

Министерство науки и высшего образования
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской академии наук
Передовая инженерная школа «Институт биотехнологий, биоинженерии
и пищевых систем» Дальневосточного федерального университета
Молодёжная научно-исследовательская лаборатория рекомбинантных
ДНК-технологий

**ЩЕЛОЧНЫЕ ФОСФАТАЗЫ:
РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ПРИРОДЕ
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ**

Монография

Чебоксары
Издательский дом «Среда»
2023

УДК 577
ББК 28.072
Щ46

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Гос. задание FZNS-2022-0015, проект «Разработка и получение препаратов на основе рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии для использования в in vitro диагностике, а также прототипов инновационных противовоспалительных лекарственных средств».

Рецензенты:

д-р хим. наук, В.Л. Новиков; канд. биол. наук С.Н. Ковальчук

Авторы:

Л. А. Балабанова, А. В. Сейткалиева, О. М. Сон, Л. А. Текутьева

Щ46 Щелочные фосфатазы : распространение в природе и биологические функции : монография /
Л. А. Балабанова, А. В. Сейткалиева, О. М. Сон [и др.]; под ред. О. Д. Новиковой. – Чебоксары: Среда, 2023. – 144 с.

ISBN 978-5-907688-94-0

В монографии приводятся данные авторов и литературные сведения о природе каталитических процессов, в которых участвуют щелочные фосфатазы прокариот и эукариот. Представлена современная структурная классификация этих ферментов, включающая несколько белковых семейств, описаны типы каталитических реакций и механизм их действия в отношении сложных органических соединений, содержащих терминальные фосфоэфирные связи, а также приведен широкий спектр природных субстратов фосфатаз. Рассмотрены вопросы общего происхождения и функции щелочных фосфатаз структурного семейства PhoA, включающего белки некоторых бактерий, а также изоферментов животных и человека. Большое внимание уделено биологической роли щелочных фосфатаз в регуляции метаболических путей в микробиомах и биогеохимических процессах минерализации фосфора.

Книга адресована специалистам в области биохимии, микробиологии и биотехнологии.

© Балабанова Л.А., Сейткалиева А.В.,
Сон О.М., Текутьева Л.А., 2023

ISBN 978-5-907688-94-0
DOI 10.31483/a-10570

© ИД «Среда», оформление, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Глава 1. КЛАССИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ	11
1.1. Суперсемейство белков со структурным доменом ЩФ и их ферментативная неспецифичность.....	11
1.1.1. Щелочные фосфатазы и фосфодиэстеразы.....	16
1.1.2. Фосфонатмоноэфиргидролазы и арилсульфатазы.....	20
1.1.3. Другие фосфатазы и ферменты суперсемейства ЩФ	25
1.2. Конкурентный механизм формирования переходного состояния ферментативной реакции и эволюция ферментов суперсемейства ЩФ	26
Глава 2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ И РОЛЬ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ БАКТЕРИЙ	39
2.1. Щелочная фосфатаза бактерии <i>E. coli</i>	40
2.2. Генетическая регуляция и транспорт фосфора у бактерии <i>E. coli</i>	45
2.3. Структурная классификация щелочных фосфатаз бактерий....	50
2.3.1. Щелочные фосфатазы PhoA, PhoD и PhoX имеют разную структуру и принадлежат к разным предковым линиям гомологов .	50
2.4. Распространенность щелочных фосфатаз бактерий в природе	60
2.4.1. Щелочные фосфатазы PhoX и PhoA являются таксономическими маркерами морских метагеномов.....	61
2.4.2. Щелочные фосфатазы PhoD преобладают среди ферментов почвенных бактерий.....	63
2.4.3. Множественность паралогов щелочных фосфатаз у бактерий как признак экологической специализации	66
Глава 3. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ СТРУКТУРНОГО СЕМЕЙСТВА PhoA	69
3.1. Семейство ЩФ PhoA включает прокариотические и эукариотические ферменты от беспозвоночных до млекопитающих	69
3.2. Структурно-функциональная адаптация щелочных фосфатаз PhoA морских бактерий.....	77

Глава 4. МЕХАНИЗМ ТРАНСПОРТА И АККУМУЛЯЦИИ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА В МОРСКИХ БАКТЕРИЯХ ...	92
4.1. Периплазматическое фосфатирование необходимо для осмотической регуляции бактерий	92
Глава 5. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОГЕОХИМИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ МИКРООРГАНИЗМОВ	102
5.1. Место щелочных фосфатаз в фосфатном метаболизме	102
5.2. Участие щелочных фосфатаз в реминерализации органических фосфатов и круговороте фосфора, углерода и азота	104
5.3. Участие щелочной фосфатазы микроорганизмов в конкурентной борьбе и симбиотических взаимоотношениях	109
5.4. Роль щелочной фосфатазы в индуцированной минерализации гидроксиапатита в биопленках	111
5.5. Участие щелочных фосфатаз в геохимических процессах образования минералов	116
Заключение	118
Сокращения	121
Список литературы	123

Введение

Щелочные фосфатазы (ЩФ) (КФ 3.1.3.1) относятся к классу гидролитических металлозависимых эктоферментов, катализирующих гидролиз и трансфосфорилирование сложных эфиров фосфорной кислоты по механизму, включающему образование ковалентного фосфосеринового интермедиата и высвобождение неорганического фосфата и спирта (или фенола) при щелочных значениях pH (McComb et al., 1979; Millán, 2006; Zimmermann et al., 2012; Chen et al., 2014; Barrozo et al., 2015; Srivastava et al., 2021; Harroun et al., 2023). Большинство ЩФ в природе являются гомодимерами, где каждый каталитический центр содержит два иона Zn^{2+} и один ион Mg^{2+} , необходимые для проявления фосфомоноэстеразной активности. Однако, согласно современной структурной классификации, в суперсемейство ЩФ входят пять белковых семейств, включая фосфодиэстеразы, фосфонатмоноэстеразы и сульфатазы, со схожим структурным доменом и механизмом действия, что объясняет наличие эволюционно сложившегося каталитического промискуитета внутри суперсемейства (Duarte et al., 2013; Barrozo et al., 2015; Sunden et al., 2017; Srivastava et al., 2021; Chandonia et al., 2022). Структурный домен суперсемейства ЩФ представляет собой трехслойную $\alpha/\beta/\alpha$ -структуру, содержащую основной каталитический домен ЩФ и, иногда, дополнительные субдомены (Paysan-Lafosse et al., 2022; Chandonia et al., 2022). Таким образом, структурный домен суперсемейства ЩФ имеется у щелочных фосфатаз (ЩФ) (3.1.3.1), арилсульфатаз (3.1.6.8); фосфоглицератмутаза (5.4.2.1); фосфоноацетатгидролаза (3.11.1.2) и фосфоенолмутаза (5.4.2.7).

Щелочные фосфатазы являются одними из ключевых внеклеточных ферментов прокариот и эукариот, которые вовлечены во многие биохимические процессы, сопряженные с реакциями фосфорилирования/дефосфорилирования, включая метаболизм глицеролипидов, фолата и ксенобиотиков, поэтому они повсеместно распространены в природе. У прокариот ферменты локализованы в периплазматическом пространстве или вакуолях (у грибов) и сво-

бодно выделяются в окружающую среду, у эукариот это мембрано-связанные гликопротеины, которые заякорены во внешнем слое клеточной мембраны посттрансляционным гликозилфосфатидилинозитолом (ГФИ-якорь, GPI anchor) со стороны С-конца фермента (McComb et al., 1979; Millán, 2006; Vimalraj et al., 2020).

У микроорганизмов ЩФ играют основную роль в использовании органических фосфатов в качестве альтернативного источника фосфора (P) при условии дефицита в окружающей среде его наиболее биодоступной формы – неорганического фосфата ($P_{inorganic}$, P_i). В природе ЩФ микроорганизмов катализируют гидролиз фосфатов углеводов (глюкозофосфатов, глицерофосфатов и др.), фосфатидатов липидов (ключевых промежуточных продуктов в биосинтезе жиров, фосфо- и гликолипидов), нуклеотидфосфатов, включая ди- и тринуклеотиды, 5' и 3'-концов РНК и ДНК, полифосфатов и пирофосфатов (McComb et al., 1979; Plisova et al., 2005; Asgeirsson et al., 2020; Lidbury et al., 2022; Harroun et al., 2023). Кроме того, ЩФ могут неспецифически дефосфорилировать некоторые белки (Fuhrmann et al., 2013; Green and Sambrook, 2020; Asgeirsson et al., 2020). Наконец, бактериальные ЩФ имеют глобальное геохимическое значение, участвуя в процессах индуцированного зарождения фосфоритов и апатитов в океанической среде и почве наряду с кислотными ЩФ и абиотическими катализаторами – природными оксидными минералами (гематитом, бирнесситом, боэмитом), способствующими расщеплению терминальных связей P-O-C/P и реминерализации сложных соединений фосфора (Wan, 2022; Skouri-Panet, 2018; Omelon, 2013; Lidbury 2022; Barrozo et al., 2015; Srivastava et al., 2021). Последние данные говорят о том, что свободные экзогенные ЩФ микроорганизмов участвуют в регуляции локальных микробиомов, индукции минерализации биопленок и экзоскелетов беспозвоночных, ремедиации тяжелых металлов и органических загрязнений, что способствует решению ряда экологических проблем (Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2017; Doing et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Dong et al., 2022; Singh et al., 2022; Zorzetto et al., 2023). В настоящее время известны четыре больших структур-

ных семейства прокариотических ЩФ, произошедших от различных предковых генов, но обладающих схожей функцией: PhoA, PhoD, PhoX и PafA (Luo et al., 2009; Sebastian et al., 2009; Zaheer et al., 2009; Ragot et al., 2015, 2016; Lidbury et al., 2022). Они отличаются друг от друга структурой, механизмом ферментативного действия, субклеточной локализацией, субстратной специфичностью, диапазонами температуры и pH и зависимостью проявления своей активности от различных ионов металлов (Luo et al., 2009; Rodriguez et al., 2014; Golotin et al., 2015; Noskova et al., 2019; Asgeirsson et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Lidbury et al., 2022).

Многочлеточные организмы продуцируют Mg^{2+}/Zn^{2+} -зависимые ферменты структурного семейства PhoA, к которому принадлежат ЩФ модельного микроорганизма *Escherichia coli* и млекопитающих. В связи с этим, ЩФ семейства PhoA лучше охарактеризованы и считаются классическими ферментами (McComb et al., 1979; Millán, 2006; Zaheer, 2009; Chen et al., 2014; Harroun et al., 2023). Несмотря на консервативность основных характеристик каталитического механизма, ЩФ млекопитающих имеют более высокие значения удельной активности (у.а.), более низкие значения константы Михаэлиса (K_m), а также оптимум pH-зависимой активности в более щелочной среде по сравнению с бактериальными ЩФ (Millán, 2006). Однако ферменты некоторых морских бактерий, таких, например, как *Vibrio splendidus* G15-21 (VAP) и *Cobetia amphilecti* КММ 296 (CmAP), в сильнощелочной среде имеют показатели у.а., сопоставимые по величине или даже превышающие таковые ЩФ млекопитающих за счет структурной адаптации к низким температурам и высокой солености. Кроме того, ЩФ морских бактерий проявляют высокую ферментативную активность как в димерном, так и в мономерном состоянии, и не требуют посттрансляционного гликозилирования в отличие от ЩФ эукариот (Millán, 2006; Gudjónsdóttir and Ásgeirsson, 2008; Golotin et al., 2015; Markússon et al., 2022).

ЩФ млекопитающих кодируются четырьмя генами и по характеру экспрессии их можно разделить на тканеспецифичные и тка-

ненеспецифичные. Три из них, включая ЩФ кишечника (IAP, Intestine Alkaline Phosphatase), зародышевых, или эмбриональных, клеток (GCAP, Germ Cell Alkaline Phosphatase; EAP, Embryonic Alkaline Phosphatase) и плаценты (PLAP, Placental Alkaline Phosphatase), являются тканеспецифичными. В то время как четвертая – тканенеспецифичная ЩФ (TNAP, Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase), может экспрессироваться в различных органах и тканях (Millán, 2006; Yang et al., 2012; Sharma et al., 2014; Duan, 2022). Знания о физиологических субстратах ЩФ до сегодняшнего дня ограничивались пирофосфатом, пиридоксаль-5'-фосфатом (витамином В₆) и нуклеотид фосфатами для TNAP и IAP соответственно (Sharma et al., 2014; Harroun et al., 2023). Предполагаемыми субстратами для TNAP являются также фосфоэтаноламин, фосфохолин и фосфорилированный остеопонтин, а для кишечной изоформы IAP было показано дефосфорилирующее действие в отношении липополисахаридов (ЛПС) грамотрицательных бактерий (Bessueille et al., 2022; Harroun et al., 2023). Изоферменты ЩФ отличаются незначительными аминокислотными заменами в полипептидной цепи и характером их гликозилирования, что приводит к различиям в физико-химических и каталитических свойствах и, следовательно, в биологических функциях ферментов, которые до конца не установлены (Zaher et al., 2020; Vimalraj et al., 2020; Levitt et al., 2022).

Гены, структуры белковых молекул и функции ЩФ животных ортологичны ферментам человека, они отличаются только эмпирическими названиями некоторых генов и изоферментов. В связи с этим, исследования биохимических и фармакологических свойств ЩФ успешно проводят на модельных животных, в частности, на мышах (Yang et al., 2012; Kaliannan et al., 2013; Lei et al., 2015; Sato et al., 2021; Bessueille, 2022).

Биохимические свойства ЩФ давно изучены, но полный спектр их биологических функций остается неизвестным. Наиболее изученной биологической функцией тканенеспецифичной ЩФ TNAP является ее ключевая роль в остеогенезе. Этот фермент способ-

ствуется минерализации костной ткани, что подтверждается возникновением такого заболевания, как гипофосфатазия при дефиците TNAP у человека и мышей (Vimalraj, 2020; Sato et al., 2021).

Способность тканеспецифичной ЩФ столбчатого эпителия (камчатых энтероцитов) желудочно-кишечного тракта и других органов дефосфорилировать липид А, токсического компонента эндотоксина клеточной стенки грамотрицательных бактерий – ЛПС, в последнее время стали рассматривать как средство взаимодействия организма-хозяина с микробиомом (Lalles et al., 2010; Yang et al., 2012). Более того, распознавание ЛПС бактерий и их дефосфорилирование являются очень древними функциями ферментов этого семейства и относится к системе врожденного иммунитета многоклеточных организмов. Это было доказано в экспериментах по колонизации светового органа (фотофора) кальмара *Euprymna scolopes* симбиотической люминесцентной бактерией *Vibrio fischeri* и регулированию численности ее популяции в соответствии с суточным ритмом активности кальмара путем изменения уровня экспрессии ЩФ его фотофора (Rader et al., 2012). Повышение уровня дефосфорилированного ЛПС к заходу солнца является сигналом для бактерий к увеличению численности популяции и соответственно интенсивности люминесценции фотофора, что одновременно является защитой беспозвоночного от чрезмерного воспаления и разрушения собственных тканей под действием фосфорилированного липида А – компонента эндотоксина (Rader et al., 2012).

У млекопитающих тканеспецифичная ЩФ IAP экспрессируется эпителиальными клетками тонкого кишечника и активно высвобождается из микроворсинок щеточной каймы в просвет кишечника в виде везикул, а также попадает в кровеносную систему (McConnell et al., 2009; Shifrin et al., 2012). На сегодняшний день установлено, что важнейшими функциями изофермента IAP являются дефосфорилирование ЛПС и других медиаторов воспаления, ответственных за хронические системные заболевания, а также поддержание кишечного микробного гомеостаза и барьерной функции кишечника (Malo et al., 2010; Lalles et al., 2010; Kaliannan et al., 2013; Hamarneh et al., 2014; Liu et al., 2016; Kühn et al., 2020).

Таким образом, с дефицитом этого фермента связан ряд патологий, включая метаболический синдром, фиброз печени, ишемическая болезнь сердца, остеопороз и сокращение продолжительности жизни в целом (Malo et al., 2010; Aw et al., 2018; Kühn et al., 2020). Кроме того, повышенный уровень недефосфорилированного ЛПС в организме человека коррелирует с повышенным риском рака печени и колоректального рака (Duan, 2022).

В данной монографии представлены последние сведения о структуре, свойствах, физиологической роли многофункционального биологического катализатора реакций дефосфорилирования нуклеиновых кислот, липополисахаридов, фосфолипидов, белков и других органических фосфатов в организме млекопитающих, включая человека, и окружающей среде – щелочной фосфатазе, на основании которых стали возможны невероятные достижения в комплексной диагностике и терапии многих заболеваний человека.

Глава 1. КЛАССИФИКАЦИЯ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ

1.1. Суперсемейство белков со структурным доменом ЩФ и их ферментативная неспецифичность

Суперсемейство ЩФ включает в себя пять белковых семейств металлоферментов: щелочные фосфатазы (ЩФ) (3.1.3.1), арилсульфатазы (3.1.6.8); фосфоглицератмутазы (5.4.2.1); фосфоноацетатгидролазы (3.11.1.2) и фосфоенолмутазы (5.4.2.7), которые имеют низкую идентичность аминокислотных последовательностей, но обладают подобием пространственной структуры (упаковки молекулы) и каталитического механизма действия. Данная классификация базируется на подобии кристаллических структур и функции белков, объединенных в одну группу, и отражена в базах данных InterPro (Global CoreBiodata Resource; <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR017850/>), SCOPe (SCOPe: Structural Classification of Proteins – extended. Release 2.08 (обновлено 2023-01-06); <http://scop.berkeley.edu/sunid=53649>) и SUPERFAMILY (<https://supfam.org/SUPERFAMILY/index.html>). На сегодняшний день в базах данных кристаллических структур белков (Protein Data Base, PDB), представлено 1562 типов пространственных структур белков (фолдов), 2816 белковых суперсемейств и 5936 белковых семейств (SCOP| Structural Classification of Proteins (cam.ac.uk), обновлено 2022-06-17). Интерактивная база SUPERFAMILY генерирует аннотации функциональных свойств всех белков, включая белки с неустановленной структурой и функцией, путем анализа последовательностей более, чем 2478 завершенных геномов с использованием скрытых Марковских моделей (hidden Markov models, HMM), которые представляют собой структурные белковые домены, идентифицированные до уровня суперсемейства SCOP. Члены суперсемейства ЩФ (InterPro ID: IPR017850, SSF 53649; SCOPe ID: c.76) являются белками α/β -класса смешанного типа с бета-листами, состоящими из 8 нитей, расположенных в порядке 43516728, где нить 7 антипараллельна остальным, что характерно для белков ЩФ-типа (Alkaline Phosphatase-like fold) (рис. 1).

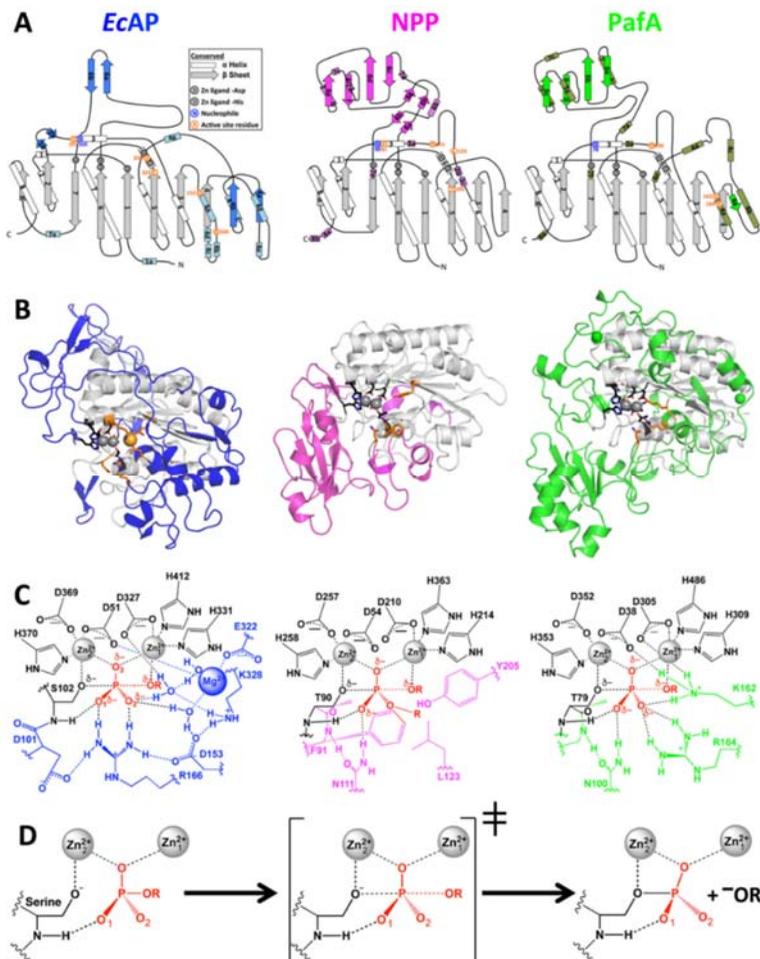
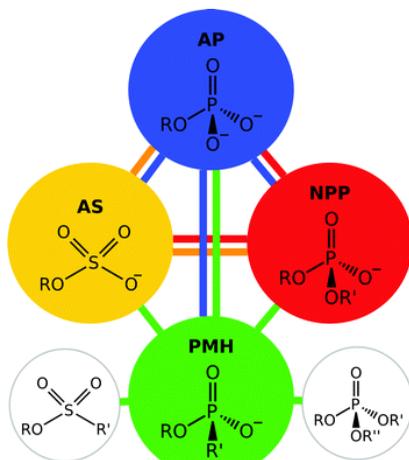


Рис. 1. Общая структура и каталитические сайты активного центра щелочной фосфатазы *E. coli* (EcAP; код PDB: 3TG0), щелочной фосфатазы/фосфодиэстеразы *Chryseobacterium meningosepticum* (PafA, код PDB: 5TJ3) и нуклеотид пиррофосфатазы/фосфодиэстеразы *Xanthomonas citri* (NPP, код PDB: 5TJ3):(A) –топология консервативных (серые и белые) и различающихся доменов (голубые для EcAP, розовые для NPP и зеленые для PafA) показана в виде

ленточных диаграмм. Каталитические сайты окрашены в оранжевый цвет; **(В)** – пространственные структуры ЩФ EcAP (3TG0), NPP (2GSN) и PafA (5TJ3) с консервативными лигандами Zn^{2+} (серые) и нуклеофилами (черные). Консервативные и неконсервативные домены и каталитические сайты обозначены в соответствии с обозначениями цветов на рисунке **(А)**; **(С)** – схематическое изображение активного центра с фосфорильной и «уходящей» группой – *n*-НФФ (красный) при переходном состоянии реакции для ферментов EcAP (голубой), PafA (розовый) и NPP (зеленый); **(D)** – схематическое изображение предполагаемых взаимодействий ферментов и субстратов в основном и переходном состоянии реакции (Sunden et al., 2017).

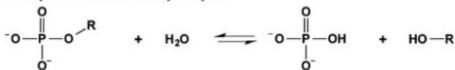
Специфичность этих ферментов заключается в том, что они катализируют преимущественно гидролиз фосфо-,сульфо- и фосфоноуглеродных субстратов. В целом все представители суперсемейства имеют сходную архитектуру активного центра, несмотря на то, что действие их активируется различными ионами металлов (Zn^{2+} и Ca^{2+} или Mn^{2+}) и нуклеофилами (серином, треонином и формилглицином) (Duarte et al., 2013; Paysan-Lafosse et al., 2022; Chandonia et al., 2022).

Представители суперсемейства ЩФ, в частности, такие гидролазы, как ЩФ и фосфодиэстеразы (3.1.3.1), арилсульфатазы (3.1.6.8) и фосфонатмоноэфиргидролазы (3.11.1.2), чаще всего используются в качестве моделей для изучения эволюционных драйверов возникновения новых гидролитических ферментов. После дивергенции они способны как к новым, так и остаточным предковым функциям, что приводит к их широкой субстратной специфичности и взаимозаменяемости в реакциях разрыва связей P-O, S-O и P-C (рис. 2). Таким образом, ферменты суперсемейства ЩФ катализируют гидролиз ряда субстратов, различающихся по характеру сольватации и степени протонирования, и, следовательно, для эффективного действия этих ферментов требуются различные условия (рис. 2 Б).

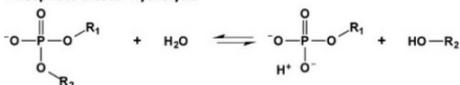


А

Phosphate monoester hydrolysis



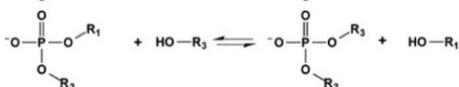
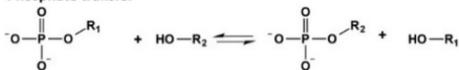
Phosphate diester hydrolysis



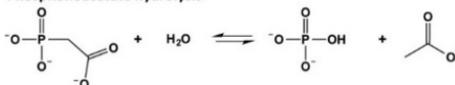
Sulfate ester hydrolysis



Phosphate transfer



Phosphonoacetate hydrolysis



Б

Рис. 2. А – Ферменты суперсемейства ЩФ имеют тенденцию к «перекрестной субстратной специфичности» – физиологический субстрат одного фермента может подвергнуться неспецифическому

гидролизу под действием фермента, принадлежащего к другому белковому семейству: щелочной фосфатазы (AP, синий круг), арилсульфатазы (AS, желтый круг), нуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы (NPP, красный круг) и фосфонатмоноэфиргидролазы (PMH, зеленый круг). Специфические субстраты для каждого белкового семейства, принадлежащего к суперсемейству ЩФ, показаны схематично внутри каждого круга, цветные линии указывают на перекрестную ферментативную активность членов каждого семейства ЩФ в отношении этих субстратов. В отношении субстратов фосфонатмоноэфиргидролазы (PMH, зеленый круг), катализирующей гидролиз фосфотриэфиров (белый круг справа) и сульфонатных моноэфиров (белый круг слева) у других ферментов суперсемейства ЩФ активность пока не обнаружена; **Б** – Субстраты, гидролизуемые под действием ферментов суперсемейства ЩФ (Durate et al., 2013).

Общим свойством для всех ферментов суперсемейства ЩФ является их металлозависимость. В зависимости от конкретного члена суперсемейства, присутствие ионов металлов играет важную роль в активации нуклеофила, которым обычно является спирт или алкоксид, за счет увеличения концентрации его активной депротонированной формы. Однако существуют различия в металлозависимости, металлоспецифичности, общей структуре и специфическом выборе нуклеофила, что, в свою очередь, может быть связано с изменениями в характере субстратного предпочтения.

Таким образом, несмотря на общую структуру основного структурного домена, суперсемейство ЩФ можно условно разделить на две группы: 1) ферменты, содержащие один ион металла в активном центре (фосфонатмоноэфиргидролазы и арилсульфатазы); 2) ферменты, содержащие классический биметаллический активный центр (щелочные фосфатазы и нуклеотидпирофосфат/фосфодиэстеразы) (рис. 3).

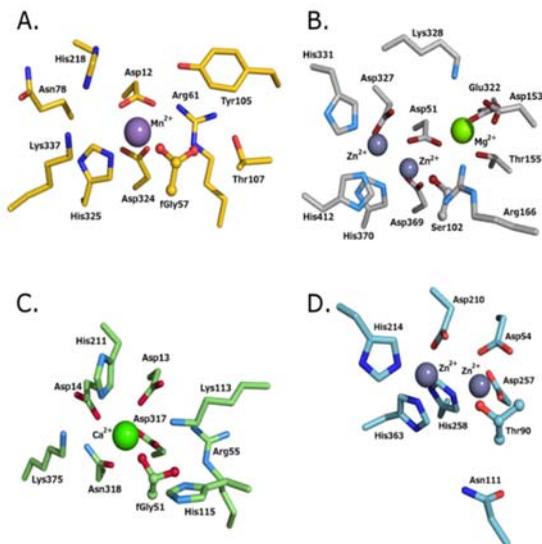


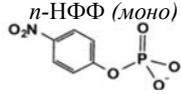
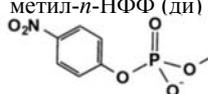
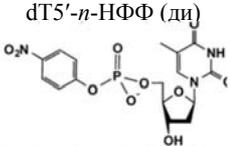
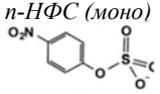
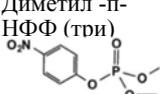
Рис. 3. Каталитические сайты активного центра некоторых представителей суперсемейства ЩФ с ионами двухвалентных металлов в виде кофакторов и с аминокислотными остатками из ближайшего окружения: (А) фосфонатмоноэстеразы *Rhizobium leguminosarum* (код PDB: 2VQR), (В) щелочной фосфатазы *E. coli* (код PDB: 1ALK) (ион магния не входит в каталитический сайт), (С) арилсульфатазы *Pseudomonas aeruginosa* (код PDB: 1HDH19) и (D) нуклеотидпирофосфатазы/фосфодиэстеразы *Xanthomonas axonopodis* (код PDB: 2GSN). (Durate et al., 2013; Barrozo et al., 2015).

1.1.1. Щелочные фосфатазы и фосфодиэстеразы

Щелочные фосфатазы (ЩФ) (3.1.3.1), в первую очередь, являются фосфомоноэстеразами, которые катализируют гидролиз широкого спектра моноэфиров алкил- и арилфосфатов с образованием неорганического фосфата и спирта или фенола соответственно и, с гораздо меньшей эффективностью, могут выступать в роли фосфодиэстераз и сульфатаз (O'Brien and Herschlag, 2002; Zalatan et al., 2006; Lassila et al., 2008; Zalatan et al., 2008; Chen et al., 2014; Sunden et al., 2015; 2016; Andrews et al., 2014). Если для нативной ЩФ *E. coli* каталитическое значение k_{cat}/K_M при гидролизе *n*-нитрофенилфосфата (*n*-НФФ) составляет $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, то для перекрестной активности этого фермента в отношении фосфодиэфира и сульфомоноэфира $k_{cat}/K_M = 5 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ и $1 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Каталитическая эффективность щелочных фосфатаз/
фосфодиэстераз в отношении моно-, ди- и триэфиров

Фермент	k_{cat}/K_m ($M^{-1} s^{-1}$)				
	 <i>n</i> -НФФ (моно)	 метил- <i>n</i> -НФФ (ди)	 dT5'- <i>n</i> -НФФ (ди)	 <i>n</i> -НФС (моно)	 Диметил - <i>p</i> - НФФ (три)
ЩФ <i>EcAP</i>	$3,3 \times 10^7$ ^a [$6,3 \times 10^8$]	$1,8 \times 10^{1b}$	$<2,0 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-3c}$	ND
ФДЭ <i>NPP</i>	$1,0$ ^d	$2,3 \times 10^{2d}$	$1,6 \times 10^{0d}$	$2,0 \times 10^{-5e}$	$<5,9 \times 10^{-4}$
ЩФ <i>PafA</i>	$1,6 \times 10^{6a}$ [$4,3 \times 10^8$]	$1,7 \times 10^{1a}$	$1,6 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^{-4}$	ND

^aSunden et al., 2016, O'Brien and Herschlag, 2002; ^bZalatan et al., 2008; ^cAndrews et al., 2014; ^dZalatan et al., 2006; ^eLassila et al., 2008. Условия анализа активности были следующими: 0,1 мкМ натрия МОПС, pH 8,0, 0,5 мкМ NaCl, 100 мкМ ZnCl₂ и 500 мкМ MgCl₂ при 25°. В квадратных скобках дана расчетная константа скорости реакции второго порядка с учетом лимитирующей химической стадии (Sunden et al., 2015, 2016; ^eAndrews et al., 2014); ND, не определено.

Как видно из данных рисунков 1 (С) и 3 (В), активный центр ЦФ содержит три сайта связывания ионов металлов: два металлосвязывающих сайта состоят из аминокислотных остатков 3 x Asp (D) и 3 x His (H) для координации двух ионов Zn^{2+} при взаимодействии с субстратом и нуклеофилом Ser (S), в то время как третий металлосвязывающий сайт состоит из остатков Asp (D), Glu (E), Thr (T) и трех молекул воды для координации иона Mg^{2+} , который, как предполагается, стабилизирует заряд фосфатной группы в транзитном состоянии (Chen and Liao, 2014; Golotin et al., 2015; Sunden et al., 2017). Результаты компьютерного моделирования также указывают на то, что активация ЦФ ионом Mg^{2+} происходит в результате его октаэдрической координации, которая структурно стабилизирует активный сайт в наиболее выгодной для прохождения катализа конформации (рис. 4 А).

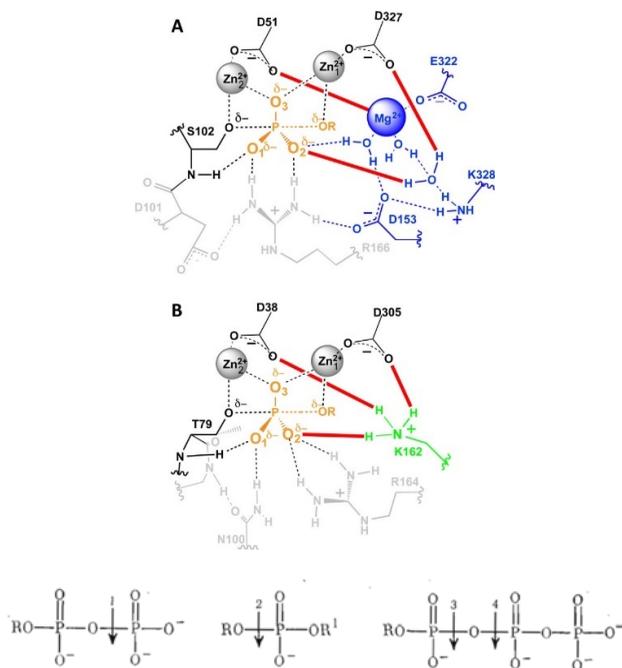


Рис. 4. Биметаллический активный центр ферментов суперсемейства ЦФ (А, В) и схема расщепления фосфоэфирных связей фосфомоноэстеразой (слева внизу) и фосфодиэстеразой (справа

внизу). Щелочные фосфатазы (**A**) и фосфодиэстеразы (**B**) имеют общую структуру активного центра: показаны сайты связывания двух ионов Zn^{2+} и субстрата и алкоксидного нуклеофила (S102 у ЩФ *E. coli* и T79 у фосфодиэстеразы *Xanthomonas citri*) в момент переходного состояния реакции (Peck et al., 2016; Sunden et al., 2017).

Расчеты показывают, что в реакции ЩФ реализуется механизм «пинг-понга», включающий две стадии химического замещения: замещение «уходящей» группы субстрата алкоксидом Ser и гидролиз фосфосерильного интермедиата Zn^{2+} -связанным гидроксидом (рис. 4 А). Оба этапа замещения протекают согласованным ассоциативным путем независимо от того, какой субстрат используется (Chen and Liao, 2014). Однако существуют другие расчеты и мнения относительно детализированного механизма реакции гидролиза фосфатов, о которых речь пойдет в отдельной главе.

Ближайшим структурным аналогом ЩФ является нуклеотидпирифосфатаза/фосфодиэстераза, которая, наоборот, преимущественно гидролизует диэфир фосфатов (Sunden et al., 2017; Noskova et al., 2019). Фермент имеет низкую идентичность аминокислотной последовательности с таковой фермента ЩФ (не более 8%), однако также содержит биметаллический каталитический центр, включающий сайты связывания двух ионов Zn^{2+} , шесть консервативных Zn^{2+} -связывающих остатка (3 x Asp и 3 x His) и каталитический остаток Thr (T), расположенный аналогично остатку Ser в активном центре ЩФ (рис. 1 С; 3 В, D; 4 А, В). Действительно, консервативный серил/треонильный остаток у обоих ферментов представляет собой лиганд для двух ионов Zn^{2+} (Zn_1^{2+} и Zn_2^{2+}) и служит нуклеофилом, который атакует атом фосфора моноэфирного или диэфирного фосфатного субстрата (рис. 4 А, Б). Подобие структуры каталитического центра рассматриваемых ферментов вызывает непонимание причины большей специфичности фосфодиэстеразы в отношении фосфодиэфиров (первичная активность фосфодиэстеразы) по сравнению с таковой в отношении фосфомоноэфиров (вторичная активность фосфомоноэстеразы).

Атом кислорода «уходящей» группы субстрата, приобретающий в транзитном состоянии отрицательный заряд, стабилизируется ионом Zn_1^{2+} , в то время как один из атомов кислорода переносимой фосфорильной группы располагается между обоими ионами Zn_1^{2+} и Zn_2^{2+} , предположительно, создавая сильные электростатические взаимодействия, стабилизирующие тригонально-бипирамидальное переходное состояние (рис. 1 С, D; 4 А, В).

1.1.2. Фосфатмоноэфиргидролазы и арилсульфатазы

Во вторую условную группу металлоферментов суперсемейства ЩФ, которую можно выделить по наличию лишь одного иона металла в активном центре, входят арилсульфатазы (3.1.6.8) и фосфатмоноэфиргидролазы (3.11.1.2).

Структура арилсульфатаз прокариот и эукариот очень консервативна, что предполагает их общее происхождение от одного предкового гена. К этому белковому семейству относятся, например, N-ацетилгалактозамин-4-сульфатаза (ASC) и арилсульфатаза бактерии *P. aeruginosa* (PAS), а также два аналога ферментов человека ASA166 и ASB164. Арилсульфатаза PAS практически с одинаково высокой эффективностью катализирует гидролиз как сульфатов, так и моно- и диэфиров фосфатов (Duarte et al., 2013).

При сравнительном анализе структур арилсульфатазы PAS, ЩФ *E. coli* и фосфодиэстеразы NPP *X. axonopodis* прослеживаются некоторые характерные для суперсемейства ЩФ свойства при явных различиях в устройстве их активных центров (рис. 3 В, С, D). Основное отличие заключается в существовании моноядерного центра связывания каталитического иона Ca^{2+} вместо двухядерного транзитного металлосодержащего центра ЩФ (рис. 3 В, С), а также необычного нуклеофила – формилглицина (fGly), который обуславливает общий для всех сульфатаз механизм катализа (рис. 3 С). Все сульфатазы в качестве нуклеофила используют либо S_{ys} , либо S_{er} , который посттрансляционно модифицируется с образованием альдегида, а затем гидратируется с образованием геминального диола (рис. 5 А, В, этапы I–II).

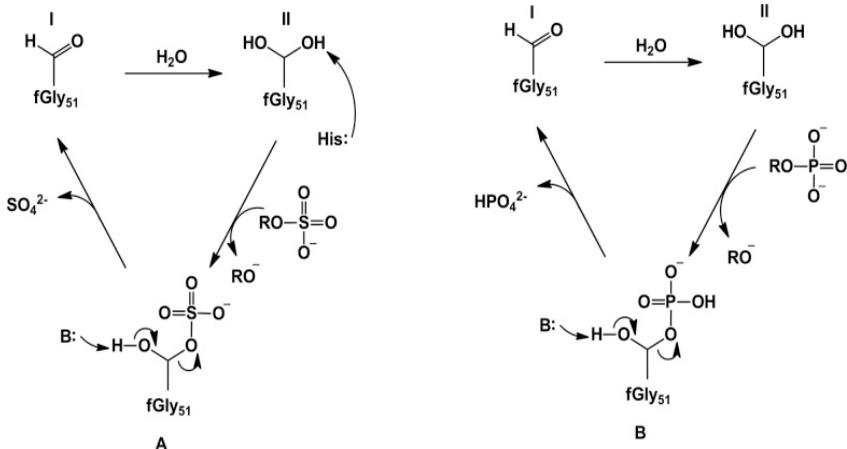


Рис. 5. Предполагаемые механизмы (А) гидролиза моноэфиров сульфатов и (В) фосфатных эфиров арилсульфатазой *P. aeruginosa* (PAS). При проявлении сульфатазной активности PAS перенос сульфальной группы происходит по механизму, в котором гистидин выступает в качестве основания (His115) с активацией геминального диола, который действует как нуклеофил. При проявлении фосфатазной активности PAS субстрат в качестве основания для депротонирования нуклеофила может действовать сам моноэфир фосфата (В). Для диэфиров фосфатов получены аналогичные результаты (Duarte et al., 2013).

Предполагаемый механизм действия сульфатазы включает атаку альдегида молекулой воды для формирования соответствующего геминального диола, за которой следует нуклеофильная атака сульфата с сопутствующим отщеплением «уходящей» группы и последующим расщеплением гемиацетала для регенерации геминального диола (рис. 5 А). Как показано на рисунке 5, важной частью каталитического механизма является начальное депротонирование образующегося геминального диола (fGly51). В качестве оснований рассматриваются два кандидата – близлежащий металл-координирующий остаток Asp317 или один из остатков His, который действует в момент каталитического расщепления физиологических для сульфатаз субстратов – сульфатов (Duarte et al., 2013).

Эволюционно родственными арилсульфатазе PAS оказались ферменты бактерий *R. leguminosarum* (RIPMH) и *Burkholderia caryophylli* (BCPMH), принадлежащие к другому белковому семейству суперсемейства ЩФ – фосфонатмоноэфиргидролазам (PMH) (Jonas et al., 2008; van Loo et al., 2010). Последовательность фермента RIPMH имеет всего 27% сходства с последовательностью сульфатазы PAS, но 64% остатков совпадают при образовании трехмерной структуры обоих белков при суперпозиции C α -атомов в теоретической модели со значением среднеквадратичного отклонения (RMSD) 2,54. Å (Jonas et al., 2008). Фосфонатмоноэфиргидролазы оказались еще более полиспецифичными по сравнению с остальными ортологами суперсемейства ЩФ, они могут катализировать, по крайней мере, пять фосфорилированных субстратов разной химической природы (рис. 6).

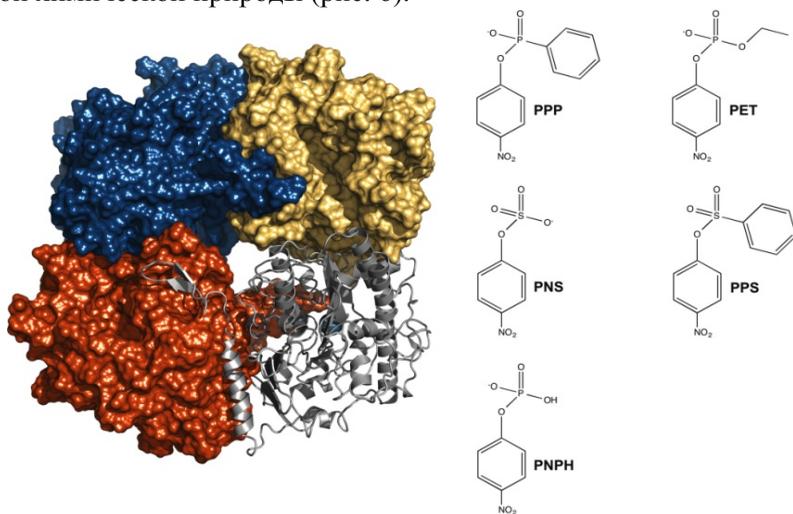


Рис. 6. Четвертичная структура фосфонатмоноэфиргидролазы *R. Leguminosarum* RIPMH (код PDB: 2VQR) и соответствующих ее специфичности субстратов. Ферменты RIPMH и BCPMH представляют собой димеры димеров (тетрамеры), в которых мономерные единицы каждого димера связываются с соответствующей олигомерной единицей через С-концевую петлю (показана серым цветом

в виде ленточной диаграммы). Эта петля выходит в соседний активный центр, помогая позиционировать ключевые каталитические остатки. Субстратами для фермента R1PMH являются фенил-*n*-нитрофенилфосфонат (PPP), этил-*n*-нитрофенилфосфат (PET), *n*-нитрофенилсульфат (PNS), фенил-*n*-нитрофенилсульфонат (PPS) и моноанион *n*-нитрофенилфосфата (*p*NPH) (Barrozo et al., 2015).

Существуют также сведения о ферментативной активности фосфонатмоноэфиргидролазы РМН в отношении триэфиров фосфатов, но пока нет однозначных экспериментальных доказательств для определения механизма этой каталитической реакции (Duarte et al., 2013; Barrozo et al., 2015). Ферменты РМН являются гомотетрамерами с массой субъединиц ~56 кДа и широкими субстрат-связывающими ферментативными полостями ($\approx 10 \times 20 \text{ \AA}$ ширина и 15 \AA глубина), позволяющими «разместить» субстрат различной формы и размера (Barrozo et al., 2015).

Оба фермента, арилсульфатаза PAS и фосфонатмоноэфиргидролаза РМН, содержат моноядерный металлический центр с искаженной октаэдрической конформацией, который у ферментов РМН, вероятно, Mn^{2+} -зависимый (Jonas et al., 2008; van Loo et al., 2010), а у арилсульфатазы PAS – Ca^{2+} -зависимый (Boltes et al., 2001) (рис. 7 А).

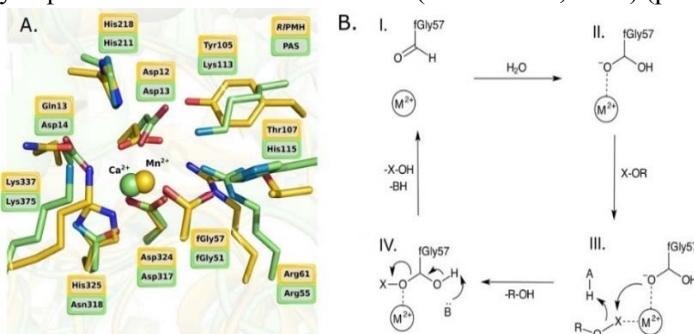


Рис. 7. (А) Суперпозиция аминокислотных остатков активных центров фосфонатмоноэфиргидролазы R1PMH и арилсульфатазы PAS, иллюстрирующая идентичность их 3D-структуры. (Б) Упрощенная схема предполагаемого механизма катализа для обоих ферментов. Поскольку в качестве каталитического иона металла у R1PMH

предположен ион Mn^{2+} , который является жесткой кислотой Льюиса, нуклеофил может быть стабильным алкоксидом, что согласуется с профилями рН-зависимости скорости реакции, показанной в работе (Barrozo et al., 2015).

Кроме того, все три фермента R1PMH, BcPMH и PAS используют необычный геминальный нуклеофил диол, что свойственно всем известным на сегодняшний день сульфатазам (Hanson et al., 2004) (рис. 2 А, С; рис. 7 В). Таким образом, РМН являются пока единственными представителями несulfатазных ферментов, которые обладают посттрансляционной модификацией цистеина в альдегид (формилглицин, fGly) (Barrozo et al., 2015). Предполагаемый в настоящее время механизм активности ферментов РМН, как присущей фосфонатмоноэфиргидролазе, так и неспецифичной для нее (рис. 6), похож на механизм действия сульфатазы PAS (рис. 5, 7 В). На первом этапе (I → II) гидратация посттрансляционно модифицированного альдегида дает реакционноспособный геминальный диол, который может действовать как нуклеофил (рис. 7 В). Этот геминальный диол активируется каталитическим металлсвязанным центром и существует в форме алкоксида. После связывания субстрата (II → III) этот геминальный диол атакует фосфорно-серный центр (III → IV) соответствующего субстрата, что приводит к формированию полуацетала промежуточного соединения (IV). На заключительном этапе (IV → I) это промежуточное соединение гидролизуется путем расщепления полуацетала с целью регенерации альдегида и получения конечного продукта (рис. 7 В). Также было предположено, что этапы IV → I, показанные на рисунке 7 (В), могут играть важную роль при проявлении каталитической полиспецифичности ферментов РМН (Barrozo et al., 2015).

1.1.3. Другие фосфатазы и ферменты суперсемейства ЩФ

Кроме фосфо- и сульфогидролаз суперсемейство ЩФ включает белки с очень разной ферментативной активностью, например, изомеразы, или лиазы, и фосфорилтрансферазы (Duarte et al., 2013). Сюда входят фосфоглицератмутаза (iPGMs), которая катализирует превращение 2-фосфоглицерата в 3-фосфоглицерат. Несмотря на проявление активности вне зависимости от кофакторов, у этого фермента в аминокислотной последовательности также обнаружены металлосвязывающие мотивы и склонность к перекрестной каталитической активности, присущей всему суперсемейству ЩФ (Duarte et al., 2013).

Кроме того, существуют другие фосфатазы, не относящиеся по своей молекулярной структуре к суперсемейству ЩФ, однако имеющие общие структурно-функциональные черты активного центра, что указывает на общность каталитического механизма по переносу фосфорильной группы в целом. К таким ферментам можно отнести фосфатазу-1 (PP1), катализирующую гидролиз фосфо- и фосфонатмоноэфиров; глицерофосфодиэстеразу (GpdQ), катализирующую расщепление нескольких фосфонатмоноэфиров, являющихся для нервной системы человека крайне токсичными продуктами распада органофосфоната (сарин, соман, циклогексилсарин (GF), VX и rVX). Сюда можно отнести также фосфотриэстеразы (PTE), катализирующие распад как специфических для них субстратов, так и фосфодиэфиров и фосфонатов, включая органофосфатные пестициды и нервно-паралитические вещества военного назначения (Duarte et al., 2013). Кроме того, фосфотриэстеразы PTE, имеют схожую четвертичную структуру, молекулярный вес субъединиц и устройство ферментативных карманов, как и у фосфонатмоноэфиргидролазы РМН структурного суперсемейства ЩФ (рис. 6), они могут расщеплять такие ксенобиотики, как сульфонатэфиры, непосредственно воздействуя на ковалентную связь S–O (Barrozo et al., 2015).

1.2. Конкурентный механизм формирования переходного состояния ферментативной реакции и эволюция ферментов суперсемейства ЦФ

Несмотря на многочисленные экспериментальные и теоретические исследования гидролиза фосфатов, включая фосфомоноэфиры, остаются серьезные вопросы относительно механизмов этих биологически важных реакций. Перенос фосфорила – одна из наиболее широко распространенных реакций в биологии, которая играет центральную роль в таких жизненных процессах, как межклеточная передача сигналов, синтез белка и получение энергии. С концептуальной точки зрения некатализируемый гидролиз эфира фосфорной кислоты должен быть простым, поскольку он включает только реакцию нуклеофильного замещения с получением неорганического фосфата и соответствующего спирта (фенола) (рис. 8).

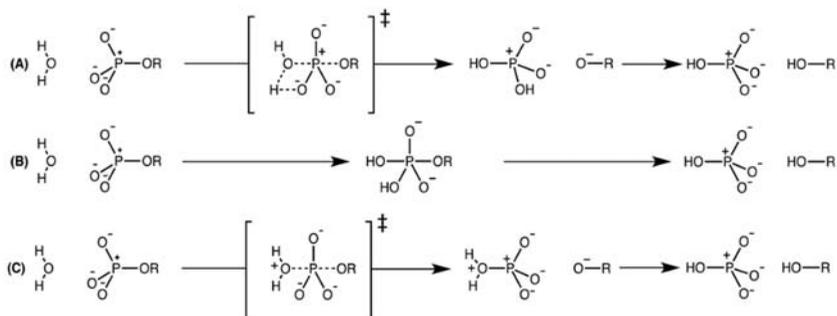


Рис. 8. Гипотетические пути гидролиза дианионов моноэфиров фосфатов: (А) согласованный путь гидролиза с нуклеофильной атакой с помощью субстрата, при котором атакующая молекула воды депротонируется субстратом в некоторой точке координаты реакции (ассоциативный путь катализа); (В) ступенчатый путь гидролиза, в котором перенос протона от нуклеофила к субстрату согласован с нуклеофильной атакой, что приводит к образованию пентакоординированного промежуточного продукта, который разрушается с согласованным переносом протона к «уходящей» группе продукта реакции; (С) согласованный путь гидролиза с нуклео-

фильной атакой с помощью растворителя, при котором на лимитирующей стадии отсутствует перенос протона от нуклеофила (диссоциативный путь катализа) (Duarte et al., 2016).

Поскольку биологически значимые функциональные группы эфиров фосфорной кислоты относятся к числу медленно реагирующих, ферменты, ускоряющие эти реакции, являются одними из наиболее эффективных катализаторов, известных на сегодняшний день. Так, пирофосфат магния (MgPP_i^{2-}) при 25°C и pH 8,5 некаталитически распадается с константой скорости $2,8 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$, тогда как при тех же условиях протекания реакции неорганическая пирофосфатаза *E. coli* имеет значение $k_{\text{cat}} = 570 \text{ s}^{-1}$, то есть фермент увеличивает скорость реакции в 2×10^{12} раза (Stockbridge and Wolfenden, 2011). Увеличение скорости гидролиза фосфата, обеспечиваемое ЩФ *E. coli*, достигает 10^{27} , что является одним из самых высоких показателей, зарегистрированных для ферментов в целом (Pesk et al., 2016). Гидролизу эфиров фосфорной кислоты в биологических объектах способствует, в свою очередь, разнообразная группа ферментов, использующих различные химические стратегии для ускорения этих реакций.

Существует значительный объем экспериментальных и теоретических данных, накопленных за последние десятилетия (Lassila et al., 2011; Kamerlin et al., 2013; Duarte et al., 2016), однозначно свидетельствующих в пользу того, что ферментативно катализируемые процессы могут реализовываться через множество конкурентных механизмов переноса фосфорила в ходе одной и той же реакции (рис. 8).

Наряду с кинетическими методами, помогающими установить общий механизм катализа и его лимитирующие стадии, а также стереохимическими методами, позволяющими предложить схему переноса фосфорила на молекулярном уровне, большое значение имеют структурно-функциональные исследования фермент-субстратных комплексов для детального понимания механизма действия фермента на атомарном уровне (Кочетков и др., 1984; Duarte et al., 2016).

В современных структурно-функциональных исследованиях широко используются известные на сегодняшний день различные кристаллические структуры ЩФ и многих референсных (функционально близких) белков из *E. coli*, классического источника ферментов этого типа. К ним относятся свободный фермент ЩФ (код PDB: 1ED8), связанный фермент ЩФ с различными ингибиторами и ковалентносвязанный промежуточный фосфофермент (Stec et al., 2000; Holtz et al., 1999; Murphy et al., 1997). Согласно координатам атомов кристаллической структуры фермента ЩФ *E. coli* (код PDB: 1ED8), в каждом активном центре мономера два иона Zn_1^{2+} и Zn_2^{2+} отстоят друг от друга на расстоянии $\sim 4 \text{ \AA}$ и связаны с белком через аминокислотные остатки боковых цепей His331, His412, Asp327, Asp369, и His370 (рис. 9).

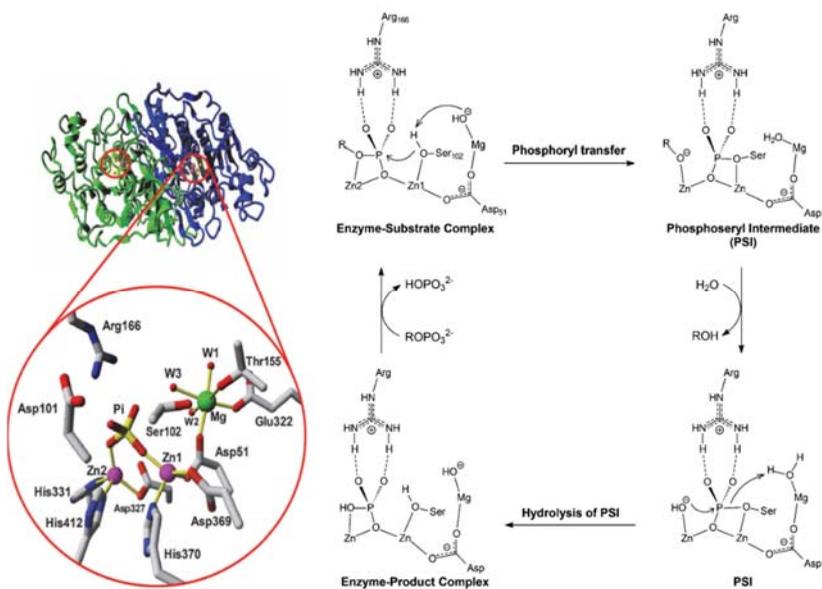


Рис. 9. Слева – общий вид 3D-структуры ЩФ *E. coli* (код PDB: 1ED8) и вынесенный крупный план активного центра со связанным P_i . Молекулы воды, координированные ионом Mg^{2+} , обозначены как W1, W2 и W3. Справа – предложенная схема механизма катализа ЩФ *E. coli*. Фосфосерильный интермедиат переходного состояния обозначен как PSI. (Chen et al., 2014).

Карбоксильная группа Asp51 выступает в качестве мостика, связывающего ион Zn_1^{2+} с ионом Mg^{2+} . Ион Mg^{2+} связан октаэдрической геометрией с остатками Asp51, Glu322, Thr155 и тремя молекулами воды (рис. 9). Неорганический P_i расположен в ферментативном кармане между двумя ионами Zn_1^{2+} и Zn_2^{2+} и связан двумя водородными связями с остатком Arg166 (O'Brien and Herschlag, 2001). Однако при аланиновой замене этого остатка инактивации фермента не наблюдалось. Высказано предположение, что остаток Arg166 отвечает за фосфомоноэстеразную активность ЩФ (O'Brien and Herschlag, 2001). Результаты исследования реакционной способности мутантного фермента *E. coli* Arg166Ser показали, что замена субстрат-связывающего остатка существенно не меняет зависимость катализа от природы уходящей группы субстрата и не влияет на характер переходного состояния, а только усиливает связывание субстрата (~3 ккал/моль) и обеспечивает дополнительную стабилизацию химического переходного состояния (на величину 1-2 ккал/моль) за счет своей боковой цепи, что может быть обусловлено комплементарностью гуанидиновой группы Arg переходному состоянию с тригонально-бипирамидальной геометрией (O'Brien et al., 2008). Каталитическим остатком ЩФ *E. coli* является Ser102 ($pK_a = 5,5$), не связанный с субстратом фермента (O'Brien et al., 2002), что позволяет ему выступать в качестве атакующего нуклеофила фосфорного центра субстрата в ходе реакции (Stec et al., 2000; Weston, 2005). В кристаллической структуре ЩФ *E. coli* природного типа (код PDB: 1ED9) (Stec et al., 2000) одна молекула воды (W3 на рис. 9), координированная ионом Mg^{2+} , находится в непосредственной близости с ионом Zn_1^{2+} (4,7 Å) при атоме кислорода каталитического остатка Ser102 (3,1 Å). Предположено, что эта молекула воды депротонируется растворителем до гидроксид-иона ($O_{Mg}H$) и действует как общее основание/кислота для регулирования состояния протонирования Ser102 (Stec et al., 2000; Kantrowitz, 2011; Chen et al. 2014). Вероятно, октаэдрическая координация иона Mg^{2+} нужна для того, чтобы структурно стабилизировать каталитические группы активного центра в наиболее активной конформации (Borosky, 2017). С помощью рентгенографических и

кристаллографических методов удалось зафиксировать различные этапы каталитического цикла ЩФ *E. coli*, такие как: 1) исходный фермент в отсутствие P_i (Stec et al., 2000); 2) ковалентный промежуточный продукт – фосфофермент (Murphy, 1997); 3) фермент со связанным аналогом субстрата в переходном состоянии (Holtz et al., 1999) и 4) нековалентный комплекс фермент- P_i (Stec et al., 2000). На основе рентгеноструктурных данных кристаллических структур был предложен тринуклеарный металлозависимый механизм реакции, предполагающий, что в фосфорном центре субстрата происходят два линейных замещения (рис. 9). Первая атака исходит от алкоксида Ser102, который активируется гидроксидом, стабилизированным ионом Mg^{2+} ($O_{Mg}H^-$) (Coleman 1992; Stec et al., 2000; Kantrowitz, 2011). Это приводит к образованию отрицательно заряженной «уходящей» группы (алкоксида или фенолята), стабилизированной ионом Zn_2^{2+} . На данной стадии замещения происходит образование ковалентного фосфорильного промежуточного соединения (PSI), поэтому она называется переносом фосфорила (рис. 9). Затем в реакцию вступает молекула воды (растворителя) и протонирует «уходящую» группу, что приводит к образованию свободного спиртового (или фенольного) продукта и Zn_2^{2+} -связанного гидроксида ($O_{Zn_2}H^-$). Образовавшийся гидроксид $O_{Zn_2}H^-$ выполняет вторую атаку с образованием комплекса фермент-продукт (P_i), одновременно регенерируя Ser102 и $O_{Mg}H^-$ (Coleman, 1992; Stec et al., 2000). Этот механизм «пинг-понга» протекает с сохранением конфигурации в фосфорном центре, что подтверждено экспериментально с помощью изотопного мечения (Holtz et al., 1999).

Характеристика переходных состояний, участвующих в ходе реакций, важный способ понять, по какому пути проходит ферментативный катализ (рис. 9). Однако исследования с использованием эмпирически измеряемых линейных соотношений свободной энергии (LFER), или корреляции Брэнстеда (β_{lg}), дают совершенно разную информацию о природе переходных состояний реакции с участием ЩФ (O'Brien et al., 2002; Chen et al. 2014). Кроме того, прямая кинетическая характеристика реакций не всегда доступна

из-за конкурирующих процессов и экспериментальных ограничений измерения чрезвычайно медленных стадий реакций (Кочетков и др., 1984; Duarte et al., 2016). Например, при катализируемом ЩФ гидролизе арил-О-фосфортиолатов наблюдалась сильная зависимость скорости реакции от «уходящей» группы (значение Брэнстеда $\beta = 0,77$), что указывает на то, что переходное состояние в значительной степени диссоциативно (Hollfelder and Herschlag, 1995). Напротив, исследования с использованием арилфосфатов показали, что число оборотов фермента (k_{cat}) остается практически постоянным и не зависит от рКа «уходящей» группы (O'Brien et al., 2002; Chen et al. 2014). В результате более ранних исследований для алкилфосфатов была обнаружена небольшая зависимость от природы «уходящей» группы (Chen et al., 2014). Однако, более чувствительный анализ с использованием изотопа ^{32}P показал, что зависимость k_{cat}/K_m от рКа «уходящей» группы соответствует крутой корреляции Бренстеда со значением $\beta = 0,8$ (O'Brien et al., 2002). Интересно отметить, что теоретические исследования гидролиза эфиров фосфорной кислоты в водном растворе предсказывают схожие барьеры для ассоциативных и диссоциативных путей (Chen et al., 2014).

На основе кристаллических структур ЩФ *E. coli* и плаценты человека (PLAP) и их комплексов с ингибиторами рядом авторов с помощью квантово-механических/молекулярно-механических методов (QM:QM, QM:MM) были получены расчетные характеристики переходных состояний (transition state, TS) и промежуточных продуктов каталитического расщепления под действием фермента двух типов субстратов – алкил- и арилфосфатов (Chen et al., 2014; Borosky, 2016; Duarte et al., 2016).

Результаты расчетов Чена и др. (Chen et al., 2014) на основе метода QM:MM подтвердили, что катализируемая ЩФ реакция идет по механизму «пинг-понга», включающего две стадии химического вытеснения (рис. 9). Алкоксид Ser102, активированный Mg^{2+} -связанным гидроксидом, сначала осуществляет нуклеофильную атаку фосфорного центра субстрата с целью замещения «уходя-

щей» группы (перенос фосфорила), а затем алкоксид Ser102 замещается Zn_2^{2+} -связанным гидроксидом (гидролиз фосфосерильного промежуточного соединения). В этом механизме образуется ковалентный фосфосерильный интермедиат (PSI) и сохраняется конфигурация фосфорного центра в каталитическом цикле (рис. 9). Оба этапа замещения протекают согласованным ассоциативным путем независимо от того, какой субстрат используется (метил- или *n*-нитрофенилфосфат) несмотря на то, что природа переноса фосфорила по мере уменьшения pK_a уходящей группы имеет тенденцию к диссоциативному пути, как в случае с *n*-НФФ (рис. 10).

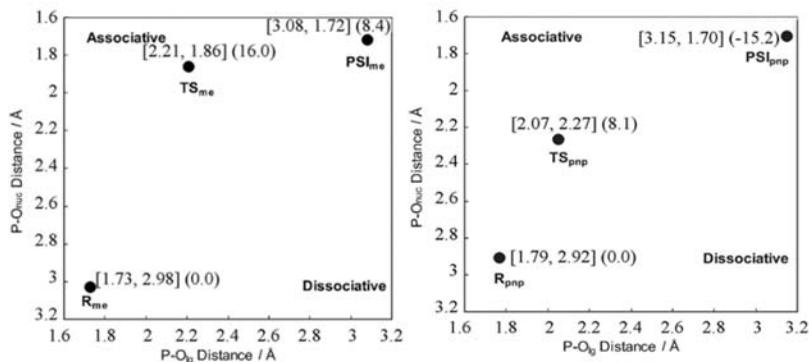


Рис. 10. Графики Мор-О'Феррала-Дженкса (MFJ), соответствующие оптимизированным структурам стационарных координат в ходе переноса фосфорила при гидролизе метилфосфата (слева) и *n*-НФФ (справа): в квадратных скобках указаны ключевые расстояния (Å) от атома фосфора до атомов кислорода «уходящей» группы ($P-O_{ig}$) и кислорода нуклеофила ($P-O_{nuc}$), в круглых скобках – относительные энергии (ккал/моль⁻¹) (Chen et al., 2014).

Однако квантово-механические расчеты (QM:QM) Бороски (Borosky, 2016) с применением полуэмпирического метода оптимизации параметров модели, показали, что лимитирующие скорость катализа стадии для алкил- и арилфосфатов разные из-за разной степени основности «уходящих» групп (рис. 11).

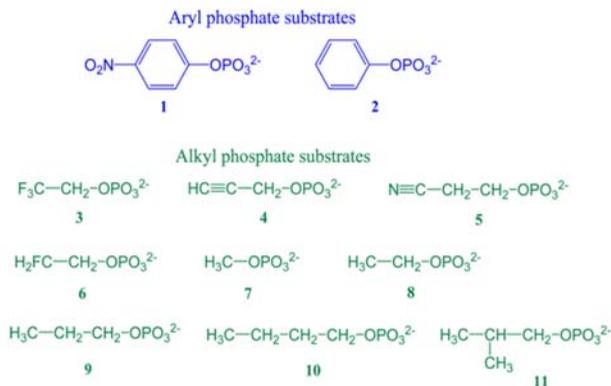


Рис. 11. Дианионы фосфоэфиров (арил- и алкилфосфаты), использованные в квантово-механических расчетах (QM:QM) на основе данных эмпирических линейных соотношений свободной энергии (LFER) (Borosky, 2016).

По данным этих расчетов более низкое значение pK_a «уходящей» группы увеличивает экзотермичность реакции образования ковалентного фосфосерина, вызывая более низкий активационный барьер при более раннем TS. Поэтому для арилмоноэфирфосфатов гидролиз ковалентно связанного промежуточного соединения является стадией, лимитирующей скорость катализа, в то время как для алкилфосфатных субстратов определяющим скорость катализа этапом является нуклеофильная атака алкоксид серина, локализованном в фосфорном центре субстрата, что согласуется с экспериментальными данными (Bloch et al., 1980; Gettins et al., 1983; Hull et al., 1976; O'Brien, et al., 2002; Chen et al., 2014; Borosky, 2016).

Однако результаты, полученные методами QM/MM анализа (Chen et al., 2014), указывают на то, что для алкилфосфатов (pK_a метанола = 15,5) обе стадии химического замещения (перенос фосфорила и гидролиз фосфосерина) вносят общий вклад в лимитирование скорости реакции, поскольку значения энергетических барьеров обеих стадий близки и очень велики по значению ($\Delta E_1 = \Delta E_2 =$

16,0 для метильной группы) (рис. 12). Кроме того, небольшое изменение pK_a «уходящей» группы приводит к изменению эффективности катализа, определяемой величиной k_{cat}/K_M (Chen et al., 2014).

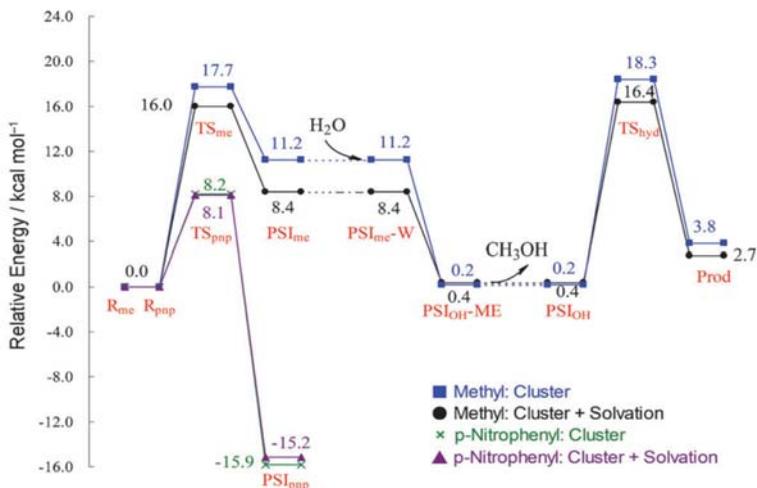


Рис. 12. Энергетические профили, рассчитанные для реакций, катализируемых ЩФ *E. coli*. Гидролиз метилфосфата и *n*-НФФ обозначены как «Methyl» и «p-Nitrophenyl». Расчетная энергия, полученная квантово-химическим методом B3LYP/6-311+G(2d,2p) с учетом нулевой энергии, обозначена как «Cluster». Учетные эффекты сольватации обозначены как «+ Solvation» (Chen et al., 2014).

Для арилфосфатов (pK_a *n*-НФФ = 7,1) первая стадия химической реакции имеет значительно меньший энергетический барьер, чем вторая стадия ($\Delta E_1 = 8,1$ $\Delta E_2 = 16,0$ ккалмоль⁻¹ для *n*-нитрофенола) (рис. 12), поэтому выделение фенолята из Zn_2^{2+} -сайта связывания можно считать лимитирующим этапом ферментативной реакции (рис. 9). Это также согласуется с экспериментом, в результате которого изменение pK_a «уходящей» группы субстрата практически не влияло на значение эффективности k_{cat}/K_M гидролиза арилфосфата (O'Brien, et al., 2002; Chen et al., 2014).

В другой работе (Duarte et al., 2016) путем сравнительных компьютерных исследований детализированной электронной структуры метилфосфата и ряда замещенных арилфосфатных моноэфиров (рис. 13) было показано, что возможность реализации сольватного (диссоциативного) или субстрат-ассоциированного (ассоциативного) механизмов (рис. 8) зависит либо от природы «уходящей» группы (pK_a), либо от наличия в системе конкурирующих процессов, при которых структуры переходного состояния TS для каждого пути схожи вне зависимости от «уходящей» группы (Duarte et al., 2016).

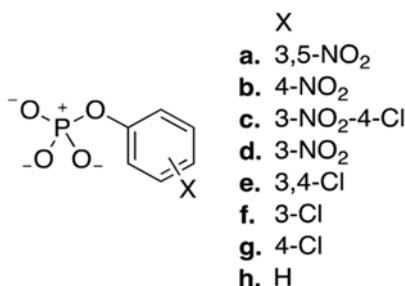


Рис. 13. Дианионы моноэфиров арилфосфатов, для которых проводили расчеты в работе Duarte et al. (2016). Субстраты выбраны таким образом, чтобы обеспечить широкий диапазон значений pK_a , при этом водород находится в орто-положениях, чтобы избежать прямых взаимодействий между реакционным центром и заместителями.

На рисунке 14 представлены варианты вероятностных механизмов гидролиза моноэфира фосфата, которые могут быть очень близки по энергетике, поэтому экспериментальными методами трудно их различить (Klähn et al., 2006; Kamerlin et al., 2008; Duarte et al., 2015).

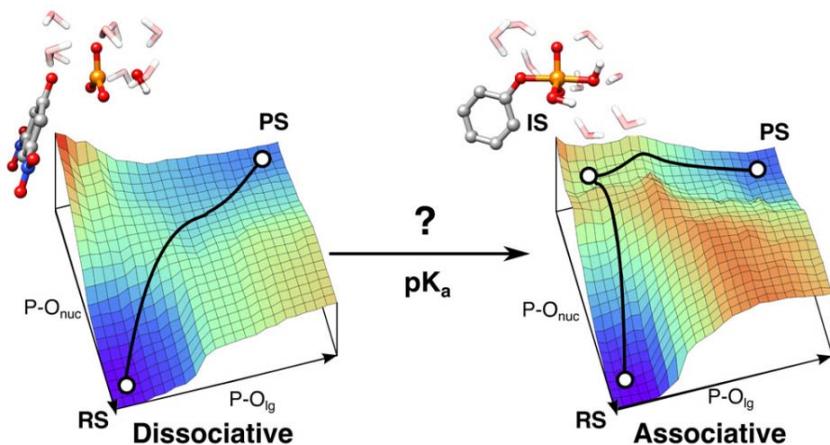


Рис. 14. Влияние pK_a «уходящей» группы на течение гидролиза моноэфиров фосфатов с участием растворителя (диссоциативное TS) и субстрата (ассоциативное TS). Для «уходящих» групп с $pK_a \leq 7,2$ наблюдается склонность протекания реакции по диссоциативному пути с участием растворителя (Duarte et al., 2016).

Авторы предполагают (Duarte et al., 2016), что сильно основные «уходящие» группы, включая *n*-НФФ ($pK_a < 7,2$), преимущественно формируют диссоциативное TS с участием растворителя (рис. 8 С, 14), т.е. у них слабая связь с нуклеофилом, в то время как слабо основные «уходящие» группы ($pK_a \geq 7,2$) алкилфосфатов, ди- и триэфиров фосфатов более склонны к ассоциативному переходному состоянию TS с участием субстрата (рис. 8 А, 14) (Lassila et al., 2011; Duarte et al., 2016).

Таким образом, катализирование гидролиза дианионов моноэфиров фосфатов с сильноосновной «уходящей» группой энергетически более затратно для ассоциативного пути по сравнению с диссоциативным. По мере увеличения pK_a уходящей группы разница в энергии между двумя путями постепенно уменьшается, что в случае реакций с участием «уходящих» алкоксигрупп приводит к механистической неопределенности (рис. 14). Расчеты показывают, что структуры переходного состояния плавно изменяются во всем

диапазоне изученных значений pK_a (рис. 13), а пути их образования остаются дискретными механистическими альтернативами (Duarte et al., 2016). Это создает разные возможности для ферментативно катализируемых реакций гидролиза арилфосфатов, поскольку оба пути для них, по-видимому, осуществимы. При условии ничтожно малой разницы между энергиями двух альтернативных путей ферментативного катализа и вне зависимости от того, какой путь катализа энергетически более благоприятен в водном растворе, в неоднородном окружении активного центра фермента существует вероятность осуществления реакции по альтернативному пути. Тем не менее, в случае гидролиза фосфата с «уходящими» группами сильной основности для реализации ассоциативного пути катализа с участием субстрата, биологическому катализатору по какой-то причине приходится, в большинстве случаев, преодолевать значительно более высокий активационный барьер (рис. 8 А, 14), чем если бы он «выбирал» диссоциативный путь с участием растворителя в отношении этих субстратов (рис. 8 С).

Возможность такой конкуренции между двумя путями реакции имеет значение для понимания эволюции функции ферментов суперсемейства ЩФ, катализирующих реакции переноса фосфорила. Несмотря на то, что фосфомоноэстеразам ЩФ приходится преодолевать больший энергетический барьер для облегчения гидролиза ГМФ или АТФ (с сильно основной «уходящей» группой) через субстрат-ассистируемый путь, для ферментов, например фосфодиэтераз, приспособленных выполнять функцию катализа гидролиза фосфатов со слабоосновными «уходящими» группами такой путь вполне объясним. Таким образом, если бы действие фермента было направлено только на стабилизацию реакции диссоциации моноэфира с сильноосновной «уходящей» группой, то переход к субстрату со слабоосновной «уходящей» группой имел бы более серьезные последствия для выполнения биологической функции такого фермента. Напротив, если бы в ходе эволюции фермент приобрел способность стабилизировать более компактные дианионные TS, которые, вероятно, образуются при щелочном гидролизе диэфиров фосфата (Lassila et al., 2011; Kamerlin, et al., 2013), то приобретение

новой полезной каталитической функции в отношении гидролиза моноэфира фосфата, реализуемой субстрат-ассоциированным путем, было бы вполне целесообразно без глобальной перестройки молекулярного механизма катализа.

Это согласуется с наблюдаемым высоким уровнем беспорядочной фосфомоноэстеразной активности у ряда субстрат-неспецифичных фосфодиэстераз (Zalatan et al., 2006; van Loo et al., 2010; Noskova et al., 2019), что, скорее всего, объясняется способностью ферментов катализировать гидролиз моноэфиров посредством компактных субстрат-связанных TS, сходных по геометрии и распределению заряда с продуктами реакции расщепления их диэфирных аналогов. Напротив, активный центр, который эволюционировал для осуществления гидролиза моноэфира фосфата с помощью растворителя по диссоциативному пути (рис. 8 С; 14), не приспособлен для осуществления реакций, требующих более плотных TS (с различным распределением заряда), каких требует фосфодиэстеразная активность. Это объясняет почему дискриминация между фосфомоно- и диэстеразной активностью намного выше у фосфомоноэстеразы ЩФ, чем у фосфодиэстеразы с более широкой субстратной специфичностью (Duarte et al., 2016).

Глава 2. РАСПРОСТРАНЕНИЕ И РОЛЬ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ БАКТЕРИЙ

Бактериям, как и всем живым организмам на Земле, необходим фосфор для выживания, роста и размножения. Наиболее доступным для них источником экзогенного фосфора является неорганический фосфат (P_i). Однако в окружающей среде часто P_i находится в очень низких, лимитирующих бактериальный рост, концентрациях. Общим свойством для всех бактерий является способность возмещать дефицит P_i в окружающей среде посредством экспрессии генов сенсорных белков, реагирующих на нехватку фосфора (P_i -стресс). Сенсорный механизм запускает P_i -зависимый синтез периплазматических или связанных с внешней мембраной фосфатаз, которые отщепляют P_i от различных органических фосфоросодержащих соединений. Любая продуктивность наземной и водной биомассы регулируется концентрацией фосфора (P) в окружающей среде, и это имеет непосредственное влияние на глобальное производство продуктов питания, биоразнообразию и снижение атмосферного CO_2 (Cordell et al., 2009; Goll et al., 2012). Кроме того, ограниченное поступление фосфора приводит к уменьшению стимуляции роста биомассы наземных растений в ответ на повышенный уровень CO_2 в атмосфере (Goll et al., 2012; Terrer et al., 2019). Большая часть Мирового океана также обеднена фосфором, что может привести либо к ограничению роста, либо к снижению продуктивности фитопланктона (Duhamel et al., 2021). В наземных и морских биомах большая часть общего пула P состоит из таких органических соединений, как фосфомоно-, фосфоди- и фосфотриэфиры, фосфонаты и фитиновая кислота (Haygarth et al., 2018; Phoenix et al., 2020; Lidbury et al., 2021). Реминерализация органических фосфатов в P_i либо первичным продуцентом, либо ассоциированными микроорганизмами, увеличивает выработку растительной биомассы (Christie-Oleza et al., 2017; Duhamel et al., 2021; Lidbury et al., 2021). Объем информации о распространении новых экзоферментов, минерализующих P в окружающей среде, и отно-

сительном вкладе отдельных микробных таксонов, экспрессирующих такие ферменты, продолжает расти (Duhamel et al., 2021; Lidbury et al., 2021).

Обычно субстратами бактериальных фосфатаз являются либо органические фосфомоноэфиры, такие как фосфаты углеводов, либо фосфодиэфиры, такие как ДНК и фосфолипиды (McComb et al., 1979; Plisova et al., 2005; Asgeirsson et al., 2020; Lidbury et al., 2022; Harroun et al., 2023). Фосфатазы бактерий представлены разными классами в зависимости от их каталитической специфичности (неспецифичные или специфичные), субстратной специфичности (фосфомоно-, фосфоди- и фосфотриэстеразы) и оптимума pH (кислотный или щелочной) для проявления ферментативной активности. Наиболее распространенным классом бактериальных фосфатаз в природе являются щелочные фосфатазы (ЩФ).

2.1. Щелочная фосфатаза бактерии *E. coli*

Наличие ЩФ (Е.С. 3.1.3.1.) у модельного организма *E. coli* впервые было показано в 1958 г. Активный фермент представлял собой димер из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 43 кДа каждая, которые в недимеризованном состоянии не имели ферментативной активности (Torgiani, 1974). Благодаря обширным структурно-функциональным исследованиям, ЩФ *E. coli* стала модельным ферментом для ЩФ других организмов, включая изомеры ЩФ человека (McComb et al., 1979; Millán, 2006; Kantrowitz, 2011). Полученные методом рентгеноструктурного анализа структуры свободного фермента, промежуточного фосфосерила, комплексов фермент-ванадата, имитирующих переходное состояние, и нековалентно связанного комплекса фермент-фосфата были использованы для определения молекулярных и атомарных деталей каталитического механизма ЩФ *E. coli* (Zalatan et al., 2008; Kantrowitz, 2011; Andrews et al., 2013; Sunden et al., 2015). Как неспецифичная фосфатаза, ЩФ во время катализа взаимодействует исключительно с переносимой фосфорильной группой и атомом кислорода «уходящей» группы, но не образует никаких связей с другими атомами «уходящей» группы, что позволяет ей высвобождать P₁ из любого

доступного источника монозамещенного фосфата (Peck et al., 2016; Andrews et al., 2013).

Активный центр ЩФ *E. coli* состоит из биметаллического Zn^{2+} -специфического ядра, которое активирует проксимальный нуклеофил Ser102, в результате чего стабилизируется заряд, появляющийся на атоме кислорода «уходящей» группы. Полагают, что дополнительную стабилизацию переходного состояния фосфорильного переноса обеспечивают остаток Arg166 (R166) и молекулы воды в активном центре, координированные ионом Mg^{2+} , а также водородные связи остатка Lys328 (K328) (рис. 4 А, 8, 9). Тетраэдрическая геометрия субстрата, вероятно, обеспечивает тригонально-бипирамидальную геометрию переходного состояния при переносе фосфорила (Peck et al., 2016). Последние данные о кристаллической структуре ЩФ *E. coli*, связанной с вольфраматом, и о каталитической активности фермента свидетельствовали в пользу модели ковалентного аддукта, которая соответствует тригонально-бипирамидальной геометрии (рис. 4 А). Это, в свою очередь, отражает геометрию предполагаемого переходного состояния в процессе фосфорильного переноса, поскольку вольфрамат в других активных центрах чаще всего находится в тетраэдрической геометрии (Peck et al., 2016). В работе Пек и др. (Peck et al., 2016) в очередной раз было показано, что ЩФ *E. coli* представляет собой димер, так как при кристаллизации с вольфраматом как имитатором субстрата наличие двух лигандов в двух активных центрах кристаллической молекулы было очевидным (Peck et al., 2016). Кроме того, стабилизации каталитически активной конформации ЩФ *E. coli* способствуют два дисульфидных мостика из четырех остатков цистеина (Cys168-Cys178 и Cys286-Cys336), связывающих две субъединицы, необходимые для созревания активного димера в периплазматическом пространстве (Bosron et al., 1977). Мутация остатка треонина Thr59Arg привела к получению фермента в мономерной форме с температурой денатурации 43°C, тогда как димер ЩФ *E. coli* природного типа сохраняет активную конформацию до 97 °C (Boulangier et al., 2003). Несмотря на обнаружение свя-

занных ионов металлов у мутантного белка Thr59Arg, его каталитическая активность была в 104 раза ниже активности фермента природного типа. Эти результаты также убеждают в том, что при димеризации происходят значительные конформационные изменения, которые повышают термостабильность, силу связывания металлов и обеспечивают оптимальные условия для каталитической реакции (Boulanger et al., 2003; Orhanović et al., 2006).

Кроме того, высказано предположение об асимметричности конформации субъединиц димера ЩФ *E. coli* из-за отрицательной кооперативности при связывании ионов Mg^{2+} . В связи с этим, димер фермента подвержен аллостерической регуляции ионами Mg^{2+} в присутствии как продукта реакции, так и субстрата (Orhanović et al., 2003). Результаты кинетических исследований активации ЩФ *E. coli* ионами Mg^{2+} показали, что механизм их действия на активность ЩФ заключается во взаимодействии между субъединицами. Высвобождение продукта реакции увеличивается за счет конформационного изменения, приводящего к образованию субъединицы с более низким сродством как к субстрату, так и к продукту. Для обеспечения связывания субстрата и высвобождения продукта в ходе каталитического цикла происходит чередование двух состояний конформации субъединиц (рис. 15).

Таким образом, ЩФ *E. coli* проявляет более высокую активность в присутствии Mg^{2+} , поскольку его связывание увеличивает скорость конформационных изменений. Неорганический фосфат, образующийся при гидролизе ковалентно связанного интермедиата, остается связанным с субъединицей 1 до тех пор, пока субъединица 2 не свяжется с субстратом или Mg^{2+} (рис. 15). Конформационно контролируемая и поддерживаемая ионами Mg^{2+} диссоциация продукта реакции (P_i) может служить кинетическим переключателем, предотвращающим потерю P_i в окружающую среду (Orhanović et al., 2003).

брану – неполярную область, практически непроницаемую для заряженных молекул. Такая специализированная система была описана как фосфат-специфическая транспортная система (Pst-система) (Willsky et al., 1973; Rao and Torriani, 1990; Krawczun et al., 2020). Конформационно-контролируемая диссоциация продукта P_i может усилить перенос метаболита к другому белку, поскольку конформационному изменению может способствовать как взаимодействие с трансмембранным каналом, так и с белком-акцептором. Кроме того, такой механизм работы ЩФ, и сама транспортная Pst-система обеспечивают возможность одновременной диффузии ионов Mg^{2+} и P_i в клетку (Orhanović et al., 2003; Jackson et al., 2008).

Фермент ЩФ *E. coli* проявляет широкую субстратную специфичность и катализирует гидролиз 5'-концов ДНК и РНК, нуклеотидов и реакцию трансфосфорилирования в присутствии высоких концентраций акцепторов фосфата. Кроме того, он гидролизует моноэфиры оксифосфатов, различные О- и S-фосфоротиоаты, фосфорамидаты, тиофосфаты и другие фосфаты (Krawczun et al., 2020; Zhou et al., 2021). У ЩФ *E. coli* обнаружена также незначительная активность фосфит-зависимой гидрогеназы при окислении фосфита до фосфата и H_2 . Однако удельная активность очищенной ЩФ *E. coli* при окислении фосфита в 1000 раз меньше, чем при гидролизе эфиров фосфорной кислоты (Yang et al., 2004; Krawczun et al., 2020).

ЩФ *E. coli* широко используют в молекулярном клонировании для удаления 5'-фосфатов из линейаризованных векторов, обнаружения продуктов ПЦР, мечения праймеров и в иммуноанализе (Буйновская и др., 2018; Krawczun et al., 2020).

Природную или рекомбинантную ЩФ *E. coli* выделяют из периплазматического пространства путем разрушения внешней мембраны клеток, используя осмотический шок, ультразвук или получают из мутантного штамма *E. coli* (Krawczun et al., 2020). Совокупность факторов, стабилизирующих 3D-активную конформацию, обеспечивающих высокую термостабильность фермента, значительно превышающую температурный диапазон роста *E. coli*, позволяет использовать для очистки ЩФ стадию нагревания. Фермент

активен до 80°C и обратимо ренатурирует при 90°C (Applebury and Coleman, 1969; Schlesinger and Barrett, 1965). Альтернативный способ получения рекомбинантной ЩФ в цитоплазме *E. coli* предполагает получение неактивного фермента без лидерного пептида, меченного остатками Hisx6, с последующей его очисткой и окислением/ренатурацией *in vitro* (Krawczun et al., 2020).

Биоинформатический анализ последовательностей и 3D-структур ЩФ *E. coli* используют для сравнительного структурно-функционального анализа ЩФ из других источников, например, для объяснения повышенной активности ЩФ млекопитающих по сравнению с бактериальными ЩФ, металлоспецифичности активных центров, субстратной специфичности и других каталитических и физико-химических свойств родственных ферментов (Gudjónsdóttir and Asgeirsson, 2008; Kantrowitz, 2011; Bobyr et al., 2012; Hjörleifsson et al., 2020).

2.2. Генетическая регуляция и транспорт фосфора у бактерии *E. coli*

Бактерия *E. coli* выработала определенный механизм поглощения фосфатов из окружающей среды и поддержания их оптимального стабильного внутриклеточного уровня (1–10 мМ) (Shulman et al., 1979; Rao et al., 1993; Xavier et al., 1995; McClear, 2017). Фосфатный гомеостаз устанавливается за счет поддержания баланса между импортом, ассимиляцией, секвестированием и экспортом фосфатов клеткой с помощью множества белков транспортной системы и их генетической регуляции в ответ на изменение уровня концентрации фосфатов в окружающей среде. Этот механизм включает белки-импортеры неорганического фосфата PitA и PitB, а также комплекс белков специфической фосфат-транспортной системы PstSCAB (рис. 16, 17).

Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции

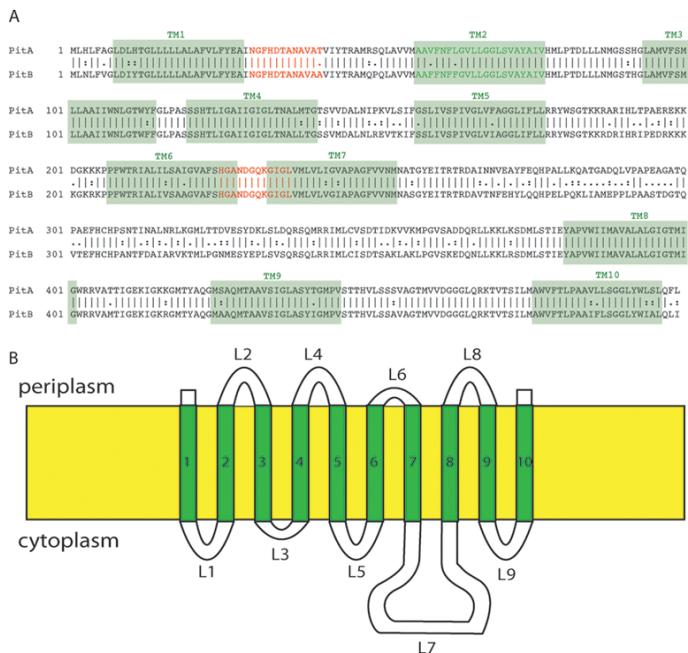


Рис. 16. Выравнивание последовательностей транспортных белков PitA и PitB с соответствующей топологической моделью. (А) Аминокислотные последовательности PitA и PitB представлены в однобуквенном коде и выровнены с использованием Европейского открытого программного обеспечения для молекулярной биологии (EMBOSS). Предсказанные трансмембранные спирали выделены зеленым цветом, консервативные характерные мотивы отмечены красным шрифтом. (В) Топологическая модель PitA и PitB. Предсказанные трансмембранные спирали обозначены 1–10, соединяющие их петли обозначены L1–L9 (McCleaг, 2017).

Ассимиляция P_i клеткой, или включение его в органические молекулы, осуществляется преимущественно через синтез АТФ из АДФ и P_i . Мониторинг уровня содержания P_i в окружающей среде происходит через двухкомпонентную систему трансдукции PhoB/PhoR и формирование сигнальных комплексов на мембране, которые запускают экспрессию генов для синтеза белков, связывающих P_i и утилизирующих альтернативные источники фосфора в

лимитирующих условиях (рис. 17). Концентрация внутриклеточного P_i поддерживается циклом формирования и деградации полифосфата (полиР). Механизм контроля внутриклеточного пула P_i включает специфические паттерны экспрессии транспортеров с разной аффинностью к P_i и скоростью его транспортировки (Hsieh and Wanner, 2010).

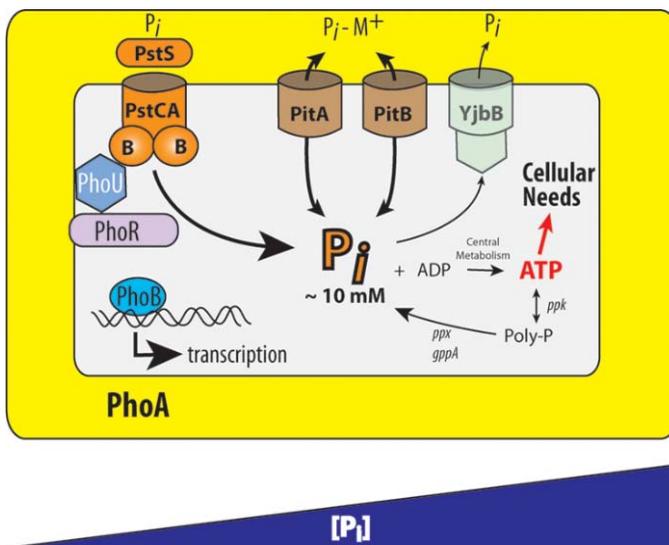


Рис. 17. Модель гомеостаза P_i в *E. coli*. Внутриклеточное количество P_i поддерживается в умеренном диапазоне концентраций (≈ 10 мМ). Механизмы такого гомеостатического поддержания включают использование нескольких импортеров P_i с различным сродством и скоростью его транспортировки через мембрану. Клетки также используют сложный двухкомпонентный сигнальный механизм PhoBR, который напрямую контролирует экспрессию генов для синтеза связывающих транспортных белков с высоким сродством к P_i (PitA и PitB) и белков для использования альтернативных источников фосфора (PstSCAB). Когда уровни P_i становятся чрезвычайно высокими, клетки включают режим экспорта или накопления P_i в виде полифосфата (полиР), который вырабатывается из АТФ ферментом Ppk. Передача сигналов происходит через двуком-

понентную систему трансдукции PhoB/PhoR, включающая различные конформации транспортеров PstSCAB и бифункционального белка PhoR (фосфатаза/киназа). Поскольку транспортеры Pst переключаются между обращенными внутрь и наружу белковыми конформациями во время транспорта P_i , они по-разному взаимодействуют с PhoR. Это взаимодействие опосредовано белком PhoU. Обращенная внутрь конформация белка PstB взаимодействует с белком PhoR, стабилизируя его фосфатазную конформацию. Конформация транспортеров PstSCAB, обращенных наружу для связывания экзогенного P_i , благоприятствует стабилизации конформации киназы PhoR, которая позволяет специфическому домену SA связывать АТФ и аутофосфорилировать свой домен DHp (McCleaг, 2017).

Формирование полифосфата требует поступления адекватного количества молекул АТФ. После того, как уровень внутриклеточного фосфата достигает верхнего предела, фосфат экспортируется во внешнюю среду белками-транспортерами PitA, PitB, или YjbB (рис. 17). Метаболические реакции, сопряженные с этим процессом, дополнительно контролируют внутриклеточное содержание полиР как запасного вещества. Первичными импортерами P_i являются белки PitA, PitB и PstSCAB (Wanner, 1996; McCleaг, 2017). Белки PitA and PitB могут выполнять и функцию вторичного транспорта для поступления в клетку комплексов P_i с металлами за счет тока протонов (Harris et al., 2001; Jackson R.J. et al, 2008). Белки транспортной системы PstSCAB являются P_i -зависимыми ABC-транспортерами, которые импортируют P_i за счет энергии гидролиза АТФ (Rosenberg et al., 1987; Webb et al., 1992; McCleaг, 2017). Транспортные белки, которые участвуют в экспорте P_i , включают глицерол-3-фосфат: P_i -антипортеры PitA, PitB и GlpT, гескозо-6-фосфат: P_i -антипортер UhpT, и P_i -экспортер YjbB (Motomura et al., 2011; McCleaг, 2017). Сигнальная система трансдукции, контролирующая экспрессию генов всех этих белков в ответ на лимитирующее рост микроорганизмов снижение уровня внеклеточного P_i , состоит из ключевого белка, гистидин киназы PhoR, и белка-регулятора ответа PhoB (Hsieh and Wanner, 2010; Santos-Beneit, 2015). Когда регулятор PhoB получает фосфорильную группу отгистидин киназы PhoR, он связывается с ДНК и активирует транскрипцию

ряда генов (рис. 17) для осуществления процессов высокоаффинного связывания P_i (включая транспортер PstSCAB) и утилизации альтернативных источников фосфора (Makino et al., 1993; McClear, 1996; Bachhawat et al., 2005). Было показано, что регулон PhoB регулирует включение не менее 31 генов, включая в том числе гены периплазматической ЩФ *phoA*, транспортных белков *pstSCAB* и регуляторных белков *phoB* и *phoR* (Hsieh and Wanner, 2010; McClear, 2017). ЩФ в свою очередь поставляет фосфорильные группы из органических молекул. К членам регулона Pho, действующего в случае перехода на альтернативные органические источники поставки фосфора, относятся и гены *ugpBAECQ*, которые кодируют ABC-транспортеры глицеро-3-фосфата и фосфодиэстеразу, а также гены *phnCDEFGHIJKLMNOP*, кодирующие транспортер фосфоната и ферменты комплекса С-Р-лиаз, которые участвуют в синтезе фосфорибозила из импортируемого фосфоната. Помимо этих 31 генов, напрямую контролируемых регулоном PhoB (Baek and Lee, 2006; Hsieh and Wanner, 2010; McClear, 2017), под его косвенным влиянием (положительным и отрицательным) может находиться синтез, предположительно, еще 400 белков (VanBogelen 1996; Yuan et al., 2006).

Таким образом, в результате действия системы сигнальной трансдукции PhoBR регулируются потребности клетки *E. coli* в фосфоре для поддержания его минимального внутриклеточного уровня при недостатке в окружающей среде, то есть в условиях, лимитирующих клеточный рост. Избыточная концентрация внутриклеточного P_i также является проблемой для обеспечения гомеостаза клетки, как было показано для мутанта *phoU E. coli* (McClear, 2017). Ген *phoU* является пятым геном оперона *pstSCAB-phoU*, и его функция является контролем количества транспортёров PstSCAB (Steed and Wanner, 1993). Мутация *phoU* вызывала снижение роста клеток, вероятно, из-за токсического действия избытка внутриклеточного P_i (Surin 1985; Steed and Wanner, 1993; Haldimann 1998). Таким образом, клетки *E. coli* обладают гомеостатическими механизмами, поддерживающими внутриклеточный уровень P_i в оптимальном режиме.

2.3. Структурная классификация щелочных фосфатаз бактерий

2.3.1. Щелочные фосфатазы *PhoA*, *PhoD* и *PhoX* имеют разную структуру и принадлежат к разным предковым линиям гомологов

Бактериальные ЩФ можно разделить по аминокислотной последовательности (первичной структуре) на три основных структурных семейства: *PhoA*, *PhoD* и *PhoX*, относящихся к белкам COG1785, COG3540 и COG3211 соответственно, которые происходят от разных предковых генов согласно классификации, приводимой в базе данных Кластеров Ортологичных Групп (Clusters of Orthologous Genes, COG), (Ragot et al., 2015; Galperin et al., 2021). Структура ферментов семейства *PhoA* была изучена первой, так как к нему принадлежит классическая фосфомоноэстераза *E. Coli* (Yang et al., 2012). В дальнейшем у бактерий окружающей среды были обнаружены ферменты, негомологичные ЩФ *E. Coli*, но обладающие похожими свойствами. Высокая вариабельность белковых последовательностей у ЩФ характерна как для представителей разных семейств, так и внутри каждого семейства, в зависимости от таксономической принадлежности продуцентов этих ферментов (Zaheer et al., 2009; Kageyama et al., 2011; Ragot et al., 2015).

Несмотря на низкую идентичность последовательностей у представителей семейств бактериальных ЩФ *PhoA*, *PhoD* и *PhoX*, общим для них свойством является продукция P_i во время истощения его запасов в окружающей среде, и, следовательно, их экспрессия и ферментативная активность подавляются большими концентрациями P_i . Однако в отличие от Mg^{2+} -активируемых фосфомоноэстераз семейства *PhoA*, большинство представителей семейств *PhoD* и *PhoX* проявляют максимальную активность в присутствии ионов Ca^{2+} в отношении более широкого круга субстратов – как моно-, так и диэфиров фосфатов, за некоторыми исключениями (табл. 2) (Ragot et al., 2015; Noskova et al., 2019; Hong et al., 2021). Так, недавно из морской γ -протеобактерии *C. amphilecti* КММ 296 была выделена щелочная фосфатаза/фосфодиэстераза CamPhoD с новой структурой (код доступа GenBank ID: WP_043333989) и широкой

субстратной специфичностью. Она отнесена к белковому структурному семейству PhoD, однако фермент проявлял необычную металлоспецифичность к ионам Co^{2+} и Fe^{3+} (Noskova et al., 2019). Ближайшим по кристаллической структуре гомологом этого фермента в момент построения его 3D-модели был фермент бактерии *Bacillus subtilis* (код доступа PDB ID: 2YEQ) с идентичностью белковой аминокислотной последовательности 20.5% (рис. 18), в активный центр которого входило два иона Ca^{2+} и один ион Fe^{3+} (Rodriguez et al., 2014).

Кроме этих двух представителей семейства PhoD у штамма *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 была обнаружена фосфомоноэстераза из отдаленного структурного семейства PhoX, в активный центр которой включены ионы Ca^{2+} и Fe^{3+} (Yong et al., 2014). Столь необычная архитектура активного центра и его Fe^{3+} -специфичность могла развиваться у ЩФ в условиях дефицита цинка (и кальция в случае Co^{2+} -специфичности CamPhoD), необходимой для адаптации бактерии к определенной окружающей среде в какой-то исторический период времени (Kathuria et al., 2010; Yong et al., 2014; Rodriguez et al., 2014; Noskova et al., 2019). Возможно, это свойство было заимствовано почвенными бактериями у пурпурных кислых ЩФ (РАР) растительного происхождения, содержащих в активном центре двухвалентные ионы Mn^{2+} (или Zn^{2+}) и лигированный тирозином ион Fe^{3+} , который придает ферменту пурпурную окраску при λ 510–560 нм (Rodriguez et al., 2014). Положение фосфат-иона в пространственной структуре ЩФ PhoD аналогично его положению в структуре фермента РАР батата. Это позволило предположить, что нуклеофильный гидроксид-ион, между ионами Fe^{3+} и Ca^{2+} (А) (рис. 18), является единственным вероятным нуклеофилом, способным участвовать в прямом замещении «уходящей» группы в реакции ферментативного переноса фосфорилла (Yong et al., 2014). Действительно, в фосфатных и ванадатных комплексах оксид-ион расположен ниже атома фосфора и находится непосредственно на линии разрываемой связи (рис. 18). Он также блокирует доступ других потенциальных нуклеофилов к атому фосфора субстрата и про-

тивоположному атому «уходящей» группы во всех трех комплексах «PhoX-лиганд» (Rodriguez et al., 2014). Кроме того, известен случай гидролиза низкомолекулярных эфиров фосфорной кислоты оксидным ионом, соединяющим два иона Co^{3+} (Williams, 1999). Предполагается, что оксидный нуклеофил с металлическими мостиками присутствует в Ca^{2+} , Fe^{3+} -зависимой пурпурной кислой фосфатазе PAP (Schenk et al., 2005; Rodriguez et al., 2014). Из-за сложности отделения μ -мостикового атома кислорода от ионов Fe^{3+} существует вероятность, что первоначальный продукт реакции распадается в результате второй нуклеофильной атаки молекулой воды, происходящей с противоположной от атома фосфора стороны (Yong et al., 2014). Эта молекула воды, вероятно, активируется путем связывания со вторым ионом Ca^{2+} , поскольку он взаимодействует с противоположной стороны с атомом кислорода разрываемой связи субстрата (Yong et al., 2014). Тем не менее, нельзя исключить возможность того, что окружение активного центра делает лабильным μ -мостиковый атом кислорода, что позволяет высвободить исходный продукт (Yong et al., 2014).

Таблица 2

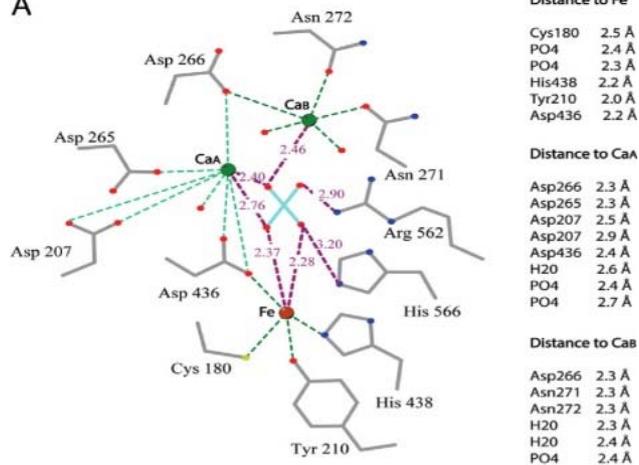
Некоторые молекулярные и каталитические характеристики
щелочных фосфатаз различного происхождения

ЩФ, источник выделения (литературный источник)	Молекулярная масса, форма (кДа x кол-во субъединиц)	Количество аминокислот а.о.	pI	pH-оптимум, (оптимальный буфер)	T ° C- оптимум	T ° C инактивации	Удельная активность, K _M , k _{cat} , зависимость Mg ²⁺
1	2	3	4	5	6	7	8
ЕСАР, <i>E. coli</i> (McComb et al., 1979)	47,2 x 2	450	5,54	8,0 (0,1 М трис-НCl)	37	90°C, t ₅₀ =8 мин	60 ед/мг; K _M =0,17 мМ; k _{cat} =139/сек ⁻¹
SAP, креветка <i>Pandalus borealis</i> (de Backer et al., 2002)	52,9 x 2	475	4,68	10,4 (0,1 М глицин-NaOH)	37	65°C, t ₁₀₀ =15 мин	4500 ед/мг; K _M =0,54 мМ; k _{cat} =11500/сек ⁻¹ ; (Mg ²⁺)
VAP, морская бактерия <i>Vibrio</i> sp. G15-21 (Helland et al., 2009; Hjørleifsson et al., 2017)	55,4 x 2	502	5,39	9,8 (10 мМ трис-НCl/10 мМ глицин-NaOH)	37	40 °C t ₅₀ =6 мин 25,8°C, (pH=8) t ₅₀ =30 мин 33,2 °C (pH=10,5) t ₅₀ =30 мин	3707 ед/мг; K _M =2 мМ; k _{cat} =1024/сек ⁻¹ ; (Mg ²⁺)
TAP, морская бактерия штамм TAB5 (Lu et al., 2010)	38 x n	353	5,48	8,5 (1 М ДЭА)	25	50 °C, t ₁₀₀ =15 мин	1650 ед/мг; (Mg ²⁺)

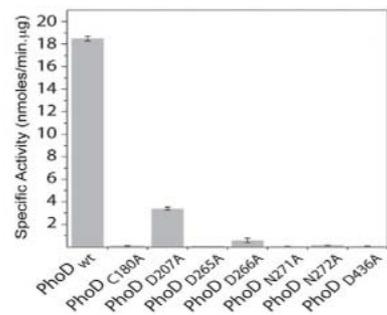
Окончание таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8
NaAP, галофильная бактерия <i>Halomonas</i> sp. 593 (Arai et al., 2014)	62 x 2	527	-	10,25 (0,97 М ДЭА)	37-50	60°C $t_{80}=5$ мин	6700 ед/мг (Mg^{2+} , Mn^{2+})
PLAP, плацента человека (Le Du et al., 2001)	55,5 x 2	512	5,79	9,8 (1 М ДЭА)	37	68°C, $t_{50}=30$ мин	$k_{cat}=460\pm 11/$ сек ⁻¹ ; $K_M=0,36\pm 0,03$ мМ; (Mg^{2+})
SCAPase, морская бактерия <i>Shewanella</i> sp. (Murakawa et al., 2002)	41,8	400	-	9,8	40	20°C	1500 ед/мг
ALP, кишечник голотурии <i>Stihopus japonicus</i> (Wu et al., 2013)	167 x 3 (97, 35, 35)	-	-	10,4 (0,2 М глицин /NaOH) (Mg^{2+})	40	50°C, $t_{83}=60$ мин	$K_M=5,76$ мМ (Mg^{2+})
ЩФ, яйцеклетки морского ежа <i>Strongylocentrotus intermedius</i> (Сейткалиева и др., 2017).	75 x 2	-	-	8,1 – 8,5 (25 мМ Tris-HCl буфер, 150 мМ NaCl)	45	48 °С, $t_{50}=20$ мин	$K_M=0,17$ мМ $V_{max}=0,98$ мкмоль/мин ⁻¹ (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})
SamPhoD, морская бактерия <i>C. Amphilecti</i> КММ 296 (Noskova et al., 2019)	54,8 x 2	492	5,08	9,2	45	65 °С, $t_{100}=20$ мин	18,2 ед/мг (<i>n</i> -НФФ); 0,3 ед/мг (<i>бис</i> - <i>n</i> ПФФ); $K_M=4,2$ мМ $V_{max}=0,203$ мМ/мин (Co^{2+} и Fe^{3+})
CmAP, морская бактерия <i>C. amphilecti</i> КММ 296 (Golotin et al., 2015; Nasu et al., 2012)	55 x 1	503	4,53	10,3 в (1М ДЭА) (Mg^{2+})	37-50 °С	40 °С, $T_{50}=27$ мин 50 °С, $t_{100}=60$ мин	12700 ед/мг; $K_M=13,2\pm 1,48$ мМ, $k_{cat}=28300/$ сек ⁻¹ $k_{cat}/K_M=2,1\pm 0,24 \times 10^6$ сек ⁻¹ /М ⁻¹

A



B



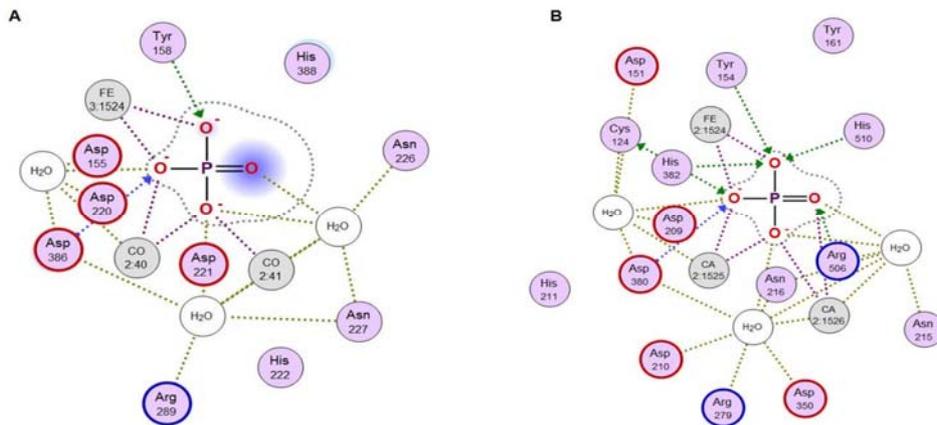


Рис. 18. Вверху – характеристика активного сайта щелочной фосфатазы/фосфодиэстеразы PhoD *B. Subtilis* (PDB ID: 2YEQ) (Rodriguez et al., 2014): (A) – Диаграмма взаимодействий фосфата с активным центром PhoD. Боковые цепи аминокислот и связанный фосфат-ион показаны в виде палочек, атомы углерода – серым цветом, атомы кислорода – красным, атомы азота – синим, атомы фосфора – голубым, атомы серы – желтым. Связывающие взаимодействия представлены пунктирными линиями. На рисунке отмечены расстояния (Å) связей до фосфат-иона. Другие расстояния между ионами металлов и лигандами приведены в таблице в правой части рисунка; (B) – фосфатазная активность вариантов активного сайта PhoD с использованием *n*-НФФ в качестве субстрата. PhoDwt – белок природного типа (Rodriguez et al., 2014). Внизу – 2D-диаграммы контактов активного центра Co^{2+} , Fe^{3+} -специфичной фосфатазы/фосфодиэстеразы CamPhoD морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296 (GenBank ID: WP_043333989) с субстратом (A) и активного центра прототипа ЩФ PhoD *B. Subtilis* (PDB ID: 2YEQ) с субстратом (B) (Noskova et al., 2019).

Некоторые авторы включают в классификацию бактериальных ЩФ четвертое семейство конститутивных Ca^{2+} -зависимых ЩФ (семейство PafA) с широкой субстратной специфичностью и неизвестной метаболической функцией, распространенных в геномах флавобактерий, преимущественно *Bacteroidetes*, ассоциированных с ризосферами растений, так как их экспрессия и ферментативная активность не подавляются продуктом реакции (P_i) и не контролируются известными регуляторами в отличие от других ЩФ (Lidbury et al., 2022). Впервые ЩФ PafA была обнаружена в бактерии *Elizabethkingia meningoseptica*. Белок с молекулярной массой 60 кДа имел 14 и 22% идентичности соответственно с ЩФ PhoA *E. Coli* и ЩФ PhoD продуцента этанола – *Zymomonas mobilis*, которая также была нечувствительна к переизбытку P_i (Berlutti et al., 2001). Однако такое же свойство было обнаружено у ЩФ PhoA, выделенной из морской бактерии *C. Amphilecti* КММ 296, имеющей идентичность белковой последовательности с ЩФ *E. Coli* не более 22,3% (Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015). Было показано, что наличие неиндуцибельных и нерепрессируемых ЩФ PafA у флавобактерий способствует быстрой реминерализации различных оргонофосфатов и накоплению P_i , что обеспечивает вторичный рост других видов бактерий в микробиомах (Lidbury et al., 2022). Кроме того, PafA-подобные ЩФ могут проявлять активность в отношении фосфотриэфиров, что расширяет роль этих ферментов в природе (Ragot et al., 2015; Barrozo et al., 2015). Однако похожие свойства встречаются и у ЩФ PhoD, PhoX и PhoA (Wu et al., 2007; Kageyama 2011; Ragot 2015; Sunden, 2017; Srivastava et al., 2021). Так, рекомбинантный аналог ЩФ PhoA из морской бактерии *Alteromonas mediterranea* показал широкую субстратную специфичность в отношении фосфоди- и триэфиров, а также сульфатов при низких значениях концентрации субстрата, тогда как высокую каталитическую эффективность фосфомоноэстеразы фермент проявлял при высокой концентрации субстрата (Srivastava et al., 2021).

Таким образом, структурная классификация ферментов ЩФ отражает только их принадлежность к различным гомологичным линиям, произошедшим от разных предковых генов, которые эволюционировали независимо друг от друга для выполнения одних и тех же функций в организме и/или микробиоме (рис. 19).

Различное происхождение ЩФ подтверждается принадлежностью ферментов разных белковых семейств к различным системам транслокации через мембрану. Несмотря на то, что все ЩФ являются белками периплазматического или экстраклеточного назначения (Luo et al., 2009), ЩФ PhoD и PhoX экспортируются во внешнюю среду через твин-аргининовый (Tat) путь (Wu et al., 2007; Kageyama 2011; Zaheer et al., 2009), тогда как PhoA секретируется через Sec-путь транслокации белка (Zaheer et al., 2009).

Кроме того, внутри самих семейств наблюдается существенная структурная дивергенция при построении филогенетических деревьев на основе анализа белков ЩФ из различных источников (рис. 19). Одна филогенетическая линия ЩФ (PhoX-I) встречается преимущественно у α - и γ -*Proteobacteria* и характеризуется наличием консервативного глицина в сайте связывания иона Ca^{2+} (Lee et al., 2015). Вторая филогенетическая линия ЩФ (PhoX-II), отличающаяся наличием консервативного аспарагина в этом же металлосвязывающем сайте, определяет флотип грамположительных бактерий *Actinobacteria*, большинства *Cyanobacteria*, многих α -*Proteobacteria*, включая *Sphingopyxis*, *Sphingobium* и *Sphingomonas* (рис. 19), за исключением γ -протеобактерии *P. Fluorescence*, имеющей ЩФ PhoX с необычной металлозависимостью и механизмом действия, свойственным в большей степени бактериальным щелочным фосфатазам/фосфодиэстеразам филогенетической линии гомологов PhoD (Zaheer et al., 2009; Sebastian et al., 2009; Lee et al., 2015). Анализ промоторных регионов геномов большинства из этих бактерий (Zaheer et al., 2009) показал наличие сайта связывания регуляторного белка фосфатного регулона PhoB, также характерного для регуляции синтеза ЩФ семейств PhoA и PhoD (рис. 17).

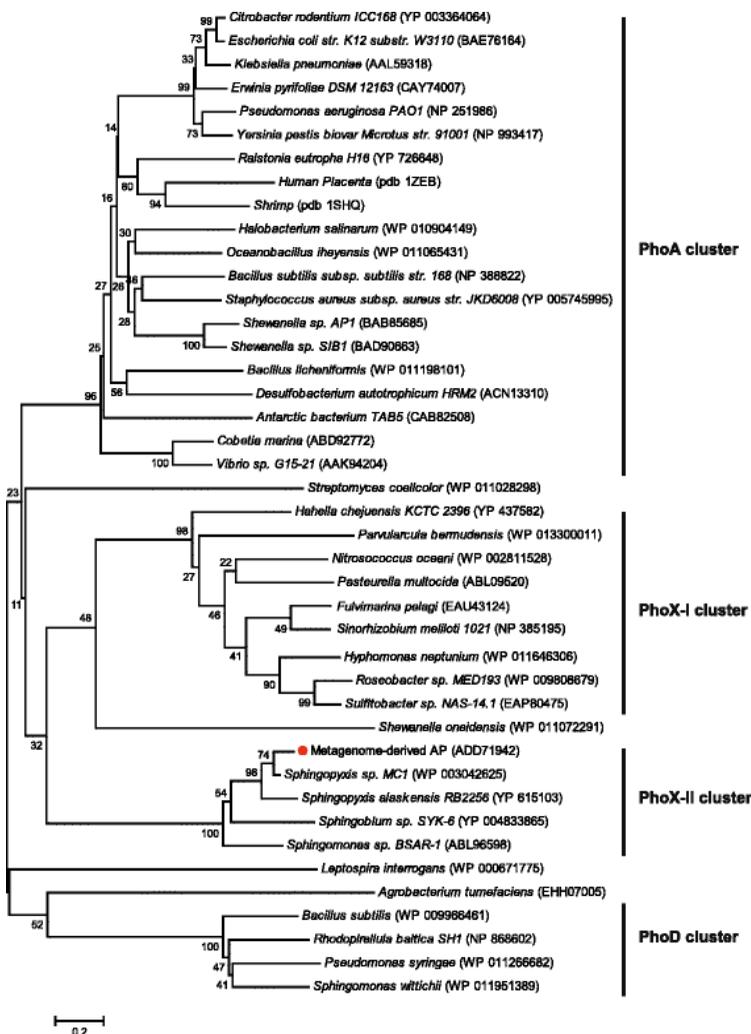


Рис. 19. Филогенетический анализ ЩФ метаженомов. Филогенетическое дерево, основанное на сходстве полноразмерных выведенных аминокислотных последовательностей, построено с помощью программы MEGA 5.2 по методу «ближайших соседей» (neighbor-joining method). Номера доступа баз данных GenBank или PDB указаны после видового названия. В узлах указаны значения бутстреп-анализа, основанного на 1000 выборов (Lee et al., 2015).

2.4. Распространенность щелочных фосфатаз бактерий в природе

Кластерный анализ результатов скрининга экзогенной ферментативной активности у штаммов бактерий разных таксономических групп показывает, что все их внеклеточные ферменты можно разделить на две группы в зависимости от принадлежности к основным или второстепенным метаболическим функциям в бактериальной клетке (Mühling et al., 2015). Как видно на рисунке 20, фосфомоно- и диэстеразы принадлежат к ферментам основного метаболизма (Cluster I).

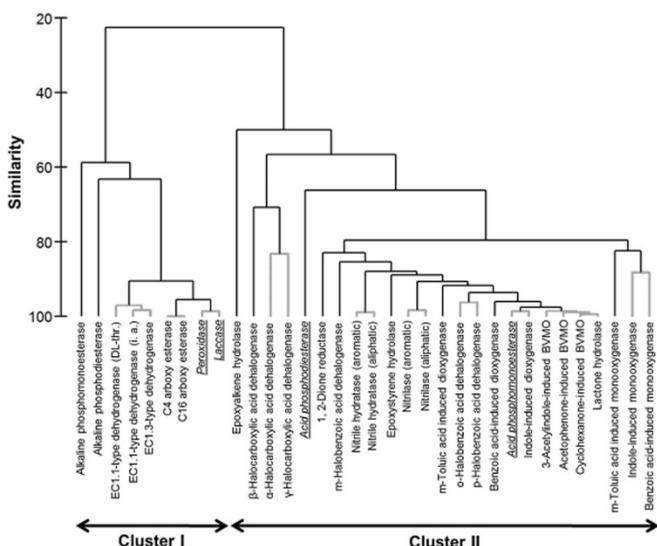


Рис. 20. Дендрограмма результатов кластерного анализа совместной встречаемости ферментативных активностей среди 374 бактериальных изолятов. Серыми линиями отмечены узлы, в которых разделение ферментативных активностей на разные кластеры могло возникнуть случайно (тест SIMPROF). 34 фермента разделены на два кластера (I, II), которые соответствуют определению «основных» (кластер I) и «специализированных» (кластер II) ферментов. Ферменты, не соответствующие этому определению, выделены курсивом и подчеркнуты (Mühling et al., 2015).

Важно отметить, что в морской среде большинство активных продуцентов ЩФ принадлежат к γ -протеобактериям, в то время как у наземных бактерий среди активных продуцентов ЩФ преобладают актинобактерии (Mühling et al., 2015). В геноме большинства бактерий присутствует ЩФ какого-либо одного семейства, оба представителя семейств PhoX и PhoA, или PhoX/PhoA и PhoD у одной и той же бактерии встречаются редко (Zaheer et al., 2009; Sebastian et al., 2009; Noskova et al., 2019).

2.4.1. Щелочные фосфатазы PhoX и PhoA являются таксономическими маркерами морских метагеномов

Результаты масштабного скрининга генетических структур и ферментативной активности одновременно показали, что как у почвенных, так и у морских изолятов встречается весьма ограниченное количество гомологов классической ЩФ PhoA *E. Coli*, в основном, это *Bacteroidetes* и γ -*Proteobacteria*. Фосфатаза PhoX широко распространена среди различных бактериальных таксонов, включая цианобактерии (рис. 21), поэтому ее часто можно обнаружить в морских метагеномах базы данных сервера Global Ocean Survey (Sebastian and Ammerman, 2009).

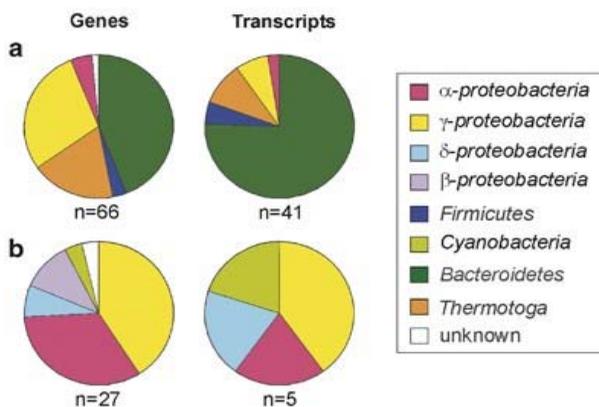


Рис. 21. Предположительная таксономическая принадлежность генов и транскриптов ЩФ у морских бактерий в ответ на P_1 -стресс в прибрежном мезокозме: (a) PhoA, (b) PhoX (Sebastian et al., 2009).

Эти таксоны включают такие экологически важные группы бактерий, как *Roseobacter* и *Trichodesmium*. Ферменты PhoX данных групп микроорганизмов индуцируются исключительно при фосфорном голодании и составляют примерно 90% суммарной фосфатазной активности модельной морской бактерии *Silicibacter pomeroyi* (Sebastian and Ammerman, 2009). Анализ доступных к 2009 году транскриптомных и метагеномных данных показал, что ЩФ PhoX является наиболее широко распространенным ферментом субтропических олиготрофных бактерий северной части Тихого океана. Идентификацию большого количества генов ЩФ PhoX этих экологически важных групп микроорганизмов можно использовать как маркер P_i-стресса и один из способов изучения цикла фосфора в Мировом океане (Sebastian et al., 2009). Гены, кодирующие PhoX, также присутствуют у цветущих цианобактерий *Mycrocystis*, обитающих в пресных и малосолёных водоемах (Hong et al., 2021), эукариотических зеленых водорослей, включая модельный организм *Chlamydomonas reinhardtii* (Moseley et al., 2006), и патогенов человека, у которых фермент является одним из факторов патогенности и секретируется через Tat-систему транслокации белков (Roy et al., 1982; van Mourik et al., 2008; Sebastian et al., 2009).

В то же время наличие структур семейства ЩФ PhoA в метагеномах может быть показателем большого количества представителей *Bacteroidetes* (рис. 21), например, во время цветения микроводорослей (Sebastian and Ammerman, 2009; Baltar et al., 2016). Более поздние исследования метагеномных данных международных баз (the Tara Ocean Microbiome, Malaspina Deep Metagenome Assembled Genomes и др.), размещенных на платформе веб-сервера Ocean Gene Atlas, показали высокие уровни содержания ферментов структурного семейства PhoA, в том числе с широкой субстратной и каталитической специфичностью, в экосистемах всех бассейнов южных регионов Тихого Океана (Srivastava et al., 2021). Авторы исследований отмечают, что распространенность ЩФ PhoA может до-

стигать 30% от общего количества прокариотических ШФ, ассоциированных с цветущим фитопланктоном (TadaY, 2011; Srivastava et al., 2021).

2.4.2. Щелочные фосфатазы *PhoD* преобладают среди ферментов почвенных бактерий

Щелочные фосфатазы структурного семейства *PhoD* широко распространены как в наземных, так и водных экосистемах, однако преобладают у почвенных бактерий (рис. 22).

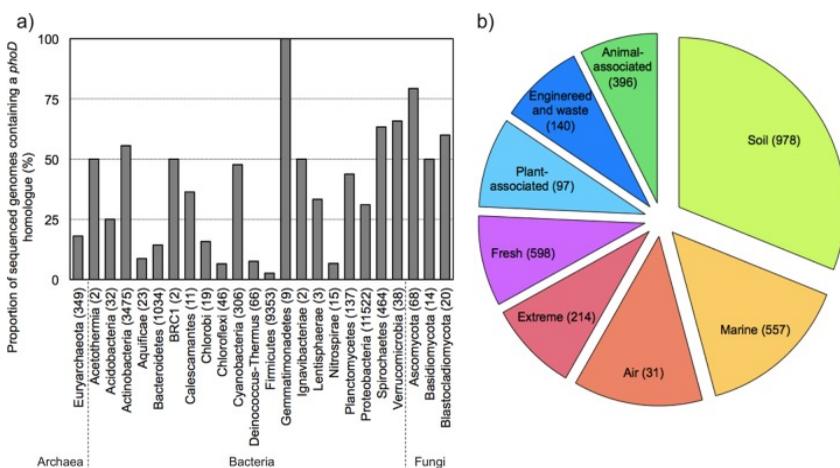


Рис. 22. Распространенность генов *phoD* базы данных IMG/M: (а) – Доля секвенированных геномов, содержащих гомолог *phoD*. Цифры в скобках указывают общее количество секвенированных геномов в каждом таксоне; (б) – Относительная распространенность генов *phoD* в различных типах сред (нормализованная в виде количества генов *phoD* на количество оснований, секвенированных в одном наборе метагеномных данных). Цифры в скобках указывают количество наборов метагеномных данных для каждого типа среды (Ragot et al., 2015).

Так, анализ геномов и метагеномов 3011 образцов, опубликованных в базе данных микроорганизмов IMG/M, показал преобладание в почвенных образцах структур ЩФ PhoD бактерий, относящихся к семействам *Actinomycetales* (13–35%), *Bacillales* (1–29%), *Gloeobacterales* (1–18%), *Rhizobiales* (18–27%) и *Pseudomonadales* (0–22%), в зависимости от pH почвы (pH 4,2–6,8). Наиболее вариabельными по содержанию PhoD были бактерии *Burkholderiales*, *Caulobacterales*, *Deinococcales*, *Planctomycetales* и *Xanthomonadales*, а содержание PhoD, в свою очередь, зависело от популяционной структуры локального микробиома почвы (Ragot et al., 2015). Кроме того, драйверами формирования видового состава и вариabельности структур ЩФ у почвенных бактерий являются климат, тип почвы и растительного покрова, характер и частота сельскохозяйственного использования земель, а также концентрация в них питательных веществ и микроэлементов (рис. 23).

Однако *phoD*-содержащие бактериальные таксоны находятся в большей зависимости от типа почвы и концентрации фосфора, тогда как бактерии с генами *phoX* появляются в микробиальном сообществе в ответ на увеличение общего содержания органических веществ в результате изменения pH и интенсивности сельскохозяйственного использования земель (Ragot et al., 2017).

Второе место по количеству генов ферментов PhoD занимают морские бактерии, которые, по понятным причинам, сообщаются с резидентной микробиотой суши, или сами когда-то претерпевали неоднократные эволюционные переходы из наземных обитателей в морские, и наоборот (Luo et al., 2009; Tan et al., 2013; Ragot 2015; Balabanova et al., 2016, 2018, 2023; Zhang et al., 2019).

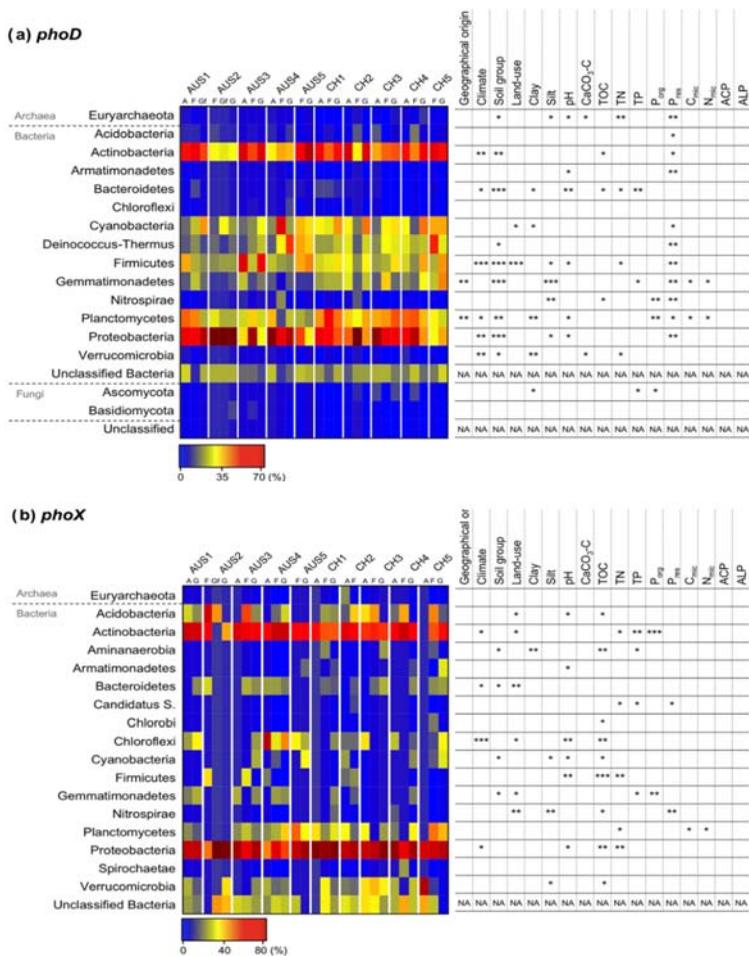


Рис. 23. Относительное распределение *phoD*- (а) и *phoX*- (б) содержащих таксонов микроорганизмов (по оси ОУ) и их корреляция с факторами окружающей среды (по оси ОХ) (Ragot et al., 2017).

2.4.3. Множественность паралогов щелочных фосфатаз у бактерий как признак экологической специализации

Следует отметить, что некоторые представители γ - и β -*Proteobacteria* обладают множеством паралогов ЩФ различных семейств, что указывает на возможную экологическую специализацию бактерий как деструкторов органофосфатов окружающей среды и их высокую приспособленность к выживанию в различных условиях окружающей среды (Skouri-Panet et al., 2017; Noskova et al., 2021). При аннотировании генов фосфатаз в геномах 3630 штаммов бактерий из 33 филогенетических групп, 1794 из которых принадлежали протеобактериям, было выявлено 4% геномов, содержащих не менее 5 генов ЩФ различных семейств (Skouri-Panet et al., 2017). При этом у 35% обладателей множественных паралогов ЩФ присутствовал хотя бы один ген семейства PhoA, тогда как 22 и 17% геномов имели соответственно гены ЩФ PhoX и PhoD. Различия в структуре и, следовательно, в физико-химических свойствах паралогов фосфатаз у одного организма позволяют предположить их функциональную диверсификацию при ассимиляции разных органических фосфорных субстратов при дефиците P в средах с различными химическими параметрами (Skouri-Panet et al., 2017). Так, β -протеобактерия *Ramlibacter tataouinensis* (Rta), выделенная из песка, участвует в активной биоминерализации фосфатов кальция в результате проявления каталитической активности пяти ферментов, принадлежащих к разным структурным семействам PhoX и PhoD (Skouri-Panet et al., 2017). Изоляты морских γ -протеобактерий рода *Cobetia* имеют в геномах от 2 до 5 генов, ответственных за синтез ЩФ, преимущественно семейств PhoX и PhoD (рис. 24).

Из-за небольшой численности штаммов микроорганизмов рода *Cobetia* (*Cobetia* sp.USD-24C, *C. amphilecti*KMM 296 (KGA01942.1), *Cobetia* sp. 1AS1, *Cobetia* sp. 1CM21F, *Cobetiasp.* AM6), имеющих гены ЩФ PhoA (рис. 24), высказано предположение, что некоторые родительские клоны свободноживущих бактерий приобрели дополнительный ген ЩФ PhoA и, таким образом, конкурентное преимущество при колонизации специфических поверхностей, таких, например, как органы и ткани организма-хозяина, в целях выживания в симбиотическом микробиоме хозяина (Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2016; Alexiev et al., 2016; Noskova et al., 2021). Действительно, филогенетический анализ всех генов ЩФ, обнаруженных в геномах каждого изолята *Cobetia* (рис. 24), выявил, что наличие структуры PhoA является характерным признаком лишь для бактерий, ассоциированных с морскими беспозвоночными (Noskova et al., 2021), а также морской травой *Zostera* spp.(*Cobetia* sp.USD-24C), поэтому признаны маркерами подвида *C. amphilecti* (Noskova et al., 2021). Данная классификация была подтверждена анализом генов 16SPHK и полных геномов близкородственных представителей видов рода *Cobetia* (Plisova et al., 2005; Romanenko et al., 2013; Alexiev et al., 2016; Noskova et al., 2021). Структурно-функциональный анализ выявил значительное сходство высокоактивной ЩФ PhoA *C. amphilecti* CmAP с гомологом из психрофильного патогена морских рыб *V. splendidus* VAP как по первичной структуре (69,4 % идентичности и 82 % сходства аминокислотных последовательностей), так и по подобию физико-химических свойств и кристаллической структуры (Helland et al., 2009; Golotin et al., 2015; Markusson et al., 2022).

Глава 3. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ СТРУКТУРНОГО СЕМЕЙСТВА PhoA

Как было отмечено выше, структурное семейство ЩФ PhoA преимущественно ассоциируют с морскими гетеротрофными бактериями классов *Bacteroidetes* и γ -*Proteobacteria*, соседствующими с популяциями цианобактерий (Sebastian and Ammerman, 2009; Zaheer et al., 2009; Baltar et al., 2016; Tada Y, 2011; Srivastava et al., 2021), а также с микроорганизмами, выделенными из микробиомов растений и животных, в частности такими, как симбионты (или патогены) *Vibrio* spp. планктонных веслоногих ракообразных (Copepoda), симбионты (факультативный патоген) *E. coli* человека, эндофит корней сахарного тростника *Enterobacter roggkampii* (Shoemaker et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Zorzetto et al., 2023); патогенморских рыб *V. splendidus* (Markusson et al., 2022); морские бактерии *C. amphilecti*, выделенными из целомической жидкости мидии *Crenomytilus grayanus* (Plisova et al., 2005), внутренних тканей губки *Amphilectus digitatus* (Romanenko et al., 2013) и корней и стеблей морской травы *Zostera* spp. (Alexiev et al., 2016). Кроме того, большинство эукариот, за исключением некоторых растений, имеют собственные ферменты PhoA (Yang et al., 2012; Rader et al., 2012; Duan, 2022). Все последовательности ферментов PhoA принадлежат к общей гомологичной линии белков и кластеризуются в отдельную ветвь филогенетического дерева (рис. 24).

3.1. Семейство ЩФ PhoA включает прокариотические и эукариотические ферменты от беспозвоночных до млекопитающих

Многочелюстные организмы также продуцируют Mg^{2+}/Zn^{2+} -зависимые ЩФ структурного семейства PhoA, гомологичные классической ЩФ *E. coli* (McComb et al., 1979; Millán et al., 2006; Yang et al., 2012; Rader et al., 2012; Chen et al., 2014; Sharma et al., 2014), которое включает ряд изоферментов позвоночных (ALP, alkaline phosphatase), таких как ЩФ эпителия кишечника (ALPI alkaline

phosphatase intestinal), ЩФ зародышевых, или эмбриональных, клеток (ALPPL2-alkaline phosphatase placental-like) и плаценты (ALPPL- alkaline phosphatase placental), а также ЩФ остальных органов и тканей (ALPL–alkaline phosphatase liver/bone/kidney) (рис. 24–26). У человека ЩФ кодируются четырьмя генами и по характеру экспрессии их можно классифицировать как тканеспецифичные и тканенеспецифичные (Millán et al., 2006; Sharma et al., 2014). Три из них, включая ЩФ кишечника (IAP, Intestine Alkaline Phosphatase), ЩФ зародышевых, или эмбриональных, клеток (GCAP, Germ Cell Alkaline Phosphatase; EAP, Embryonic Alkaline Phosphatase) и плаценты (PLAP, Placental Alkaline Phosphatase) являются тканеспецифичными. В то же время, четвертая – тканенеспецифичная ЩФ (TNAP, Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase), также может экспрессироваться в различных тканях и органах (Millán et al., 2006; Sharma et al., 2014; Duan, 2022).

Предполагают, что гомологи и паралоги ЩФ PhoA позвоночных возникли и эволюционировали в ходе многократной дупликации генов у древних беспозвоночных хордовых (рис. 26). В свою очередь, ген кишечной ЩФ древних костных рыб мог стать прародителем генов изоферментов тканеспецифичных ЩФ позвоночных (ALPP, ALPPL2, ALPI), включая человека и других млекопитающих (рис. 26).

Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции

красным (ALPL – тканеспецифическая ЩФ, экспрессируемая в печени, почках, костной ткани (liver/bone/kidney) и других органах; ALPPL – плацентарная ЩФ; ALPPL2 – ЩФ зародышевых, или эмбриональных, клеток; ALPI – кишечная ЩФ; ALPI 2 1 и ALPI 2 2 – кишечные ЩФ (паралоги) латимериевых рыб; ALP 3 – ЩФ латимериевых и лучеперых рыб. Паралоги других семейств генов, таких как гены Ece1, Ecel1, Ece2 и Eif4, показаны одинаковыми цветами. Стрелки обозначают направление транскрипции. (С) Консервативные синтении в четырех паралогах генома человека, только два из которых имеют гены ЩФ. На рисунке показаны четыре хромосомы человека: Hsa1, Hsa2, Hsa3 и Hsa7, линии между хромосомами указывают на паралоги. Каждый ген представлен в виде квадрата, гены в виде маленьких серых квадратов, не соединенных линиями, не имеют паралогов (Yang et al., 2012).

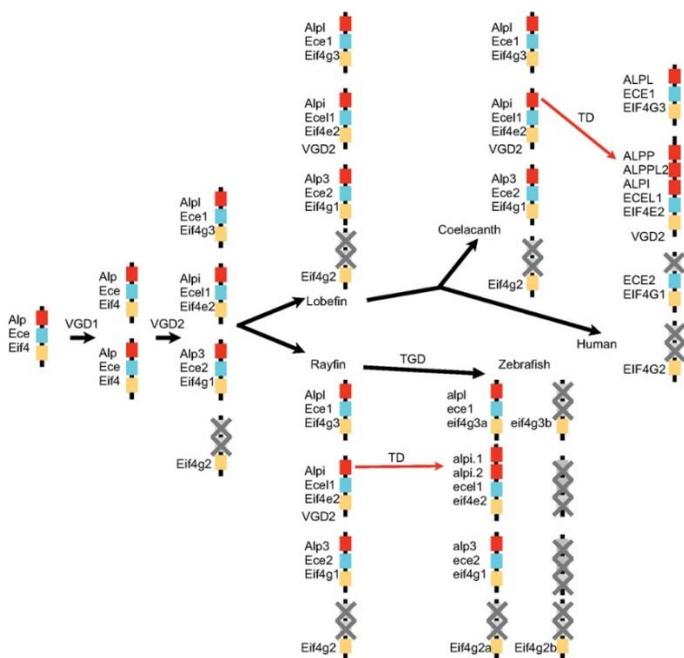


Рис. 26. Сегмент хромосомы хордового беспозвоночного, содержащий гены *Ece*, *Alp* и *Eif4*, который претерпел повторную дупликацию в геноме позвоночных (VGD1 и VGD2), образовав 4 паралога, один из которых потерял свой ген ЩФ (*Alp*). Дивергенция линий

лучеперых и лобановых костистых рыб, дупликация генома телеоста (TGD) не привела к появлению новых генов ЩФ (Alp), но тандемные дупликации (TD) в локусе Alр1 привели к появлению ряда генов изоферментов ЩФ (Alp) (Yang et al., 2012).

Кроме очевидной функции древней кишечной ЩФ семейства PhoA – обеспечения организма неорганическим фосфатом (P_i), в отношении ЩФ столбчатого эпителия в целом (каемчатых энтероцитов) как беспозвоночных, так и высших животных, стали появляться доказательства ее участия во взаимодействии хозяина с микробиомом за счет способности дефосфорилировать липид А как сигнальную молекулу бактериальной коммуникации, являющуюся структурным фрагментом одного из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахарида (ЛПС) (Lalles, 2010; Yang, 2012). Было показано, что грамотрицательные бактерии по своей численности превалируют над облигатными симбионтами человека – бактериями порядка *Bacteroidales*, в микробиомах пациентов с низким иммунным статусом (Malard et al., 2021). Все более очевидным становится тот факт, что функция распознавания и дефосфорилирования ЛПС бактерий является очень древней функцией этого семейства ферментов и относится к системе врожденного иммунитета многоклеточных организмов. Это было показано в экспериментах по колонизации светового органа (фотофора) кальмара *E. scolopes* симбиотической люминесцентной бактерией *V. fischeri* и регулированию численности ее популяции в соответствии с суточным ритмом активности кальмара путем изменения уровня экспрессии ЩФ эпителия его фотофора (Rader et al., 2012). Повышение уровня дефосфорилированного ЛПС к заходу солнца является сигналом для бактерий к увеличению численности популяции и соответственно интенсивности люминесценции фотофора, что является одновременно защитой беспозвоночного от чрезмерного воспаления и разрушения собственных тканей под действием фосфорилированного липида А (Rader et al., 2012).

Полный спектр биологических функций паралогов, кодирующих изоферменты ЩФ в одном многоклеточном организме, остается неизвестным (рис. 25, 26). Последовательности изоферментов ЩФ PhoA имеют инвариантные ключевые аминокислотные остатки для связывания субстрата и катализа (рис. 27, 28), которые отличаются между собой лишь незначительными заменами в полипептидной цепи (рис. 27) и характером гликозилирования, что, вероятно, приводит к различиям физико-химических и, следовательно, биологических функций, которые до конца не установлены (Zaher et al., 2020; Vimalraj, 2020; Levitt et al., 2022).

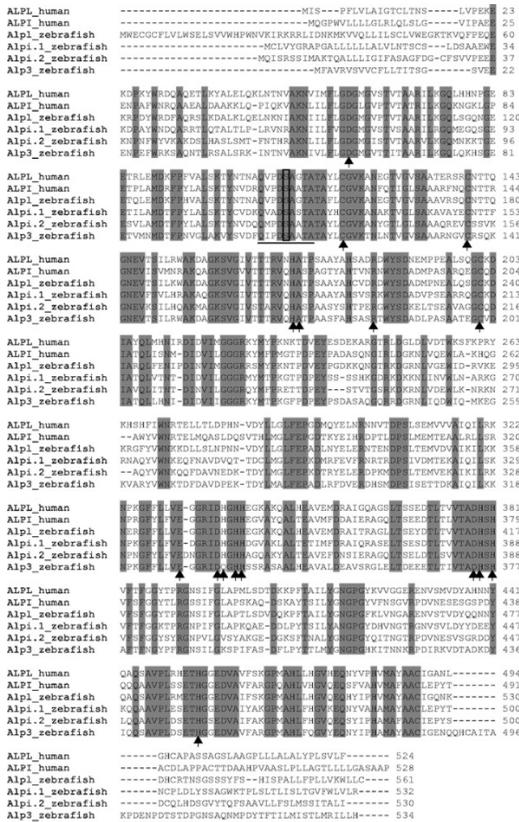


Рис. 27. Выравнивание последовательностей ЩФ (ALP) человека и зебрафиш (*Danio rerio*) программой ClustalW. Идентичные аминокислоты выделены черными рамками.

кислоты заштрихованы серым цветом, предполагаемые метал-
лосвязывающие сайты обозначены стрелками, сайты активного
центра подчеркнуты, консервативный каталитический серин (S),
необходимый для активности фермента, заключен в рамку. В вы-
равнивании использованы белки человека ALPL (ENSP00000363973) и ALPI (ENSP00000295463); зебрафиш Alpl (ENSDARP00000117214), Alpi.1 (ENSDARP000016216), Alpi.2 (ENSDARP00000070354) и Alp3 (ENSDARP00000019098) (Yang et al., 2012).

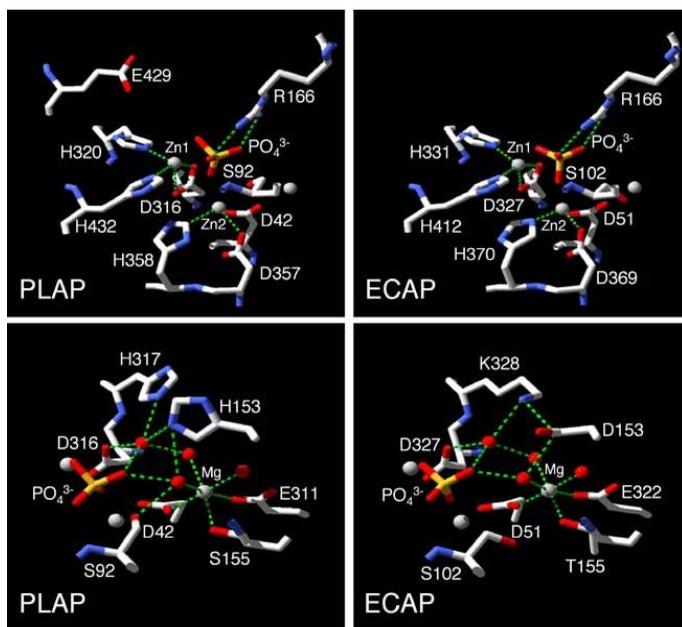


Рис. 28. Сравнение аминокислотных остатков, координирующих металлы сайтов активного центра, в ЩФ плаценты человека PLAP и кишечной палочки *E. coli* ECAP. На верхних рисунках показано окружение металлосвязывающих сайтов Zn¹ и Zn² и их лигандов, на нижних рисунках – окружение металлосвязывающего сайта Mg²⁺ и его лигандов. Молекулы воды показаны красными сферами. Зелеными пунктирными линиями обозначены металл-лигандные взаимодействия и водородные связи. (Kozlenkov et al., 2002; Millán, 2006).

Наиболее изученной биологической функцией тканеспецифичного изофермента ЩФ TNAP (или ALPL - liver/bone/kidney alkaline phosphatase) является ключевая роль в остеогенезе, способствующая минерализации костной ткани, что подтверждается возникновением такого заболевания, как гипофосфатазия при дефиците TNAP у человека и животных (Vimalraj, 2020; Sato et al., 2021). Знания о физиологических субстратах изоформ ЩФ человека и других млекопитающих до сегодняшнего дня ограничивались пирофосфатом, пиридоксаль-5'-фосфатом (витамином В₆) и нуклеотид фосфатами для TNAP и IAP соответственно (Sharma et al., 2014; Harroun et al., 2023). Предполагаемыми субстратами для тканеспецифической изоформы ЩФ человека TNAP являются фосфоэтаноламин, фосфохолин и фосфорилированный остеопонтин, а для кишечной изоформы ЩФ человека IAP было показано дефосфорилирующее действие в отношении ЛПС грамотрицательных бактерий (Bessueille et al., 2022; Harroun et al., 2023). Гены, белковые структуры и функции ЩФ животных ортологичны человеческим и отличаются только эмпирическими названиями некоторых генов и изоферментов, поэтому исследования биохимических и фармакологических свойств ЩФ успешно проводят на модельных животных, в частности на мышах (Yang, 2012; Lei et al., 2015; Sato et al., 2021; Bessueille et al., 2022).

Несмотря на консервативность основных аминокислотных остатков, подобие третичной структуры активного центра и общность каталитического механизма действия ферментов структурного семейства PhoA (рис. 9, 27, 28), ЩФ млекопитающих, по сравнению с бактериальными, имеют более высокие значения удельной активности, более низкие значения константы Михаэлиса (K_m), а также оптимум pH в более щелочной среде (табл. 2). Тем не менее, ферменты некоторых штаммов морских бактерий, таких, например, как *V. splendidus* G15-21 (VAP) и *C. amphilecti* KMM 296 (SmAP), в сильнощелочной среде имеют сопоставимые или даже превышающие показатели активности ЩФ млекопитающих из-за особенностей их молекулярной структуры, возникших в ходе эволюционной адаптации к окружающей среде (Gudjónsdóttir and Ásgeirsson, 2008; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015; Markússon et al., 2022).

3.2. Структурно-функциональная адаптация щелочных фосфатаз *RhoA* морских бактерий

Параметры окружающей среды для ферментов многоклеточных организмов сохраняются относительно постоянными как внутри клеток, так и в межклеточном пространстве, напротив, периплазматические ферменты морских бактерий, находясь под влиянием специфических факторов окружающей среды (высокая ионная сила (0,55 М хлорид иона, ~0,47 М натрия), рН (7,6–8,4) и низкая температура), параметры которых к тому же подвержены высокой скорости колебания в широком диапазоне значений, испытали эволюционное давление, приведшее к замене аминокислотных остатков для облегчения катализа в таких условиях (Kamennaya, et al., 2020; Feller et al., 2003; Pucci et al., 2017; Talley et al., 2010).

В северных широтах, к примеру, микроорганизмы обитают в порых и каналах морского льда, где соленость может варьировать от 0 до 200% (Thomas et al. 2002; Mock et al., 2005). Различные эффекты влияния солей могут наблюдаться как при их низких концентрациях, обусловленные полуспецифическим связыванием ионов с ферментом, так и при их более высоких концентрациях, когда меняются свойства водной среды (эффекты Хофмайстера) (Markússon et al., 2022). Природа этих взаимодействий еще не до конца понята, как и механизм рН- и термозависимого активирования ферментов морских бактерий анионами различных солей, в отличие от ферментов животных, которые не активируются повышением ионной силы реакционной среды (Golotin et al., 2015; Hjörleifsson and Ásgeirsson, 2017; Noskova et al., 2019; Markússon et al., 2022). Фермент *E. coli* также активируется в присутствии ионов соли, однако этот эффект не является рН-зависимым. Методами кинетического и ингибиторного анализа было показано, что гуанидин хлорид неспецифически усиливает активность ЩФ *E. coli* за счет изменения электростатического потенциала и соответственно ускорения диссоциации нековалентного комплекса Е•Р – фактора, лимитирующего скорость реакции, а также устранения негативной

кооперации, которая зависит от согласованного взаимодействия двух субъединиц (Orhanović et al., 2003).

Морские холодоактивные ЩФ адаптированы к осуществлению катализа при высокой ионной силе и низких значениях температур за счет увеличения общей пластичности своей структуры и понижения величины pI , поэтому механизм их активации ионами соли отличается от механизма активации ЩФ *E. coli*. Было показано, что NaCl увеличивает активность и стабильность холодоактивной ЩФ *V. splendidus* VAP в зависимости от pH в диапазоне значений 7–10 (Hjörleifsson and Ásgeirsson, 2017). Переход pH среды от нейтральных к щелочным значениям сопровождался значительным увеличением как K_i для неорганического фосфата (ингибирование продуктом реакции), так и K_M для *n*-НФФ (Hjörleifsson and Ásgeirsson, 2017). Профиль активности VAP в зависимости от pH имел два максимума, тогда как время полужизни фермента VAP($t_{1/2}$) увеличивалось от 40 до 60°C в зависимости от концентрации соли (рис. 29). Кроме того, стабилизация димера VAP строго зависела от pH и концентрации NaCl (Hjörleifsson and Ásgeirsson, 2017).

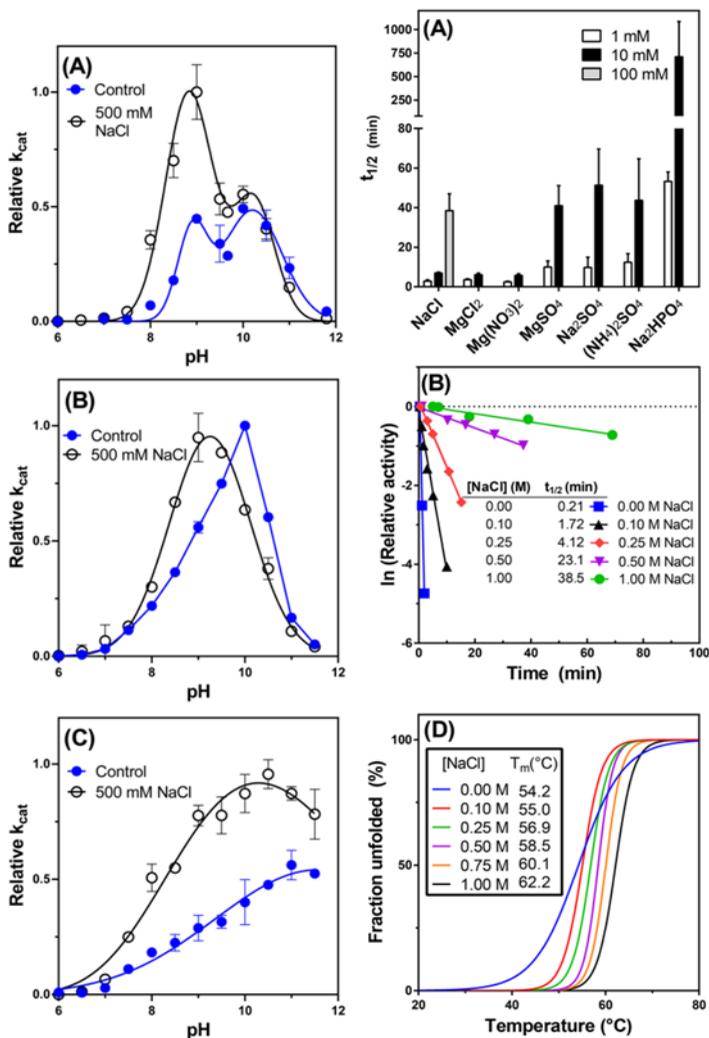


Рис. 29. Слева – профили активности в зависимости от рН для трех щелочных фосфатаз: (А) ЩФ *V. splendidus* VAR, (В) ЩФ кишечника телят и (С) ЩФ кишечной палочки. Профили рН-активности измеряли без добавления (контроль) или с добавлением 500 мМ NaCl в реакционную среду. Активность нормировалась по наибольшему значению k_{cat} , измеренному для каждого профиля активности фермента в нескольких независимых экспериментах ($n =$

2-4). Справа – влияние ионов на термостабильность ЩФ VAP: (A) Влияние солей NaCl, магния и конкурентного ингибитора на стабильность при 30°C в 20 мМ Трис (pH 8,0). Аликвоты фермента отбирали в разные моменты времени, анализировали по стандартному методу определения активности и определяли время полужизни фермента при 30°C ($t_{1/2}$). (B) Скорость инактивации фермента при 55°C в зависимости от концентрации NaCl в 20 мМ Трис и 10 мМ MgCl₂ (pH 8,0). (D) Термическая денатурация VAP в зависимости от концентрации NaCl. Доля денатурированного фермента VAP определялась с помощью КД-спектроскопии при длине волны 222 нм в 25 мМ Mops и 1 мМ MgSO₄ (pH 8,0) (Hjörleifsson and Ásgeirsson, 2017; Markússon et al., 2022).

Изменения в активности фермента, наблюдаемые при варьировании pH среды, коррелировали с изменениями в структуре молекулы VAP, которые были определены по изменениям в спектре триптофановой флуоресценции белка. Примечательно, что инактивация ЩФ VAP, индуцированная теплом и мочевиной, не сопровождалась ни высвобождением ионов металлов из активного центра фермента, ни диссоциацией димеров. Это позволило предположить, что инактивация VAP вызвана какими-то тонкими конформационными изменениями в структуре активного сайта фермента.

Кристаллизация мутантных аналогов холодоактивной ЩФ *V. splendidus* VAP в комплексах с хлоридом и бромидом позволила определить локализацию двух центров связывания ионов Cl⁻ (рис. 30), а также изучить структурные основы анионной активации и стабилизации фермента (Hjörleifsson and Ásgeirsson, 2017; Markússon et al., 2022). Анализ полученных кристаллических структур, наряду с результатами мутагенеза и кинетическими данными, подтвердил модель, в которой связывание хлорида в удаленном от активного центра месте, подверженном воздействию растворителя (воды), способствует стабилизации молекулы за счет уменьшения ее тепловых движений. При этом диффузионно-зависимое связывание ионов Cl⁻ в активном центре способствует увели-

чению скорости каталитической реакции за счет модуляции подвижности субстрат-связывающего остатка Arg129 и электростатического потенциала активного центра (рис. 30).

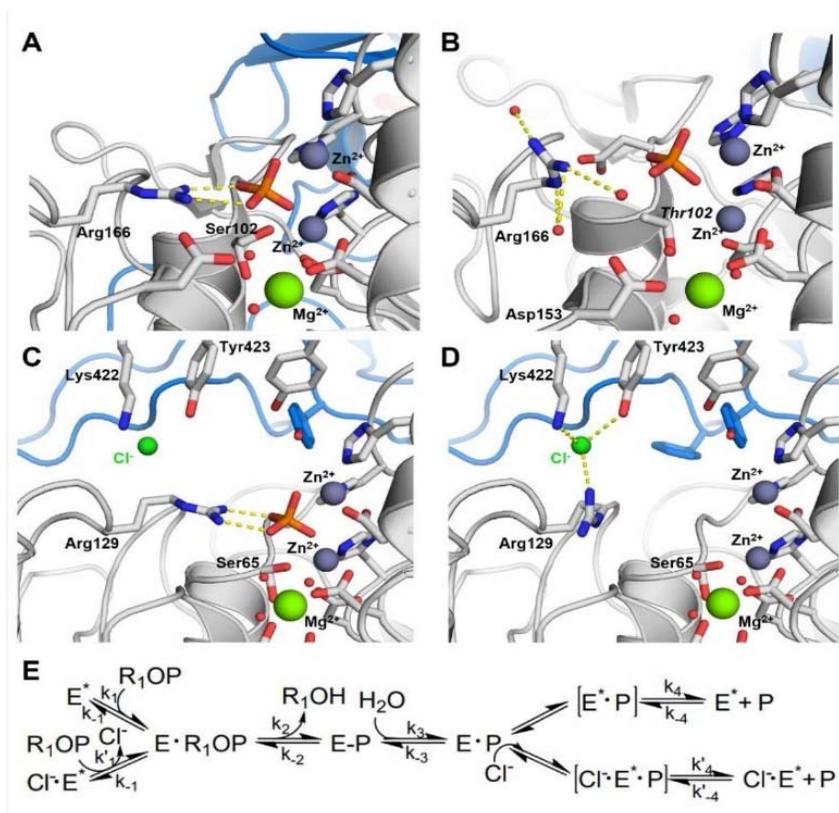


Рис. 30. Схема активации ЩФ VAP хлоридом через стабилизацию вращения субстрат-связывающего остатка Arg129: (A) ЩФ *E. coli*, кристаллизованная в переходном состоянии (E·P), где остаток Arg166 непосредственно связан с продуктом ферментативной реакции (PDB: 1ED8); (B) Субстрат-связывающий остаток Arg166 ЩФ *E. coli* в обращенной наружу конформации в фосфат-связанном мутанте S102T (PDB: 2G9Y); (C) ЩФ VAP кристаллизованная в переходном состоянии (E·P) со связанным хлоридом; (D) Расположение хлорида в кристаллической структуре VAP позволяет предположить, что он стабилизирует обращенную наружу конфор-

мацию остатка Arg129 в отсутствие фосфата, что способствует увеличению скорости реакции; (Е) Предложенная схема реакции катализа ЩФ VAR с учетом увеличения ионом хлора скорости лимитирующей стадии, где $k'4 > k4$ (Markússon et al., 2022).

ЩФ психрофильной морской бактерии *V. splendidus* VAR имеет еще одну отличительную особенность четвертичной структуры (димера), большая внешняя петля из аминокислотных остатков одного мономера покрывает активный центр другого мономера (рис. 31). Такая пространственная организация сайта связывания субстрата обеспечивает ферменту высокую каталитическую эффективность и, предположительно, высокую адаптационную способность.

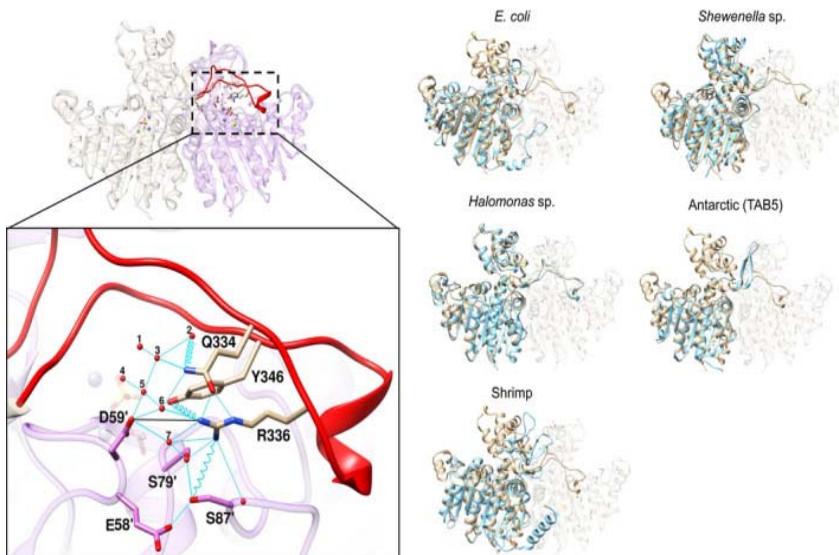


Рис. 31. Большая петля ЩФ *Vibrio* VAR интерфейса поверхности субъединицы, участвующей в димеризации. Левая панель: на вставке показаны меж- и внутримолекулярные взаимодействия в окружении остатка Arg336 (R336) большой интерфейсной петли VAR (PDB ID: 3E2D) (выделена красным цветом). Ключевые молекулы воды пронумерованы. Водородные связи длиной $< 3,0 \text{ \AA}$ показаны голубыми линиями, а слабые водородные связи ($3,0\text{-}5,0 \text{ \AA}$) –

голубыми пружинами. Солевой мостик обозначен темной линией, ионы Zn^{2+} и Mg^{2+} – на заднем плане прозрачны. Остатки мономера В обозначены знаком (*). Правая панель: 3D-структура ЩФ VAP (выделена бежевый цвет) в суперпозиции со следующими структурами ЩФ (выделены голубым цветом) для сравнения областей большой интерфейсной петли: *E. coli* ECAP (PDB ID: 3TG0), *Shewenella* sp. (PDB ID: 3A52), *Halomonassp.* (PDB ID: 3WBH), атлантической креветки (PDB ID: 1SHN) и антарктической бактерии TAB5 (PDB ID: 2W5W) (Hjörleifsson et al., 2021).

На рисунке 31 показана кристаллическая структура ЩФ VAP с акцентом на межсубъединичное и внутримолекулярные взаимодействия наиболее значимого для димеризации остатка аргинина (R336), локализованного в большой интерфейсной петле (обозначена красным цветом), которая при образовании димера взаимодействует с другой субъединицей. При исследовании значимости четвертичной структуры ЩФ VAP для проявления высокой ферментативной активности были сконструированы несколько различных мутантных вариантов фермента с целью устранения межсубъединичных взаимодействий в интерфейсе димера. Разрыв межсубъединичных контактов по одному ключевому остатку R336 в каждом мономере снижал температурную стабильность фермента и каталитическую скорость реакции с его участием на 40% (Hjörleifsson et al., 2021). По-видимому, большая петля обладает повышенной конформационной пластичностью и в то же время увеличивает площадь поверхности интерфейса между субъединицами, что создает между ними дополнительные контакты и может способствовать чередующемуся структурному циклу, обусловленному механизмом реакции по типу поочередной негативной аллостерической регуляции мономеров (Orhanović et al., 2003; Hjörleifsson et al., 2021). Димер ЩФ существует в балансе между двумя конформациями: первой, обеспечивающей высокое сродство к субстрату и фосфорильной группе в момент близости аллостерической петли к активному центру (активной субъединицы), и второй, с низкой аффинностью к субстрату и фосфорильной

группе, которая формируется при разрыве дополнительных контактов активного центра с петлей (неактивная субъединица). Однако NaCl имеет разный эффект на данный процесс при pH 8,0 и pH 10,5 (рис. 32).

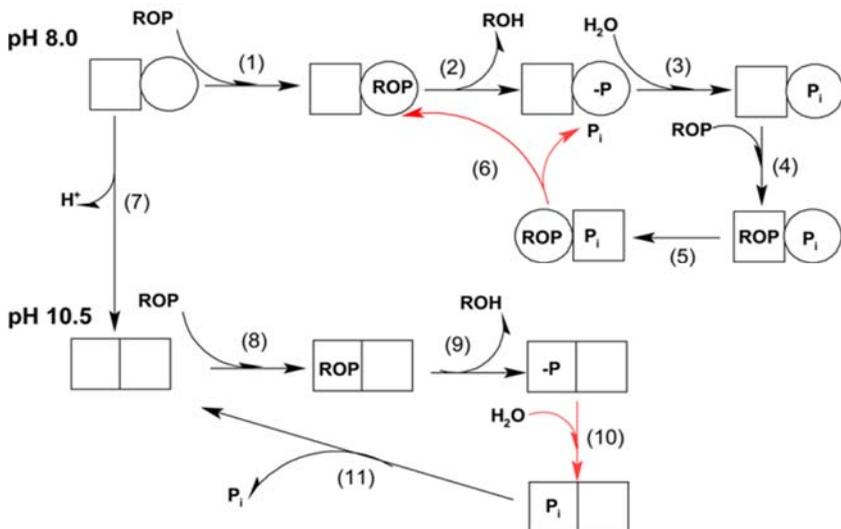


Рис. 32. Гипотетическая схема полусайтового механизма реакции гидролиза ЩФ VAP при pH 8,0 и 10,5 при насыщающих концентрациях субстрата. Пустые кружки обозначают субъединицу с высоким сродством как к субстрату, так и к фосфатному продукту реакции, а открытые квадраты – субъединицу с низким сродством к субстрату и фосфатному продукту реакции. При pH 8,0 лимитирующим по скорости этапом является высвобождение фосфатного продукта (этап 6, окрашенный красным цветом). Перед высвобождением фосфата происходит конформационное изменение, в результате которого субъединицы поочередно переключаются между низкоаффинным и высокоаффинным состоянием (этап 5). Увеличение pH до 10,5 приводит к конформационному изменению, вызванному событием депротонирования, в результате чего обе субъединицы переходят в низкоаффинное состояние. В дальнейшем вы-

свобождение фосфата происходит быстрее, и лимитирующим этапом становится дефосфорилирование (этап 10) (Hjörleifsson et al., 2021).

При pH 8,0 K_M ЩФ VAR не меняется в присутствии NaCl, тогда как K_i увеличивается в 4 раза, это влечет за собой четырехкратное увеличение k_{cat} вследствие быстрого высвобождения фосфата (лимитирующей скоростью реакции). При pH 10,5 под действием 0,5 М NaCl K_M увеличивается в 3,5 раза. K_i также увеличивается в 6 раз по сравнению с контролем. Однако в этом случае увеличение K_i , индуцированное солью NaCl, не влечет за собой увеличение эффективности катализа (k_{cat}), что свидетельствует о том, что высвобождение фосфатного продукта реакции больше не является фактором, лимитирующим скорость (рис. 32). Это подтвердилось экспериментом с добавлением сахарозы в реакционную смесь, снижающей активность фермента из-за повышения вязкости, но в присутствии соли, не влияющей на активность фермента (Hjörleifsson et al., 2017).

Несколько выравниваний и суперпозиций кристаллической структуры ЩФ VAR со структурами других ЩФ позволило выявить различия в длине интерфейсной петли. Фактически, вариант ЩФ *E. coli* ECAP не содержит такой внешней петли, вместо этого фермент имеет N-концевую интерфейсную петлю, за которой следует короткая спираль (рис. 32). Такая же структура наблюдается у ЩФ млекопитающих и ЩФ атлантической креветки (PDB ID: 1SHN) (рис. 32). С другой стороны, в структуре ЩФ антарктического бактериального штамма TAB5 имеется вставка с большой петлей, аналогичной ЩФ VAR, которую, однако, невозможно было правильно описать из-за наличия артефакта в кристалле (Wang et al., 2007). Ближайшими гомологичными структурами для VAR являются ЩФ морской бактерии *Shewanella sp.* (PDB ID: 3A52) с гораздо более короткой интерфейсной петлей (рис. 32), ЩФ галофильной бактерии *Halomonas sp.* (PDB ID: 3WBH) и ЩФ *Staphylococcus aureus* морской бактерии *C. amphilecti* KMM 296, имеющей высокую сте-

Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции

пень подобия (53–75% идентичности, 69–86% сходства) аминокислотных последовательностей и 3-D структуры, включая большую петлю (рис. 33–35).

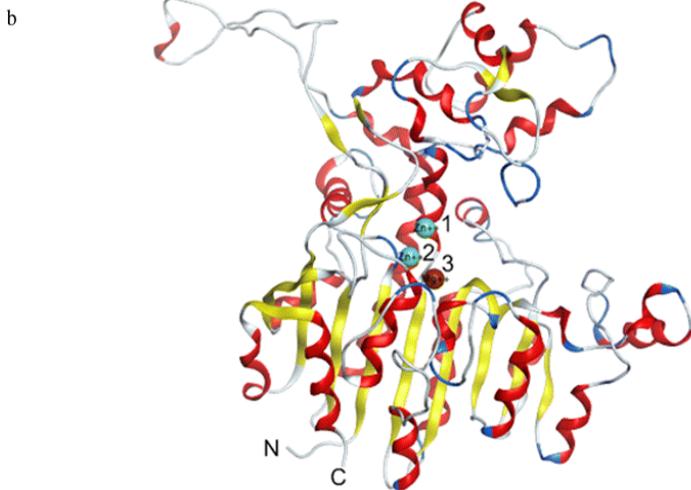
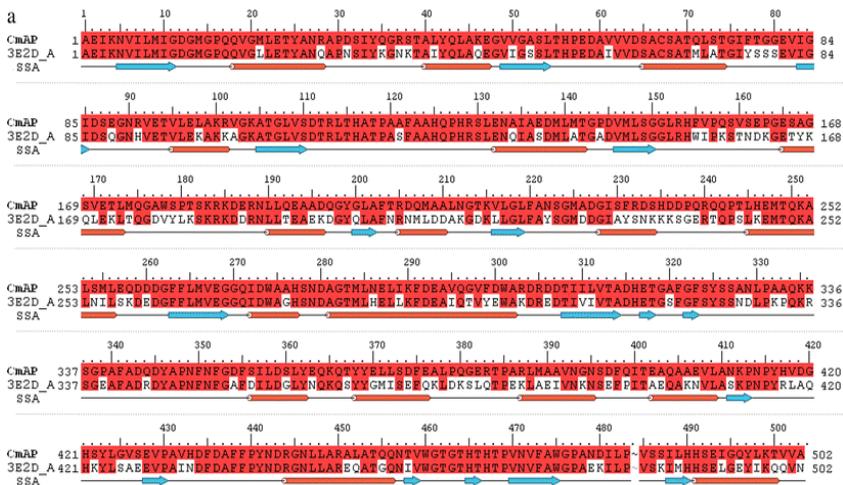


Рис. 33. (а) Выравнивание последовательностей ЩФ СтмАР морской бактерии *C. amphilecti* (UniProt: Q1W622) и ЩФ ВАР морской

бактерии *V. splendidus* G-15 (PDB-код: 3E2D_A). Для ЩФ VAP показаны элементы вторичной структуры. Идентичные и гомологичные остатки показаны красным и оранжевым цветами. (б) Модель 3D-структуры мономера ЩФ СтАР морской бактерии *S. amphilecti*, построенная с использованием кристаллической структуры ЩФ VAP морской бактерии *V. splendidus* G-15 в качестве прототипа. Структура белка представлена в виде ленточной диаграммы. Элементами вторичной структуры являются β -тяжи (желтый цвет), α -спирали (красный цвет), повороты (синий цвет) и неупорядоченная структура (серый цвет). Ионы металлов Zn^{2+} (1), Zn^{2+} (2) и Mg^{2+} (3) показаны в виде синих и коричневых сфер (Golotin et al., 2015).

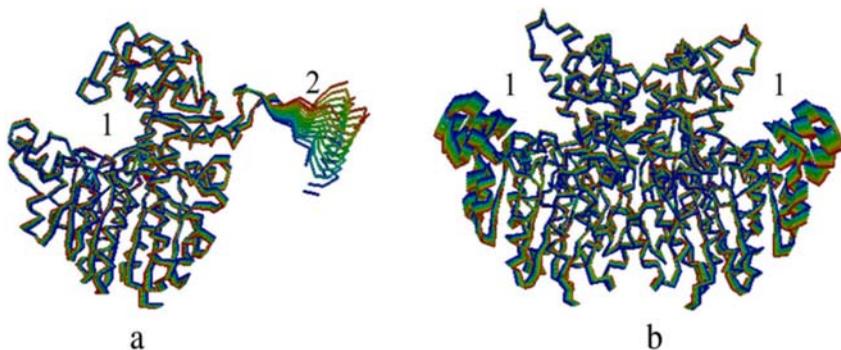


Рис. 34. (а) Конформационная подвижность большой интерфейсной петли мономера ЩФ СтАР: активный центр (1); субъединичная петля, стабилизирующая димер (2). (б) Димер ЩФ СтАР: активные центры (1). Амплитуда конформационной подвижности аминокислотных цепей ЩФ СтАР показана диапазоном цветовой гаммы ленточной диаграммы (Golotin et al., 2015).

У ЩФ VAP (Helland et al., 2009), как и у всех ближайших ее гомологов, ион Zn^{2+} в первом металлосвязывающем сайте скоординирован шестью Н-связями с остатками Asp (D273), His (H277), His (H465) для образования контактов с двумя атомами кислорода субстрата (рис. 30, 33, 35).

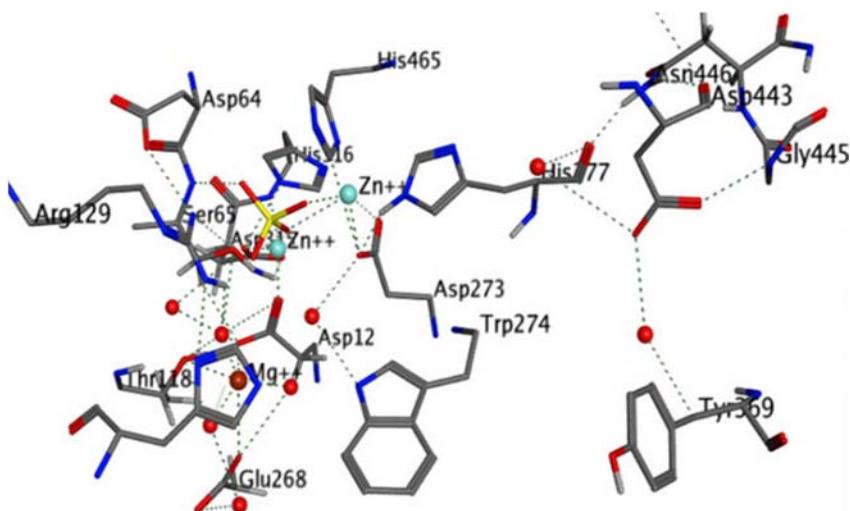


Рис. 35. Детализированная структура активного центра и металлосвязывающих сайтов ЩФ SmAP (UniProt: Q1W622), полученная методом молекулярного моделирования в программе MOE 2012.10 с использованием прототипа ЩФ VAR (PDB-код: 3E2D_A) без учета молекул воды (Golotin et al., 2015).

Ион Zn^{2+} во втором металлосвязывающем сайте скоординирован пятью Н-связями с остатками Asp (D12), Ser (S65), Asp (D315), His (H316) и образует контакт с одним атомом кислорода субстрата (рис. 30, 33, 35). Ион Mg^{2+} в третьем металлосвязывающем сайте образует Н-связи с остатками His (D12), Thr (T118), Glu (E268) и тремя молекулами воды, таким образом, косвенно участвуя в катализе, но выполняя, главным образом, стабилизирующую функцию для поддержания оптимальной конформации молекулы, как и у ЩФ *E. coli* (рис. 4).

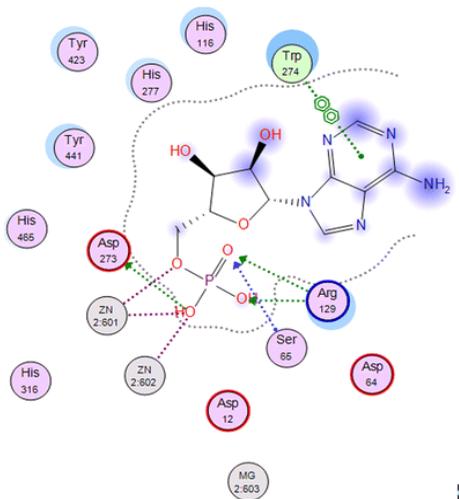
Примечательно, что аминокислотные остатки, участвующие в образовании металлосвязывающих сайтов у прокариотических и эукариотических ЩФ PhoA консервативны, за исключением остатков Mg^{2+} -связывающего сайта (рис. 28, 35). Так, в суперпозиции остатка His (H116) в Mg^{2+} -связывающем сайте ЩФ VAR и SmAP у фермента кишечной палочки ЕСАР и человеческой ЩФ имеются

остатки Asp (D51) и Asp (D42) соответственно (Рисунки 28, 35). В положении, соответствующем остатку Thr (T118) у ЩФ VAP и CmAP, и Thr (T155) у фермента *E. coli* ECAP, плацентарная ЩФ человека PLAP имеет остаток Ser (S155) (рис. 28, 35). Наконец, на месте остатка Trp (W274) у холодоактивных ЩФ VAP, TAP и CmAP (рис. 35) в молекулах бактериальной ЩФ ECAP и эукариотических ЩФ SAP и PLAP находятся остатки Lys (K328) и His (H153) соответственно (рис. 28). Однако субстрат-связывающий остаток аргинина у всех ЩФ является идентичным – Arg (R129) у VAP и CmAP (рис. 33, 35), Arg (R148) у фермента TAP (Wang et al., 2007) и Arg (R166) у ECAP и PLAP (рис. 28).

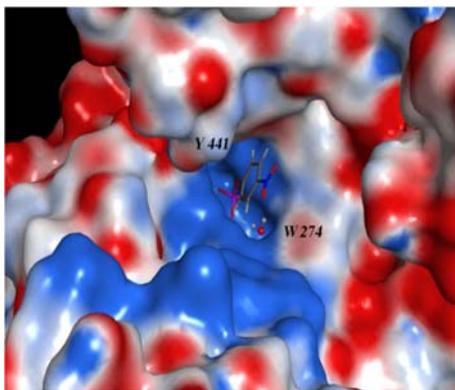
Несмотря на высокую степень идентичности первичной структуры (75%) и топологии каталитического Ser65 и субстрат-связывающего Arg129, а также остатков, связанных с ионами металлов Zn^{2+} и Mg^{2+} у ЩФ CmAP и VAP, вторичная структура их молекул отличается, что обуславливает различие в физико-химических свойствах и каталитической активности этих ферментов (табл. 2). Анализ неидентичных областей поверхности молекулы ЩФ CmAP выявил 10-кратное увеличение количества остатков Ala, Val, Arg, Pro, Gly и Phe и снижение количества остатков Lys, Ile, Asn и Tyr по сравнению с VAP (Golotin et al., 2015). Незначительные структурные различия CmAP и VAP, вероятно, определяют различия в каталитической эффективности и термостабильности (Hauksson et al. 2000; Nasu et al. 2012; Golotin et al., 2015; Hjörleifsson et al., 2017; Hjörleifsson et al., 2021). Удельная активность гомогенной ЩФ CmAP достигала 12700 ед/мг (1 М ДЭА, pH 10,3 или 0,5 М трис-HCl, 0,3 М NaCl, 5 мМ Mg, pH 10,0) (Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015), тогда как активность VAP достигала 3700 ед/мг (10 мМ трис-HCl/10 мМ глицин-NaOH, pH 9,8) (Helland et al., 2009), которая увеличивалась вместе с повышением термостабильности до 60% при добавлении 0,5 М NaCl в 1 М диэтаноламиновом буфере, pH 10,0 (Hjörleifsson et al., 2017; Hjörleifsson et al., 2021). Повышенную эффективность каталитического расщепления субстрата п-НФФ под действием ЩФ CmAP по сравнению с другими ферментами можно объяснить уникальными свойствами субстрат-связывающего остатка Arg (R129) и остатков микроокружения ферментативной

Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции

щели, которые они приобретают в момент связывания субстрата с активным центром *СтАР* в условиях $pH \geq 10$ (рис. 36 Б).



А



В

Рис. 36. А – Диаграмма контактов взаимодействия активного центра ЩФ *СтАР* с субстратом аденозинмонофосфатом (АМФ). В – Электростатический потенциал молекулярной поверхности у входа в активный центр *СтАР*. Положительно заряженные аминокислотные остатки обозначены синим цветом. Отрицательно заряженные аминокислотные остатки обозначены красным цветом (Golotin et al., 2015).

Отличительная особенность фермента *СтАР* заключается в том, что при значениях $pH \geq 10,0$ субстрат-связывающий остаток Arg (R129) становится нейтральным, а остаток Tug (Y441), участвующий в ароматическом взаимодействии (π - π взаимодействие) с субстратом (рис. 36 В), приобретает отрицательный заряд, что дополнительно ускоряет высвобождение продукта реакции PO_4^{4-} из активного центра. При этом протяженная область положительно заряженных остатков вдоль узкого входа в ферментативную щель способствует эффективному аккумулярованию отрицательно заряженных молекул субстрата, увеличивая K_m (рис. 36). Такие особенности структуры, вероятно, позволяют *СтАР*, в отличие от других ЩФ, эффективно работать даже при высоких концентрациях конечных продуктов реакции, которые не проявляют ингибирующего действия на фермент, что расширяет экологическую и биогеохимическую роль *СтАР* в природе (McComb et al., 1979; Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015). Щелочные фосфатазы с высокой каталитической эффективностью при высоких концентрациях фосфатов в окружающей среде необходимы для морских бактерий, которые способны запасать большое количество P_i без причинения вреда внутриклеточному метаболизму (Hudek et al., 2016; McCleary, 2017; Kamennaya et al., 2020; Lidbury et al., 2021).

Глава 4. МЕХАНИЗМ ТРАНСПОРТА И АККУМУЛЯЦИИ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФАТА В МОРСКИХ БАКТЕРИЯХ

4.1. Периплазматическое фосфатирование необходимо для осмотической регуляции бактерий

Аккумуляция P_i настолько важна для морских бактерий, что максимальный клиренс P_i в их клетках в 30 раз ниже теоретической максимальной скорости поступления питательных веществ внутрь путем диффузии (рис. 37).

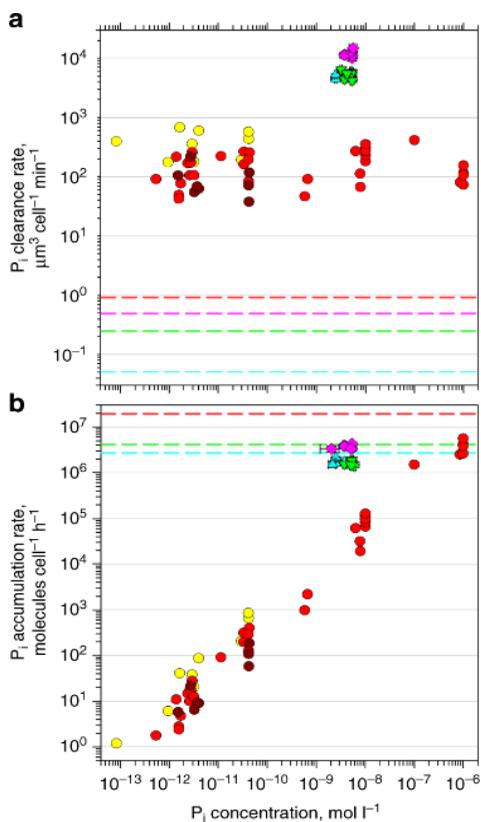


Рис. 37. (а) Сравнение скорости клеточного клиренса P_i океанических протобактерий SAR11 (голубые треугольники, $n = 14$),

Prochlorococcus (зеленые треугольники, $n = 11$) и *Synechococcus* (розовые ромбы, $n = 7$) при концентрациях P_i в окружающей среде с показателями культивируемых штаммов *Synechococcus* WH7803 (желтые круги, $n = 10$), WH8102 (красные круги, $n = 35$) и WH8109 (коричневые круги, $n = 8$) в широком диапазоне концентраций P_i . (b) Сравнение максимальных скоростей накопления P_i в клетках одних и тех же бактерий (SAR11 $n = 12$, *Prochlorococcus* $n = 7$, *Synechococcus* $n = 7$, WH7803 $n = 10$, WH8102 $n = 35$ и WH8109 $n = 8$). Пунктирные линии обозначают соответствующие (a) клеточные объемы ($\text{мкм}^3 \cdot \text{клетка}^{-1}$) и (b) содержание фосфора в клетках (атомы $P \cdot \text{клетка}^{-1}$) океанического SAR11 (голубой), *Prochlorococcus* (зеленый), *Synechococcus* (розовый) и культивируемого *Synechococcus* sp. WH8102 (оранжевый). Горизонтальные серые линии обозначают основные деления логарифмической оси Y , помогающие сравнивать значения (Kamennaya et al., 2020).

При этом эксперименты показали, что, несмотря на активный клеточный рост, скорость поглощения P_i фитопланктоном в период цветения (активного размножения водорослей и цианобактерий) в поверхностных водах тропических морей ниже, чем можно было ожидать (Kamennaya et al., 2020). Снижение скорости поглощения P_i быстрорастущими клетками фитопланктона можно объяснить лишь наличием у них промежуточного периплазматического буфера, в котором накапливается P_i (P_i -буфер). Соответственно, чем полнее P_i -буфер клетки, например, в тропических поверхностных водах с высоким содержанием органики и P_i , тем медленнее клетка поставляет P_i из морской воды для пополнения своего P_i -буфера. Поскольку каждая приобретенная клеткой молекула P_i сначала попадает в периплазматический P_i -буфер, а затем импортируется в цитоплазму для ассимиляции, процессы бактериального поглощения и импорта P_i могут осуществляться разными механизмами (Kamennaya et al., 2020). Высокий процент P_i в периплазме и постепенная ассимиляция накопленного P_i свидетельствует о том, что скорость периплазматического накопления P_i намного превышает скорость импорта P_i и распределение P_i в периплазматическом пространстве не является упорядоченным (Kamennaya et al., 2020).

Тем не менее, репродуктивный успех самых распространенных в Мировом океане планктонных фотосинтезирующих цианобактерий *Prochlorococcus* и гетеротрофных углеводородокисляющих α -протеобактерий SAR11 (*Pelagibacter*), вероятно, связан с высокой скоростью поглощения P_i (Giovannoni et al., 2017). Несмотря на то, что *Prochlorococcus* и SAR11 обладают генами, связанными с синтезом полифосфатов (полиР), их клетки слишком малы для хранения P_i в виде полиР внутри периплазматического буфера (Giovannoni et al., 2017). Очевидно, помимо внутриклеточного накопления P_i в виде полиР, эти водоросли накапливают P_i в периплазме клеток каким-то другим образом. Пассивная диффузия свободного P_i в периплазму также не объясняет механизма аккумуляции P_i , так как бактерия поддерживает его периплазматическую концентрацию ниже уровня окружающей среды. Недавно был описан внеклеточный P_i -буфер, накоплению P_i в котором, по-видимому, противодействует градиент, необходимый для диффузии P_i в периплазму (рис. 38а†).

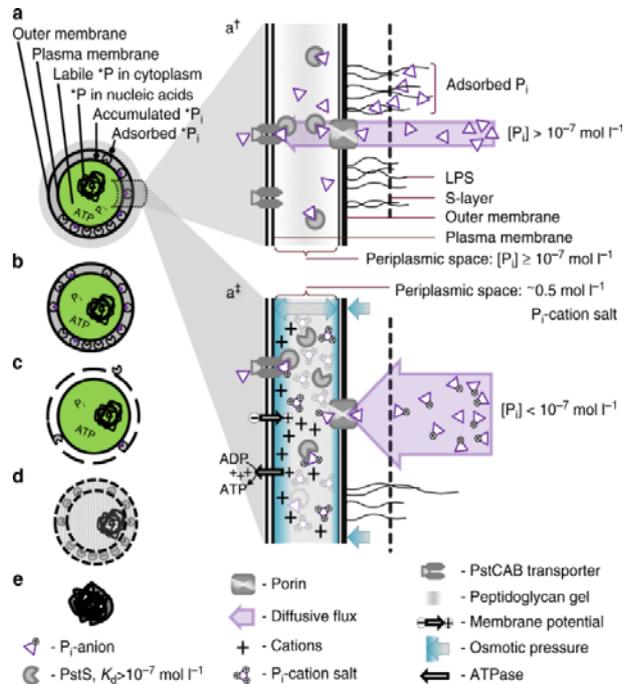


Рис. 38. Механизм транспорта фосфата (P_i) морскими бактериями: (а) – В модельной клетке, меченной *P_i : *P_i - может быть (I) внеклеточным, т.е. адсорбированным на поверхности клетки; (II) накапливается в периплазме; (III) связан с субъединицей транспортного белка PstS в периплазме; (IV) в лабильной форме в

цитоплазме, например, растворимый P_i , нуклеотиды, сахарофосфаты, малые молекулы РНК; и (V) в нелabileйной форме ассимилированного P, например, ДНК, рибосомальной РНК, полифосфатах, фосфолипидах; (a†) – Традиционная модель транспорта и ассимиляции P_i в клетках бактерий – параллельные процессы пассивной адсорбции P_i на поверхности бактериальной клетки, состоящей из полимеров липополисахарида наружной мембраны (ЛПС) и покрытых (у некоторых бактерий) белковым поверхностным слоем (S-слоем), и диффузии P_i через наружную мембрану через порины в периплазму. Диффузия напрямую связана с транспортом P_i через цитоплазматическую мембрану с помощью транспортеров ABC-типа (PstCAB) с использованием периплазматического P_i -связывающего белка (PstS); (a‡) – Предложенная модель Kamennaya et al. (2020) – массовый перенос анионов P_i через внешнюю мембрану посредством поринов, их буферизация катионами мембранного потенциала в периплазме и импорт P_i из буферного запаса (P_i -буфера) через цитоплазматическую мембрану с помощью фосфат-специфичной транспортной системы PstCAB. Изотоническое или слабо гипертоническое осмотическое давление в периплазме поддерживается забуференной солью P_i ; (b-e) – Удаление различных пулов фосфора путем промывки или фиксации *P_i – меченых клеток модельного микроорганизма *Synechococcus* sp. WH8102 (Kamennaya et al., 2020).

Необъяснимым кажется и тот факт, что бактерии могут накапливать миллионы молекул P_i в периплазме, сохраняя при этом механизм пассивной диффузии даже при очень низких концентрациях P_i в окружающей среде (Kamennaya et al., 2020). Бактерии не синтезируют полиР в периплазме, но каким-то образом делают молекулы P_i полулабильными – доступными для субъединиц транспортной P_i -специфичной системы PstS, не позволяющей им диффундировать обратно в морскую воду. С одной стороны, периплазматический P_i должен оставаться в ионной форме, а не фосфорилировать органические молекулы, поскольку субъединицы PstS специфически связывают ионы HPO_4^{2-} и $H_2PO_4^-$ (Hudek et al., 2016; McCleary, 2017; Kamennaya et al., 2020). С другой стороны, P_i не может поддерживаться в виде свободных ионов, поскольку наличие свободных ионов P_i приведет к тому, что периплазматическая концентрация P_i превысит концентрацию в окружающей среде и, следовательно, начнется обратная диффузия. Практически мгновенное прекращение накопления P_i под действием ингибиторов протонной движущей силы (the proton motive force, PMF) по сравнению с отсроченным снижением накопления P_i под действием другого ингибитора (DCCD), преимущественно блокирующего синтез АТФ и, тем самым, разрушающего АТФ-поддерживаемый мембранный потенциал, убедительно доказывает, что накопление P_i связано с клеточной энергетикой через PMF, а не при непосредственном участии АТФ через транспортеры типа PstSCAB, как показано на рисунке 38 (а†). Взаимоисключающие условия PMF-зависимого накопления P_i в периплазме не могут быть объяснены PstS-опосредованным импортом P_i (рис. 38а†). Следовательно, необходим альтернативный механизм транспорта и ассимиляции P_i .

Поскольку традиционный механизм P_i -специфического транспорта не может объяснить накопление P_i в морских бактериях, авторы (Kamennaya et al., 2020) предположили, что периплазматические анионы P_i образуют пары с хемиосмотическими катионами каналов наружной мембраны (P_i -специфичных поринов, OmpP) (Pongprayoon et al., 2009), создающими протонную движущую силу

(PMF), или электрохимический градиент, и, таким образом, миллионы накопленных P_i -пар могут влиять на периплазматическую осмолярность морских бактерий (рис. 38).

Альтернативный механизм PMF-зависимого накопления P_i в периплазме является гипотезой, поскольку недостаточно известно об организации и функционировании периплазмы в живой бактериальной клетке. Клетка поддерживает PMF путем экстррузии протонов (ионов H^+) через плазматическую мембрану против электрохимического градиента, используя энергию дыхания и фотосинтеза (Kamennaya et al., 2020). Накопление H^+ в периплазме приводит к тому, что она становится кислой относительно среды цитоплазмы (pH $\sim 7,253$) и морской воды (pH 8,0-8,354) (рис. 38 а†). Однако маловероятно, чтобы в периплазме морских бактерий накапливалось большое количество свободных ионов H^+ , поскольку их наружная мембрана проницаема для них. Следовательно, ионы H^+ должны диффундировать в окружающую среду, чтобы быть нейтрализованными более, чем стократным избытком ионов OH^- в щелочной (pH 8,0-8,3) морской воде (Marion et al. 2011; Kamennaya et al., 2020), тем самым разрушая мембранный потенциал. Для предотвращения диссипации градиента на основе H^+ антипортеры H^+/Na^+ могут обменивать, по крайней мере, часть периплазматических ионов H^+ на ионы Na^+ (Kamennaya et al., 2020). Такое замещение может сохранять электрический градиент и поддерживать производство АТФ с помощью H^+ -АТФ-синтаз, которые могут транспортировать Na^+ (Dufresne, A. et al. 2003). Паралоги H^+/Na^+ антипортера и Na^+ -управляемой АТФ-синтазы присутствуют во многих геномах морских бактерий (Balabanova et al., 2016; Kamennaya et al., 2020; Nedashkovskaya et al., 2021). Электрический потенциал между кислой положительно заряженной периплазмой и щелочной морской водой будет способствовать диффузии, или, точнее, массопереносу анионов с большим отрицательным зарядом, нежели анионов с меньшим отрицательным зарядом. Таким образом, массоперенос анионов HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} (составляющих соответственно 29% и 0,01% от общего количества P_i в морской воде при pH 8,0)

через анионоселективные порины OmpP будет особенно благоприятным (Pongprayoon et al., 2009; Kamennaya et al., 2020). Эффективная ассоциация основных анионов морской воды (например, Cl^- , HSO_4^- , HCO_3^- и NO_3^-) с катионами также способствует массопереносу свободных анионов P_i . Попадая в периплазму, обогащенную H^+ , анионы HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} связываются с одним или двумя H^+ и катионами металлов, достигая рН-зависимого равновесия видообразования ионных пар и кинетической стабильности нейтрализованных молекул P_i в периплазме, поэтому нарушение мембранного потенциала в экспериментах оказывало лишь незначительное воздействие на P_i , уже накопленного в периплазме (Atlas, et al., 1976; Kamennaya et al., 2020).

Нейтрализация катионов анионами P_i приводит к снижению протонной движущей силы РМФ, однако она может быть восстановлена путем непрерывной экструзии H^+ и катионов металлов через плазматическую мембрану для поддержания массопереноса анионов P_i через каналы поринов до тех пор, пока свободные анионы P_i не смогут массово поступать из окружающей среды (рис. 38). Массоперенос прекратится, когда будет достигнуто равновесие, т.е. все анионы P_i , оставшиеся в морской воде, будут слишком прочно связаны с катионами окружающей среды и молекулами воды. Сила их связи зависит от общего ионного состава окружающей водной среды. В морской воде ассоциация анионов P_i , по-видимому, слабая, поскольку накопление анионов P_i бактериями продолжается вплоть до их концентрации в среде $<10^{-12}$ - $<10^{-15}$ моль·л⁻¹ (Kamennaya et al., 2020). Несмотря на то, что периплазма бактерий насыщается анионами P_i за 1 ч, клетка каким-то образом избегает осаждения солей P_i в периплазме. Для того, чтобы предотвратить образование нерастворимых солей P_i , клетка должна минимизировать концентрацию двухвалентных катионов в периплазме, например, Ca^{2+} и Mg^{2+} , которые образуют с P_i соли низкой растворимости, уравнивая при этом концентрацию моновалентных катионов (например, Na^+ и K^+) и анионов P_i для образования нейтральных растворимых ионных пар по аналогии с обычным фосфатным

буфером. Несмотря на то, что H_2PO_4^- связан с катионами, он не может не образовывать пары ионов, поэтому ионы PO_4^{2-} остаются доступными для PstS-опосредованного импорта (субъединицы PstS имеют специфическое сродство к этим двум формам анионов), поскольку они остаются растворимыми (рис. 38 а†). Образование пар нейтральных ионов будет поддерживать массоперенос анионов HPO_4^{2-} и PO_4^{3-} в периплазму и препятствовать выходу H^+ в морскую воду. Для упрощения механизм периплазматической ассоциации фосфат-катионов под действием H^+ обозначен как периплазматическое фосфатирование (Kamennaya et al., 2020).

Поддержание максимальных скоростей приобретения P_i цианобактериями независимо от наличия световой энергии позволяет предположить, что периплазматическое фосфатирование функционально важно для морских бактерий в целом. Можно выделить три физиологические функции периплазматического фосфатирования: (I) периплазматическая ассоциация P_i с хемиосмотическими катионами накапливает не только P_i , но и катионы. Накопление последних можно рассматривать как сохранение энергии, поскольку импорт H^+/Na^+ через плазматическую мембрану может генерировать АТФ; (II) высокая концентрация P_i , накапливаемая в периплазме, может также обеспечивать постоянное насыщение транспортной системы PstS, которая работает почти на своей максимальной скорости; (III) периплазматическое фосфатирование может иметь осмотическую функцию. Поскольку в периплазме присутствуют и другие осмотически активные молекулы и концентрация соли P_i может еще больше повысить осмолярность периплазмы, это может легко привести к превышению осмолярности морской воды (~ 1 осмоль $\cdot \text{л}^{-1}$) (Kamennaya et al., 2020). Для установления равновесия образовавшегося осмотического перепада молекулы воды будут поступать в периплазму, увеличивая ее объем и тургор наружной мембраны (рис. 38а†), которая в данном случае «работает» как несущий элемент (Rojas et al., 2018).

Таким образом, периплазматическое фосфатирование необходимо бактериальным клеткам как для осмотической регуляции, так

и для сохранения и накопления энергии - процесса, сопряженного с накоплением и привлечением жизненно важного P_i .

Таким образом, поскольку традиционный механизм P_i -специфического транспорта не может объяснить накопление P_i у морских бактерий, альтернативный механизм периплазматического фосфатирования, при котором периплазматические анионы P_i образуют пары с хемиосмотическими катионами РМФ, может обеспечить периплазматическую осмолярность морских бактерий за счет миллионов накопленных P_i . Явлением периплазматического фосфатирования можно объяснить существование высокоактивных ЩФ, неингибируемых высокими концентрациями P_i , у галофильных и умеренно галофильных бактерий, которыми являются обитатели засоленных почв, морские бактерии, а также микроорганизмы, колонизирующие внутренние органы животных и человека, в частности, мочевыделительную систему, где необходимо поддерживать осмолярность для своего выживания.

Глава 5. ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОГЕОХИМИЧЕСКАЯ РОЛЬ ЩЕЛОЧНЫХ ФОСФАТАЗ МИКРООРГАНИЗМОВ

5.1. Место щелочных фосфатаз в фосфатном метаболизме

Фосфор (P) является одним из наиболее важных макронутриентов на планете, а микроорганизмы, в том числе бактерии и археи, играют ключевую роль в круговороте фосфора во всех живых существах и экосистемах. На сегодняшний день появляются все более совершенные базы данных микроорганизмов, такие, например, как PCусDB с выверенными функциональными аннотациями генов одновременно по нескольким источникам (базы данных agCOG, COG, eggNOG и KEGG), что существенно облегчает анализ биохимического потенциала микробных сообществ, осуществляющих круговорот фосфора в типичных местах обитания естественных и искусственных экосистем (рис. 39).

Анализ 139 семейств известных и недавно обнаруженных генов фосфатного метаболизма показал, что пуриновый и пиримидиновый метаболизм являются наиболее широко распространенными биохимическими процессами, участвующими в модуляции процесса рециклинга фосфора, за ними следуют транспортеры и двухкомпонентные сигнальные системы, что свидетельствует о большой потребности в фосфоре во всех местообитаниях живых организмов (рис. 39). Было обнаружено, что численность генов специфических гидролаз (лиаз) органических фосфоэфиров (*phnGHIJKLMNOP*; *phnDEC*, *phnSTUV*, *aepXVWSP*; *lysR*, *phnA* и *phnR*), расщепляющих связи С-О-Р и С-Р, а также генов кислых фосфатаз, во всех биотопах ниже, чем генов ЩФ *phoA*, *phoD*, *phoX* и *pafA* и их специфических транспортеров (*pstSCAB*), за исключением мангровых биотопов. Это свидетельствует о том, что набор генов микроорганизмов зависит от места их обитания и важной роли микробиальных ЩФ в круговороте фосфора в природе (Zeng et al., 2022). Однако из сказанного в предыдущих главах вытекает предположение о том, что ЩФ микроорганизмов играют огромную роль не только в получении жизненно важного для них макроэлемента Р из органических фосфатов как альтернативного источника

PEP – фосфоенолпируват; PGA – 2-фосфоглицерат и 3-фосфоглицерат; PRPP – α -D-рибоза-1-дифосфат-5P; GAR – 5'-фосфорибозилглицинамид; FGAR, 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамид; FGAM, 2-(формамидо)-N1-(5'-фосфорибозил) ацетамидин; AIR, риботид аминимидазола; CAIR, 1-(5'-фосфо-D-рибозил)-5-амино-4-имидазолкарбоксилат; N5-CAIR, 5-карбоксиямино-1-(5-фосфо-D-рибозил)-имидазол; SAICAR, 1-(5'-фосфо-D-рибозил)-5-амино-4-(N-сукцинокарбоксамид)-имидазол; AICAR, 1-(5'-фосфорибозил)-5-амино-4-имидазолкарбоксамид; FAICAR, 1-(5'-фосфорибозил)-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид (Zeng et al., 2022).

5.2. Участие щелочных фосфатаз в реминерализации органических фосфатов и круговороте фосфора, углерода и азота

Недоступность P_i может ограничивать любую первичную продукцию и скорость роста микроорганизмов, что приводит к использованию ими множества доступных органических форм фосфатов. Известно, что в природе ЩФ микроорганизмов катализируют гидролиз таких фосфомоноэфиров, как β -глюкозофосфат, 5'- и 3'-концы ДНК и РНК, рибо- и дезоксирибонуклеотидмонофосфаты, дифосфаты и трифосфаты (НМФ, НДФ, НТФ и дНМФ, дНДФ, дНТФ), фосфатидаты липидов, полифосфат и пирофосфат (McComb et al., 1979; Plisova et al., 2005; Omelon et al., 2013; Asgeirsson et al., 2020; Zhou et al., 2021; Westermann et al., 2023; Harroun et al., 2023). Согласно последним данным, многие бактериальные ЩФ обладают каталитической и соответственно субстратной неразборчивостью (Lassila, 2008; Durate et al., 2013; Barrozo et al., 2015; Sunden, 2016; Zhou et al., 2021; Srivastava et al., 2021), поэтому могут участвовать наряду со специфичными фосфоди- и триэстеразами в реминерализации органических фосфоди- и фосфотриэфиров в окружающей среде, что имеет большое экологическое значение (рис. 40).

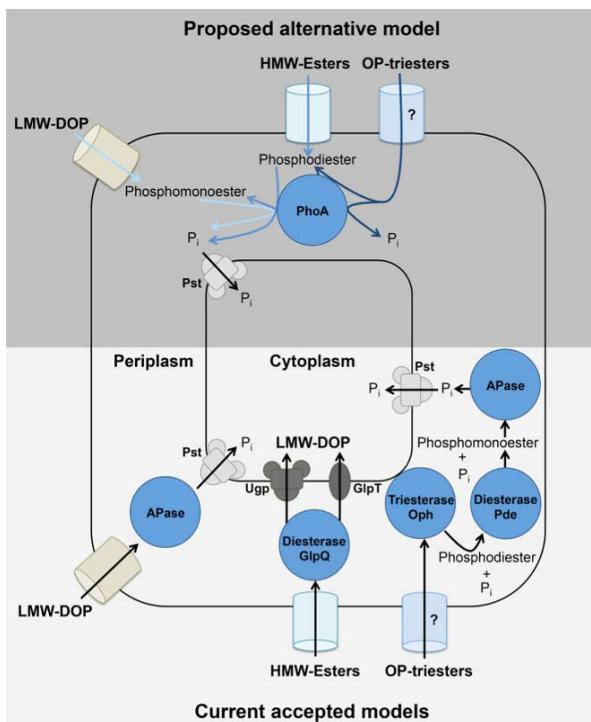


Рис. 40. Классическая (внизу) и альтернативная (вверху) модели реминерализации органических фосфатов бактериальной клеткой, основанные на использовании специфических фосфатгидролаз (внизу) и субстратной неспецифичности ЩФPhoA (вверху), обнаруженной в исследовании Srivastava et al. (2021): APase – щелочная фосфатаза; Oph – фосфотриэстераза или фосфорорганическая гидролаза; GlpQ – глицерофосфодиэфирфосфодиэстераза; GlpT – *sn*-глицерол-3-фосфатный транспортер; HMW-фосфоэфиры высокомолекулярные; LMW-DOP – низкомолекулярные растворенные органические фосфоэфиры; OP – органические триэфиры фосфорной кислоты; Pde – фосфодиэстераза; PhoA –ЩФ семейства PhoA; Pi – неорганический фосфат; Pst – высокоаффинный транспортер Pi; Ugp – *sn*-глицерол-3-фосфатный ABC-транспортер (Srivastava et al., 2021).

Кроме того, минерализация органического Р-содержащего субстрата влечет за собой реминерализацию органических аминов в неорганический аммоний, укрепляя связь между колимитирующими биогенными циклами в океане (Westermann et al., 2023). Было показано, что катаболические пути деградации общих для всех фосфолипидов – фосфохолина (ФХ) и фосфорилэтанолamina (ФЭ) у морской α -протеобактерии *Phaeobacter* sp. MED193, представляет собой внеклеточный гидролиз, включающий дефосфорилирование липидов щелочной фосфатазой PhoX-типа и высвобождающий азотсодержащие субстраты – этаноламин и холин (рис. 41).

Транспортеры этаноламина (EtoX) и холина (BetT) повсеместно распространены в Мировом океане во всей толще воды, что подчеркивает важность катаболизма фосфолипидов (Westermann et al., 2023). Таким образом, катаболическая активация путей деградации этаноламина и холина, следующая за метаболизмом фосфолипидов, специфически связывает, а значит, и объединяет циклы фосфора, азота и углерода (Westermann et al., 2023). Тейхоевые кислоты клеточной стенки грамположительных бактерий *B. subtilis* в условиях фосфорного голодания также подвергаются деградации с участием ЩФ PhoD (Rodriguez et al., 2014).

Более того, результаты последних исследований активности ЩФ в биосфере Мариинской впадины в хадальной зоне (зона глубин свыше 6000 м) указывают на тесную связь между Р- и С-циклами, опосредованными взаимным обменом веществ между микроорганизмами (Fang et al., 2022). Для удовлетворения своих потребностей в углероде микроорганизмы, обитающие на больших океанских глубинах, вероятно, используют стратегию «обратной связи» в отношении обитателей поверхностных вод, которые испытывают дефицит фосфора ($110 \text{ нмоль} \cdot \text{л}^{-1}$), благодаря поддержанию высокого уровня синтеза своей ЩФ и накоплению высоких концентраций Р на глубине ($2,2 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$) (Fang et al., 2022).

бетаинового альдегида (MED193_21681); BetA: дегидрогеназа холина (MED193_21686); ChoW: ABC-транспортер, пермеазный компонент (MED193_07693); ChoV: ABC-транспортер, АТФ-связывающий компонент (MED193_07698); ChoX: ABC-транспортер, бетаин/карнитин/холин-связывающий белок (MED193_07703); RpiR: регулятор RpiR (MED193_10021); GGAH: γ -глутамилглицин амидогидролаза (MED193_10026), EtoV: TRAP-транспортер, малый пермеазный компонент (MED193_10031); EtoW: TRAP-транспортер, большой пермеазный компонент (MED193_10036); EtoX: TRAP-транспортер, этаноламин-связывающий белок (MED193_10041); ETAGA: этаноламин γ -глутамилаза (MED193_10046); GAADDH: Γ -глутамилацетил-альдегиддегидрогеназа (MED193_10051); GETADH: γ -глутамилэтаноламид дегидрогеназа (MED193_10056); PstA: ABC-транспортер, пермеазный компонент (MED193_04047); PstB: ABC-транспортер, пермеазный компонент (MED193_04052); PstC: ABC-транспортер, АТФ-связывающий компонент (MED193_04057); PstS: ABC-транспортер, Pi-связывающий белок (MED193_04062). **(D)** Анализ микромасштабного термофореза, определяющий средство связывания MED193_10041 с этаноламином. Очищенный белок смешивали с растворами этаноламина, полученными в результате последовательных разведений, и измеряли средство к связыванию. По оси X отложена логарифмическая концентрация этаноламина **(M)**, по оси Y – нормализованная флуоресценция (Fnorm). Аффинность связывания рассчитывалась с учетом K_d , равного $7,88 \pm 1,88$ мкМ, $n = 3$ (Westermann et al., 2023).

Кроме того, ЩФ неспецифически дефосфорилируют некоторые белки, многие из которых включены в систему межклеточной коммуникации как прокариот, так и эукариот (Fuhrmann et al., 2013). Наряду с этим, недавно было показано, что ЩФ участвуют в регуляции локальных микробиомов, индукции минерализации биопленок и экзоскелетов беспозвоночных, ремедиации тяжелых металлов и органических загрязнений, при этом регуляция экспрессии генов *pho*-регулона тесно сопряжена с рядом других метаболических процессов (Golotin et al., 2015; Doing et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Dong et al., 2022; Singh et al., 2022). Так, в штамме *E. coli* K-12 транскрипционные факторы PhoB (*cis*-регуляторные элементы промотора), участвующие в регуляции экспрессии генов фосфатного регулона (рис. 17), которая связана с поглощением и метаболизмом фосфора и контролем за внеклеточной концентрацией P_i , также участвуют в регуляции клеточного гомеостаза ионов железа (Fur) и метаболизма жирных кислот и фосфолипидов (FadR) (Skouri-Panet et al., 2017).

5.3. Участие щелочной фосфатазы микроорганизмов в конкурентной борьбе и симбиотических взаимоотношениях

Регуляция экспрессии ЩФ индивидуального микроорганизма может быть сопряжена не только со своими клеточными процессами, но и метаболическими процессами других конкурентных членов микробиома, включая патогены, и это имеет стратегически важное значение для изучения механизмов патогенеза и разработки средств борьбы с инфекциями (Doing et al., 2020). Результаты транскриптомного анализа совместной культуры клеток оппортунистических патогенов *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans* показали, что выработка псевдомонадой антифунгицида – 5-метил-феназин-1-карбоновой кислоты (5-MPCA), в ответ на продукцию дрожжами *C. albicans* этанола зависит от доступности и концентрации в окружающей среде P_i (Doing et al., 2020). Антагонизм этих микроорганизмов начинается с возбуждения транскрипции регулятора PhoB у *P. Aeruginosa* метаболитом микроскопического гриба,

Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции

стимулирующего синтез ЦФ и активное образование P_i , необходимого для продукции 5-MPCA. В ответ на это, *C. albicans* увеличивает активность своего фосфатного регулятора Pho4 и секрецию фосфатазы, что, вероятно, высвобождает дополнительное количество P_i для того, чтобы подавить PhoB-зависимую продукцию 5-MPCA у конкурента *P. aeruginosa* (рис. 42).

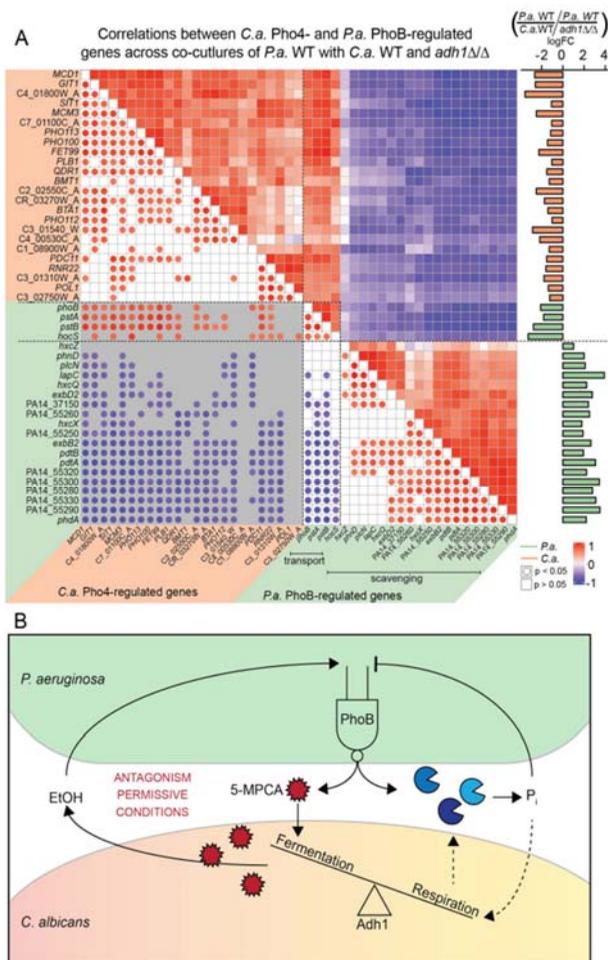


Рис. 42. *P. aeruginosa* (*P.a.*) и *C. albicans* (*C.a.*) асинхронно реагируют на низкий уровень фосфатов. (А) Анализ корреляции Пирсона между транскриптами, реагирующими на низкое содержание

фосфатов в *P.a.* (зеленые аннотации) и *C.a.* (оранжевые аннотации), полученных при совместном культивировании *P.a.* WT с *C.a.* WT (дикого типа) или *adh1* Δ/Δ (мутанта, не вырабатывающего этанол). Очевидны обратные межвидовые корреляции между PhoB- и Pho4-регулируемыми генами *P.a.* Значения корреляции Log₂FC (p) обозначены интенсивностью цвета относительно шкалы. Сравнения одного вида имеют белый фон, межвидовые корреляции – серый фон. **(В)** Модель активности PhoB в совместных культурах *P.a.*-*C.a.* PhoB опосредует условную продукцию антагонистического противогрибкового феназина 5-MPCA в ответ на низкий уровень фосфатов и выработку грибами этанола (Doing et al., 2020).

Проведенное на мышах линии Balb/c *in vivo* исследование по выяснению влияния очищенного фермента ЩФ *E. coli* на инфекцию, вызванную *P. aeruginosa*, показало, что ЩФ уменьшает количество патогенных бактерий в печени, селезенке и легких с достоверными различиями ($P < 0,05$) (Hashem et al. 2016). Кроме того, у инфицированных мышей, получающих препарат ЩФ *E. coli*, происходило достоверное повышение уровня цитокинов (IL-6, IL-10 и IL-12) по сравнению с контрольной группой. Активность экзогенной ЩФ *E. coli* также положительно модулировала рост комменсальных бактерий у животных, что, вероятно, приводило к усилению их конкуренции с возбудителем инфекции и снижению выработки им энтеротоксинов (Hashem et al., 2016).

В случае симбиотических отношений, было доказано, что арбускулярный микоризный гриб *Gigaspora margarita*, являющийся облигатным микроорганизмом ризосфер растений *Glomus intraradices*, использует ЩФ для регулярной поставки организму-хозяину P_i из почвы в обмен на получение биодоступного углерода (Aono et al., 2004).

5.4. Роль щелочной фосфатазы в индуцированной минерализации гидроксиапатита в биопленках

Большое отношение площади поверхности бактерий к их объему делает идеальным их местонахождение для зарождения кристаллов. Их поверхность, покрытая функциональными группами со

Щелочные фосфатазы: распространение в природе и биологические функции

свободным отрицательным зарядом, действует как концентратор и поглотитель катионов металлов из окружающей среды (Hoffmann et al., 2021). Отрицательный заряд поверхности клеток у грамположительных бактерий придают карбоксильные ($R-CO_2H$) и фосфатные группы ($R-PO_4H_2$) теиховых кислот, у грамотрицательных бактерий – фосфолипиды и липополисахариды (ЛПС) (Madigan et al., 2018). S-слои бактерий дополнительно влияют на заряд поверхности в зависимости от наличия или отсутствия гликолевых белков S-слоя с гликозилированными длинными углеводными цепями, а также в зависимости от структурных групп, экспонированных в порах их решетки (Hoffmann et al., 2021). Эти структуры бактериальной поверхности представлены на рисунке 43.

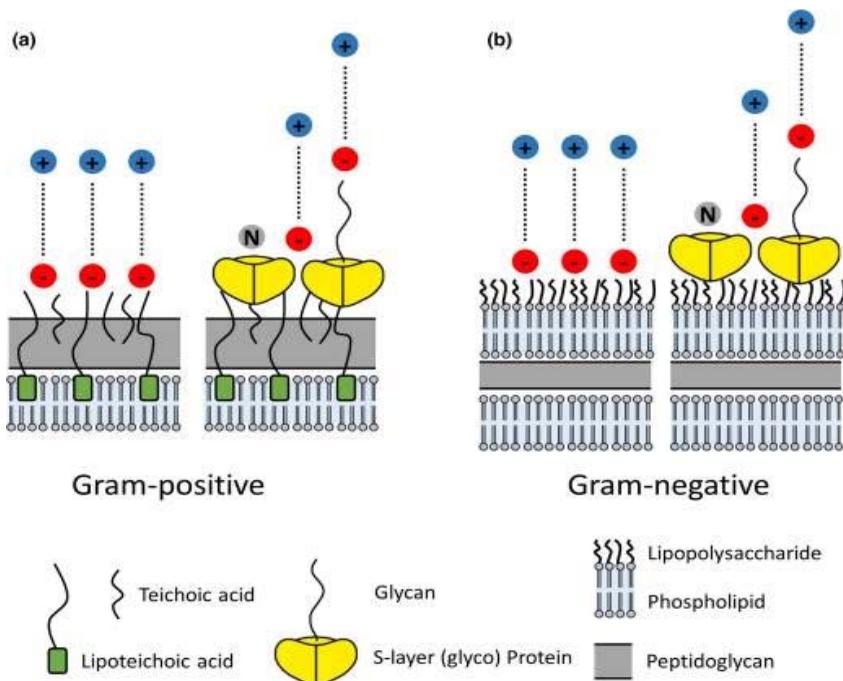


Рис. 43. Схема основных надмолекулярных структур в поверхностной архитектуре (a) грамположительных и (b) грамотрицательных бактерий, которые обеспечивают доступность сайтов взаимодействия с катионами металлов. Красные круги представляют собой

112

участки с отрицательным зарядом, серые – с нейтральным, синие – с положительно заряженными катионами, пунктирные линии иллюстрируют взаимодействие между отрицательными и положительными зарядами (Hoffmann et al., 2021).

Внеклеточные полимерные вещества, капсулы, оболочки, слизь и матрица биопленки, могут дополнительно окружать грамположительные и грамотрицательные бактерии. Они, как правило, имеют отрицательный заряд, придаваемый карбоксильными и фосфатными группами, которые могут свободно взаимодействовать с растворимыми катионами (Hoffmann et al., 2021). Микробные биопленки образуются для выживания в сложных условиях окружающей среды посредством колонизации различных поверхностей в результате синтеза компонентов внеклеточного матрикса. В некоторых биопленках происходит минерализация микроорганизмов в результате адвентивного осаждения неорганических соединений, обусловленного различными метаболическими процессами. Наиболее распространенными минералами, осаждаемыми бактериями, являются карбонаты и фосфаты кальция, и они обычно накапливаются на поверхности бактерий (эпицеллюлярная минерализация), которые затем встраиваются в растущие кристаллы (Zorzetto et al., 2023). Понимание процесса отложения минералов в бактериальных биопленках важно по нескольким причинам. С одной стороны, патологическая минерализация может приводить к целому ряду заболеваний, включая образование зубного камня при пародонтите и камней в почках при патологиях обменных процессов. С другой стороны, бактериальные биопленки представляют интерес в качестве материала, имеющего потенциальное техническое применение. В последнем случае минерализация может служить одной из возможных стратегий модификации механических и других физических свойств пленки (Zorzetto et al., 2023).

Концентрации ионов кальция и фосфата обычно недостаточно высоки, чтобы вызывать спонтанное выпадение осадка. Но поскольку бактериальная ШФ была признана индикатором пародонтита, можно предположить сходство механизмов отложения минералов у бактерий и в клетках костной ткани у эукариот

(Zorzetto et al., 2023). Однако в костях млекопитающих фосфаты кальция откладываются в виде гидроксиапатита в результате тонко настроенного процесса «биологически контролируемой минерализации», который приводит к образованию функционального материала с высоким уровнем пространственной организации, сложной морфологией и структурой, в отличие от спонтанной «биологически индуцированной минерализации», происходящей у большинства прокариот (Mann, 2001). ЩФ костной ткани катализирует гидролиз полифосфатов и фосфатных эфиров из органических источников (например, алкалоидов и белков) и делает их доступными для взаимодействия с катионами (например, кальцием). На примере биопленок *E. coli*, выращенных на твердой среде, также было показано, что осаждение частиц гидроксиапатита происходит в присутствии ионов кальция и β -глицерофосфата, и этот процесс биоминерализации активно поддерживается бактериальной ЩФ (рис. 44).

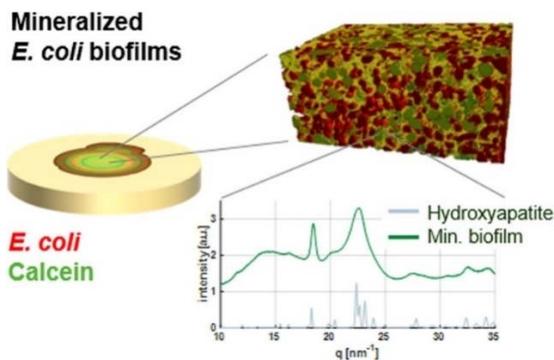


Рис. 44. Исследование минерализации биопленок кишечной палочки штамма *E. coli* K-12 W3110, который продуцирует волокнистый матрикс на основе амилоида. Минерализация биопленок происходила в условиях выращивания штамма на питательных агаровых субстратах с добавлением ионов кальция и β -глицерофосфата. Минеральную фазу локализовали в различных масштабах с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии и рентгеновской микротомографии. Широкоугольное рассеяние рентгеновских лучей позволило дополнительно идентифицировать минерал

как гидроксиапатит. Учитывая важную роль фермента ЩФ в осаждении фосфата кальция в костной ткани млекопитающих, было проверено, участвует ли периплазматическая ЩФ, экспрессируемая геном *phoA E. coli*, в минерализации биопленки. Было показано, что биопленки *E. coli*, выращенные на минерализующей среде с ингибитором ЩФ, подвергаются минерализации в меньшей степени и с задержкой, тогда как очищенный препарат ЩФ *E. coli*, добавленный на поверхность минерализующей агаризованной среды, индуцировал минерализацию биопленки (Zorzetto et al., 2023).

Несмотря на то, что минерализация приводит к гибели значительной части бактерий, образующийся композитный материал может обеспечивать защиту небольшого числа выживших бактерий и, в целом, всего микробного сообщества (Cosmidis et al., 2015). Исходя из этого, менее минерализованный слой, находящийся между минерализованными верхним и нижним слоями, может стать средой, в которой бактерии наиболее защищены от воздействия окружающей среды (рис. 44). Минерализованные слои могут блокировать дальнейшую диффузию предшественников минерализации и предотвращать минерализацию всей биопленки и ее бактериальной популяции. Таким образом, гибель части бактерий в результате частичной или полной минерализации может быть выгодным с популяционной точки зрения. В некоторых случаях «жертвоприношение» бактерий заключается в переходе в состояние покоя, так называемое жизнеспособное некультивируемое состояние (Zorzetto et al., 2023).

Однако очевидной корреляции между появлением минерализованных слоев и структурой поперечного сечения неминерализованных биопленок, созданных теми же бактериями, не существует. Поэтому остается неясным, контролируется ли коллективным сообществом бактерий эта слоистая геометрия, или же она является результатом физико-химических явлений, включающих комбинацию диффузии и фазовых переходов. Действительно, слоистые периодические структуры гидроксиапатита, напоминающие кольца Лизеганга, спонтанно формируются в агаре в присутствии неорганических источников ионов кальция и фосфата, возникающего по-

сле ферментативного высвобождения фосфат-ионов из β -глицерофосфата (рис. 44). Явление, основанное на диффузии, может объяснить слоистую картину минерализации в биопленках, а также появление слоя минерализации, обнаруженного внутри агарового субстрата, находящегося относительно далеко от самих бактерий (Zorzetto et al., 2023).

Тем не менее, подобно роли коллагена в образовании костного апатита (Wang et al., 2012), белковые волокна матрикса микробной биопленки (curli), благодаря благоприятному взаимодействию между ионами металлов и заряженными аминокислотами (Tavafoghi et al., 2016), могут участвовать в зарождении минеральных кристаллов, в частности, служить каркасом для минерализации гидроксиапатита (Abdali et al., 2020). Кроме того, матрица биопленки *E. coli* может влиять на рост и морфологию кристаллов гидроксиапатита подобно тому, как матрица биопленки *B. subtilis* влияет на образование кристаллов карбоната кальция (Azulay et al., 2018).

5.5. Участие щелочных фосфатаз в геохимических процессах образования минералов

Наконец, ЩФ имеют глобальное биогеохимическое значение, являясь одними из самых распространенных ферментов почв и Мирового океана, участвующих в реминерализации различных органических фосфоросодержащих соединений (Ragot et al., 2017; Zheng et al., 2019; Noskova et al., 2019; Lidbury et al., 2021; Srivastava et al., 2021; Fang et al., 2022; Wan et al., 2022; Zeng et al., 2022). Кроме того, морские бактерии могут аккумулировать P_i в большом количестве как в периплазме (рис. 38, 40), так и в цитоплазме в виде полиР с последующим его высвобождением из клеток в окружающую среду и одновременным увеличением уровня своей фосфатазной активности (Ghyoot et al., 2015; Kamennaya et al., 2020; Srivastava et al., 2021; Lidbury et al., 2021). По литературным данным содержание ЩФ в донных отложениях и почвах находится в широком диапазоне: $0,00005-12,02 \text{ ед} \cdot \text{г}^{-1}$ и $0,00018-2,27 \text{ ед} \cdot \text{г}^{-1}$ соответственно (Wan et al., 2022). Высокая активность ЩФ, которая может достигать сотен мкмоль $\text{д}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}$, является причиной существенного вклада этих ферментов в скорость гидролиза моноэфиров органических фосфатов (GP, G6P, и AMP) (рис. 45). В то же время

скорость гидролиза фосфоангидридов и фитиновой кислоты как под действием фосфатаз, так и оксидных минералов, выступающих в роли абиотических катализаторов, относительно невысока и достигает лишь нескольких $\mu\text{mol} \cdot \text{d}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ вследствие их высокой стабильности в условиях окружающей среды (рис. 45).

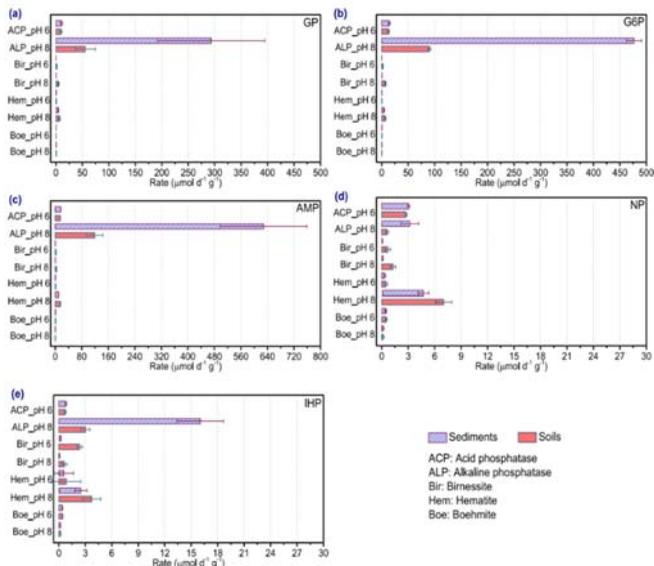


Рис. 45. Расчетный диапазон скоростей гидролиза органических фосфатов кислотными/щелочными фосфатазами и оксидными минералами Mn/Fe/Al при pH 6 или 8 в почвах и донных отложениях. (a-e) – расчетные данные для фосфатов: глицерофосфат (GP), глюкозо-6-фосфат (G6P), аденозинмонофосфат (AMP), нуклеотидфосфат (NP) и инозитолгксокисфосфат (IHP). Содержание и распределение фосфатаз и оксидных минералов (бирнессит, гематит, боэмит) оценивалось по литературным данным (Wan et al., 2022).

Таким образом, ферменты микроорганизмов принимают активное участие в глобальных биогеохимических процессах на Земле путем энзиматической индукции зародышеобразования (нуклеации) и роста кристаллов природных минералов, в частности, фосфоритов и апатитов (Omelson et al., 2013; Skouri-Panet et al., 2017; Wan et al., 2022).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель авторов этой монографии заключалась в том, чтобы в концентрированном виде представить обширную информацию об одних из самых распространенных и жизненно важных ферментах, щелочных фосфатазах, показав при этом читателю, какую роль они играют в природной среде и какую пользу могут принести человечеству глубокие знания об особенностях их каталитического действия.

В последние годы произошли серьезные изменения в области исследований структуры, функции, механизма действия и метаболизма различных белков и ферментов. Ярким примером этому является щелочная фосфатаза. С одной стороны, она представляет собой наиболее охарактеризованный на сегодняшний день фермент, а с другой, ее биологическая роль в организме, биомах и круговороте фосфора в природе, без которого невозможно существование жизни на Земле, оказалась гораздо сложнее и шире, чем предполагалось ранее.

Среди трех типов фосфоэфирных связей, существующих в природе, фосфоди- и триэфирные связи исключительно стабильны, с периодом полураспада около 3×10^7 лет при умеренной температуре и нейтральном значении pH, в то время как ускорение их разрыва (до 10^{16} раз) может быть достигнуто только путем ферментативного гидролиза высокоспециализированными металлоферментами, такими как нуклеазы и фосфоэстеразы. Благодаря универсальности механизма каталитического действия щелочных фосфатаз в отношении фосфоэфирных связей, продемонстрированного в результате масштабных исследований, эти ферменты признаны наиболее широко распространенными в природе. Поражает воображение не только масштаб участия этого фермента в метаболических процессах, как в собственном организме-производителе, так и в организмах других обитателей биологического сообщества, от бактерий до человека, но и множественность его изоформ и многофункциональность каждой из них при сохранении общности и универсальности каталитического механизма нуклеофильной атаки.

Экологическое значение этих ферментов как для природы, так и для человечества в целом стало очевидным после того, как появились доказательства каталитического действия щелочных фосфатаз в отношении сложных органических фосфатов, включая фосфоди- и триэфиры, к которым относятся многие нейротоксичные антропогенные загрязнения в окружающей среде. Заслуживает внимания и тот факт, что фосфомоноэстеразная активность, увеличивающая скорость гидролиза (до 10^{27} раз) широкого спектра биомолекул (белков, нуклеиновых кислот и липидов), является отличительным свойством этих ферментов независимо от принадлежности к тому или иному структурному семейству белков. Это указывает на масштабность и важность роли этих ферментов для самых разнообразных природных процессов: энергетического обмена, репарации и модификации ДНК, биоминерализации, а также регуляции концентрации вторичных метаболитов, в частности, свободных нуклеотидов, необходимых для продолжения жизни и рециркуляции фосфора на Земле. Так, щелочная фосфатаза структурного семейства PhoA (SmAP) морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (Коллекция морских микроорганизмов, Тихоокеанский институт биорганической химии им. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук (ГИБОХ ДВО РАН)), выделенная из целомической жидкости мидии *Crenomytilus grayanus*, вероятно, способствует минерализации раковины моллюска-хозяина и разрушает биопленки многих видов бактериальных патогенов. Детали биологического действия SmAP до сих пор остается неясными, изучение механизмов этих процессов продолжается.

Тем не менее, не до конца изученными остаются вопросы метаболизма щелочных фосфатаз, а именно, их участие в механизмах межклеточной регуляции биологических процессов, как в многоклеточном организме, так и в микробиомах с многовидовым составом. Предполагается, что щелочные фосфатазы вовлечены в такие важные клеточные события, как регуляция фосфорилирования белков, рост клеток, апоптоз и клеточная миграция. Поэтому большинство патологических состояний или заболеваний человека сопровождаются изменением уровня экспрессии щелочной фосфатазы, что является диагностическим признаком этих состояний и может

стать основой соответственных терапевтических подходов. Следует упомянуть и недавно обнаруженные функции щелочных фосфатаз, такие как поддержание гомеостаза тканей и органов путем инактивации бактериальных липополисахаридов (ЛПС), регуляция клеточной секреции, управление видовым составом и жизненным циклом клеток микробиомов и опухолей. Эти свойства щелочных фосфатаз, а также, возможно, способность к детоксикации гиперфосфорилированных внеклеточных белков тау, которые играют ключевую роль в прогрессировании болезни Альцгеймера, несомненно, дадут толчок к пониманию этиологии и способов лечения многих патологий.

Рекомбинантная человеческая кишечная щелочная фосфатаза (IAP) прошла третью фазу клинических испытаний, связанных с инактивацией ЛПС и медиаторов воспаления для лечения хирургических заболеваний и метаболических нарушений. Развитию этого нового подхода к лечению будет немало способствовать поиск новых источников щелочных фосфатаз среди морских объектов, обладающих высокоэффективной дефосфорилирующей активностью и широкой субстратной специфичностью, а также последующее изучение механизма их действия.

На сегодняшний день поиск и изучение новых ферментов с фосфоэстеразной активностью все еще остается сложной задачей для биотехнологии из-за некоторых присущих им ограничений, таких как нежелательная селективность в отношении некоторых субстратов, трудности в выделении или синтезе, узкий диапазон рабочих температур и pH, в целом высокая стоимость обеспечения технологических процессов. В связи с этим, детальное изучение структурно-функциональной зависимости щелочных фосфатаз, известных и новых, разработка их рекомбинантных аналогов не теряет своей актуальности. Особое место среди перспективных направлений исследований в этой захватывающей области энзимологии занимают вопросы поиска новых мишеней в человеческом организме для направленного действия щелочных фосфатаз как на генетическом, так и молекулярном уровнях. Об этом речь пойдет в отдельной книге.

СОКРАЩЕНИЯ

- ЩФ – щелочные фосфатазы.
КФ – классификация ферментов.
P_i – фосфат неорганический (inorganic phosphate).
P – фосфор.
полиP – полифосфат.
АМФ – аденозинмонофосфат.
ГМФ – гуанозинмонофосфат.
PhoA, PhoX, PhoD, PafA – белковые семейства в структурной классификации ЩФ.
StAP – высокоактивная щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296.
КММ – коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН.
ЛПС – липополисахарид
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.
РНК – рибонуклеиновая кислота.
TNAP (Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase) – тканенеспецифичная щелочная фосфатаза человека.
IAP (Intestinal Alkaline Phosphatase) – кишечная щелочная фосфатаза человека.
PLAP (Placental Alkaline Phosphatase) – плацентарная щелочная фосфатаза человека.
K_M – константа Михаэлиса.
VAP – щелочная фосфатаза *Vibrio* sp. G15-21.
у.а. – удельная активность фермента.
k_{cat} – число оборотов фермента (максимальное количество субстрата, которое фермент может преобразовать в продукт реакции в единицу времени).
k_{cat}/K_M – эффективность ферментативной реакции (катализа).
pK_a – показатель константы диссоциации.
PDB (Protein Data Base) – международная база белковых структур.
TAP – щелочная фосфатаза антарктической бактерии штамма TAB5.
ESAP – щелочная фосфатаза *Escherichia coli*.
NPP – нуклеотидпирофосфатаза/фосфодиэстераза.
ФДЭ – фосфодиэстераза.
PMH – фосфонатмоноэфиргидролаза.
AS – арилсульфатаза.
PAS – арилсульфатаза *Pseudomonas aeruginosa*.

RIPMH – фосфонатмоноэфиргидролаза *Rhizobium leguminosarum*.

BcPMH – фосфонатмоноэфиргидролаза *Burkholderia caryophylli*.

PTE – фосфотриэстераза.

п-НФФ – *para*-нитрофенилфосфат (4-нитрофенилфосфат).

п-НФ – *n*-нитрофенол (4-нитрофенол).

Zn₁²⁺ и Zn₂²⁺ – ионы цинка в первом и втором соответственно металлосвязывающем сайтах активного центра ЩФ.

fGly – нуклеофил формилглицин.

PSI – ковалентно связанный фосфосериновый интермедиат (промежуточное соединение в реакции ферментативного гидролиза фосфата).

QM:QM/QM:MM – квантово-механические/молекулярно-механические методы расчета.

TS (transition state) – переходное состояние каталитической реакции.

LFER – линейные эмпирические соотношения свободной энергии.

Да (Дальтон) – единица измерения молекулярной массы белков.

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфаты.

PhoB/PhoR – двухкомпонентная система трансдукции.

PstSCAB – многокомпонентная фосфат-специфичная транспортная система.

MOE (Molecular Operating Environment) – программная платформа для молекулярного дизайна, которая объединяет в одном пакете визуализацию, моделирование и симуляцию.

RMSD – значение среднеквадратичного отклонения Ca-атомов 3-D структуры молекулы при суперпозиции с установленной структурой прототипа.

SCOP (Structural Classification of Proteins) – база данных семейств белков с общими функциональными и структурными особенностями (доменами), которые, как предполагается, происходят от общего эволюционного предка.

InterPro – база данных белковых семейств, доменов и функциональных сайтов Европейского Института Биоинформатики для интерактивного анализа и классификации белковых последовательностей.

His x 6 – дополнительная последовательность аминокислотных остатков в рекомбинантном белке для проведения металлоаффинной хроматографии.

Список литературы

1. Abdali Z. [и др.]. Curli-Mediated Self-Assembly of a Fibrous Protein Scaffold for Hydroxyapatite Mineralization // *ACS Synth. Biol.* 2020. № 12 (9). С. 3334–3343.
2. Alexiev A. [и др.]. Draft Genome Sequence of *Cobetia sp.* UCD-24C, Isolated from Roots and Leaves of the Seagrass *Zostera marina* // *Genome Announcements*. 2016. № 2 (4).
3. Andrews L. D., Fenn T. D., Herschlag D. Ground State Destabilization by Anionic Nucleophiles Contributes to the Activity of Phosphoryl Transfer Enzymes // *PLoS Biology*. 2013. № 7 (11). С. e1001599.
4. Andrews L. D., Zalatan J. G., Herschlag D. Probing the Origins of Catalytic Discrimination between Phosphate and Sulfate Monoester Hydrolysis: Comparative Analysis of Alkaline Phosphatase and Protein Tyrosine Phosphatases // *Biochemistry*. 2014. № 43 (53). С. 6811–6819.
5. Aono T. [и др.]. Expression of Alkaline Phosphatase Genes in Arbuscular Mycorrhizas // *The New Phytologist*. 2004. № 2 (162). С. 525–534.
6. Applebury M. L., Coleman J. E. *Escherichia coli* alkaline phosphatase. Metal binding, protein conformation, and quaternary structure // *The Journal of Biological Chemistry*. 1969. № 2 (244). С. 308–318.
7. Applebury M. L., Johnson B. P., Coleman J. E. Phosphate binding to alkaline phosphatase. Metal ion dependence. // *The Journal of biological chemistry*. 1970. (245 19). С. 4968–76.
8. Applebury M. L., Johnson B. P., Coleman J. E. Phosphate binding to alkaline phosphatase. Metal ion dependence // *The Journal of Biological Chemistry*. 1970. № 19 (245). С. 4968–4976.
9. Ásgeirsson B. [и др.]. X-ray crystal structure of *Vibrio* alkaline phosphatase with the non-competitive inhibitor cyclohexylamine // *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2020. (24). С. 100830.
10. Atlan D., Portalier R. Purification of extracellular alkaline phosphatase released by *Escherichia coli* excretory mutants // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1987. № 4 (26). С. 318–322.
11. Atlas E. L., Culbertson C. H., Pytkowicz R. M. Phosphate association with Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ in seawater // *Marine Chemistry*. 1976. (4). С. 243–254.
12. Aw W., Fukuda S. Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes mellitus // *Journal of Diabetes Investigation*. 2017. № 1 (9). С. 5–12.

13. Azulay D. N. [и др.]. Biopolymers from a bacterial extracellular matrix affect the morphology and structure of calcium carbonate crystals // *Crystal Growth & Design*. URL: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:105549507>.

14. Azulay D. N. [и др.]. Biopolymers from a bacterial extracellular matrix affect the morphology and structure of calcium carbonate crystals // *Crystal Growth & Design*. 2018. № 9 (18). С. 5582–5591.

15. Bachhawat P. [и др.]. Mechanism of Activation for Transcription Factor PhoB Suggested by Different Modes of Dimerization in the Inactive and Active States // *Structure*. 2005. № 9 (13). С. 1353–1363.

16. Baek J. H., Lee S. Y. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli* // *FEMS Microbiology Letters*. 2006. № 1 (264). С. 104–109.

17. Balabanova L. [и др.]. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products // *Food Control*. 2017. (78). С. 270–278.

18. Balabanova L. [и др.]. Computational Insight into Intraspecies Distinctions in *Pseudoalteromonas distincta*: Carotenoid-like Synthesis Traits and Genomic Heterogeneity // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. № 4 (24). С. 4158–4158.

19. Balabanova L. A. [и др.]. The Genome of the marine bacterium *Cobetia marina* KMM 296 isolated from the mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) // *Russian Journal of Marine Biology*. 2016. № 1 (42). С. 106–109.

20. Balabanova L. A. [и др.]. Biotechnology Potential of Marine Fungi Degrading Plant and Algae Polymeric Substrates // *Frontiers in Microbiology*. 2018. (9).

21. Baltar F. [и др.]. Prokaryotic Responses to Ammonium and Organic Carbon Reveal Alternative CO₂ Fixation Pathways and Importance of Alkaline Phosphatase in the Mesopelagic North Atlantic // *Frontiers in Microbiology*. 2016. (7).

22. Barrozo A. [и др.]. Cooperative Electrostatic Interactions Drive Functional Evolution in the Alkaline Phosphatase Superfamily // *Journal of the American Chemical Society*. 2015. № 28 (137). С. 9061–9076.

23. Berlutti F. [и др.]. The Chryseobacterium meningosepticum PafA enzyme: prototype of a new enzyme family of prokaryotic phosphate-irrepressible alkaline phosphatases? The GenBank accession number for pafA reported in this paper is AF157621. // *Microbiology*. 2001. № 10 (147). С. 2831–2839.
24. Bessueille L. [и др.]. Inhibition of alkaline phosphatase impairs dyslipidemia and protects mice from atherosclerosis // *Translational Research*. 2023. (251). С. 2–13.
25. Bloch W., Gorby M. S. Catalytic mechanism of Escherichia coli alkaline phosphatase: resolution of three variants of the acyl-enzyme mechanism // *Biochemistry*. 1980. № 22 (19). С. 5008–5018.
26. Bobyr E. [и др.]. High-Resolution Analysis of Zn²⁺ Coordination in the Alkaline Phosphatase Superfamily by EXAFS and X-ray Crystallography // *Journal of Molecular Biology*. 2012. № 1 (415). С. 102–117.
27. Boltes I. [и др.]. 1.3 Å Structure of Arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* Establishes the Catalytic Mechanism of Sulfate Ester Cleavage in the Sulfatase Family // *Structure*. 2001. № 6 (9). С. 483–491.
28. Borosky G. L. Quantum-Mechanical Study on the Catalytic Mechanism of Alkaline Phosphatases // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2017. № 3 (57). С. 540–549.
29. Bosron W. F. [и др.]. Effect of magnesium on the properties of zinc alkaline phosphatase // *Biochemistry*. 1977. № 4 (16). С. 610–614.
30. Boulanger R. R., Kantrowitz E. R. Characterization of a Monomeric Escherichia coli Alkaline Phosphatase Formed upon a Single Amino Acid Substitution // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. № 26 (278). С. 23497–23501.
31. Brian Peter Surin, Rosenberg H., Cox G. B. Phosphate-specific transport system of Escherichia coli: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships // *Journal of Bacteriology*. 1985. № 1 (161). С. 189–198.
32. Bulgarelli D. [и др.]. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota // *Nature*. 2012. № 7409 (488). С. 91–95.
33. Bulgarelli D. [и др.]. Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley // *Cell Host & Microbe*. 2015. № 3 (17). С. 392–403.

34. Буйновская Н. С. [и др.]. Гибридный бифункциональный белок на основе порина OmpF и высокоактивной щелочной фосфатазы // Биоорганическая химия. 2018. № 4 (44). С. 417–424.

35. Chandonia J.-M. [и др.]. SCOPe: improvements to the structural classification of proteins – extended database to facilitate variant interpretation and machine learning // Nucleic Acids Research. 2021. № D1 (50). С. D553–D559.

36. Chen K. T. [и др.]. Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2010. № 2 (299). С. G467–G475.

37. Chen S.-L., Liao R.-Z. Phosphate Monoester Hydrolysis by Trinuclear Alkaline Phosphatase; DFT Study of Transition States and Reaction Mechanism // ChemPhysChem. 2014. № 11 (15). С. 2321–2330.

38. Chlebowski J. F., Coleman J. E. Mechanisms of hydrolysis of O-phosphorothioates and inorganic thiophosphate by *Escherichia coli* alkaline phosphatase // The Journal of Biological Chemistry. 1974. № 22 (249). С. 7192–7202.

39. Christie-Oleza J. A. [и др.]. Nutrient recycling facilitates long-term stability of marine microbial phototroph–heterotroph interactions // Nature Microbiology. 2017. № 9 (2). С. 1–10.

40. Chuntao Y. [и др.]. Role of Bacterial Communities in the Natural Suppression of *Rhizoctonia solani* Bare Patch Disease of Wheat (*Triticum aestivum* L.) // Applied and Environmental Microbiology. 2013. № 23 (79). С. 7428–7438.

41. Coleman J. E. Structure and Mechanism of Alkaline Phosphatase // Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 1992. № 1 (21). С. 441–483.

42. Cordell D., Drangert J. O., White S. The story of phosphorus: Global food security and food for thought // Traditional Peoples and Climate Change. 2009. № 2 (19). С. 292–305.

43. Cosmidis J. [и др.]. Calcium-Phosphate Biomineralization Induced by Alkaline Phosphatase Activity in *Escherichia coli*: Localization, Kinetics, and Potential Signatures in the Fossil Record // Frontiers in Earth Science. 2015. (3). С. 84.

44. Doing G. [и др.]. Conditional antagonism in co-cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*: An intersection of ethanol and phosphate signaling distilled from dual-seq transcriptomics // PLOS Genetics. 2020. № 8 (16). С. e1008783–e1008783.

45. Dong H. [и др.]. A critical review of mineral–microbe interaction and co-evolution: mechanisms and applications // *National Science Review*. 2022. № 10 (9).
46. Duan R. The role of intestinal alkaline phosphatase and bacterial lipopolysaccharides in patients undergoing pancreaticoduodenectomy 2022.
47. Duarte F. [и др.]. The Competing Mechanisms of Phosphate Monoester Dianion Hydrolysis // *Journal of the American Chemical Society*. 2016. № 33 (138). С. 10664–10673.
48. Duarte F., Amrein B. A., Kamerlin S. C. L. Modeling catalytic promiscuity in the alkaline phosphatase superfamily // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2013. № 27 (15). С. 11160.
49. Dufresne A. [и др.]. Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. № 17 (100). С. 10020–10025.
50. Duhamel S. [и др.]. Phosphorus as an integral component of global marine biogeochemistry // *Nature Geoscience*. 2021. № 6 (14). С. 359–368.
51. Fang J. [и др.]. Microbial Extracellular Alkaline Phosphatase Revealed the Linkage Between Carbon and Phosphorus Cycles in the Deepest Ocean // *Research Square*. 2022.
52. Feller G., Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation // *Nature Reviews Microbiology*. 2003. № 3 (1). С. 200–208.
53. Fernley H. N., Walker P. G. Studies on alkaline phosphatase. Transientstate and steady-state kinetics of *Escherichia coli* alkaline phosphatase // *Biochemical Journal*. 1969. № 2 (111). С. 187–194.
54. Fuhrmann J. [и др.]. Structural basis for recognizing phosphoarginine and evolving residue-specific protein phosphatases in gram-positive bacteria // *Cell Reports*. 2013. № 6 (3). С. 1832–1839.
55. Galperin M. Y. [и др.]. COG database update: focus on microbial diversity, model organisms, and widespread pathogens // *Nucleic Acids Research*. 2021. № D1 (49). С. D274–D281.
56. Gardner T. G. [и др.]. Soil rhizosphere microbial communities and enzyme activities under organic farming in alabama // *Diversity*. 2011. № 3 (3). С. 308–328.

57. Garen A., Levinthal C. A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. Coli* I. Purification and characterization of alkaline phosphatase // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1960. (38). С. 470–483.

58. Gettins P., Coleman J. E. ³¹P nuclear magnetic resonance of phosphoenzyme intermediates of alkaline phosphatase // *The Journal of Biological Chemistry*. 1983. № 1 (258). С. 408–416.

59. Ghyoot C. [и др.]. Modelling alkaline phosphatase activity in microalgae under orthophosphate limitation: the case of *Phaeocystis globosa* // *Journal of Plankton Research*. 2015. № 5 (37). С. 869–885.

60. Giovannoni S. J. SAR11 Bacteria: The Most Abundant Plankton in the Oceans // *Annual Review of Marine Science*. 2017. (9). С. 231–255.

61. Goll D. S. [и др.]. Nutrient limitation reduces land carbon uptake in simulations with a model of combined carbon, nitrogen and phosphorus cycling // *Biogeosciences*. 2012. № 9 (9). С. 3547–3569.

62. Golotin V. [и др.]. Recombinant Production and Characterization of a Highly Active Alkaline Phosphatase from Marine Bacterium *Cobetia marina* // *Marine Biotechnology*. 2014. № 2 (17). С. 130–143.

63. Green M. R., Sambrook J. Alkaline Phosphatase // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2020. № 8 (2020). С. pdb.top100768.

64. Gudjónsdóttir K., Ásgeirsson B. Effects of replacing active site residues in a cold-active alkaline phosphatase with those found in its mesophilic counterpart from *Escherichia coli* // *FEBS Journal*. 2007. № 1 (275). С. 117–127.

65. Haldimann A., Daniels L. L., Wanner B. L. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the *Escherichia coli* phosphate regulon // *Journal of Bacteriology*. 1998. № 5 (180). С. 1277–1286.

66. Hamarneh S. R. [и др.]. A Novel Approach to Maintain Gut Mucosal Integrity Using an Oral Enzyme Supplement // *Annals of Surgery*. 2014. № 4 (260). С. 706–715.

67. Hanson S. R., Best M. D., Wong C.-H. Sulfatases: Structure, Mechanism, Biological Activity, Inhibition, and Synthetic Utility // *Angewandte Chemie International Edition*. 2004. № 43 (43). С. 5736–5763.

68. Harris R. M. [и др.]. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 2001. № 17 (183). С. 5008–5014.

69. Harroun S. G., Vallée-Bélisle A. Methods to Characterise Enzyme Kinetics with Biological and Medicinal Substrates: The Case of Alkaline Phosphatase // Chemistry methods. 2023. № 8 (3).

70. Hashem K. A., Authman S. H., Mahdi L. H. In vivo antibacterial activity of alkaline phosphatase isolates from *Escherichia coli* isolated from diarrhea patients against *Pseudomonas aeruginosa* // The Pharma Innovation Journal. 2016. № 12 (5). С. 32–36.

71. Hauksson J. B., Andrésón Ó. S., Ásgeirsson B. Heat-labile bacterial alkaline phosphatase from a marine *Vibrio sp.* // Enzyme and Microbial Technology. 2000. № 1-2 (27). С. 66–73.

72. Haygarth P. M., Harrison A. F., Turner B. L. On the history and future of soil organic phosphorus research: a critique across three generations // European Journal of Soil Science. 2018. № 1 (69). С. 86–94.

73. Helland R., Lie Larsen R., Ásgeirsson B. The 1.4 Å crystal structure of the large and cold-active *Vibrio sp.* alkaline phosphatase // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 2009. № 2 (1794). С. 297–308.

74. Hjörleifsson J. G. [и др.]. The high catalytic rate of the cold-active *Vibrio* alkaline phosphatase requires a hydrogen bonding network involving a large interface loop // FEBS Open Bio. 2020. № 1 (11). С. 173–184.

75. Hjörleifsson J. G., Ásgeirsson B. pH-Dependent Binding of Chloride to a Marine Alkaline Phosphatase Affects the Catalysis, Active Site Stability, and Dimer Equilibrium // Biochemistry. 2017. № 38 (56). С. 5075–5089.

76. Hjörleifsson J. G., Ásgeirsson B. Chloride promotes refolding of active *Vibrio* alkaline phosphatase through an inactive dimeric intermediate with an altered interface // FEBS Open Bio. 2018. (9). С. 169–184.

77. Hoffmann T. D., Reeksting B., Gebhard S. Bacteria-induced mineral precipitation: a mechanistic review // Microbiology. 2021. № 4 (167).

78. Hollfelder F., Herschlag D. The nature of the transition state for enzyme-catalyzed phosphoryl transfer. Hydrolysis of O-aryl phosphorothioates by alkaline phosphatase. // Biochemistry. 1995. № 38 (34). С. 12255–64.

79. Holtz K. M., Stec B., Kantrowitz E. R. A Model of the Transition State in the Alkaline Phosphatase Reaction // Journal of Biological Chemistry. 1999. № 13 (274). С. 8351–8354.

80. Hong S. [и др.]. Identification and characterization of alkaline phosphatase gene *phoX* in *Microcystis aeruginosa* PCC7806 // *3 Biotech*. 2021. № 5 (11).

81. Horiuchi T., Horiuchi S., Mizuno D. A Possible Negative Feedback Phenomenon controlling Formation of Alkaline Phosphomonoesterase in *Escherichia coli* // *Nature*. 1959. № 4674 (183). С. 1529–1530.

82. HORIUCHI T., HORIUCHI S., MIZUNO D. A Possible Negative Feedback Phenomenon controlling Formation of Alkaline Phosphomonoesterase in *Escherichia coli* // *Nature*. 1959. № 4674 (183). С. 1529–1530.

83. Hsieh Y.-J., Wanner B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system // *Current Opinion in Microbiology*. 2010. № 2 (13). С. 198–203.

84. Hudek L. [и др.]. Role of Phosphate Transport System Component PstB1 in Phosphate Internalization by *Nostoc punctiforme* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2016. № 21 (82). С. 6344–6356.

85. Hull W. E. [и др.]. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance study of alkaline phosphatase: the role of inorganic phosphate in limiting the enzyme turnover rate at alkaline pH // *Biochemistry*. 1976. № 7 (15). С. 1547–1561.

86. Jackson R. J. [и др.]. Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* responsive to zinc and inorganic phosphate levels // *FEMS Microbiology Letters*. 2008. № 2 (289). С. 219–224.

87. Johansen J. E., Binnerup S. J. Contribution of Cytophaga-like Bacteria to the Potential of Turnover of Carbon, Nitrogen, and Phosphorus by Bacteria in the Rhizosphere of Barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Microbial Ecology*. 2002. № 3 (43). С. 298–306.

88. Jonas S. [и др.]. A New Member of the Alkaline Phosphatase Superfamily with a Formylglycine Nucleophile: Structural and Kinetic Characterisation of a Phosphonate Monoester Hydrolase/Phosphodiesterase from *Rhizobium leguminosarum* // *Journal of Molecular Biology*. 2008. № 1 (384). С. 120–136.

89. Kageyama H. [и др.]. An alkaline Phosphatase/Phosphodiesterase, PhoD, induced by salt stress and secreted out of the cells of *Aphanotece halophytica*, a halotolerant cyanobacterium // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. № 15 (77). С. 5178–5183.

90. Kaliannan K. [и др.]. Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. № 17 (110). С. 7003–7008.

91. Kamennaya N. A. [и др.]. Accumulation of ambient phosphate into the periplasm of marine bacteria is proton motive force dependent // *Nature Communications*. 2020. № 1 (11).

92. Kamerlin S. C. L. [и др.]. Why nature really chose phosphate // *Quarterly reviews of biophysics*. 2013. № 1 (46). С. 1–132.

93. Kamerlin S. C. L., Florián J., Warshel A. Associative Versus Dissociative Mechanisms of Phosphate Monoester Hydrolysis: On the Interpretation of Activation Entropies // *ChemPhysChem*. 2008. № 12 (9). С. 1767–1773.

94. Kantrowitz E. R. *E. coli* Alkaline Phosphatase. 2011.

95. Kathuria S., Martiny A. C. Prevalence of a calcium-based alkaline phosphatase associated with the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*

and other ocean bacteria // *Environmental Microbiology*. 2010. № 1 (13). С. 74–83.

96. Katrín Guðjónsdóttir, B. Ásgeirsson Effects of replacing active site residues in a cold-active alkaline phosphatase with those found in its mesophilic counterpart from *Escherichia coli* // *The FEBS Journal*. 2008. (275).

97. Klähn M., Rosta E., Arieh Warshel On the Mechanism of Hydrolysis of Phosphate Monoesters Dianions in Solutions and Proteins // *Journal of the American Chemical Society*. 2006. № 47 (128). С. 15310–15323.

98. Кочетков С. И., Габитов А. Г., Северин Е. С. Механизмы переноса фосфорильной группы в ферментативных реакциях // *Биоорганическая химия*. 1984. № 10 (10).

99. Kolton M. [и др.]. The flavobacterium genus in the plant holobiont: Ecological, physiological, and applicative insights 2016.

100. Kolton M. [и др.]. The Flavobacterium Genus in the Plant Holobiont: Ecological, Physiological, and Applicative Insights под ред. S. C. Sowinski, Singapore: Springer Singapore, 2016. С. 189–207.

101. Kozlenkov A. [и др.]. Function Assignment to Conserved Residues in Mammalian Alkaline Phosphatases // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. № 25 (277). С. 22992–22999.

102. Krawczun N. [и др.]. Boosting toxic protein expression: transient in vivo inactivation of engineered bacterial alkaline phosphatase 2020.

103. Krawczun N. [и др.]. Boosting toxic protein biosynthesis: transient in vivo inactivation of engineered bacterial alkaline phosphatase // *Microbial Cell Factories*. 2020. № 1 (19).

104. Kühn F. [и др.]. Intestinal alkaline phosphatase targets the gut barrier to prevent aging // *JCI Insight*. 2020. № 6 (5).

105. Kwak M.-J. [и др.]. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato // *Nature Biotechnology*. 2018. № 11 (36). С. 1117–1117.

106. Lallès J.-P. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet // *Nutrition Reviews*. 2010. № 6 (68). С. 323–332.

107. Lassila J. K., Herschlag D. Promiscuous sulfatase activity and thio-effects in a phosphodiesterase of the alkaline phosphatase superfamily // *Biochemistry*. 2008. № 48 (47). С. 12853–12859.

108. Lassila J. K., Zalatan J. G., Herschlag D. Biological Phosphoryl-Transfer Reactions: Understanding Mechanism and Catalysis // *Annual Review of Biochemistry*. 2011. № 1 (80). С. 669–702.

109. Lee D.-H. [и др.]. A novel psychrophilic alkaline phosphatase from the metagenome of tidal flat sediments // *BMC Biotechnology*. 2015. № 1 (15).

110. Lei W. [и др.]. Alkaline Phosphatase Protects Lipopolysaccharide-Induced Early Pregnancy Defects in Mice // *PLOS ONE*. 2015. № 4 (10). С. e0123243.

111. Levitt M. D., Hapak S. M., Levitt D. G. Alkaline Phosphatase Pathophysiology with Emphasis on the Seldom-Discussed Role of Defective Elimination in Unexplained Elevations of Serum ALP – A Case Report and Literature Review // *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2022. (15). С. 41–49.

112. Lidbury I. D. E. A. [и др.]. A highly active phosphate-insensitive phosphatase is widely distributed in nature // *bioRxiv*. 2021.

113. Lidbury I. D. E. A. [и др.]. A widely distributed phosphate-insensitive phosphatase presents a route for rapid organophosphorus remineralization in the biosphere // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022. № 5 (119). С. e2118122119.

114. Liu W. [и др.]. Intestinal Alkaline Phosphatase Regulates Tight Junction Protein Levels // *Journal of the American College of Surgeons*. 2016. № 6 (222). С. 1009–1017.

115. Luo H. [и др.]. Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. № 50 (106). С. 21219–21223.

116. Madigan M. T. [и др.]. *Brock Biology of Microorganisms* / M. T. Madigan, K. S. Bender, D. H. Buckley, M. W. Sattley, D. A. Stahl, 15-е изд., New York, USA: Pearson Higher Education, 2018.

117. Maimaiti J. [и др.]. Isolation and characterization of hydrogen-oxidizing bacteria induced following exposure of soil to hydrogen gas and their impact on plant growth // *Environmental Microbiology*. 2007. № 2 (9). С. 435–444.

118. Makino K. [и др.]. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12 // *Journal of Molecular Biology*. 1986. № 1 (190). С. 37–44.

119. Makino K. [и др.]. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. // *Genes & Development*. 1993. № 1 (7). С. 149–160.

120. Malard F. [и др.]. Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease // *Mucosal Immunology*. 2020. № 3 (14). С. 547–554.

121. Malo M. S. [и др.]. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota // *Gut*. 2010. № 11 (59). С. 1476–1484.

122. Mann S. *Bioinorganic Chemistry: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry* / S. Mann, New York: Oxford University Press, 2001.

123. Marion G. M. [и др.]. pH of seawater // *Marine Chemistry*. 2011. № 1-4 (126). С. 89–96.

124. Markússon S. [и др.]. Structural Characterization of Functionally Important Chloride Binding Sites in the Marine *Vibrio* Alkaline Phosphatase // *Biochemistry*. 2022. № 20 (61). С. 2248–2260.

125. McCleary W. R. The activation of PhoB by acetylphosphate // *Molecular Microbiology*. 1996. № 6 (20).

126. McCleary W. R. *Molecular mechanisms of phosphate homeostasis in Escherichia coli* под ред. Amidou Samie, IntechOpen, 2017.

127. McComb R. B., Bowers G. N., Posen S. *Alkaline Phosphatase* / R. B. McComb, G. N. Bowers, S. Posen, Boston, MA: Springer US, 1979.

128. McConnell R. E. [и др.]. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle // *The Journal of Cell Biology*. 2009. № 7 (185). С. 1285–1298.

129. Millan J. L. *Mammalian Alkaline Phosphatases: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology* / J. L. Millan, Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2006.

130. Millán J. L. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes // *Purinergic signalling*. 2006. № 2 (2). С. 335–41.

131. Mock T., Thomas D. N. Recent advances in sea-ice microbiology // *Environmental Microbiology*. 2005. № 5 (7). С. 605–619.

132. Moseley J. L., Chiung Wen C., Grossman A. R. Genome Based Approaches to Understanding Phosphorus Deprivation Responses and PSR1 Control in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Eukaryotic Cell*. 2006. № 1 (5). С. 26–44.

133. Motomura K. [и др.]. Overproduction of YjbB reduces the level of polyphosphate in *Escherichia coli* : a hypothetical role of YjbB in phosphate export and polyphosphate accumulation // *FEMS Microbiology Letters*. 2011. № 1 (320). С. 25–32.

134. Mourik A. van [и др.]. Functional analysis of a *Campylobacter jejuni* alkaline phosphatase secreted via the Tat export machinery // *Microbiology*. 2008. № 2 (154). С. 584–592.

135. Mühling M., Joint I., Willetts A. J. The biodiscovery potential of marine bacteria: an investigation of phylogeny and function // *Microbial Biotechnology*. 2013. № 4 (6). С. 361–370.

136. Murphy J. E. [и др.]. Trapping and visualization of a covalent enzyme–phosphate intermediate // *Nature Structural Biology*. 1997. № 8 (4). С. 618–622.

137. Mushak P., Coleman J. E. Hydrolysis of a stable oxygen ester of phosphorothioic acid by alkaline phosphatase // *Biochemistry*. 1972. № 2 (11). С. 201–205.

138. Nasu E., Ichiyanagi A., Gomi K. Cloning and expression of a highly active recombinant alkaline phosphatase from psychrotrophic *Cobetia marina* // *Biotechnology Letters*. 2012. № 2 (34). С. 321–328.

139. Nedashkovskaya O. I. [и др.]. Genome-Based Classification of Strain 16-SW-7, a Marine Bacterium Capable of Converting B Red Blood Cells, as *Pseudoalteromonas distincta* and Proposal to Reclassify *Pseudoalteromonas paragorgicola* as a Later Heterotypic Synonym of *Pseudoalteromonas distincta* // *Frontiers in Microbiology*. 2022. (12).

140. Neumann H. Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases. // *The Journal of biological chemistry*. 1968. (243 18). С. 4671–6.
141. Neumann H. Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases // *The Journal of Biological Chemistry*. 1968. № 18 (243). С. 4671–4676.
142. Nishioka T. [и др.]. Microbial basis of Fusarium wilt suppression by *Allium* cultivation // *Scientific Reports*. 2019. № 1 (9).
143. Niu B. [и др.]. Simplified and representative bacterial community of maize roots // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. № 12 (114). С. E2450–E2459.
144. Noskova Y. [и др.]. A Novel Alkaline Phosphatase/Phosphodiesterase, CamPhoD, from Marine Bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // *Marine Drugs*. 2019. № 12 (17). С. 657.
145. Noskova Y. [и др.]. Are the Closely Related *Cobetia* Strains of Different Species? // *Molecules*. 2021. № 3 (26). С. 690.
146. O'Brien P. J. [и др.]. Arginine coordination in enzymatic phosphoryl transfer: evaluation of the effect of Arg166 mutations in *Escherichia coli* alkaline phosphatase. // *Biochemistry*. 2008. № 29 (47). С. 7663–72.
147. O'Brien P. J., Herschlag D. Functional interrelationships in the alkaline phosphatase superfamily: phosphodiesterase activity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. // *Biochemistry*. 2001. № 19 (40). С. 5691–9.
148. O'Brien P. J., Herschlag D. Alkaline Phosphatase Revisited: Hydrolysis of Alkyl Phosphates // *Biochemistry*. 2002. № 9 (41). С. 3207–3225.
149. Omelon S. [и др.]. A Review of Phosphate Mineral Nucleation in Biology and Geobiology // *Calcified Tissue International*. 2013. № 4 (93). С. 382–396.
150. Orhanović S. [и др.]. Effect of a T81A mutation at the subunit interface on catalytic properties of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2006. № 1 (40). С. 54–58.
151. Orhanović S., Pavela-Vrančić M. Dimer asymmetry and the catalytic cycle of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* // *European Journal of Biochemistry*. 2003. № 21 (270). С. 4356–4364.
152. Paysan-Lafosse T. [и др.]. InterPro in 2022 // *Nucleic Acids Research*. 2022. № D1 (51).

153. Peck A. [и др.]. Tungstate as a Transition State Analog for Catalysis by Alkaline Phosphatase // *Journal of Molecular Biology*. 2016. № 13 (428). С. 2758–2768.

154. Phoenix G. K. [и др.]. Niche differentiation and plasticity in soil phosphorus acquisition among co-occurring plants // *Nature Plants*. 2020. № 4 (6). С. 349–354.

155. Plisova E. Yu. [и др.]. A Highly Active Alkaline Phosphatase from the Marine Bacterium *Cobetia* // *Marine Biotechnology*. 2005. № 3 (7). С. 173–178.

156. Pongprayoon P. [и др.]. Simulations of anion transport through OprP reveal the molecular basis for high affinity and selectivity for phosphate // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009. № 51 (106). С. 21614–21618.

157. Pucci F., Rooman M. Physical and molecular bases of protein thermal stability and cold adaptation // *Current Opinion in Structural Biology*. 2017. (42). С. 117–128.

158. Rader B. A. [и др.]. Modulation of Symbiont Lipid A Signaling by Host Alkaline Phosphatases in the Squid-*Vibrio* Symbiosis // *mBio*. 2012. № 3 (3).

159. Ragot S. A. [и др.]. Soil *phoD* and *phoX* alkaline phosphatase gene diversity responds to multiple environmental factors // *FEMS Microbiology Ecology*. 2016. № 1 (93). С. fiv212.

160. Ragot S. A., Kertesz M. A., Bünemann E. K. *phoD* alkaline phosphatase gene diversity in soil // *Applied and Environmental Microbiology*. 2015. № 20 (81). С. 7281–7289.

161. Rao N. N., Torriani A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology*. 1990. № 7 (4). С. 1083–1090.

162. Rao S. [и др.]. Effect of *glpT* and *glpD* mutations on expression of the *phoA* gene in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 1993. (175). С. 74–79.

163. Reid T. W., Wilson I. B. *E. coli* alkaline phosphatase под ред. P. D. Boyer, Academic Press, 1971. С. 373–415.

164. Rice C. D. [и др.]. Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB2 ABC transporter in *Escherichia coli* // *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. № 3 (75). С. 573–582.

165. Rodriguez F. [и др.]. Crystal Structure of the Bacillus subtilis Phosphodiesterase PhoD Reveals an Iron and Calcium-containing Active Site // Journal of Biological Chemistry. 2014. № 45 (289). С. 30889–30899.

166. Rodríguez J. [и др.]. Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD // Diseases of Aquatic Organisms. 2006. № 1 (69). С. 175–183.

167. Rojas E. R. [и др.]. The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria // Nature. 2018. № 7715 (559). С. 617–621.

168. Romanenko L. A. [и др.]. Description of *Cobetia amphilecti* sp. nov., *Cobetia litoralis* sp. nov. and *Cobetia pacifica* sp. nov., classification of *Halomonas halodurans* as a later heterotypic synonym of *Cobetia marina* and emended descriptions of the genus *Cobetia* and *Cobetia marina* // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013. № 1 (63). С. 288–297.

169. Rosenberg H. Phosphate transport in prokaryotes San Diego: Academic Press, Inc, 1987. С. 205–248.

170. Roy N. K., Ghosh R. K., Das J. Monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae* // Journal of Bacteriology. 1982. № 3 (150). С. 1033–1039.

171. Santos-Beneit F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria // Frontiers in Microbiology. 2015. (6).

172. Sato M. [и др.]. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase, a Possible Mediator of Cell Maturation: Towards a New Paradigm // Cells. 2021. № 12 (10). С. 3338.

173. Schenk G. [и др.]. Phosphate forms an unusual tripod complex with the Fe–Mn center of sweet potato purple acid phosphatase // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005. № 2 (102). С. 273–278.

174. Schlesinger M. J., Barrett K. The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Formation and reactivation of subunits // The Journal of Biological Chemistry. 1965. № 11 (240). С. 4284–4292.

175. Schlesinger M. J., Barrett K. J. The reversible dissociation of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. I. Formation and reactivation of subunits. // The Journal of biological chemistry. 1965. (240 11). С. 4284–92.

176. Schwartz J. H. The phosphorylation of alkaline phosphatase. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1963. (49). С. 871–8.

177. Schwartz J. H. The phosphorylation of alkaline phosphatase // Proceedings of the National Academy of Sciences. 1963. № 6 (49). С. 871–878.

178. Sebastian M., Ammerman J. W. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA // The ISME Journal. 2009. № 5 (3). С. 563–572.

179. Sharma U., Pal D., Prasad R. Alkaline Phosphatase: An Overview // Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2013. № 3 (29). С. 269–278.

180. Shifrin D. A. [и др.]. Enterocyte microvillus-derived vesicles detoxify bacterial products and regulate epithelial-microbial interactions // Current Biology. 2012. № 7 (22). С. 627–631.

181. Shoemaker K. M., McCliment E. A., Moisaner P. H. Copepod-Associated Gammaproteobacterial Alkaline Phosphatases in the North Atlantic Subtropical Gyre // Frontiers in Microbiology. 2020. (11).

182. Shulman R. G. [и др.]. Cellular Applications of ^{31}P and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance // Science. 1979. № 4402 (205). С. 160–166.

183. Singh S. B. [и др.]. Intestinal Alkaline Phosphatase Prevents Sulfate Reducing Bacteria-Induced Increased Tight Junction Permeability by Inhibiting Snail Pathway // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2022. (12). С. 882498.

184. Skouri-Panet F. [и др.]. In Vitro and in Silico Evidence of Phosphatase Diversity in the Biomineralizing Bacterium *Ramlibacter taouinensis* // Frontiers in Microbiology. 2018. (8).

185. Srivastava A. [и др.]. Enzyme promiscuity in natural environments: alkaline phosphatase in the ocean // The ISME Journal. 2021. № 11 (15). С. 3375–3383.

186. Srivastava A. K. [и др.]. Editorial: Plant Microbiome: Interactions, Mechanisms of Action, and Applications // Frontiers in Microbiology. 2021. (12).

187. Stec B., Holtz K. M., Kantrowitz E. R. A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions // Journal of Molecular Biology. 2000. № 5 (299). С. 1303–1311.

188. Steedt P. M., Wanner B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon // Journal of Bacteriology. 1993. № 21 (175). С. 6797–6809.

189. Stockbridge R. B., Wolfenden R. Enhancement of the Rate of Pyrophosphate Hydrolysis by Nonenzymatic Catalysts and by Inorganic Pyrophosphatase // *The Journal of Biological Chemistry*. 2011. № 21 (286). С. 18538–18546.

190. Sunden F. [и др.]. Extensive site-directed mutagenesis reveals interconnected functional units in the alkaline phosphatase active site // *eLife*. 2015. (4). С. e06181.

191. Sunden F. [и др.]. Extensive site-directed mutagenesis reveals interconnected functional units in the alkaline phosphatase active site // *eLife*. 2015. (4).

192. Sunden F. [и др.]. Mechanistic and Evolutionary Insights from Comparative Enzymology of Phosphomonoesterases and Phosphodiesterases across the Alkaline Phosphatase Superfamily // *Journal of the American Chemical Society*. 2016. № 43 (138). С. 14273–14287.

193. Sunden F. [и др.]. Differential catalytic promiscuity of the alkaline phosphatase superfamily bimetallo core reveals mechanistic features underlying enzyme evolution // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. № 51 (292). С. 20960–20974.

194. Tada Y. [и др.]. Differing Growth Responses of Major Phylogenetic Groups of Marine Bacteria to Natural Phytoplankton Blooms in the Western North Pacific Ocean // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011. № 12 (77). С. 4055–4065.

195. Talley K., Alexov E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2010. № 12 (78). С. 2699–2706.

196. Tan H. [и др.]. Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the phoD phosphorus mineraliser group in pasture soils // *Biology and Fertility of Soils*. 2012. № 6 (49). С. 661–672.

197. Tavafoghi M., Cerruti M. The role of amino acids in hydroxyapatite mineralization // *Journal of The Royal Society Interface*. 2016. № 123 (13). С. 20160462.

198. Teeling H. [и др.]. Substrate-Controlled Succession of Marine Bacterioplankton Populations Induced by a Phytoplankton Bloom // *Science*. 2012. № 6081 (336). С. 608–611.

199. Terrer C. [и др.]. Nitrogen and phosphorus constrain the CO₂ fertilization of global plant biomass // *Nature Climate Change*. 2019. № 9 (9). С. 684–689.

200. Thomas D. N. Antarctic Sea Ice--a Habitat for Extremophiles // *Science*. 2002. № 5555 (295). С. 641–644.
201. Thomas F. [и др.]. Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection // *Frontiers in Microbiology*. 2011. (2).
202. Torriani A. The alkaline phosphatase of *Escherichia coli* под ред. R. C. King, New York: Springer US, 1974. С. 173–181.
203. Van Loo B. [и др.]. An efficient, multiply promiscuous hydrolyase in the alkaline phosphatase superfamily // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010. № 7 (107). С. 2740–2745.
204. Vanbogelen R. A. [и др.]. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology*. 1996. № 15 (178). С. 4344–4366.
205. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization // *Gene*. 2020. № 754 (754). С. 144855.
206. Wan B. [и др.]. Rethinking the biotic and abiotic remineralization of complex phosphate molecules in soils and sediments // *Science of The Total Environment*. 2022. (833). С. 155187.
207. Wang E. [и др.]. Crystal Structure of Alkaline Phosphatase from the Antarctic Bacterium TAB5 // *Journal of Molecular Biology*. 2007. № 4 (366). С. 1318–1331.
208. Wang Y. [и др.]. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite // *Nature Materials*. 2012. № 8 (11). С. 724–733.
209. Wanner B. L. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. Washington, D.C.: ASM Press , 1996. С. 1357–1381.
210. Webb D. C., Rosenberg H., Cox G. B. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. // *The Journal of biological chemistry*. 1992. (267 34). С. 24661–8.
211. Webb D. C., Rosenberg H., Cox G. B. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. // *The Journal of biological chemistry*. 1992. (267 34). С. 24661–8.
212. Westermann L. M. [и др.]. Bacterial catabolism of membrane phospholipids links marine biogeochemical cycles // *Science Advances*. 2023. № 17 (9).

213. Weston J. Mode of Action of Bi- and Trinuclear Zinc Hydrolases and Their Synthetic Analogues // *Chemical Reviews*. 2005. № 6 (105). С. 2151–2174.
214. Williams N. H., Lehuis A., Chin J. A Structural and Functional Model of Dinuclear Metallophosphatases // *J. Am. Chem. Soc.* 1999. № 14 (121). С. 3341–3348.
215. Willsky G. R., Bennett R. L., Malamy M. H. Inorganic Phosphate Transport in *Escherichia coli*: Involvement of Two Genes Which Play a Role in Alkaline Phosphatase Regulation // *Journal of Bacteriology*. 1973. № 2 (113). С. 529–539.
216. Wu J.-R. [и др.]. Cloning of the gene and characterization of the enzymatic properties of the monomeric alkaline phosphatase (PhoX) from *Pasteurella multocida* strain X-73 // *FEMS Microbiology Letters*. 2007. № 1 (267). С. 113–120.
217. Xavier K. B. [и др.]. Kinetic analysis by in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance of internal Pi during the uptake of sn-glycerol-3-phosphate by the pho regulon-dependent Ugp system and the glp regulon-dependent GlpT system // *Journal of Bacteriology*. 1995. (177). С. 699–704.
218. Yang K., Metcalf W. W. A new activity for an old enzyme: *Escherichia coli* bacterial alkaline phosphatase is a phosphite-dependent hydrogenase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004. № 21 (101). С. 7919–7924.
219. Yang Y. [и др.]. Dynamic Evolution of the LPS-Detoxifying Enzyme Intestinal Alkaline Phosphatase in Zebrafish and Other Vertebrates // *Frontiers in Immunology*. 2012. (3).
220. Yong S. C. [и др.]. A complex iron-calcium cofactor catalyzing phosphotransfer chemistry // *Science*. 2014. № 6201 (345). С. 1170–1173.
221. Yuan Z. [и др.]. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria // *Nucleic Acids Research*. 2006. № 9 (34). С. 2686–2697.
222. Zaheer R. [и др.]. Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria // *Environmental Microbiology*. 2009. № 6 (11). С. 1572–1587.
223. Zaher D. M. [и др.]. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors // *Archiv Der Pharmazie*. 2020. № 5 (353). С. e2000011.

224. Zalatan J. G. [и др.]. Structural and functional comparisons of nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase and alkaline phosphatase: Implications for mechanism and evolution, // *Biochemistry*. 2006. № 32 (45). С. 9788–9803.

225. Zalatan J. G., Fenn T. D., Herschlag D. Comparative Enzymology in the Alkaline Phosphatase Superfamily to Determine the Catalytic Role of an Active-Site Metal Ion // *Journal of Molecular Biology*. 2008. № 5 (384). С. 1174–1189.

226. Zeng J. [и др.]. PCycDB: a comprehensive and accurate database for fast analysis of phosphorus cycling genes // *Microbiome*. 2022. № 1 (10).

227. Zhang H. [и др.]. Repeated evolutionary transitions of flavobacteria from marine to non-marine habitats // *Environmental Microbiology*. 2019. № 2 (21). С. 648–666.

228. Zheng L. [и др.]. Roles of Phosphorus Sources in Microbial Community Assembly for the Removal of Organic Matters and Ammonia in Activated Sludge // *Frontiers in Microbiology*. 2019. (10).

229. Zhou Y. [и др.]. Effects of *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase PhoA on the Mineralization of Dissolved Organic Phosphorus // *Water*. 2021. № 23 (13). С. 3315.

230. Zimmermann H., Zebisch M., Sträter N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases // *Purinergic Signalling*. 2012. № 3 (8). С. 437–502.

231. Zorzetto L. [и др.]. Induced Mineralization of Hydroxyapatite in *Escherichia coli* Biofilms and the Potential Role of Bacterial Alkaline Phosphatase // *Chemistry of Materials*. 2023. № 7 (35). С. 2762–2772.

Для заметок

Научное издание

Балабанова Лариса Анатольевна
Сейткалиева Александра Валерьевна
Сон Оксана Михайловна
Текутьева Людмила Александровна

**ЩЕЛОЧНЫЕ ФОСФАТАЗЫ:
РАСПРОСТРАНЕНИЕ В ПРИРОДЕ
И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ**

Монография

Чебоксары, 2023 г.

Редактор д-р хим. наук *О. Д. Новикова*
Компьютерная верстка *Е. В. Кузнецова*
Дизайн обложки *Н. В. Фирсова*

Подписано в печать 26.12.2023 г.

Дата выхода издания в свет 29.12.2023 г.

Формат 60×84/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.
Гарнитура Times. Усл. печ. л. 8,37. Заказ К-1235. Тираж 500 экз.

Издательский дом «Среда»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75, офис 12
+7 (8352) 655-731
info@phsreda.com
https://phsreda.com

Отпечатано в Студии печати «Максимум»
428005, Чебоксары, Гражданская, 75
+7 (8352) 655-047
info@maksimum21.ru
www.maksimum21.ru