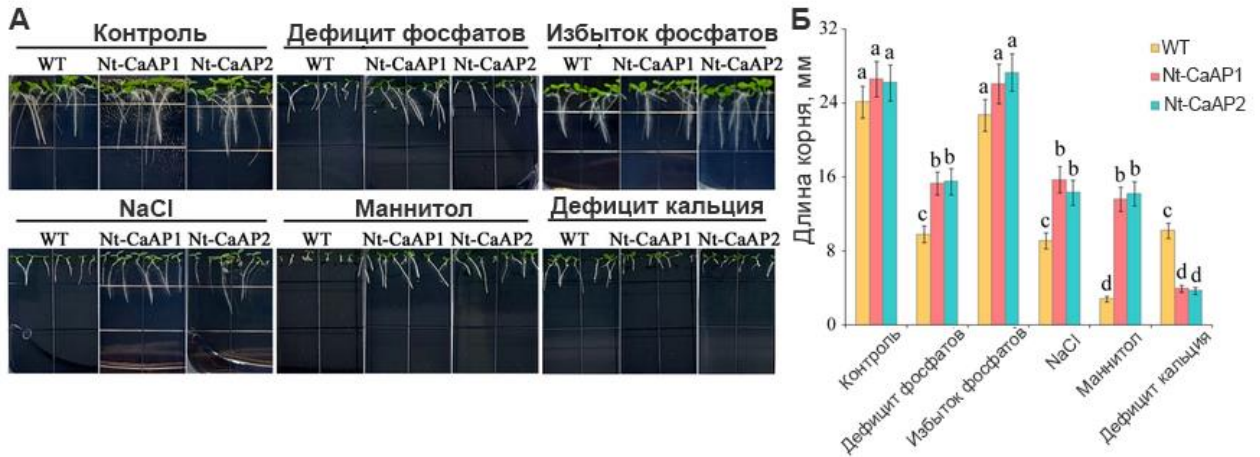


Рис. 27 – Влияние экспрессии гена *alp* на рост корней *N. tabacum* в условиях абиотического стресса. **А.** Морфология проростков дикого типа (WT) и трансгенных линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 через 14 суток после посева. **Б.** Статистический анализ длины корней ($M \pm SE$, три биологических повтора). Разными буквами обозначены статистически значимые различия при $p < 0,05$ (тест LSD) (Yugay et al., 2025)

В условиях дефицита фосфатов длина корней у линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 превышала показатель WT в 2,7 раза (27 А). Вероятно, экспрессия *rSmAP* усиливает адаптивное перераспределение ресурсов растения в пользу развития корневой системы для оптимизации поглощения фосфора. При солевом и осмотическом стрессах трансгенные линии также демонстрировали преимущество, превосходя WT по длине корней в 1,6 и 5 раз соответственно. Избыток фосфатов в среде не оказывал значимого влияния на рост корней во всех исследуемых группах. Напротив, дефицит кальция приводил к более выраженному угнетению роста корневой системы у Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 по сравнению с диким типом (рис. 27 Б). Таким образом, гетерологическая экспрессия ШФ морской бактерии усиливает адаптивный потенциал растений к дефициту элементов питания и осмотическому стрессу, но снижает их устойчивость к нехватке кальция.

Анализ окислительно-восстановительного статуса показал, что в контрольных условиях и при избытке фосфатов активность пероксидаз и содержание H_2O_2 были минимальными и сопоставимыми во всех линиях (рис. 28 А, Б). Дефицит фосфатов и кальция приводил к умеренному (в 1,5–2 раза) росту активности пероксидаз и 4-кратному накоплению во всех группах. Наиболее выраженные различия отмечены при солевом и осмотическом стрессах: у растений WT содержание H_2O_2 достигало 1900 мкмоль/г сырой массы, тогда как в линиях Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 этот показатель был значительно ниже (около 1200 мкмоль/г) (рис. 28 Б). При этом в условиях засоления растения WT демонстрировали максимальную активность пероксидаз (рост в 2,8 раза), что указывает на более интенсивный окислительный стресс по сравнению с трансгенными линиями (рис. 28 А).

В контрольных условиях и при избытке фосфатов уровень малонового диальдегида (МДА) во всех линиях был минимальным (около 1 нмоль/г сырой массы) (рис. 28 В). Дефицит фосфатов вызывал умеренный окислительный стресс с двукратным ростом содержания МДА во всех группах. При солевом и осмотическом стрессах накопление МДА в растениях WT было в 1,5 и 2,3 раза выше, чем в трансгенных линиях, что свидетельствует о менее выраженной деструкции мембран у Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2. Напротив, дефицит кальция приводил к росту содержания МДА в трансгенных растениях (в 1,5 раза выше уровня WT), подтверждая их повышенную чувствительность к нехватке этого мезоэлемента (рис. 28 В).

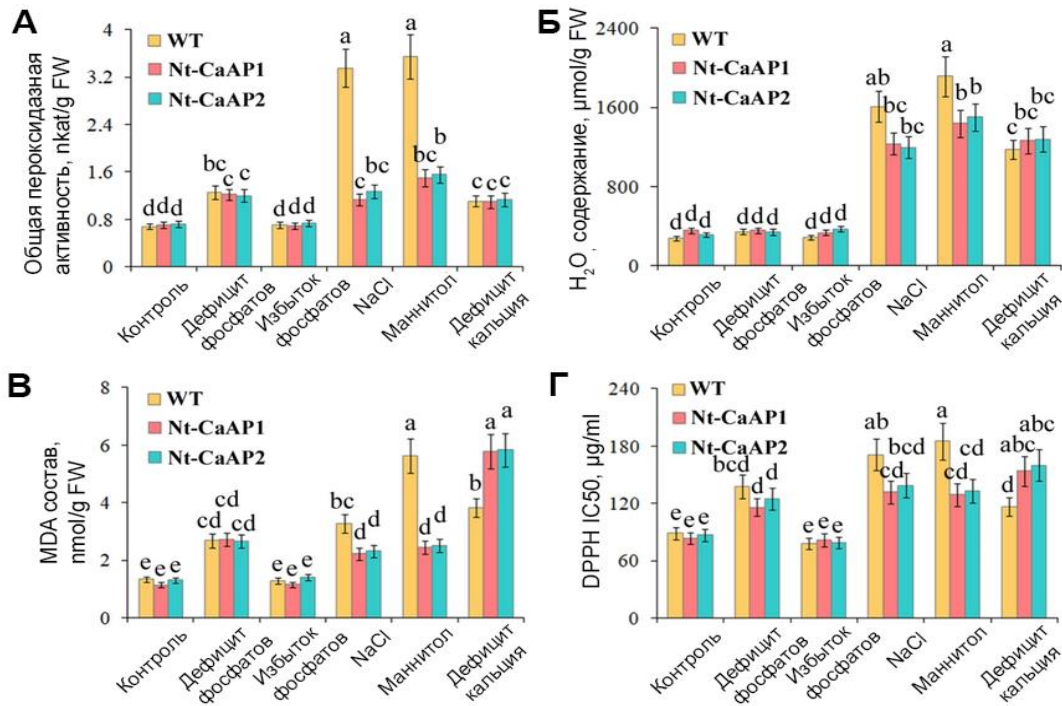


Рис. 28 – Показатели окислительно-восстановительного статуса растений *N. tabacum* дикого типа (WT) и трансгенных линий (Nt-CaAP1, Nt-CaAP2) при абиотических стрессах. **А.** Общая активность пероксидаз. **Б.** Содержание перекиси водорода (H₂O₂). **В.** Содержание малонового диальдегида (MDA). **Г.** Антирадикальная активность (DPPH-метод). Данные представлены как M ± SE (n = 3). Разными буквами обозначены статистически значимые различия при p < 0,05 (тест LSD) (Yugay et al., 2025)

Значения активности IC₅₀ по отношению к радикалу DPPH во всех линиях при выращивании в контрольных условиях и в среде с избытком фосфатов были относительно низкими, находясь в диапазоне 78-89 мкг/мл (рис. 28 D). Отсутствие фосфатов и кальция, а также воздействие солевого и осмотического стрессов приводили к увеличению значений IC₅₀ DPPH приблизительно в 1,5 раза по сравнению с контрольными условиями. При дефиците фосфатов различий между растениями WT, Nt-CaAP1, Nt-CaAP2 не наблюдалось. В условиях солевого и осмотического стрессов значения IC₅₀ DPPH в растениях WT были в 1,3 раза выше, чем в трансгенных линиях. Напротив, при дефиците кальция значения IC₅₀ DPPH у трансгенных линий Nt-CaAP1, Nt-CaAP2 превышали показатели WT в 1,3 раза (рис. 28 D).

Кроме того, отмечено эндогенное влияние rSmAP на физиологические характеристики трансгенных линий табака (рис. 29). В контрольных условиях и при избытке фосфатов все линии демонстрировали высокие значения MSI (индекс стабильности мембраны), достигая почти 90% (рис. 29 A). Индекс стабильности мембран (MSI) служил ключевым индикатором устойчивости растений к стрессовым повреждениям. Установлено, что дефицит фосфатов приводил к сопоставимому снижению MSI (до 70 %) во всех исследуемых линиях. Наиболее выраженная деструкция мембран отмечена при солевом и осмотическом стрессах: у растений WT значения MSI снизились в 3–4 раза, оказавшись в 1,6–2,0 раза ниже, чем у трансгенных линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (C1 и C2) (рис. 29 A). Напротив, в условиях дефицита кальция линии, экспрессирующие rSmAP, проявляли повышенную чувствительность, демонстрируя более низкие значения MSI по сравнению с диким типом (рис. 29 A).

Параллельно со снижением MSI, солевой и осмотический стрессы приводили к резкому росту утечки электролитов (в 4–7 раз выше контроля) (рис. 29 Б). В этих условиях трансгенные линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (C1 и C2) проявляли в 1,5 раза большую устойчивость мембран, чем дикий тип. Напротив, в условиях дефицита кальция именно в линиях, экспрессирующих rSmAP, наблюдалась максимальная деструкция мембран: утечка электролитов достигала 71–75 %, что значительно превышало показатели WT. В

контрольных вариантах, а также при дефиците или избытке фосфатов, значимых различий по данному показателю между линиями зафиксировано не было (рис. 29 Б).

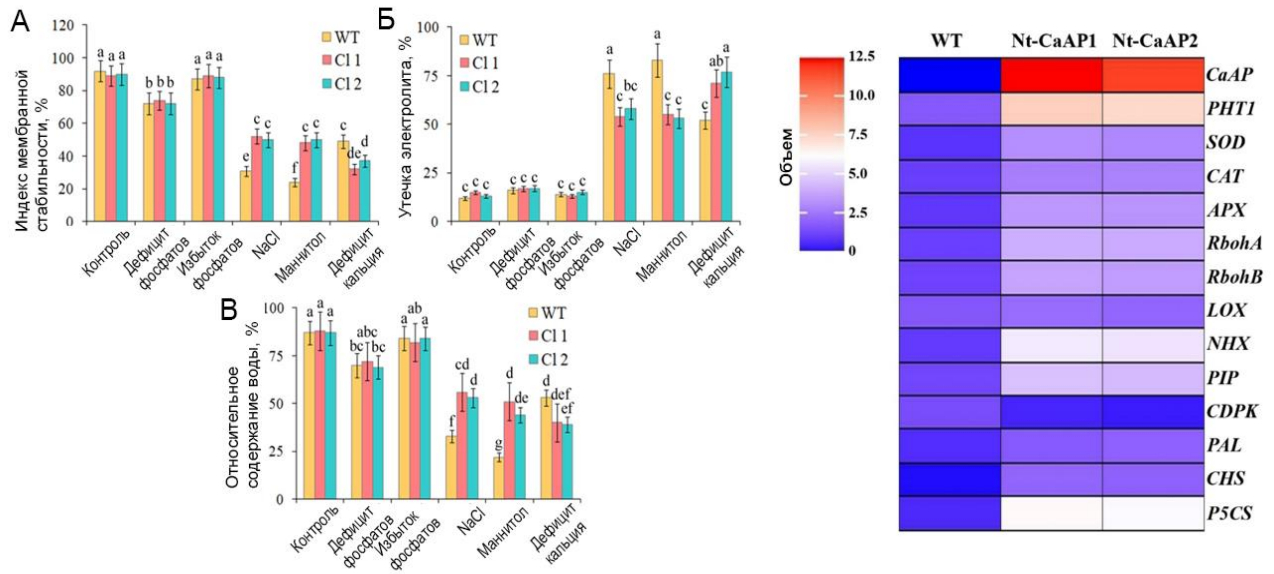


Рис. 29 – Физиологические показатели и профиль экспрессии генов в растениях *N. tabacum* дикого типа (WT) и трансгенных линий Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (C11, C12) при абиотических стрессах. **А.** Индекс стабильности мембран (MSI). **Б.** Утечка электролита. **В.** Относительное содержание воды в листьях (RWC). Данные представлены как $M \pm SE$ ($n = 3$); разными буквами обозначены статистически значимые различия при $p < 0,05$ (тест LSD). **Справа:** Тепловая карта экспрессии трансгена *rhoA* морской бактерии (*CaAP*) и генов антиоксидантной защиты (SOD, CAT, APX), генерации АФК (RbohA, RbohB), липидного метаболизма (LOX), транспорта ионов (NHX) и воды (PIP), кальциевой сигнализации (CDPK), биосинтеза фенолов (PAL, CHS) и пролина (P5CS) (Yugay et al., 2025)

Относительное содержание воды (RWC) в контрольных условиях и при варьировании уровня фосфатов оставалось стабильно высоким (70–88 %) во всех исследуемых линиях (рис. 29 В). Солевой и осмотический стрессы приводили к критическому снижению RWC у растений WT (до 22–33 %), тогда как трансгенные линии Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 (C1 и C2) сохраняли более высокий уровень гидратации (свыше 50 %). В условиях дефицита кальция водоудерживающая способность тканей снизилась вдвое относительно контроля во всех группах (рис. 100 В).

Таким образом, экспрессия ЩФ rSmAP приводила к повышению чувствительности растений к дефициту кальция по сравнению с диким типом (рис. 26–29). Кальций является критическим вторичным мессенджером, регулирующим стрессовые ответы и активность кальций-зависимых ферментов. Вероятно, дефицит кальция в трансгенных линиях Nt-CaAP1 и Nt-CaAP2 лимитирует работу антиоксидантной системы и нарушает фосфорный гомеостаз, что ведет к избыточному накоплению АФК и деструкции клеточных мембран.

Количественный анализ экспрессии генов в растениях *N. tabacum* (рис. 29) выявил масштабную активацию ключевых адаптивных механизмов под влиянием ЩФ PhoA морской бактерии (rSmAP). В трансгенных линиях отмечена индукция путей транспорта фосфата (PHT1) и сигнализации АФК (RbohA, RbohB) в 3–4 раза, антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, APX) в 2,5–4 раза, а также систем ионного и водного гомеостаза (NHX, PIP) в 3,5–5,8 раза. Особо значимый рост зафиксирован для генов биосинтеза вторичных метаболитов: фенилпропаноидов (PAL, в 2,9 раза), флавоноидов (CHS, в 15 раз) и осмопротектора пролина (P5CS, в 10 раз). Напротив, уровень мРНК Ca²⁺-зависимой протеинкиназы CDPK снизился в 4 раза, что коррелирует с их повышенной чувствительностью к дефициту кальция. Активация NHX-антипортеров и антиоксидантной системы подтверждает гипотезу об

оптимизации ионного баланса и снижении окислительной деструкции мембран у трансгенных растений (Yugay et al., 2025).

Таким образом, гетерологическая экспрессия гена *phoA* *C. amphilecti* подтвердила роль ЩФ в регуляции метаболизма на транскрипционном уровне, обеспечивая защиту от окислительного стресса и повреждения тканей. Это указывает на универсальность механизмов редокс-баланса и ионного гомеостаза у прокариот и эукариот. Установлено, что экспрессия rSmAP при солевом и осмотическом стрессах способствует росту активности пероксидаз, снижению уровня H₂O₂ и накопления МДА, что минимизирует деструкцию мембран и утечку электролитов (рис. 28, 29). Помимо стрессоустойчивости, способность ЩФ семейства PhoA расщеплять сложные фосфоэфирные связи открывает новые горизонты для их использования. Широкая субстратная специфичность и регуляторный потенциал морских ЩФ делают их перспективными инструментами для биомедицины, селекции стрессоустойчивых агрокультур и обеспечения продовольственной безопасности (Animasaun et al., 2023; Adedibu et al., 2024; Valabanova et al., 2024a, б; Yugay et al., 2025).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования проведена комплексная полногеномная и таксономическая характеристика морских бактерий типов *Pseudomonadota* и *Bacteroidota* — продуцентов адаптивных ферментов (фосфатаз, нуклеаз, гликозидаз, протеаз) и биосинтетических кластеров (БГК) ценных метаболитов. Функциональная аннотация генов подтверждена получением рекомбинантных белков, активных при низких температурах, высокой солености и щелочных рН. Разработан единый методический подход к оценке биотехнологического потенциала штаммов на основе синтеза таксономического, фенотипического и молекулярно-генетического анализов. Применение данного подхода позволило уточнить классификацию гетерогенных групп микроорганизмов, описать новые виды и новый род *Rhodalgimonas*, а также выявить штаммоспецифическое разнообразие структур щелочных фосфатаз (ЩФ). Установлено, что хромосомная локализация генов ЩФ в составе БГК мембранных белков и отсутствие оперонной организации указывают на их регуляторную роль в поддержании редокс-баланса и защите от окислительного стресса. Выявленные альтернативные метаболические пути подтверждают высокую адаптагенность морских бактерий к флуктуациям факторов среды (температуры, солености, аэрации и доступности субстратов). Метаболическая пластичность и наличие разнообразных БГК обеспечивают морским гетеротрофам высокую конкурентоспособность при колонизации экологических ниш, включая симбиоз с гидробионтами. Полученные данные закладывают основу для биоремедиации прибрежных систем, создания пробиотиков для аквакультуры и получения уникальных биопродуцентов. Впервые на модели трансгенных растений доказана роль бактериальной ЩФ PhoA в защите клеток от оксидативного стресса через регуляцию антиоксидантных систем. Установлено функциональное сходство PhoA морских бактерий со ЩФ эукариот в механизмах купирования провоспалительных процессов. Противовоспалительный эффект реализуется через детоксикацию ЛПС и ограничение продукции АФК мембранными оксидазами. Выдвинута гипотеза об универсальной биологической функции ЩФ как отрицательных регуляторов анаболизма, предотвращающих повреждение мембран и ДНК. Высокая технологичность получения и активность ЩФ морских бактерий открывают перспективы их применения в качестве терапевтических агентов в медицине и защитных биопрепаратов в сельском хозяйстве.

ВЫВОДЫ

1. На основе сравнительного геномного анализа 87 видов морских бактерий проведена реклассификация и типирование новых изолятов. Описан новый род и вид *Rhodalgimonas zhirmunskyi* (сем. *Roseobacteraceae*), изменены описания видов *P. distincta*, *C. amphilecti* и *C. marina*. Все изученные штаммы являются аэробными гетеротрофами с выраженной

ферментативной активностью (оксидаза, каталаза, щелочная фосфатаза) и высокой адаптивностью к факторам среды (рост при 4–42 °С и 0–20 % NaCl).

2. Анализ метаболических путей выявил преобладание аэробного обмена, дополненного анаэробным дыханием, ассимиляцией CO₂ и Na⁺-транслоцирующими комплексами (Rsx/Rnf). Идентифицированы специфические БГК: у *Cobetia* – эктоина, сидерофоров и сульфатированных ЭПС; у флавобактерий – антимикробных пептидов (аналогов севацидина) и гликозидаз. Альфа-протеобактерии характеризуются генами обмена N и S, а *Pseudoalteromonas* – потенциалом синтеза нуклеозидов, иммуносупрессоров (аналогов бразиликардина А), антибиотиков (аналогов стрепторубина В) и полисахарид-деградирующих ферментов. Каротиноидный фенотип ассоциированных штаммов обусловлен БГК арилполиенов, этерифицированных резорцином.

3. Полногеномный анализ выявил высокую изменчивость систем щелочных фосфатаз (ЩФ): от 2–5 копий у протеобактерий до 7–9 у флавобактерий. Идентифицированы гены семейств PhoA, PhoX, PhoD, PafA и YncM, при этом их состав и количество паралогов являются штаммо- и видоспецифичными. Установлено, что ЩФ семейства PhoA типичны для ассоциированных с эукариотами штаммов и филогенетически близки гомологам *E. coli* и млекопитающих. Диверсификация систем фосфатаз обусловлена адаптацией к различным экологическим нишам.

4. Разработано веб-приложение Syntenome для анализа генетического контекста и функционального прогнозирования белков. Установлено, что гены ЩФ локализованы в кластерах различных мембранных НАДН-оксидоредуктаз: rhoA ассоциирован с Na⁺ транслоцирующим Rxs-комплексом, rhoD – с системами нейтрализации H₂O₂, а rhoX/pafA – с транспортерами альтернативных субстратов. Соответствие между числом систем ЩФ и количеством ЭТЦ указывает на ключевую роль ЩФ в поддержании редокс-гомеостаза и предотвращении деполяризации мембран при осмотическом и оксидативном стрессах. Предсказано участие внеклеточной ЩФ PhoA в путях регенерации пула кофермента НАД⁺.

5. Получены активные рекомбинантные аналоги ЩФ и сопутствующих гидролаз, что подтвердило точность их функциональной аннотации. Показано, что психротолерантные нуклеазы, протеазы и гликозидазы изученных штаммов обладают биотехнологическим потенциалом за счет высокой активности в экстремальных условиях (низкие температуры, широкий диапазон рН и соленость до 3,0 М NaCl). Разработаны эффективные продуценты ЩФ семейства PhoA штамма *S. amphilecti* КММ 296 (СтАР), пригодные для применения в биомедицине и молекулярной диагностике.

6. Рекомбинантная ЩФ *S. amphilecti* (СтАР) характеризуется высокой удельной активностью (до 20 000 Ед/мг) и каталитической эффективностью (k_{cat}/K_m до 10⁷ М⁻¹·с⁻¹), значительно превосходя гомолог из *E. coli*. Установлено, что высокая эффективность СтАР и его холододовая адаптация обусловлены пониженным сродством к продукту (P_i) и повышенной конформационной лабильностью «большой петли» (остатки 375–420). Фермент сохраняет стабильность в широком диапазоне рН (6,0–11,0) и концентраций NaCl.

7. Обосновано применение СтАР как модели для скрининга ингибиторов ЩФ млекопитающих. Среди 5-азаиндольных алкалоидов морской губки идентифицирован селективный неконкурентный ингибитор – гитаррин С (IC₅₀ 8,5 мкМ). Установлена зависимость его активности от наличия карбоксильной (С6) и гидроксильной (С8) групп. Показан потенциал гитарринов как регуляторов ЩФ микробиома и ингибиторов aberrантной активности фосфатаз человека.

8. Обосновано применение ЩФ СтАР в составе химерных белков: с лектинами – для детекции опухолевых маркеров (ТЛФА), с порином OmpF – для диагностики иерсиниозов (ИФА). Установлено дозозависимое ингибирующее действие СтАР на формирование биопленок, рост планктонных клеток бактерий, а также пролиферацию клеток карциномы

(T-47D, MDA-MB-231), что указывает на универсальный механизм регуляторного влияния ЩФ PhoA на энергетический метаболизм про- и эукариот.

9. В модели хронического колита у мышей показана противовоспалительная активность СтАР, сопоставимая с кишечной ЩФ человека. Эффект обусловлен детоксикацией РАМР/DAMP-агентов и нормализацией уровней ИЛ-1 β , ИЛ-6. Обоснован механизм действия ЩФ, включающий дефосфорилирование внеклеточных пуринов и ЛПС, модуляцию фосфостатуса сигнальных белков, что инициирует метаболическое перепрограммирование клеток (переход от гликолиза к окислительному фосфорилированию). Это ведет к подавлению активности НАДФН оксидаз, купированию оксидативного стресса и восстановлению барьерной функции кишечника.

10. Подтверждено регуляторное действие ЩФ PhoA на редокс-баланс растений. Гетерологичная экспрессия rhoA у трансгенного табака активирует антиоксидантные пути, снижая уровень АФК и МДА, что повышает устойчивость к засолению, осмотическому стрессу и дефициту фосфатов. Установлено, что ЩФ PhoA отрицательно регулирует транскрипцию киназы СДРК, снижая стрессоустойчивость при дефиците кальция. Это указывает на прямую взаимозависимость между кальциевым гомеостазом, фосфатным обменом и регуляцией окислительного стресса.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Plisova E. Yu., **Balabanova L. A.**, Ivanova E. P., Kozhemyako V. B., Mikhailov V. V., Agafonova E. V., Rasskazov V. A. A highly active alkaline phosphatase from the marine bacterium *Cobetia* // Marine Biotechnology (NY). 2005. Vol. 7, № 3. P. 173–178. doi: 10.1007/s10126-004-3022-4.
2. **Balabanova L. A.**, Bakunina I. Y., Nedashkovskaya O. I., Makarenkova I. D., Zaporozhets T. S., Besednova N. N., Zvyagintseva T. N., Rasskazov V. A. Molecular characterization and therapeutic potential of a marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 alpha-galactosidase // Marine Biotechnology (NY). 2010. Vol. 12, № 1. P. 111–120. doi: 10.1007/s10126-009-9205-2.
3. Bakunina, I., Nedashkovskaya, O., **Balabanova, L.**, Zvyagintseva, T., Rasskasov, V., Mikhailov, V. Comparative analysis of glycoside hydrolases activities from phylogenetically diverse marine bacteria of the genus *Arenibacter* // Marine Drugs. 2013. Vol. 11, P. 1977–1998. doi:10.3390/md11061977.
4. Nedashkovskaya O. I., **Balabanova L. A.**, Zhukova N. V., Kim S. J., Bakunina I. Y., Rhee S. K. *Flavobacterium ahnfeltiae* sp. nov., a new marine polysaccharide-degrading bacterium isolated from a Pacific red alga // Archives of Microbiology. 2014. Vol. 196, № 10. P. 745–752. doi: 10.1007/s00203-014-1010-2.
5. **Balabanova L.**, Golotin V., Kovalchuk S., Bulgakov A., Likhatskaya G., Son O., Rasskazov V. Novel bifunctional hybrid with marine bacterium alkaline phosphatase and far eastern holothurian mannan-binding lectin activities // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, № 11. Art. e112729. doi: 10.1371/journal.pone.0112729.
6. **Балабанова Л. А.**, Голотин В. А., Бакунина И. Ю., Слепченко Л. В., Исаков В. В., Подволоцкая А. Б., Рассказов В. А. Рекомбинантная α -N-ацетилгалактозаминидаза морской бактерии, модифицирующая детерминанты А-эритроцитов // Acta Naturae. 2015. Т. 7, № 1 (24). С. 124–127. doi.org/10.32607/20758251-2015-7-1-117-120.
7. Терентьева Н. А., Тимченко Н. Ф., **Балабанова Л. А.**, Рассказов В. А. Характеристика образования, ингибирования и разрушения биопленок *Yersinia pseudotuberculosis*, формирующихся на абиотических поверхностях // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 3. С. 72–78.
8. Golotin V., **Balabanova L.**, Likhatskaya G., Rasskazov V. Recombinant production and characterization of a highly active alkaline phosphatase from marine bacterium *Cobetia*

- marina* // Marine Biotechnology (NY). 2015. Vol. 17, № 2. P. 130–143. doi: 10.1007/s10126-014-9601-0.
9. Kovalchuk S. N., Golotin V. A., **Balabanova L. A.**, Buinovskaya N. S., Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A. Carbohydrate-binding motifs in a novel type lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*: Homology modeling study and site-specific mutagenesis // Fish & Shellfish Immunology. 2015. Vol. 47, № 1. P. 565–571. doi: 10.1016/j.fsi.2015.09.045.
 10. Голотин В. А., **Балабанова Л. А.**, Буйновская Н. С., Лихацкая Г. Н., Булгаков А. А., Черников О. В., Чикаловец И. В., Рассказов В. А. Щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia marina* как инструмент в исследовании свойств рекомбинантных белков // Вестник ДВО РАН. 2015. № 6. С. 124–127.
 11. **Balabanova L.**, Golotin V., Podvolotskaya A., Rasskazov V. Genetically modified proteins: functional improvement and chimeragenesis // Bioengineered. 2015. Vol. 6, № 5. P. 262–274. doi: 10.1080/21655979.2015.1075674.
 12. Bakunina I. Yu., **Balabanova L. A.**, Pennacchio A., Trincone A. Hooked on α -D-galactosidases: from biomedicine to enzymatic synthesis // Critical Reviews in Biotechnology. 2016. Vol. 36, № 2. P. 233–245. doi: 10.3109/07388551.2014.949618.
 13. **Балабанова Л. А.**, Голотин В. А., Ковальчук С. Н., Бабий А. В., Шевченко Л. С., Сон О. М., Косовский Г. Ю., Рассказов В. А. Геном морской бактерии *Cobetia marina* КММ 296, выделенной из мидии *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // Биология моря. 2016. Т. 42, № 1. С. 73–76. doi: 10.1134/S106307401601003X.
 14. **Balabanova L.**, Nedashkovskaya O., Podvolotskaya A., Slepchenko L., Golotin V., Belik A., Shevchenko L., Son O., Rasskazov V. Data supporting functional diversity of the marine bacterium *Cobetia amphilecti* КММ 296 // Data in Brief. 2016. Vol. 8. P. 726–732. doi: 10.1016/j.dib.2016.06.034.
 15. **Balabanova L.**, Podvolotskaya A., Slepchenko L., Eliseikina M., Noskova Yu., Nedashkovskaya O., Son O., Tekutyeva L., Rasskazov V. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* КММ 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products // Food Control. 2017. Vol. 78. P. 270–278. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.029.
 16. Nedashkovskaya O. I., Kim S.-G., **Balabanova L. A.**, Zhukova N. V., Bakunina I. Y., Mikhailov V. V. *Polaribacter staleyii* sp. nov., a polysaccharide-degrading marine bacterium isolated from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2018. Vol. 68, № 2. P. 623–629. doi: 10.1099/ijsem.0.002554.
 17. Буйновская Н. С., **Балабанова Л. А.**, Портнягина О. Ю., Новикова О. Д., Рассказов В. А. Гибридный бифункциональный белок на основе порина OmpF и высокоактивной щелочной фосфатазы // Биоорганическая химия. 2018. Т. 44, № 4. С. 417–424.
 18. Kovalchuk S. N., Buinovskaya N. S., Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A., Son O. M., Tekutyeva L. A., **Balabanova L. A.** Mutagenesis studies and structure-function relationships for galnac/gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // Marine Drugs. 2018. Vol. 16, № 12. Art. 471. doi: 10.3390/md16120471.
 19. Bakunina I., Slepchenko L., Anastyuk S., Isakov V., Likhatskaya G., Kim N., Tekutyeva L., Son O., **Balabanova L.** Characterization of properties and transglycosylation abilities of recombinant α -galactosidase from cold-adapted marine bacterium *Pseudoalteromonas* КММ 701 and its C494N and D451A mutants // Marine Drugs. 2018. Vol. 16, № 10. Art. 349. doi: 10.3390/md16100349.
 20. Likhatskaya G. N., **Balabanova L. A.**, Kovalchuk S. N., Bakunina I. Yu., Isaeva M. P., Zvaygintseva T. N., Kusaykin M. I., Golotin V. A., Slepchenko L. V., Belik A. A., Chernysheva N. Yu., Trifonov E. V., Tarasov G. V., Nurminsky E. A., Rasskazov V. A. Structural bioinformatics in the study of cold-active enzymes from marine organisms // Vestnik of the Far East Branch of the Russian Academy of Sciences. – 2018. – No. 6S (202). – P. 50-51.

21. **Балабанова Л. А.**, Исаева М. П. Морская биохимия: достижения и перспективы структурно-функционального исследования генов и геномов морских организмов // Вестник ДВО РАН. 2019. № 5. С. 123–127.
22. **Balabanova L. A.**, Shkryl Yu. N., Slepchenko L. V., Yugay Yu. A., Gorpenchenko T. Y., Kirichuk N. N., Khudyakova Yu. V., Bakunina I. Yu., Podvolotskaya A. B., Bulgakov V. P., Seitkhalieva A. V., Son O. M., Tekutyeva L. A. Development of host strains and vector system for an efficient genetic transformation of filamentous fungi // *Plasmid*. 2019. Vol. 101. P. 1–9. doi: 10.1016/j.plasmid.2018.11.002.
23. Noskova Y., Likhatskaya G., Terentieva N., Son O., Tekutyeva L., **Balabanova L.** A novel alkaline phosphatase/phosphodiesterase, CamPhoD, from marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // *Marine Drugs*. 2019. Vol. 17, № 12. Art. 657. doi: 10.3390/md17120657.
24. Averianova L. A., **Balabanova L. A.**, Son O. M., Podvolotskaya A. B., Tekutyeva L. A. Production of vitamin B2 (Riboflavin) by microorganisms: an overview // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. Vol. 8. Art. 570828. doi: 10.3389/fbioe.2020.570828.
25. **Balabanova L.**, Shkryl Yu. N., Slepchenko L. V., Cheraneva D. D., Podvolotskaya A. B., Bakunina I. Yu., Nedashkovskaya O. I., Son O. M., Tekutyeva L. A. Genomic features of a food-derived *Pseudomonas aeruginosa* strain PAEM and biofilm-associated gene expression under a marine bacterial α -galactosidase // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Vol. 21, № 20. Art. 7666. doi: 10.3390/ijms21207666.
26. Бакунина И. Ю., Недашковская О. И., **Балабанова Л. А.**, Кухлевский А. Д., Белоус О. С. Активность О-гликозидгидролаз и других полисахарид-деградирующих ферментов у культивируемых бактериальных изолятов красной водоросли *Ahnfeltia tobuchiensis* // *Биология моря*. 2020. Т. 46, № 5. С. 357–360.
27. Терентьева Н. А., Буйновская Н. С., Носкова Ю. А., Слепченко Л. В., Недашковская О. И., Текутьева Л. А., **Балабанова Л. А.** Гидролитические ферменты из морских организмов как ингибиторы образования биопленок // *Биология моря*. 2020. Т. 46, № 4. С. 285–288.
28. **Balabanova L.**, Averianova L., Marchenok M., Son O., Tekutyeva L. Microbial and genetic resources for cobalamin (vitamin B12) biosynthesis: from ecosystems to industrial biotechnology // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22, № 9. Art. 4522. doi: 10.3390/ijms22094522.
29. Noskova Yu., Seitkhalieva A., Nedashkovskaya O., Shevchenko L., Tekutyeva L., Son O., **Balabanova L.** Are the closely related *Cobetia* strains of different species? // *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 3. Art. 690. doi: 10.3390/molecules26030690.
30. **Balabanova L.**, Pentekhina I., Nedashkovskaya O., Degtyarenko A., Grigorchuk V., Yugay Y., Vasyutkina E., Kudinova O., Seitkhalieva A., Slepchenko L., Son O., Tekutyeva L., Shkryl Y. Shift of choline/betaine pathway in recombinant *Pseudomonas* for cobalamin biosynthesis and abiotic stress protection // *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23, № 22. Art. 13934. doi: 10.3390/ijms232213934.
31. Nedashkovskaya O. I., Kim S.-G., **Balabanova L. A.**, Zhukova N. V., Son O. M., Tekutyeva L. A., Mikhailov V. V. Genome-based classification of strain 16-SW-7 as *Pseudoalteromonas distincta* and proposal to reclassify *Pseudoalteromonas paragorgicola* as a later heterotypic synonym of *Pseudoalteromonas distincta* // *Frontiers in Microbiology*. 2022. Vol. 12. Art. 809431. doi: 10.3389/fmicb.2021.809431.
32. Animasaun D. A., Adedibu P. A., Shkryl Yu., Emmanuel F. O., Tekutyeva L., **Balabanova L.** Modern plant biotechnology: an antidote against global food insecurity // *Agronomy*. 2023. Vol. 13, № 8. Art. 2038. doi: 10.3390/agronomy13082038.
33. Pentekhina I., Nedashkovskaya O. I., Seitkhalieva A. V., Gorbach V. V., Slepchenko L. V., Kirichuk N. N., Podvolotskaya A. B., Son O. M., Tekutyeva L. A., **Balabanova L. A.** Chitinolytic and fungicidal potential of the marine bacterial strains habituating Pacific

- Ocean regions // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, № 9. Art. 2255. doi: 10.3390/microorganisms11092255.
34. **Балабанова Л. А.**, Сейткалиева А. В., Сон О. М., Текутьева Л. А. Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции: монография / под ред О. Д. Новиковой. – Чебоксары: Среда, 2023. – 144 с.
35. **Balabanova L.**, Nedashkovskaya O., Otstavnykh N., Isaeva M., Kolpakova O., Pentehina I., Seitkhalieva A., Noskova Yu., Stepochkina V., Son O., Tekutyeva L. Computational insight into intraspecies distinctions in *Pseudoalteromonas distincta*: Carotenoid-like synthesis traits and genomic heterogeneity // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, № 4. Art. 4158. doi: 10.3390/ijms24044158.
36. Nedashkovskaya O., Otstavnykh N., **Balabanova L.**, Bystritskaya E., Kim S.-G., Zhukova N., Tekutyeva L., Isaeva M. *Rhodalgimonas zhirmunskyi* gen. nov., sp. nov., a marine Alphaproteobacterium isolated from the Pacific red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, № 10. Art. 2463. doi: 10.3390/microorganisms11102463.
37. Noskova Yu., Son O., Tekutyeva L., **Balabanova L.** Purification and characterization of a DegP-type protease from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, № 7. Art. 1852. doi: 10.3390/microorganisms11071852.
38. **Balabanova L.**, Bakholdina S., Buinovskaya N., Noskova Y., Kolpakova O., Vlasova V., Bondarev G., Seitkhalieva A., Son O., Tekutyeva L. LPS-dephosphorylating *Cobetia amphilecti* alkaline phosphatase of PhoA family divergent from the multiple homologues of *Cobetia* spp. // *Microorganisms*. 2024a. Vol. 12, № 3. Art. 631. doi: 10.3390/microorganisms12030631.
39. **Balabanova L.**, Bondarev G., Seitkhalieva A., Son O., Tekutyeva L. Insights into Alkaline Phosphatase Anti-Inflammatory Mechanisms // *Biomedicines*. 2024b. Vol. 12., № 11. Art. 2502. doi: 10.3390/biomedicines12112502.
40. Nedashkovskaya O., **Balabanova L.**, Otstavnykh N., Zhukova N., Detkova E., Seitkhalieva A., Bystritskaya E., Noskova Yu., Tekutyeva L., Isaeva M. In-depth genome characterization and pan genome analysis of strain KMM 296, a producer of highly active alkaline phosphatase; proposal for the reclassification of *Cobetia litoralis* and *Cobetia pacifica* as the later heterotypic synonyms of *Cobetia amphilecti* and *Cobetia marina* // *Biomolecules*. 2024. Vol. 14, № 2. Art. 196. doi: 10.3390/biom14020196.
41. Adedibu P. A., Noskova Y. A., Yugay Y. A., Ovsiannikova D. M., Vasyutkina E. A., Kudinova O. D., Grigorchuk V. P., Shkryl Y. N., Tekutyeva L. A., **Balabanova L. A.** Expression and characterization of alkaline phosphatase from *Cobetia amphilecti* KMM 296 in Transiently Transformed Tobacco Leaves and Transgenic Calli // *Plants*. 2024. Vol. 13, № 24. Art. 3570. doi: 10.3390/plants13243570.
42. Seitkhalieva A., Noskova Y., Isaeva M., Guzii A., Makarieva T. N., Fedorov S., **Balabanova L.** *In silico* prediction of alkaline phosphatase interaction with the natural inhibitory 5-azaindoles guitarrin C and D // *Molecules*. 2024. Vol. 29, № 23. Art. 5701. doi: 10.3390/molecules29235701.
43. Noskova Y., Nedashkovskaya O., **Balabanova L.** Production, purification, and biochemical characterization of a novel ATP-dependent caseinolytic protease from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // *Microorganisms*. 2025. Vol. 13, № 2. Art. 307. doi: 10.3390/microorganisms13020307.
44. Yugay Y., Kudinova O., Vasyutkina E., Adedibu P., Rudenko D., Alaverdov E., Rusapetova T., Fialko A., Degtyareva V., Bulgakov V., **Balabanova L.**, Shkryl Y. Heterologous expression of marine bacterial alkaline phosphatase enhances abiotic stress tolerance and metabolic adaptation in tobacco // *Journal of Plant Growth Regulation*. 2025. doi: 10.1007/s00344-025-11824-2.