

Л.А. БАЛАБАНОВА, М.П. ИСАЕВА

Морская биохимия: достижения и перспективы структурно- функционального исследования генов и геномов морских организмов

Приведены результаты исследований генов морского генеза с использованием геномных и генно-инженерных технологий. Даны примеры изучения биополимеров и усовершенствования методов диагностики на основе рекомбинантных гибридных бифункциональных белков, составной частью которых являются высокоактивные морские ферменты. Представлены данные по геномам морских бактерий как источника ценных ферментов и метаболитов.

Ключевые слова: морские организмы, ферменты, гибридные белки, мутагенез, геномные исследования.

Marine biochemistry: achievements and prospects of structural and functional researches of genes and genomes of marine organisms. L.A. BALABANOVA, M.P. ISAEVA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

The results of studies on the marine origin genes using genomics and genetic engineering technologies are reported. Herein, there are examples of biopolymers investigation and improvement of diagnostic methods based on the recombinant hybrid bifunctional proteins genetically labelled by the highly active marine enzymes. The data concerning the marine bacteria genomes as a source of biotechnologically valuable enzymes and metabolites are presented.

Key words: marine organisms, enzymes, fusion proteins, mutagenesis, genomic research.

Лаборатория морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН была организована в 1972 г. на базе группы изучения нуклеиновых кислот. Со дня основания и до 2018 г. ее бессменным руководителем был Валерий Александрович Рассказов. На протяжении длительного времени основным научным направлением лаборатории было исследование морских ферментов нуклеинового обмена, таких как нуклеазы, нуклеотидкиназы и фосфатазы. Однако позже, с активным развитием методов молекулярного клонирования с постановкой так называемого «полного цикла» – от установления нуклеотидной последовательности, конструирования генетической конструкции и до получения функционально-активного рекомбинантного белка, область научных интересов лаборатории расширилась. При активном сотрудничестве с другими подразделениями института новым направлением исследований стало изучение структуры уникальных и ценных для биотехнологии белков морских и наземных организмов. Результаты этих исследований освещены в обзорной статье В.А. Рассказова [5]. Недавние научные достижения лаборатории, рассмотренные через призму изучения и применения генов морских организмов на основе использования методов сайт-направленного мутагенеза, технологий геномного секвенирования, филогенетического и эволюционного анализа, представлены в данной обзорной статье.

БАЛАБАНОВА Лариса Анатольевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, *ИСАЕВА Марина Петровна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). *E-mail: issaeva@piboc.dvo.ru

Приоритетным направлением «Стратегии научно-технического развития Российской Федерации» является переход к персонализированной медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям здоровьесбережения, в том числе за счет рационального применения лекарственных препаратов (прежде всего антибактериальных). Решение этих задач наиболее полно может быть осуществлено за счет изучения и использования биологических ресурсов Океана. Морские организмы и микроорганизмы – ценный источник уникальных биополимеров, прежде всего ферментов, которые могут рассматриваться в качестве новых катализаторов для различных биотехнологических процессов и получения диагностических и терапевтических препаратов. Преимущество этих ферментов заключается в молекулярных и каталитических особенностях, обусловленных адаптационной эволюцией морских (микро)организмов под воздействием крайних значений физических факторов окружающей среды [8].

Высокая активность ферментов из морских источников позволяет эффективно использовать их в генно-инженерных конструкциях для исследования структурно-функциональных свойств новых белков. Для определения углеводсвязывающих свойств рекомбинантного бифункционального химерного лектина мидии CGL/CmAP с активностью щелочной фосфатазы (CmAP) морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 в отношении муциноподобных онкомаркеров был проведен направленный мутагенез сайтов связывания лектина CGL [14]. Методом твердофазного лектин-ферментного анализа установлено, что сила связывания комплекса «лектин–лиганд» у мутантных форм значительно меньше, чем у дикого типа. Результаты анализа активности фермента CmAP у мутантов гибридного белка и анализа его механизма связывания с такими лигандами, как галактоза, глоботриоза и муцин, *in silico* показали индивидуальный вклад аминокислотных остатков CGL в углеводсвязывающую активность. Впервые установлено, что сродство CGL к лигандам зависит от химической структуры трех эпитопных остатков углеводов, что определяет количество водородных связей в комплексах «CGL–лиганд». Полученные результаты важны для понимания молекулярного механизма функционирования CGL, а также для разработки синтетического аналога CGL с улучшенными углеводсвязывающими свойствами для диагностики и терапии рака.

Для ферментов морского происхождения характерны высокая удельная активность при пониженных температурах и устойчивость к действию неблагоприятных факторов. Понимание особенностей их физико-химических и каталитических свойств возможно при сравнительном анализе структур ферментов из морских и наземных организмов [17]. Альфа-галактозидазы, инактивирующие серологическую активность эритроцитов человека группы В, – относительно редкие ферменты. С целью исследования свойств альфа-галактозидазы *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 был получен ее рекомбинантный аналог α -Gal и сконструированы мутанты [6, 9]. В результате установлено, что α -Gal катализирует гидролиз альфа-О-гликозидной связи с сохранением оптической конфигурации аномерного центра субстрата, что характерно для альфа-галактозидаз семейства GH36. Искусственное увеличение термостабильности молекулы психрофильного фермента путем замены ключевых аминокислотных остатков по тому же принципу, который существует в структурной организации мезофильных и термостабильных гомологов, ведет к ограничению созданных природой вариантов его активной конформации, что неизбежно отражается на общей скорости каталитической реакции и механизме действия фермента.

К недавним достижениям лаборатории относится усовершенствование метода диагностики псевдотуберкулеза путем получения генно-инженерного гибридного бифункционального белка CmAP/OmpF на основе порина OmpF из патогенной для человека бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* и высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296, у которой каталитическая эффективность субъединицы в разы превышает таковую известных димерных аналогов [3, 4, 13]. Показано, что в гибридном белке модуль OmpF не теряет свойств диагностического антигена, а модуль CmAP сохраняет ферментативную активность для обнаружения комплексов «порин–специфическое

антитело». Использование данного гибридного белка позволяет исключить применение меченных ферментами вторых антител при диагностике острых и вторично-очаговых форм псевдотуберкулеза.

Несомненный практический интерес представляют результаты действия рекомбинантных щелочных фосфатаз и альфа-галактозидаз морских бактерий на клетки патогенных бактерий и их способность к образованию биопленок [11]. Было показано, что рекомбинантные ферменты морских бактерий *C. amphilecti* КММ 296 и *Pseudoalteromonas* sp. 701 обладают антибиопленочной активностью в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. enterica* и *S. aureus*. Полученные результаты представляют интерес с точки зрения использования психрофильных морских ферментов для контроля качества пищевых продуктов и безопасности медицинского оборудования.

К уникальным белкам морского генеза относятся цитолизины актиний (актинопорины). Интерес к таким соединениям связан с возможностью создания на их основе иммуноконъюгатов для направленного уничтожения клеток чужеродных организмов или опухолевых клеток [18]. Установлено, что геном морской анемоны *Heteractis crispa* содержит множество генов цитолизинов, различающихся между собой заменами в области, кодирующей зрелый белок. Для этих генов наблюдается сильное влияние стабилизирующего отбора на большинство сайтов, связанных со стабильностью структуры и порообразующей активностью [15].

Морские мицелиальные грибы являются перспективными продуцентами полисахариддеградирующих ферментов с интересными для сельского хозяйства и медицины свойствами. В ходе исследований найдены новые штаммы с высокоактивными и специфичными ламинариназами, альгинатлиазами, каррагиназами, полиманнуронатлиазами, агаразами и фукоиданазами [2]. В некоторых наземных штаммах микромицетов уровень активности ферментов, катализирующих расщепление полисахаридов водорослей, превышал во много раз активности, проявленные морскими штаммами, что может указывать на вторичное морское происхождение почвенных грибов, выделенных в приморском регионе. Эти результаты открывают перспективы дальнейшего изучения полисахариддеградирующего потенциала мицелиальных грибов для переработки различных растительных отходов сельского хозяйства и марикультур [10].

С целью открытия новых метаболических путей, получения новых сведений о распределении и эволюции генов и оперонов, отвечающих за синтез перспективных биополимеров и природных соединений, в лаборатории были начаты работы по секвенированию геномов морских бактерий. Методом пиросеквенирования были получены последовательности геномов таких морских бактерий, как *Vitellibacter vladivostokensis* КММ 3516Т [7], *C. amphilecti* КММ 296 (ранее – *C. marina*) [1], *Zobellia amurskyensis* КММ 3676Т [12], *Vibrio* sp. СВ1-14 [16].

Анализ последовательностей геномов обнаружил присутствие большого числа генов, отнесенных к гипотетическим генам белков с неустановленной функцией, а значит новых метаболических путей и их продуктов, представляющих интерес как для фундаментальной науки, так и для биотехнологических решений.

Морские бактерии семейства Flavobacteriaceae хорошо известны как ключевые участники процессов деградации биополимеров, главным образом полисахаридов водорослей. По данным секвенирования, геном морской флавобактерии *Z. amurskyensis* КММ 3676Т кодирует 361 ген системы углеводного обмена, включая 97 генов гликозилгидролаз, 13 генов полисахаридлиаз и 77 генов сульфатаз [12]. Полученная генетическая информация указывает на то, что бактерия обладает высоким ферментативным потенциалом для гидролиза основных полисахаридов водорослей, а наличие сульфатаз способствует эффективной деградации сульфатированных форм полисахаридов, таких как фуканы, каррагинаны и хондроитин. Большое содержание генов полисахариддеградирующих экзоферментов может указывать на важную экологическую роль бактерии в круговороте органических углерода и серы в океане. В дальнейшем на основании анализа

геномных данных могут быть выбраны гены для получения рекомбинантных аналогов уникальных ферментов, пригодных для модификации и деградации коммерчески важных полисахаридов водорослей.

Новые технологии исследования геномов позволяют также осуществлять направленный поиск генных кластеров для кодирования путей биосинтеза ценных вторичных метаболитов. Особый интерес представляет изучение генома морской бактерии *Vibrio* sp. СВ1-14, выделенной из слизи ловчей сети морской полихеты *Chaetopterus variopedatus* и являющейся продуцентом гуанидинового алкалоида 6-эпи-монанхорина, обладающего цитостатической активностью [16]. Изучение генома *Vibrio* sp. СВ1-14 открывает возможности для идентификации не только генного кластера биосинтеза 6-эпи-монанхорина, но и других редких и уникальных биосинтетических кластеров. Предварительный анализ генома показал присутствие генных кластеров, ответственных за синтез сахаров, жирных кислот и антимикробных пептидов. Так, в этом геноме найден крайне редко встречающийся биосинтетический кластер антибиотика дапдиамида. Однако ключевых генов ферментов, предсказанных гипотетической схемой биосинтеза 6-эпи-монанхорина, обнаружено не было. Поскольку большинство кластеров определяются как гипотетические, дальнейшая работа должна быть сосредоточена на получении мутантов с «выключенными» генами, а также на привлечении методов метабомики для детекции биосинтетических интермедиатов.

Таким образом, полученные результаты показывают перспективность молекулярно-генетических и геномных исследований морских биополимеров в качестве новых инструментов в биохимии и биотехнологии морских (микро)организмов, позволяющих открывать новые структуры и функции, находить новые биологические источники уникальных ферментов и вторичных метаболитов, а также получать ключевые ферменты, участвующие в биосинтезе морских биологически активных веществ. Не вызывает сомнений тот факт, что использование геномных и генно-инженерных технологий будет способствовать поиску новых биохимических соединений морского генеза и созданию на их основе новых высокоэффективных лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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) // Биол. моря. 2016. Т. 42, № 1. С. 78–81. – http://bm.dvo.ru/2016/n1/r_a013.htm
2. Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Слепченко Л.В., Киричук Н.Н., Худякова Ю.В., Сон О.М., Пивкин М.В., Рассказов В.А. Полисахариддеградирующая активность морских и наземных штаммов микелиальных грибов // Биоорган. химия. 2018. Т. 44, № 4. С. 425–432. – <http://www.rjbc.ru/2018/4/abstracts/9.shtml>
3. Балабанова Л.А., Голотин В.А., Буйновская Н.С., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Рассказов В.А. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40CmAP/OmpF, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной щелочной фосфатазы CmAP и порообразующего мембранного белка порина OmpF, и рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/OmpF – продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF: пат. 2634871 РФ. Заявл. 03.08.2016; опубл. 07.11.2017, Бюл. № 31.
4. Буйновская Н.С., Балабанова Л.А., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Рассказов В.А. Гибридный бифункциональный белок на основе OMPF порина и высокоактивной щелочной фосфатазы // Биоорган. химия. 2018. Т. 44, № 4. С. 417–424. – <http://www.rjbc.ru/2018/4/abstracts/8.shtml>
5. Рассказов В. А. Ферменты морских организмов и перспективы их использования в медицине и биотехнологии // Вестн. ДВО РАН. 2014. № 1. С. 61–68.
6. Слепченко Л.В., Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю., Исаков В.В., Подволоцкая А.Б., Елисейкина М.Г., Носкова Ю.А., Рассказов В.А. Свойства и возможная биологическая роль альфа-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 // Вестн. ДВО РАН. 2017. № 2. С. 51–58.
7. Чернышева Н.Ю., Ромашко Д.А. Геномный анализ гидролитического потенциала морской бактерии *Vitellibacter vladivostokensis* // Вестн. ДВО РАН. 2015. № 6. С. 159–163. – <https://elibrary.ru/item.asp?id=25501013>
8. Arrigo K.R. Marine microorganisms and global nutrient cycles // Nature. 2004. Vol. 437, N 7057. P. 349. – <https://www.nature.com/articles/nature04159>
9. Bakunina I., Slepchenko L., Anastuyuk 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* sp. KMM 701 and its C494N and D451A mutants // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 10. P. 349. – <https://doi.org/10.3390/md16100349>
10. Balabanova L., Slepchenko L., Son O., Tekutyeva L. Biotechnology potential of marine fungi degrading plant and algae polymeric substrates // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9. P. 1527. – <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01527>
 11. Balabanova L., Podvolotskaya A., Slepchenko L., Eliseikina M., Noskova Y., Nedashkovskaya O., Son O., Tekutyeva L., Rasskazov V. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products // *Food Control*. 2017. Vol. 78. P. 270–278. – <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.029>
 12. Chernysheva N.U., Likhatskaya G.N., Nedashkovskaya O.I., Isaeva M.P. Comparative genomics of *Zobellia*: analysis of polysaccharide lyases genes and operons // *Vestnik FEB RAS*. 2018. № 6. Supplement. – www.vestnikdvo.ru/index.php/vestnikdvo/.../204
 13. Golotin V., Portnyagina O., Chopenko N., Kim N., Rasskazov V., Novikova O. Production of recombinant porin from *Y. pseudotuberculosis* in a water-soluble form for pseudotuberculosis diagnostics // *Biol. Chem.* 2017. Vol. 398, N 11. P. 1229–1236. – <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0142>
 14. 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* // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 12. P. 471. – <https://doi.org/10.3390/md16120471>
 15. Leychenko E., Isaeva M., Tkacheva E., Zelepuga E., Kvetkina A., Guzev K., Monastyrnaya M., Kozlovskaya E. Multigene family of pore-forming toxins from sea anemone *Heteractis crispa* // *Mar. Drugs*. 2018. Vol. 16, N 6. P. 183. – <https://doi.org/10.3390/md16060183>
 16. Makarieva T., Shubina L., Kurilenko V., Isaeva M., Chernysheva N., Popov R., Bystritskaya E., Dmitrenok P., Stonik V. Marine bacterium *Vibrio* sp. CB1-14 produces guanidine alkaloid 6-epi-monancherin, previously isolated from marine polychaete and sponges // *Mar. Drugs*. 2019. Vol. 17, N 4. P. 213. – <https://doi.org/10.3390/md17040213>
 17. Rina M., Pozidis C., Mavromatis K., Tzanodaskalaki M., Kokkinidis M., Bouriotis V. Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5 // *The FEBS J*. 2000. Vol. 267, N. 4. P. 1230–1238. – <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01127.x>
 18. Tejuca M., Anderlueh G., Dalla Serra M. Sea anemone cytolytins as toxic components of immunotoxins // *Toxicon*. 2009. Vol. 54, N. 8. P. 1206–1214. – <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.025>