



**IX**

**Ежегодная научная конференция  
Федерального исследовательского центра  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук**

**13-15 февраля 2023**

---

**ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ**

**Москва**

# АНАММОКС-СООБЩЕСТВО: СТРУКТУРА, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ, ВОЗМОЖНОСТИ НАПРАВЛЕННОЙ МОДИФИКАЦИИ

Пименов Н.В.<sup>1</sup>, Каллистова А.Ю.<sup>1</sup>, Николаев Ю.А.<sup>1</sup>, Равин Н.В.<sup>2</sup>, Марданов А.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Процесс анаммокс (окисление аммония нитритом в аноксидных условиях) играет ключевую роль в круговороте азота и используется для очистки сточных вод от аммония. Анаммокс-сообщества чувствительны к изменениям внешних условий, что является частой причиной сбоев в работе реакторов на очистных сооружениях. Большинство микроорганизмов в анаммокс-сообществах не выделены в чистые культуры, и межвидовые взаимосвязи в сообществе плохо изучены.

Целью работы было исследование структуры и функционирования симбиотического анаммокс-сообщества для направленной модификации процесса анаммокс и разработки биотехнологий удаления азота из сточных вод.

Разработана лабораторная установка, состоящая из 3-х параллельных реакторов последовательно-периодического действия с полным удержанием биомассы активного ила на загрузке. Установка позволяет проводить селекцию и модификацию анаммокс-сообщества путем смены режимов работы отдельных реакторов. Исследовано влияние метаболических эффекторов-регуляторов (формиата и фолата) на эффективность анаммокс-процесса в условиях резкого повышения нагрузки по аммонiu. Выявлено стимулирующее влияние фолата в сообществе, обогащенном анаммокс-бактериями рода *Ca. "Brocadia"*. Внесение формиата стимулировало развитие и активность анаммокс-бактерий рода *Ca. "Jettenia"*. Сравнительный геномный анализ позволил предположить у анаммокс-бактерии родов *Ca. "Brocadia"* и *Ca. "Jettenia"* разные стратегии выживания. Биоаугментация (внесение экзогенных нитрификаторов и анаммокс-бактерий) при запуске анаммокс-реактора ускоряет его выход на рабочий режим. Однако в ходе эксплуатации экзогенные микроорганизмы постепенно вытесняются более конкурентоспособными автохтонными. Внесение анаммокс-бактерий после выхода реактора на стабильный режим более эффективно, т.к. способствует лучшей адаптации экзогенных анаммокс-бактерий в аборигенном сообществе, увеличению доли и разнообразия анаммокс-бактерий в реакторе и, как следствие, увеличению скорости удаления аммония.

## Публикации:

1. Kallistova A., Nikolaev Y., Grachev V., Beletsky A., Gruzdev E., Kadnikov V., Dorofeev A., Berestovskaya J., Pelevina A., Zekker I., Ravin N., Pimenov N., Mardanov A. New insight into the interspecies shift of anammox bacteria *Ca. "Brocadia"* and *Ca. "Jettenia"* in reactors fed with formate and folate // **Front. Microbiol.** 2022. V. 12. Art. 802201. doi: 10.3389/fmicb.2021.802201
2. Пименов Н.В., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Грачёв В.А., Каллистова А.Ю., Миронов В.В., Вантеева А.В., Григорьева Н.Г., Берестовская Ю.Ю., Груздев Е.В., Бегматов Ш.А., Равин Н.В., Марданов А.В. Биоаугментация активного ила анаммокс нитрифицирующим сообществом бактерий как способ повышения эффективности удаления азота // **Микробиология.** 2022. Т. 91. № 2. С. 160–170. doi: 10.31857/S0026365622020124
3. Пименов Н.В., Николаев Ю.А., Дорофеев А.Г., Грачёв В.А., Каллистова А.Ю., Канапацкий Т.А., Литти Ю.В., Груздев Е.В., Бегматов Ш.А., Равин Н.В., Марданов А.В. Внесение экзогенного активного ила как способ повышения эффективности удаления азота в процессе анаммокс // **Микробиология.** 2022. Т. 91. № 4. С. 410–418. doi: 10.31857/S0026365622300176
4. Пименов Н.В., Николаев Ю.А., Грачёв В.А., Каллистова А.Ю., Берестовская Ю.Ю., Равин Н.В., Марданов А.В. Способ удаления азотсодержащих соединений из сточных вод. Патент. RU 2751356 С1. 2021.

# МЕХАНИЗМ ЭКСТРАКЛЕТОЧНОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ У ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ. СТРУКТУРА И СВОЙСТВА 11-ГЕМОВОГО ЦИТОХРОМА С – КЛЮЧЕВОГО КОМПОНЕНТА ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ

Тихонова Т.В., Гаврилов С.Н., Осипов Е.М., Хренова М.Г., Дергусова Н.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Попов В.О.

*ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Процессы анаэробного дыхания с участием нерастворимых внеклеточных акцепторов электронов, таких как минеральные формы окислов металлов переменной валентности, широко распространены у бактерий. Эти процессы сопровождаются переносом электронов от клетки к пространственно отделенному от нее внеклеточному акцептору. Основной механизм экстраклеточного электронного транспорта (ЭЭТ) связан с участием комплексов мультигемовых цитохромов с, образующих линейные и разветвленные цепи переноса электронов, в которых терминальный цитохром цепи взаимодействует непосредственно с акцептором. Систематическое исследование ЭЭТ проводилось только для грам-отрицательных бактерий, для которых подробно исследованы структура и функции мультигемовых цитохромов с – компонентов ЭЭТ. Для грам-положительных микроорганизмов процессы ЭЭТ изучены слабо, несмотря на то, что грам-положительные железоредукторы доминируют в некоторых экологических нишах, в том числе среди термофилов – металлоредукторов. Проведенный нами протеомный и геномный анализ термофильного грам-положительного железоредуктора *Carboxydothemus ferrireducens* показал, что механизм ЭЭТ у этой бактерии отличается от тех, были ранее описаны для грам-отрицательных бактерий. В клетке были идентифицированы три новых мультигемовых цитохрома С OmhA, SmhA and SmhC, которые могут быть вовлечены в процесс трансформации ферригидрита в магнетит, осуществляемых *C. ferrireducens*. Один из них - конститутивный 11-гемовый цитохром OmhA – был выделен и охарактеризован. Показано, что OmhA способен переносить электроны на растворимые и нерастворимые соединения железа, такие как ферригидрит; субстраты мультигемовых оксидоредуктаз и растворимые низкомолекулярные переносчики электронов. Получена пространственная структура OmhA с разрешением 2.5 Å, из которой следует, что белок состоит из двух функционально разных доменов: электрон-транспортного домена, содержащего 11 гемов с, и домена связывания с S-слоем на поверхности клетки *C. ferrireducens*. Укладка гемов с в электрон-транспортной цепи OmhA отличается от организации гемов в электрон-транспортных цитохромах из грам-отрицательных бактерий.

## Публикация:

1. Gavrilov SN, Zavarzina DG, Elizarov IM, Tikhonova TV, Dergousova NI, Popov VO, Lloyd JR, Knight D, El-Naggar MY, Pirbadian S, Leung KM, Robb FT, Zakhartsev MV, Bretschger O, Bonch-Osmolovskaya EA. (2021) Novel Extracellular Electron Transfer Channels in a Gram-Positive Thermophilic Bacterium // **Front Microbiol.** 11:597818. doi: 10.3389/fmicb.2020.597818.
2. Tikhonova TV, Osipov EM, Dergousova NI, Boyko KM, Elizarov IM, Gavrilov SN, Khrenova MG, Robb FT, Solovieva AY, Bonch-Osmolovskaya EA, Popov VO. (2023) Extracellular Fe(III) reductase structure reveals a modular organization enabling S-layer insertion and electron transfer to insoluble substrates // **Structure**, 31:174-184. doi.org/10.1016/j.str.2022.12.010.

## РЕКОНСТРУКЦИЯ ГЕНОМОВ НОВЫХ МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ ELUSIMICROBIOTA ИЗ БОЛОТНОЙ ПОЧВЫ

Узун М.М., Сухачева М.В., Баслеров Р.В.

*ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Несмотря на широкое использование подходов, не основанных на культивировании бактерий, большая часть «микробной темной материи» остается малоизученной. Магнитотактические бактерии (МТБ) могут помочь в решении этого вопроса благодаря возможности их сепарировать в отдельную фракцию методом магнитного обогащения. Такой способ облегчает изучение малопредставленных в экосистемах групп бактерий, так называемой «редкой биосферы». Сепарация возможна благодаря способности МТБ синтезировать магнетосомы — кристаллы магнетита или грейгита, покрытые липопротеиновой мембраной. Синтез магнетосом контролируется генетически магнетосомным генным кластером (МГК). Используя метод магнитной сепарации, за последние несколько лет были получены новые геномы МТБ, принадлежащие различным слабоизученным филумам (*Fibrobacterota*, *Riflobacteria* и т. д.). Эти бактерии были обнаружены в почвенных местообитаниях, где наличие МТБ ранее практически не изучалось, что послужило основой для дальнейшего изучения МТБ в этой среде.

В данной работе было исследовано микробное разнообразие болотной почвы (Дурыкино, Московская область) и ее обогащенной магнитной фракции. В результате метагеномного секвенирования магнитной фракции было получено 106 276 479 коротких парных чтений (16,1 Гб) и 299 619 длинных чтений (2,1 Гб). После биоинформатического анализа было получено два генома МТБ, DUR002 и DUR003, принадлежащих к разным классам относительно малоизученного филума *Elusimicrobiota*. Филогенетический анализ, совместно с анализом геномных индексов, позволили отнести DUR002 и DUR003 к двум новым родам и видам, получившим названия *Candidatus Liberimonas magnetica* DUR002 и *Ca. Obscuribacterium magneticum* DUR003. Анализ МГК этих и других известных геномов МТБ филума *Elusimicrobiota* позволил выявить уникальные гены, названные *mae* генами. Кроме того, в МГК отсутствовали последовательности *mamK*, а в магнетосомных белках - магнетохромные домены, что нетипично для МТБ. Геномный анализ также показал отсутствие генов синтеза жгутиков, тогда как все ранее изученные МТБ ими обладали. МТБ филума *Elusimicrobiota*, в свою очередь, обладали генами пилей IV типа, обеспечивающих поверхностно-ассоциированное движение. Кроме того, у МТБ этого филума были детектированы гены метаболизма ферментативного типа, что ранее не встречалось среди МТБ. Полученные результаты поднимают новые вопросы о механизмах магнитотаксиса при отсутствии жгутиков и белков, выстраивающих магнетосомы в цепочки, о процессе биоминерализации магнетосом в отсутствие магнетохромных доменов, а также расширяют знания о представителях редкой биосферы.

### **Публикация:**

Uzun M, Koziyeva V, Dziuba M, Alekseeva L, Krutkina M, Sukhacheva M, Baslerov R, Grouzdev D. Recovery and genome reconstruction of novel magnetotactic *Elusimicrobiota* from bog soil // **ISME Journal**, 2023, 17, 204–214.

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ СИСТЕМЫ БИОСИНТЕЗА ПЕПТИДОВ

Юркова М.С., Зенин В.А., Федоров А.Н.

*ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Разработана система биосинтеза пептидов на основе шаперона GroEL. За основу взят шаперонин GroEL из термостабильного организма *T. thermophilus*. Целевые пептиды включены в состав полипептидной цепи GroEL таким образом, что шаперонин экранирует их от цитоплазматического окружения, нивелируя тем самым потенциальные отрицательные эффекты, такие, как лабильность, токсичность, склонность к агрегации и др. В этой системе получены биосинтетическим путем пептиды с различными физико-химическими характеристиками. Данная работа посвящена изучению свойств полученных конструкторов GroEL в зависимости от того, какие целевые пептиды включены в состав полипептидной цепи GroEL.

### Публикации:

1. Maria S. Yurkova and Alexey N. Fedorov. GroEL—A Versatile Chaperone for Engineering and a Plethora of Applications // **Biomolecules**, 2022, 12(5),607 <https://doi.org/10.3390/biom12050607>
2. Zenin V., Yurkova M., Tsedilin A., Fedorov A. Enfvirtide biosynthesis in thermostable chaperone-based fusion // **Biotechnology Reports**, 2022, 35, September, e00734 <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00734>.

## БИОПЛЕНКИ МИКРООРГАНИЗМОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА: ДЕЙСТВИЕ ГОРМОНОВ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВНУТРИ СООБЩЕСТВ

Ганнесен А.В.<sup>1</sup>, Мартьянов С.В.<sup>1</sup>, Неволина Е.Д.<sup>1</sup>, Овчарова М.А.<sup>1</sup>, Дювенжи Е.В.<sup>1</sup>, Панкратов Т.А.<sup>1</sup>, Лойко Н.Г.<sup>1</sup>, Сухачева М.В.<sup>2</sup>, Щелкунов М.И.<sup>3</sup>, Макарова Н.Е.<sup>3</sup>, Бочкова Е.А.<sup>1</sup>, Журина М.В.<sup>1</sup>, Эль-Регистан Г.И.<sup>1</sup>, Николаев Ю.А.<sup>1</sup>, Плакунов В.К.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>3</sup> Сколковский институт науки и технологий (Сколтех)

Микробиота кожи человека в последние десятилетия является объектом пристального внимания исследователей по всему миру, однако, будучи сложным сообществом, состоящим из сотен видов микроорганизмов, формирующих мультивидовые биопленки, она по-прежнему представляет собой во многом малоизученное явление. В частности, крайне скудны сведения о том, каким образом на микробиоту кожи влияют гормоны человека, и является ли микробиота кожи в той же степени связанной с системой гуморальной регуляции, как, например, сообщество кишечника. В наших исследованиях мы показали, что все выбранные микроорганизмы-комменсалы кожи и слизистых человека так или иначе подвержены действию всех исследованных гормонов. Влияние это зависит от множества факторов, в том числе от времени инкубации, концентрации гормона в среде, а также присутствия второго микроорганизма, если речь идет о простейших модельных сообществах – бинарных биопленках. Как правило, гормоны не обладают резко выраженным влиянием на рост биопленок, как, к примеру, антибиотики, однако в их присутствии меняется экспрессия генов у микроорганизмов, что выражается в стимуляции или ингибировании роста бактерий, а также в изменениях химического состава матрикса биопленок. Кроме того, гормоны способны влиять на способность микроорганизмов противостоять различным стрессовым воздействиям, а также на способность популяции микроорганизмов производить покоящиеся формы клеток – персистеры. Наконец, гормоны способны влиять не только на поведение самих бактерий в биопленках, но и модулировать действие других активных соединений – антибиотиков. Так, нами впервые показано, что некоторые гормоны снижают эффективность азитромицина в отношении биопленок *Staphylococcus aureus* и *Kytococcus schroeteri*.

Работа поддержана грантом РФФ № 19-74-10071.

### Публикации:

1. Mart'yanov S.V. et al. The impact of norepinephrine on mono-species and dual-species staphylococcal biofilms // **Microorganisms**. 2021. V. 9. P. 820. Doi: 10.3390/microorganisms9040820
2. Ovcharova M.A. et al. Atrial natriuretic peptide affects skin commensal *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes* dual-species biofilms // **Microorganisms**. 2021. V. 9. P. 552. Doi 10.3390/microorganisms9030552
3. Gannesen A.V. et al. Epinephrine affects gene expression levels and has a complex effect on biofilm formation in *Micrococcus luteus* strain C01 isolated from human skin // **Biofilm**. 2021. V. 3. P. 100058. Doi 10.1016/j.biofilm.2021.100058
4. Kiseleva A.A. et al. Effect of  $\beta$ -estradiol on mono- and mixed-species biofilms of human commensal bacteria *Lactobacillus paracasei* ak508 and *Micrococcus luteus* c01 on different model surfaces // **Coatings**. 2022. V. 12. P. 436. Doi 10.3390/coatings12040436
5. Дювенжи Е.В. и др. Бинарные биопленки *Staphylococcus aureus* 209Р и *Kytococcus schroeteri* H01: дуалистическая роль китококков и изменения клеточной адгезии в присутствии натрийуретического пептида А-типа // **Микробиология**. 2022. Т. 91. С. 597–612. Doi 10.31857/S0026365622100251
6. Loiko N.G. et al. Brain natriuretic peptide (BNP) affects growth and stress tolerance of representatives of the human microbiome, *Micrococcus luteus* C01 and *Alcaligenes faecalis* DOS7 // **Biology**. 2022. V. 11. P. 984. Doi 10.3390/biology11070984
7. Gannesen A.V. et al. Epinephrine extensively changes the biofilm matrix composition in *Micrococcus luteus* C01 isolated from human skin // **Front. Microbiol.** 2022. V. 13. Doi 10.3389/fmicb.2022.1003942

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА CRISPR/CAS9 ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ШТАММОВ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Кислицин В.Ю.<sup>1</sup>, Чулкин А.М.<sup>1</sup>, Рожкова А.М.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> МГУ им. Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химической энзимологии

Мицелиальный гриб *P. verruculosum* является эффективным продуцентом целлюлаз с уровнем секреции ферментов до 60 г/л. Его секретлируемый комплекс характеризуется высоким содержанием целлобиогидролаз, эндоглюканаз и β-глюкозидазы. В тоже время актуальными задачами остаются повышение продуктивности промышленных штаммов, а также оптимизация состава ферментативного комплекса для различных технологических потребностей. Этого можно добиться современными методами синтетической биологии, в частности, методом CRISPR/Cas9, который позволяет проводить нокауты целевых генов без использования стандартного метода гомологичной рекомбинации, частота которой в мицелиальных грибах составляет не более 5% [Kück U., Hoff B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – Vol. 86 (1). – P. 51–62].

Нами была адаптирована методика использования системы CRISPR/Cas9 для получения двойных нокаутов в мицелиальном грибе *P. verruculosum* с получением ауксотрофных штаммов, используемых для дальнейших трансформаций. Данным способом нами были получены штаммы с нокаутами генов целлобиогидролазы 1 (*cbh1*), целлюлазного/ксилазанного регулятора *XlnR* и репрессора целлюлаз *TacA*.

Нокаут гена *cbh1* продемонстрировал возможность использования метода для перераспределения состава ферментативного комплекса, а нокауты генов *xlnR* и *tacA* позволили конкретизировать механизм регуляции экспрессии целлюлаз у *P. verruculosum*, что необходимо для получения более продуктивных штаммов.

## Публикации:

1. Рожкова А. М., Кислицин В. Ю. Редактирование геномов мицелиальных грибов: применение системы CRISPR/Cas // **Успехи биологической химии**. – 2021. – Том LXI, - С.253-294.
2. Kislitsin V. Yu., Chulkin A. M., Zorov I. N., Denisenko Y. A., Sinitsyn A. P., Rozhkova A. M. The effect of cellobiohydrolase 1 gene knockout for composition and hydrolytic activity of the enzyme complex secreted by filamentous fungus *Penicillium verruculosum* // **Biores. Technol. Rep.** – 2022. – Vol. 18. – P. 101023.
3. Кислицин В. Ю., Чулкин А. М., Зоров И. Н., Синельников И. Г., Сеницын А. П., Рожкова А. М. Функция транскрипционного фактора *XlnR* у мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* // **Биотехнология**. – 2022. – Том 38. - №6. – С. 29–39.

## УСПЕХИ В ИССЛЕДОВАНИИ ВОДОРАСТВОРИМЫХ КАРОТИНОИД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

Слущанко Н.Н.<sup>1</sup>, Слонимский Ю.Б.<sup>1,2</sup>, Егоркин Н.А.<sup>1,2</sup>, Лунегова Д.А.<sup>1,2</sup>, Мойсенович А.М.<sup>2</sup>, Зупник А.О.<sup>1,2</sup>, Клейменов С.Ю.<sup>1</sup>, Варфоломеева Л.А.<sup>1</sup>, Минеев К.С.<sup>3</sup>, Максимов Е.Г.<sup>1,2</sup>, Бойко К.М.<sup>1</sup>, Попов В.О.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ биотехнологии РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

Каротиноиды – мощные природные антиоксиданты, представляющие интерес для биотехнологии и медицины, однако их использование ограничено низкой растворимостью в водной среде. В качестве посредников было предложено применение водорастворимых каротиноид-связывающих белков (КСБ). Несмотря на описание большого числа КСБ из разных организмов от бактерий до растений и человека, механизм связывания каротиноидов, лигандная специфичность и 3D структура описаны неполно и лишь для единичных КСБ.

В работе был исследован фотоактивный белок ОСР (клада X) из самой древней нынеживущей цианобактерии рода *Gloeobacter*, определена его кристаллическая структура (первая для ОСРХ), проведено структурно-функциональное сравнение с наиболее изученным ОСР (клада I) из цианобактерии *Synechocystis*, которое позволило объяснить способность ОСРХ к сверхбыстрой релаксации после фотоактивации и отсутствие регуляции под действием белка-партнера – FRP. На основе анализа предложено переименование и разделение гетерогенной клады X (в «3») и ее разбиение на три филогенетически обособленные субклады – ОСР3а, ОСР3б и ОСР3с.

У белка AstaP, недавно открытого у зеленой водоросли *Coelastrella astaxanthina*, выявлена необычная способность связывать различные каротиноиды (астаксантин, зеаксантин, кантаксантин, β-каротин). С помощью метода ЯМР установлена первая структура AstaP (также первая для какого-либо КСБ этим методом). AstaP имеет классический фасцилин-подобный фолд (характерен для белков адгезии) и связывает одну молекулу каротиноида в гидрофобном туннеле, который слишком короток и не обеспечивает контактов с кольцами каротиноида. Такая редкая для КСБ ситуация объясняет промискуитет AstaP в отношении связываемых каротиноидов. Структурные данные подтверждены с помощью исследования мутантных форм AstaP, а также его дальнего гомолога из *Synechocystis*. Сделано и подтверждено предположение о том, что в эволюции фасцилиновых доменов имела место неофункционализация – приобретение способности связывать каротиноиды.

Установлена первая кристаллическая структура КСБ из тутового шелкопряда *Bombyx mori* (VmCBP), который за счет переноса каротиноида лютеина обеспечивает окрашивание коконов, используемых в шелководстве в течение более 4 тыс. лет. VmCBP имеет фолд, типичный для семейства START (steroidogenic acute regulatory protein lipid transfer), однако особенности строения его лиганд-связывающей полости позволяют ему связывать разные каротиноиды, что уникально для START семейства. Показано, что даже гомолог STARD3 человека, вопреки устоявшемуся мнению в литературе, не связывает каротиноиды. Продемонстрирована возможность применения апоформы VmCBP для экстракции каротиноидов из грубого растительного сырья и их доставки к модельным белкам, биомембранам и клеткам фибробластов.

### Публикации:

1. Slonimskiy, Y. B. et al. A primordial Orange Carotenoid Protein: Structure, photoswitching activity and evolutionary aspects // **Int. J. Biol. Macromol.** 222, 167–180 (2022). DOI 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.131. IF=8.03
2. Slonimskiy, Y. B., Egorikin, N. A., Friedrich, T., Maksimov, E. G. & Sluchanko, N. N. Microalgal protein AstaP is a potent carotenoid solubilizer and delivery module with a broad carotenoid binding repertoire // **FEBS J.** 289, 999–1022 (2022). DOI 10.1111/febs.16215. IF=5.62
3. Slonimskiy, Y. B. et al. Reconstitution of the functional carotenoid-binding protein from silkworm in *E. coli*. // **Int. J. Biol. Macromol.** 214, 664–671 (2022). DOI 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.135. IF=8.03
4. Sluchanko, N. N. et al. Structural basis for the carotenoid binding and transport function of a START domain // **Structure** 30, 1647–1659.e4 (2022). DOI 10.1016/j.str.2022.10.007. IF=5.87
5. Sluchanko, N. N. et al. Silkworm carotenoprotein as an efficient carotenoid extractor, solubilizer and transporter // **Int. J. Biol. Macromol.** 223, 1381–1393 (2022). DOI 10.1016/j.ijbiomac.2022.11.093. IF=8.03



## НОВЫЕ ТАКСОНЫ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ПОДЗЕМНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ

Хомякова М.А., Заварзина Д.Г., Меркель А.Ю., Клюкина А.А., Пихтерева В.А., Гаврилов С.Н., Слободкин А.И.

*ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Континентальная подземная биосфера населена микроорганизмами, значительная часть из которых относится к некультивируемым таксономическим группам. Одна из таких групп, ОРВ41, является филогенетической линией на уровне порядка внутри актинобактериального класса Coriobacteriia. Бактерии ОРВ41 широко географически распространены, но физиология, метаболические признаки и возможная экологическая роль этой космополитной группы были неизвестны.

Из наземного грязевого вулкана полуострова Тамань и из подземных минеральных вод месторождения Эссентуки мы выделили две чистые культуры анаэробных актинобактерий, принадлежащих к ОРВ41. Клетки новых изолятов представляют собой мелкие неподвижные палочки, образующие многочисленные пилы. Штамм M08DHB<sup>T</sup> является мезофилом, тогда как штамм Es71-Z0120<sup>T</sup> – термофил, имеющий широкий температурный диапазон для роста (25–77°C). Штамм M08DHB<sup>T</sup> восстанавливает соединения серы и использует ароматическое соединение – 3,4-дигидроксibenзоат. Штамм ES71-Z0120<sup>T</sup> является облигатным железоредуктором. Оба изолята растут литотрофно и потребляют молекулярный водород или формиат, используя либо тиосульфат, либо элементную серу, либо Fe (III) в качестве акцептора электронов. Геномы штаммов содержат гены, кодирующие белки предполагаемого, малоисследованного восстановительного глицинового пути автотрофной фиксации CO<sub>2</sub>, водород-поглощающие Ni-Fe гидрогеназы и мультигемовые цитохромы с-типа. Мы предлагаем отнести выделенные штаммы к новым таксонам уровней вид–порядок и описываем штамм M08DHB<sup>T</sup> как *Anaerosoma tenue* gen. nov., sp. nov., а штамм ES71-Z0120<sup>T</sup> как *Parvirga hydrogeniphila* gen. nov., sp. nov., которые являются членами нового порядка *Anaerosomatales* ord. nov. Следующий микроорганизм, выделенный из соляного озера наземного грязевого вулкана, принадлежит к семейству *Geopsychrobacteraceae* класса *Desulfuromonadia*. Это анаэробная мезофильная алкалофильная бактерия (штамм M08fum<sup>T</sup>). Изолят способен к сбраживанию органических кислот и анаэробному дыханию с элементной серой, Fe(III) и арсенатом. На основании фенотипических, генотипических и филогенетических характеристик мы предлагаем отнести штамм M08fum<sup>T</sup> к новому виду нового рода *Pelovirga terrestris* gen. nov., sp. nov.

Эти работы расширяют знания о разнообразии, метаболических функциях и экологических ролях представителей филума Actinomycetota и класса *Desulfuromonadia*.

### Публикации:

1. Khomyakova M.A., Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Pikhтерева V.A., Gavrilov S.N., Slobodkin A.I. The first cultivated representatives of the actinobacterial lineage OPB41 isolated from subsurface environments constitute a novel order *Anaerosomatales* // **Front. Microbiol.** 2022. V. 13. Art. 1047580. Doi: 10.3389/fmicb.2022.1047580
2. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Kopitsyn D.S., Slobodkin A.I. *Pelovirga terrestris* gen. nov., sp. nov., anaerobic, alkaliphilic, fumarate-, arsenate-, Fe(III)- and sulfur-reducing bacterium isolated from a terrestrial mud volcano // **Syst. Appl. Microbiol.** 2022. V. 45. Art. 126304. Doi: 10.1016/j.syapm.2022.126304

# ИНДИВИДУАЛЬНОЕ И СОВМЕСТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ХИМИЧЕСКИХ ШАПЕРОНОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ И КИНЕТИКУ АГРЕГАЦИИ ГЛИКОГЕНФОСФОРИЛАЗЫ Б

Михайлова В.В., Еронина Т.Б., Чеботарева Н.А., Клейменов С.Ю., Пивоварова А.В., Курганов Б.И.

*ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Химические шапероны представляют собой низкомолекулярные соединения, способные препятствовать агрегации белков. Понимание механизма их действия является ключевым для использования в биотехнологии. В качестве шаперонов могут выступать сахара, метиламины, аминокислоты. Было изучено индивидуальное и совместное влияние химических шаперонов разных классов, таких как трегалоза, бетаин и лизин, на стабильность, олигомерное состояние и кинетику тепловой агрегации гликогенфосфорилазы Б (ФБ) при 48 °С. Методами динамического светорассеяния, дифференциальной сканирующей калориметрии и аналитического ультрацентрифугирования показано, что трегалоза и бетаин стабилизируют третичную и четвертичную структуры молекулы ФБ и защищают белок от агрегации. При совместном использовании данные шапероны усиливают действие друг друга. Лизин, напротив, снижает термостабильность ФБ, ускоряет ее денатурацию и стимулирует формирование крупных белковых агрегатов. Дестабилизирующее влияние лизина на белок практически полностью нейтрализуется 2,2-кратным избытком трегалозы и лишь частично аналогичным количеством бетаина. Большая эффективность трегалозы по сравнению с бетаином может объясняться усилением ее защитного действия на ФБ в присутствии лизина. Сделан вывод, что основное влияние каждого из агентов направлено на стадию диссоциации/денатурации димера ФБ, являющейся скоростью-лимитирующей при тепловой агрегации белка. Добавление второго шаперона может внести существенные изменения в стабильность, олигомерное состояние и кинетику процесса агрегации белковой молекулы. Работа поддержана грантом РФФИ № 21-14-00178.

## **Публикации:**

1. Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Chebotareva N.A., Kleymenov S.Y., Pivovarova A.V., Kurganov B.I. Combined action of chemical chaperones on stability, aggregation and oligomeric state of muscle glycogen phosphorylase b // **Int J Biol Macromol.** 2022; 203:406-416. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.01.106. (IF=8.025). Q1
2. В.В. Михайлова, Т.Б. Еронина, Н.А. Чеботарева, Б.И. Курганов. Влияние химических шаперонов на процессы агрегации белков, протекающие в различных кинетических режимах // **Биохимия**, 2023. Принята в печать

## ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ БИОСИНТЕЗОМ АНТИБИОТИКА ЦЕФАЛОСПОРИНА С И МЕТАБОЛИЗМОМ ПОЛИАМИНОВ У *ACREMONIUM CHRYSOGENUM*

Жгун А.А.<sup>1</sup>, Нураева Г.К.<sup>1</sup>, Думина М.В.<sup>1</sup>, Январев Д.В.<sup>2</sup>, Хомутов М.А.<sup>2</sup>, Эльдаров М.А.<sup>1</sup>, Хомутов А.Р.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup>ИМБ РАН

В начале 2010-х было показано, что экзогенное введение алифатических полиаминов способно дополнительно повышать продукцию целевых вторичных метаболитов у ряда важнейших грибных продуцентов (таких как, продуцент пенициллина *G Penicillium chrysogenum* или продуцент ловастатина *Aspergillus terreus*), улучшенных классическими методами. Однако молекулярные основы этого феномена до сих пор неизвестны. Объектами нашего исследования явились штаммы сордариомицета *Acremonium chrysogenum*, дикого типа (WT) и его улучшенный классическими методами аналог (HY), с увеличенным в 200–300 раз уровнем продукции антибиотика цефалоспорина С (цефС). Добавление экзогенных полиаминов, таких как спермидин или 1,3-диаминопропан, в процессе ферментации *A. chrysogenum* HY приводило к дополнительному увеличению выхода цефС на 10–15%. В тоже время, этот высокоактивный аналог проявлял повышенную устойчивость к ингибитору ключевого фермента биосинтеза полиаминов, орнитиндекарбоксилазе, и имел увеличенное содержание эндогенных полиаминов. В текущем исследовании мы разработали специальную синтетическую среду, на которой выявили противоположный эффект полиаминов. Добавление 1,3-диаминопропана приводило к увеличению выхода цефС на 12–15%. Однако добавление спермидина приводило к снижению выхода цефС на 14–15% и накоплению предшественника пути его метаболизма – деацетилцефалоспорина С (ДАС); общее количество цефемов (ДАС и цефС) было таким же, как и после добавления 1,3-диаминопропана. Это указывает на то, что спермидин, но не 1,3-диаминопропан, влияет на финальную стадию биосинтеза цефС, связанную с ацелированием его предшественника. В обоих случаях активация биосинтетических генов из бета-лактамных BGCs происходила на том же уровне по сравнению с контролем; экспрессия транспортных генов была на уровне контроля. Противоположный эффект может быть связан с тем, что N<sup>1</sup>-ацелирование при катаболизме спермидина происходит гораздо эффективнее, чем для 1,3-диаминопропана. Таким образом впервые показана взаимосвязь между биосинтезом цефалоспорина С и метаболизмом полиаминов на уровне общего субстрата, ацетилкофермента А. Такие знания важны как для понимания молекулярных основ действия полиаминов на высокопродуктивные штаммы грибов, так и для целенаправленного создания штаммов и подбора питательных сред для повышения продукции целевых вторичных метаболитов.

### Публикации:

1. Zhgun, A.A., Eldarov, M.A. Spermidine and 1,3-Diaminopropane Have Opposite Effects on the Final Stage of Cephalosporin C Biosynthesis in High-Yielding *Acremonium chrysogenum* Strain // **International Journal of Molecular Sciences**, 2022, 23, 14625, doi:10.3390/IJMS232314625/S1. IF=6.208, Q1.
2. Zhgun, A.A., Eldarov, M.A. Polyamines Upregulate Cephalosporin C Production and Expression of  $\beta$ -Lactam Biosynthetic Genes in High-Yielding *Acremonium chrysogenum* Strain // **Molecules**, 2021, Vol. 26, Page 6636 2021, 26, 6636, doi:10.3390/MOLECULES26216636. IF=4.927, Q1.

# НОВЫЕ КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ ГАЛО(НАТРОНО)АРХЕИ ИЗ ГИПЕРСОЛЕННЫХ И СОДОВЫХ ОЗЕР, УТИЛИЗИРУЮЩИЕ ПОЛИСАХАРИДЫ

Сорокин Д.Ю.<sup>1</sup>, Ельченинов А.Г.<sup>1</sup>, Хижняк Т.В.<sup>1</sup>, Колганова Т.В.<sup>2</sup>, Кубланов И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Способность галоархей утилизировать различные полисахариды представляет значительный интерес как для фундаментального понимания их функционального значения для минерализации органического вещества в гиперсоленых средах, так и для рассмотрения их как источника чрезвычайно гало(щелоче) устойчивых внеклеточных гидролаз, которые имеют большой потенциал применения в производстве биотоплива из лигноцеллюлозных отходов.

Пробы донных осадков и рассолов (гиперсоленых хлоридно-сульфатных озер с нейтральным рН и гиперсоленых содовых озер Кулундинской степи (Алтай, Россия), северо-восточной Монголии и Северной Америки (Калифорния)) были отобраны ранее и использованы в качестве инокулята для получения первичных накопительных культур гало- и натроноархей, способных использовать полисахариды.

Результаты исследования продемонстрировали значительное разнообразие полисахарид-специализированных галоархей, принадлежащих к уже описанным родам и видам (преимущественно для соленых озер) и нескольким новым родам (преимущественно среди натроноархей), все представители которых обладают ферментативным репертуаром, достаточным для разложения соответствующих полисахаридов. Впервые были выделены галоархеи, способные расти на таких полисахаридах, как декстран, курдлан, ксилоглюкан и бета-маннан. Проведена характеристика 7 чистых культур алкалофильных галоалоархей из гиперсоленых содовых озер юго-западной Сибири с использованием амилопектина и бета-фруктанов (инулина и левана). На основе фенотипических, филогенетических и геномных различий штаммы группы 1 (типовой штамм AArc-St1-1) были описаны как представители нового вида внутри рода *Natronaeroarchaeum* – *Natronaeroarchaeum aerophilus* sp. nov., а штаммы группы 2 (типовой штамм AArc-St2) образуют новый род и новый вид *Natronocalculus amylovorans* gen. nov., sp. nov.

## Публикации:

1. Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Khizhniak T.V., Kolganova T.V., Kublanov I.V. Selective enrichment on a wide polysaccharide spectrum allowed isolation of novel metabolic and taxonomic groups of haloarchaea from hypersaline lakes // **Frontiers in Microbiology**. 2022. V. 13. Art. 1059347. Doi: 10.3389/fmicb.2022.1059347
2. Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Khizhniak T.V., Koenen M., Bale N.J., Sinninghe Damsté J.S., Kublanov I.V. *Natronocalculus amylovorans* gen. nov., sp. nov., and *Natronaeroarchaeum aerophilus* sp. nov., dominant culturable amylolytic natronoarchaea from hypersaline soda lakes in southwestern Siberia // **Systematic and Applied Microbiology**. 2022. V. 45 (4). Art. 126336. Doi: 10.1016/j.syapm.2022.126336

## МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ ПОЧВ ДЛЯ РАСШИФРОВКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА МАЛОИЗУЧЕННЫХ И НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГРУПП МИКРООРГАНИЗМОВ

Белецкий А.В., Марданов А.В., Бегматов Ш.А., Ракитин А.Л., Дедыш С.Н., Равин Н.В.

*ФИЦ Биотехнологии РАН*

Несмотря на интенсивные исследования микробиомов почв с применением как классических микробиологических методов, так и современных молекулярно-генетических подходов, наши знания о функциональных возможностях большинства почвенных микроорганизмов остаются ограниченным. Из примерно 500 филотипов, доминирующих в почвенных микробиомах, больше половины представляют линии, некультивируемые в лабораторных условиях. Целью работы является анализ метагеномов почв для расшифровки функционального потенциала ключевых микроорганизмов этих экосистем, в первую очередь - таких малоизученные группы бактерий как Acidobacteria, Verrucomicrobia, Planctomycetes, а также «некультивируемые» филумы. В результате секвенирования метагеномов торфяно-болотных почв, собраны геномы высокого качества для 89 микроорганизмов, в том числе малоизученных линий Acidobacteriota (некультивируемые порядки UBA754 и UBA5066, семейство UBA2999), Verrucomicrobiota (порядок Methyacidiphilales), Planctomycetota (порядок UBA1161), Bacteroidota (порядок АКУН767), и кандидатных филумов WPS-2, AD3 и MBNT15. В докладе будут представлены результаты анализа геномов представителей двух линий бактерий, о которых ранее почти ничего не было известно – веррукомикробиев порядка Methyacidiphilales и некультивируемого филума MBNT15. На основе геномных данных определено филогенетическое положение этих бактерий, реконструированы пути их метаболизма, предсказана функциональная роль в экосистемах почв. Работа поддержана грантом РФФИ 19-29-05059 и Минобрнауки РФ (ИЦМУ «Агротехнологии будущего»).

### Публикации:

1. Dedysh SN, Beletsky AV, Ivanova AA, Danilova OV, Begmatov S, Kulichevskaya IS, Mardanov AV, Ravin NV. (2021) Peat-inhabiting Verrucomicrobia of the order Methyacidiphilales do not possess methanotrophic capabilities // **Microorganisms**. 9: 2566.
2. Begmatov S, Beletsky AV, Dedysh SN, Mardanov AV, Ravin NV. (2022) Genome analysis of the candidate phylum MBNT15 bacterium from a boreal peatland predicted its respiratory versatility and dissimilatory iron metabolism // **Front Microbiol**. 13: 951761.
3. Дедыш С.Н., Иванова А.А., Бегматов Ш.А., Белецкий А.В., Ракитин А.Л., Марданов А.В., Филиппов Д.А., Равин Н.В. (2022) Ацидобактерии в низинных болотах: филогенетическое разнообразие и анализ геномов ключевых представителей // **Микробиология**, т. 91, № 6, с. 685–694.

# ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА СТРУКТУРУ G-КВАДРУПЛЕКСНОГО АПТАМЕРА И ЕГО ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА

Самохвалов А.В.<sup>1</sup>, Сафенкова И.В.<sup>1</sup>, Еремин С.А.<sup>1</sup>, Бончук А.Н.<sup>2</sup>, Максименко О.Г.<sup>2</sup>, Случанко Н.Н.<sup>1</sup>, Жердев А.В.<sup>1</sup>, Дзантиев Б.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН;*

<sup>2</sup> *Институт биологии гена РАН*

Управление аффинностью лиганд-рецепторного взаимодействия позволяет существенно расширить возможности биоаналитических систем. Для аптамеров (олигонуклеотидных рецепторов) такими потенциальными регуляторами являются короткие одноцепочечные нуклеиновые кислоты (оцНК), комплементарные к различным элементам структуры аптамера. Однако вопрос о выборе регулятора для того или иного воздействия на аптамер остается открытым; как правило, работы ограничиваются демонстрацией возможностей одной априорно выбранной оцНК. В связи с этим задача представляемого исследования состояла в характеристике влияния на структуру и лиганд-связывающую способность аптамера комплементарных оцНК, отличающихся по локализации участков связывания и количеству образующихся водородных связей. Эксперименты проводились с аптамером, специфичным к охратоксину А (ОТА) – низкомолекулярному токсичному метаболиту грибов. Изучавшийся аптамер представляет собой 36-звенную оцДНК (5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA-3'), состоящую из 5'-хвоста (нуклеотиды с 1-го по 5-й), G-квадруплекса (по 24-й нуклеотид) и 3'-хвоста. Охарактеризованы 24 оцНК, перекрывающие все структурные элементы аптамера. Взаимодействия аптамер–оцНК, аптамер–ОТА и конкуренцию между ОТА (или ОТА, меченным флуоресцеином) и оцНК за связывание с аптамером изучали методами неденатурирующего электрофореза, регистрации анизотропии флуоресценции (АФ), изотермической микрокалориметрии (ИМК) и спектроскопии кругового дихроизма (КД).

Равновесные константы диссоциации комплексов аптамер–оцНК (диапазон значений от 18 до 4000 нМ) и аптамер–ОТА (78±23 нМ) определены методами ИМК и АФ; показано хорошее соответствие результатов применения двух методов. Константы в обоих наборах снижаются с ростом количества Н-связей в комплексе. Но обнаружены и исключения, когда для разных оцНК с равным числом Н-связей, константы, измеренные одним и тем же методом, отличаются на порядок. Например, для оцНК {16–24} и {28–36} (по 24 Н-связи)  $K_D$  равняются 700 и 63 нМ, соответственно. Установлено, что оцНК, образующие менее 18 Н-связей, независимо от локализации участка связывания с аптамером, не влияют на его взаимодействие с ОТА.

При изучении кинетики методом АФ показано, что конкуренция за связывание с аптамером между избытком оцНК (более 18 Н-связей), перекрывающейся с G-квадруплексом, и меченым ОТА занимает 25 минут. Методом КД установлено, что реакции с аптамером ОТА и оцНК, комплементарных хвостам, проходят менее 1 минуты, тогда как переход G-квадруплекса в дуплекс при взаимодействии с оцНК в отсутствие ОТА занимает до 10 минут. Добавленный ОТА успевает прореагировать с аптамером раньше оцНК, после чего начинается его высвобождение из комплекса, увеличивающее время перехода G-квадруплекса в дуплекс до 7 раз. Возможность высвобождения определяется тем, насколько оцНК перекрывает G-квадруплексную часть аптамера. Так, оцНК {6-15} (взаимодействует с 9 из 19 нуклеотидов, образующих G-квадруплекс) необратимо ингибирует комплексообразование с ОТА, хотя эти реакции сопоставимы по константам связывания. Для пяти оцНК с меньшей степенью перекрытия с G-квадруплексом наблюдается обратимое ингибирование.

Конкурентное связывание оцНК и ОТА с аптамером применено для детекции ОТА. В оцНК вводили флуоресцентную метку (оцНК\*) и регистрировали АФ комплекса аптамер–оцНК\*. Обнаружено, что при взаимодействии с аптамером оцНК\* и ОТА-содержащей пробы даже при избытке ОТА высвобождается лишь около 30% оцДНК\*, из-за чего возможно выявлять ОТА лишь в концентрациях от 20 нМ. Более эффективна твердофазная схема с пероксидазным усилением: комплекс аптамер–оцНК\* сорбировали на полистироловый планшет, инкубировали с пробами, содержащими ОТА, и отмывали, а оставшиеся на фазе оцНК\* проявляли антителами к флуоресцеину и антивидовыми антителами, меченными пероксидазой, регистрируя связанную ферментную метку с помощью хемилюминесцентного субстрата. Такая система позволяет выявлять до 3 нМ ОТА, что меньше чем нормативные требования к предельно допустимому содержанию ОТА в пищевых продуктах – 5 мкг/кг (12,4 нМ).

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-74-00112).

## Публикации:

1. Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Eremin S.A., Bonchuk A.N., Maksimenko O.G., Sluchanko N.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Modulation of aptamer–ligand-binding by complementary oligonucleotides: A G-quadruplex anti-ochratoxin A aptamer case study // **International Journal of Molecular Sciences**. 2022, V. 23(9), article 4876.
2. Samokhvalov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Electrophoretic study of G-quadruplex aptamer interactions with different short single-strand complementary oligonucleotides // **Journal of Physics: Conference Series**, 2022, V. 2212(1), article 012001.

## ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ АКТИВНЫХ ИЛОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ ГОРОДА МОСКВЫ

Бегматов Ш.А.<sup>1</sup>, Дорофеев А.Г.<sup>2</sup>, Кадников В.В.<sup>1</sup>, Белецкий А.В.<sup>1</sup>, Пименов Н.В.<sup>2</sup>, Равин Н.В.<sup>1</sup>, Марданов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИИБ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> ИИМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Микробные сообщества активных илов очистных сооружений играют центральную роль в очистке сточных вод. Их таксономический состав изменяется в зависимости от технологии и характеристики поступающих сточных вод. В ходе работы мы исследовали микробные сообщества активных илов девяти крупных очистных сооружений города Москвы. В двух сооружениях использовалась традиционная технология аэробной очистки сточных вод, в одном сооружении применялась двустадийная технология нитрификации/денитрификации, а в шести сооружениях использовалась технология, разработанной в Кейптаунском университете УСТ, в процессе очистки происходит смена анаэробных/аноксигенных/оксигенных условий. Таксономический состав микробных сообществ определяли на основании анализа V3-V4 фрагмента гена 16S рРНК, полученного с помощью высокопроизводительного секвенирования на базе платформы MiSeq (Illumina). Результаты исследования показали, что на развитие и формирование микробного сообщества повлияла применяемая технология очистки воды. В сообществах преобладали представители филумов Proteobacteria, Bacteroidota и Actinobacteriota. КОС (Курьяновские очистные сооружения), использующие процесс УСТ, эффективно удаляют не только органические вещества, но также азот и фосфор, что соответствует высокому содержанию аммоний окисляющих бактерий рода *Nitrosomonas* sp., денитрификаторы и фосфатаккумулялирующих бактерий, которые были представлены *Candidatus Accumulibacter*, *Tetrasphaera* sp. С помощью сетевого анализа совместного присутствия было показано, что в активном иле присутствуют ключевые группы микроорганизмов, влияющих на стабильность и эффективность работы микробного сообщества активных илов в процессе очистки сточных вод. В результате сравнения составов микробных сообществ очистных сооружений со всего мира было показано, что московские образцы кластеризуются вместе, что указывает на то, что характеристики влияющих факторов, связанные с социальными, культурными и экологическими факторами, могут быть более важными, чем технология очистки.

### Публикация:

Begmatov, S., Dorofeev, A. G., Kadnikov, V. V., Beletsky, A. V., Pimenov, N. V., Ravin, N. V., & Mardanov, A. V. (2022). The structure of microbial communities of activated sludge of large-scale wastewater treatment plants in the city of Moscow // *Scientific Reports*, 12. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07132-4>

# БИОТРАНСФОРМАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ ЛИГНОЛИТИЧЕСКИМИ ФЕРМЕНТАМИ ГРИБА БЕЛОЙ ГНИЛИ *TRAMETES HIRSUTA* 072

Савинова О.С., Шабаетв А.В., Глазунова О.А., Моисеенко К.В., Федорова Т.В.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Дереворазрушающие базидиомицеты, вызывающие белую гниль древесины, являются наиболее активными деструкторами лигнина в природе. Они синтезируют комплекс внеклеточных окислительно-восстановительных ферментов, катализирующих трансформацию и разрушение лигнина, так называемый лигнинолитический ферментный комплекс (ЛФК). Наиболее важными ферментами комплекса являются пероксидазы (лигнинпероксидаза LiP, марганец пероксидаза MnP и версатил пероксидаза VP), а также медьсодержащая фенолоксидаза (лакказа Lac). Ферменты ЛФК отличаются широкой субстратной специфичностью и могут принимать участие не только в биотрансформации и разрушении лигнина, но также различных ксенобиотиков, включая гербициды, пестициды, красители, полициклические ароматические углеводороды и др., что определяет востребованность грибов белой гнили в качестве перспективных продуцентов в технологиях биоконверсии и биоремедиации.

В данной работе была изучена возможность использования дереворазрушающего сапротрофного гриба белой гнили *Trametes hirsuta* 072 и его лигнолитического фермента лакказы для биотрансформации таких ксенобиотиков, как эфиры фталевой кислоты (ЭФК), микотоксины и фенолоподобные стероидные соединения, повсеместно обнаруживаемые в окружающей среде и являющиеся потенциально опасными для жизни и здоровья живых организмов.

Проведена оценка способности гриба *T. hirsuta* 072 к трансформации таких наиболее опасных ЭФК, как бис(2-этилгексил) фталат, бензил бутилфталат, диизобутилфталат и дибутилфталат. Показано, что скорость роста и накопление биомассы *T. hirsuta* 072 на средах с ЭФК снижается незначительно, при этом происходит деструкция фталатов. Методом 2D электрофореза с последующей масс-спектрометрической идентификацией белковых пятен (MALDI-TOF/TOF MS/MS) выявлены ферменты, играющие ключевую роль в биодеструкции ЭФК. Показано, что основными секретлируемыми белками в присутствии ЭФК являлись ферменты ЛФК гриба, такие как марганец пероксидазы (MnP2, MnP5, MnP7), версатил пероксидаза (VP2), лигнин пероксидаза (LiP9) и лакказа (LacA). Кроме того, были идентифицированы метаболиты, которые образуются в результате деструкции ЭФК грибом и проведена первичная оценка их токсичности.

Ранее нами были получены и охарактеризованы 4 изофермента лакказы гриба *T. hirsuta* – нативный мажорный (LacA) и рекомбинантные минорные изоферменты (rLacC, rLacD и rLacF), полученные в *Penicillium canescens*. В данном исследовании была изучена их способность к трансформации микотоксинов. Показана возможность деструкции афлатоксина B1 (AFB1) и зеараленона чистыми препаратами лакказ, причем в случае AFB1 минорные изоферменты rLacD и rLacF были наиболее эффективны. Кроме того, проведено сравнительное исследование способности данных изоферментов лакказы к биотрансформации 17β-эстрадиола (E2). Установлено, что все изоферменты способны катализировать окислительное сочетание E2 в водной среде с образованием преимущественно димеров и тримеров, которые считаются менее биологически активными, чем исходный E2.

## Публикации:

1. Loi M., Glazunova O., Fedorova T., Logrieco A.F., Mulè G. / Fungal Laccases: The Forefront of Enzymes for Sustainability // **Journal of Fungi** – 2021 – Vol. 7 – 1048; DOI:10.3390/jof7121048
2. Savinova O.S., Solyev P.N., Fedorova T.V., Kochetkov S.N., Savinova T.S. / Comparative analysis of the white rot fungus *Trametes hirsuta* 072 laccases ability to modify 17β-oestradiol in the aqueous medium // **Biocatalysis and Biotransformation** – 2022; DOI:10.1080/10242422.2022.2085034
3. Савинова О.С., Шабаетв А.В., Глазунова О.А., Еремин С.А., Фёдорова Т.В. / Биодеструкция эфиров фталевой кислоты грибами белой гнили // **Прикладная Биохимия и Микробиология** – 2022 – Т. 58, № 5 – С. 484–499; DOI: 10.31857/S0555109922050142
4. Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Fedorova T.V. Benzyl Butyl Phthalate and Diisobutyl Phthalate Biodegradation by White-rot Fungus *Trametes hirsuta* // **Applied Biochemistry and Microbiology** – 2022 – Vol. 58, Suppl. 1 – P. S113–S125; DOI:10.1134/S0003683822100118



## ПРИМЕНЕНИЕ ИННОВАЦИОННОГО ПОДХОДА DBNG ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ЖИВЫХ КЛЕТОК

Складнев Д.А.<sup>1</sup>, Сорокин В.В.<sup>1</sup>, Саакян С.В.<sup>2</sup>, Алексеева А.П.<sup>2</sup>, Карлов С.П.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава РФ

<sup>3</sup> Московский политехнический университет

В сообщении представлены новые сведения о применении разработанного авторами метода DBNG (Detection of Biogenic Nanoparticles Growth/Generation), позволяющего проводить оценку метаболической активности живых клеток по их природной способности восстанавливать катионы металлов до нуль-валентного состояния. Именно присутствие в исследуемых пробах живых клеток (долговременных доноров электронов) обеспечивает потерю катионами заряда, что запускает кластеризацию восстановленных атомов, дальнейшую самосборку нанокристаллических структур, приводящую к генерации биогенных наночастиц металлов. Как было доказано ранее, параметры биогенных наночастиц, генерируемых *de novo*, отражают уровень метаболической активности живых клеток, тогда как в присутствии неактивных клеток и в стерильных средах наночастицы не формируются.

В отчетный период были продолжены исследования для демонстрации применимости метода DBNG в нескольких областях биомедицинских исследований. Так были выявлены две новые бактериальные культуры из микробных сообществ криолитозоны Якутии, перспективные для практического получения биогенных наночастиц серебра с заданными параметрами. С применением метода DBNG исследовали влияние инактивации некоторых клеточных биосистем на способность психроактивных бактерий генерировать наночастицы серебра (моделируя «выключение» отдельных биосистем клеток добавлением различающихся по своему действию биоцидных соединений). При продолжении совместных исследований с офтальмоонкологами были получены результаты для уточнения протокола дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей придаточного аппарата глаза. Для этого варианта применения метода DBNG разработана новая концепция ускоренной фотометрической детекции твердой нанокристаллической фазы, генерируемой клетками *de novo*.

### Публикации:

1. Skladnev D.A., Sorokin V.V., Gromova A.S., Chirov V.V., Kotsyurbenko O.R. Nanobiotechnological method for studying metabolically active natural microbial communities // **J. Microbiol. Biotechnol.** 2022. V. 7 (4). Art. 000240. doi: 10.23880/oajmb-16000240
2. Саакян С.В., Складнев Д.А., Алексеева А.П., Сорокин В.В., Цыганков А.Ю. Экспресс-диагностика злокачественных опухолей придаточного аппарата глаза на основе синтеза биогенных наночастиц // **Head and neck. Russian Journal.** 2022. Т. 10. № S252. С. 94–97. doi: 10.25792/HN.2022.10.2.S2.94-97
3. Складнев Д.А., Карлов С.П., Анисимкин В.И., Сорокин В.В. Методы исследования параметров биогенных металлических наночастиц, формирующихся *in situ* // **РЭНСИТ: Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии.** 2022. Т. 14 (4). С. 393–414. doi: 10.17725/rensit.2022.14.393
4. Саакян С.В. Алексеева А.П., Складнев Д.А., Сорокин В.В., Цыганков А.Ю., Безнос О.В. Способ экспресс-диагностики злокачественных опухолей век и конъюнктивы. Патент № 2776647 С1 РФ, МПК В82В 1/00, G01N 21/00. Дата начала отсчета срока действия патента 29.12.2021.

# ПРОТОНИРОВАННЫЕ ПОЛИДИАЛЛИЛАМИНЫ – НОВЫЕ ПОЛИМЕРЫ С БИОЦИДНЫМ ЭФФЕКТОМ В ОТНОШЕНИИ МИКОБАКТЕРИЙ: МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Шлеева М.<sup>1</sup>, Тимофеева Л.<sup>2</sup>, Бондаренко Г.<sup>2</sup>, Никитушкин В.<sup>1</sup>, Симонова Ю.<sup>2</sup>, Топчий М.<sup>2</sup>, Еременко И.<sup>2</sup>, Мулюкин А.<sup>1</sup>, Капрельянц А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН

Микобактерии, в том числе возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, обладают уникальным строением клеточной стенки (КС), что делает их неуязвимыми к действию многих дезинфицирующих средств, в том числе кватернизованных полимерных и низкомолекулярных биоцидов. Так, кватернизованный полидиаллиламин поли(диаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ)), который проявляет умеренную антимикробную активность в отношении возбудителей широко распространенных госпитальных инфекций и используются в качестве флокулянта на водоочистных сооружениях, не активен в отношении микобактерий.

Нами было обнаружено, что катионные некватернизованные протонированные диаллиламмониевые полимеры (вторичные и третичные трифторацетатные соли полидиаллиламмония, ПДАА) проявляют сильное бактерицидное действие в отношении как вегетативных, так и покоящихся форм *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*. Причем активность этих соединений зависит от протонирования аммониевых групп, которые в структуре звеньев ПДАА позволяют варьировать свойства полимера от полисолей до полиоснований в зависимости от рН среды. Более того, способность этих групп аммония/амина образовывать водородные связи может придавать полимерам новые свойства, отличные от свойств четвертичных групп. Значения минимальных бактерицидных концентраций (МБК) ПДАА для микобактерий сопоставимы с минимальными ингибирующими концентрациями (МИК) современных антибиотиков. ПДАА проявляют достаточно быстрое микобактерицидное (т.е. в отношении микобактерий, в частности *M. smegmatis*) и туберкулоцидное (в отношении *M. tuberculosis*) действие в течение 1,5 ч при МБК выше значений 1,5–30 мкг/мл. С ростом молекулярной массы полимеров ПДАА закономерно наблюдается значительное увеличение биоцидной эффективности. ПДАА активны также против покоящихся клеток *M. tuberculosis*, но с более низкой эффективностью чем в отношении клеток в активной фазе. Активность в отношении покоящихся форм указывает на то, что механизм действия ПДАА на микобактерии неспецифичен и не направлен на метаболические процессы бактериального роста. Микроскопические исследования в режиме эпифлуоресценции свидетельствовали о нарушении проницаемости внутренней мембраны на примере клеток *M. smegmatis* под действием ПДАА через 20 мин. Наглядным свидетельством нарушения проницаемости клеточной стенки (КС) *M. smegmatis* и последующей гибели клеток явились также результаты исследования ТЭМ. При измерении электрофоретической подвижности клеток *M. smegmatis* было показано, что наружный слой КС микобактерий имеет небольшой отрицательный заряд, который меняется на положительный за счет адсорбции протонированного полимера ПДАА. С помощью ИК-Фурье спектроскопии показано, что полимеры ПДАА образуют межмолекулярный комплекс с фенольными гликолипидами (ФГЛ) внешнего слоя КС микобактерий, что приводит к фатальному нарушению проницаемости КС, а впоследствии и к гибели клеток.

Таким образом, механизм неспецифического действия ПДАА заключается в первоначальном прочном комплексообразовании полимеров с молекулами ФГЛ наружной мембраны КС. Образование комплекса с адсорбированным поликатионом должно приводить к латеральной сегрегации молекул наружного слоя КС, вызывая фатальное нарушение структуры и целостности наружной мембраны клетки, ведущее к гибели клетки. Антимикробное действие полимеров ПДАА усиливается за счет подавления трансмембранного потенциала (ТМ) клеток микобактерий. Мы полагаем, что благодаря структурной и химической идентичности КС *M. smegmatis* и *M. tuberculosis*, этот вывод, полученный на модельной бактерии, верен и для патогенной бактерии *M. tuberculosis*.

## Публикация:

Larisa Timofeeva, Galina Bondarenko, Vadim Nikitushkin, Yulia Simonova, Maxim Topchiy, Ivan Eremenko, Margarita Shleeva, Andrey Mulyukin, Arseny Kaprelyants, On the molecular mechanism of nonspecific antimicrobial action of protonated diallylammonium polymers on mycobacterial cells // **European Polymer Journal**, Volume 171, 2022, 111214, Q1 <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2022.111214>.

## СОЗДАНИЕ БЕЗЦИСТЕИНОВОГО ВАРИАНТА БИФОТОХРОМНОГО БЕЛКА MOXSAASOTI ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ОКИСЛИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ КЛЕТКИ

Марынич Н.К.<sup>1</sup>, Хренова М.Г.<sup>1,2</sup>, Гавшина А.В.<sup>1</sup>, Соловьев И.Д.<sup>1</sup>, Савицкий А.П.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова

Бифотохромные белки являются уникальными представителями GFP-подобных флуоресцентных белков. Они обладают одновременно двумя типами фотопревращений: обратимым фотопереключением (переход между флуоресцирующим и нефлуоресцирующим состояниями) и необратимой фотоконверсией (переход из зеленого в красное флуоресцирующее состояние). Высокая фотохимическая активность остатков цистеина является одной из причин создания «тох»-мономерных и устойчивых к окислению форм белка. Путем одновременного двухточечного сайт-насыщенного мутагенеза а.о. цистеина в положениях 105 и 117 получены два варианта с яркой флуоресценцией на 520 нм: moxSAASoti-T и moxSAASoti-V (содержащие замены всех цистеинов, V127T и отличающиеся только заменами в положении 117: C117T и C117V, соответственно). Варианты moxSAASoti характеризуются более высокой скоростью фотопереключения по сравнению с mSAASoti и снижением скорости фотообесцвечивания по сравнению с вариантом mSAASoti-3C. Скорости фотоконверсии близки к варианту mSAASoti-3C и выше, чем у mSAASoti, однако эффективность фотоконверсии хуже, что, предположительно, связано со снижением стабильности красной формы белка. Поскольку кинетические константы фотопревращений moxSAASoti-V ниже, чем у moxSAASoti-T, в качестве основного moxSAASoti был выбран вариант moxSAASoti-T.

### Публикация:

N.K.Marynich, M.G.Khrenova, A.V.Gavshina, I.D.Solovyev, and A.P.Savitsky, First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // **Scientific Reports**, vol. 12, no. 1, p. 7862, May. 2022, doi: 10.1038/s41598-022-11249-x.

# ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО ИНДИКАТОРА КАЛЬЦИЯ GEM-GECO ДЛЯ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА ИЗМЕНЕНИЯМИ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ В ЦИТОЗОЛЕ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ *OGATAEA PARAPOLYMORPHA*

Кулакова М.В., Каргинов А.В., Агафонов М.О.

*ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Кальций является вторичным мессенджером, участвующем в ответе на внешние раздражители в разных типах живых клеток. Для этого в отсутствие воздействий его концентрация в цитозоле ( $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ ) поддерживается на низком уровне (50-200 нМ) путем перекачивания его из цитозоля во внутриклеточные депо. Основным депо  $Ca^{2+}$  в дрожжевой клетке является вакуоль, в которой происходит накопление  $Ca^{2+}$ , в существенной степени, за счет действия вакуолярной кальциевой АТФазы Pmc1. Ранее мы наблюдали, что инактивация этой АТФазы у дрожжей рода *Ogataea* приводит к фенотипам, связанным с нарушением клеточного цикла. Для дальнейшего изучения этого феномена важно было иметь инструмент для мониторинга изменений  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  в режиме реального времени. В качестве такого инструмента в клетках животных часто применяют генетически кодируемые флуоресцентные индикаторы кальция (GECI), которые представляют собой флуоресцентные белки с круговой пермутацией, слитые с кальмодулином (CaM) на C-конце и содержащие  $Ca^{2+}$ /CaM-связывающий пептид на N-конце. Однако в литературе не было описано примеров использования таких индикаторов для почкующихся дрожжей. Поэтому целью данной работы было определить возможность использования GECI для мониторинга  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  у дрожжей *O. parapolymorpha* и влияние продукции таких индикаторов на физиологию клеток. Для этого был выбран ратиометрический индикатор кальция GEM-GECO. Максимум эмиссии свободной от кальция формы находится на 513 нм, а кальций-связанной формы - около 450 нм. Продукция этого белка в клетках дикого типа оказывала незначительное влияние на физиологию клеток. Однако в клетках с инактивацией вакуолярной кальциевой помпы Pmc1 продукция GEM-GECO приводила к усугублению мутантных фенотипов pmc1-Δ. Эффекты, которые мы наблюдали, скорее всего, были связаны с усиленным ответом на повышение  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$ . Тем не менее, нами было продемонстрировано, что этот индикатор применим для мониторинга  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  в клетках дрожжей. В частности, было выявлено, что он преимущественно присутствует в клетках в свободной от  $Ca^{2+}$  форме в нормальных условиях и переходит в  $Ca^{2+}$ -связанную форму при повышении  $[Ca^{2+}]_{\text{цит}}$  в ответ на внешнее повышение концентрации  $Ca^{2+}$ .

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 20-04-00330).

## Публикация:

Kulakova, M.V.; Karginov, A.V.; Alexandrov, A.I.; Agaphonov, M.O. The GEM-GECO Calcium Indicator Is Useable in *Ogataea parapolymorpha* Yeast, but Aggravates Effects of Increased Cytosolic Calcium Levels // **International Journal of Molecular Sciences**. 2022. Vol. 23 (17). 10004.

## ROKUBACTERIA СЕВЕРНЫХ ТОРФЯНИКОВ: ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕДПОЧТЕНИЯ И ВОЗМОЖНЫЙ МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Иванова А.А.<sup>1</sup>, Ошкин И.Ю.<sup>1</sup>, Данилова О.В.<sup>1</sup>, Равин Н.В.<sup>2</sup>, Дедыш С.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Rokubacteria – это филогенетическая группа прокариот, в которой пока нет культивируемых и таксономически описанных представителей, по причине чего она имеет статус филума-кандидата. Бактерии этого филума населяют различные наземные экосистемы, такие, как богатые органическим веществом почвы, торфяники, осадочные отложения, но обычно составляют малую долю (не более нескольких процентов) сообщества бактерий этих экосистем. Знания о метаболическом и функциональном потенциале представителей Rokubacteria весьма фрагментарны и получены исключительно с помощью метагеномных исследований. В одной из подобных работ последнего времени было сделано громкое заявление о метанотрофном потенциале Rokubacteria. Настоящее исследование было инициировано с целью анализа разнообразия представителей этого филума-кандидата в бореальных торфяниках различных типов, а также проверки гипотезы о наличии метанотрофии у этих бактерий. Результаты профилирования микробных сообществ четырех верховых и шести низинных торфяников по генам 16S рПНК показали, что Rokubacteria населяют только низинные болота, где их относительная численность составляет до 4% всех бактерий, обнаруживая положительную корреляцию с общим содержанием азота. Инкубация образцов низинного торфа с 10%  $\text{CH}_4$  в течение 4-х недель не вызвала популяционного отклика Rokubacteria, тогда как существенное возрастание численности было зарегистрировано для известных метанотрофов. Наконец, выполненный в работе анализ 60-ти ныне доступных метагеномов Rokubacteria опроверг наличие в них генов, кодирующих ключевой фермент метанотрофов – метанмонооксигеназу (ММО). Вместо нее в нескольких метагеномах кодируются эволюционно родственные растворимой ММО медь-содержащие алканмонооксигеназы, подобные обнаруженным у ряда актинобактерий. Таким образом, исследование показало, что Rokubacteria представлены нейтрофильными организмами, не имеющими метанотрофного потенциала, но, возможно, способными окислять короткоцепочечные алканы.

Исследование выполнено в рамках работы по проекту РФФ 21-14-00034.

### Публикация:

Ivanova A.A., Oshkin I.Y., Danilova O.V., Philippov D.A., Ravin N.V., Dedysh S.N. Rokubacteria in northern peatlands: habitat preferences and diversity patterns // *Microorganisms*. 2022. V. 10 (1). Art. 11. doi: 10.3390/microorganisms10010011

## ФОТОХИМИЧЕСКАЯ РЕДОКС-АКТИВНОСТЬ ДИМЕРА ХЛОРОФИЛЛА В ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКАХ СЕМЕЙСТВА WSCP

Неверов К.В.<sup>1</sup>, Обухов Ю.Н.<sup>1</sup>, Малеева Ю.В.<sup>2</sup>, Крицкий М. С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В.Ломоносова, Биологический факультет

Водорастворимые хлорофилл-связывающие белки семейства WSCP (Water Soluble Chlorophyll-binding Proteins) обнаружены у представителей некоторых таксонов высших растений. Они локализованы вне мембранных структур хлоропластов и не участвуют в фотосинтезе. Холоформы WSCP имеют тетрамерную структуру, они связывают до четырех молекул хлорофиллов (Хл) и не содержат каротиноидов.

Хотя четвертичная структура WSCP сильно отличается от структуры фотосинтетических мембранных ансамблей, молекулы Хл в WSCP упакованы в их составе в виде молекулярных димеров, аналогичных димерам «специальной пары» хлорофилла (бактериохлорофилла) в реакционных центрах (РЦ) фотосистем. Поскольку «специальная пара» Хл (БХл) в РЦ играет роль донора электрона в первичном фотохимическом акте, возник вопрос о наличии фотохимической активности у конвергентно сходных димеров Хл в составе WSCP.

Для выяснения возможности участия димеров Хл в составе WSCP в фотохимических редокс-процессах мы исследовали взаимодействие собранных *in vitro* холоформ WSCP с акцепторами и донорами электрона при облучении их растворов красным светом, поглощаемым только Хл. В качестве объектов были выбраны белки ВоWSCP (подкласс семейства WSCP Па, связывающий только Хл а) и LvWSCP (подкласс Пб, связывающий Хл а и Хл б).

Облучение деаэрированных растворов ВоWSCP в присутствии цитохрома с красным светом ( $\lambda \geq 650$  нм), поглощаемым только Хл, сопровождалось восстановлением цитохрома, которое детектировали по приросту его пика поглощения при 550 нм. Константа скорости фотовосстановления цитохрома с линейно зависела от концентрации цитохрома, что указывает на прямое взаимодействие акцептора электрона с фотовозбужденным димером Хл в WSCP. Установлено, что источником электронов для восстановления цитохрома в наших экспериментах служил Трис (трис(гидроксиметил)аминометан), присутствовавший в пробах в качестве буферного основания [1].

В насыщенных воздухом растворах мы обнаружили эффективное фотоокисление доноров электрона - НАДН или аскорбата. В бескислородной среде фотоокисления доноров не происходило. Снижение скорости фотоокисления доноров при добавлении  $\text{NaN}_3$  – тушителя триплетного состояния Хл и ингибитора генерации синглетного кислорода ( $^1\text{O}_2$ ), указывает на протекание реакции по механизму типа II, т.е., через фотосенсибилизированную Хл генерацию  $^1\text{O}_2$ . Константа скорости фотоокисления НАДН заметно не отличалась для белков ВоWSCP и LvWSCP. Методами абсорбционной и КД-спектроскопии показана значительная устойчивость как самого Хл в WSCP, так и его димерной структуры к синглетному кислороду. Константа скорости фотоиндуцированного ВоWSCP окисления аскорбата была выше, чем НАДН, очевидно, вследствие более высокой эффективности взаимодействия аскорбата с  $^1\text{O}_2$ .

Обнаруженная нами фотохимическая активность димеров Хл в WSCP и высокая фотостабильность тетрамера делает белки семейства WSCP перспективными для создания моделей эволюционных прототипов РЦ и для конструирования искусственных наносенсоров и фотоконверторов, а также препаратов для фотодинамической терапии.

Работа поддержана фондом РФ (грант № 21-74-20155).

### Публикация:

Обухов Ю.Н., Неверов К.В., Малеева Ю.В., Крицкий М.С. (2023) Димеры хлорофилла а в составе водорастворимого белка ВоWSCP фотосенсибилизируют восстановление цитохрома с // Доклады Академии наук. Науки о жизни. Т. 509. С. 88-92.

# РЕПОЗИЦИОНИРОВАНИЕ ЛЕКАРСТВ ДЛЯ КОМПЕНСАЦИИ ПОТЕРИ нкРНК CHASERR

Зубрицкий А.В., Медведева Ю.А.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Длинные некодирующие РНК (днкРНК) - нерибосомальные РНК, имеющие длину более 200 нт, которые копируются, сплайсируются и полиаденилируются, но не кодируют белков. Это отличает их от других видов более коротких некодирующих РНК: микроРНК, коротких интерферирующих РНК, РНК, взаимодействующих с белком piwi (piRNA), малых ядерных и ядрышковых РНК и др. Несмотря на то, что в геноме человека только около 2% представлено белок-кодирующими последовательностями, транскрибируется порядка 90% генома. Долгое время днкРНК считались «транскрипционным шумом», но в дальнейшем появились сведения об участии днкРНК в регуляции экспрессии белок-кодирующих генов и структуры хроматина на различных уровнях. В настоящий момент обнаружено более 120 нкРНК, которые участвуют в эпигенетической регуляции [1]. Активация и репрессия генов-мишеней днкРНК возможна в цис- и транс-положении, причем потеря днкРНК может приводить к серьезным нарушениям дифференцировки клеток, порокам развития или летальному исходу.

Примером цис-регуляции днкРНК и ее гена-мишени может служить пара CHASERR (CHD2 adjacent, suppressive regulatory RNA) и CHD2. ДнкРНК CHASERR транскрибируется на одной цепи с белок-кодирующим геном CHD2 выше него и локализуется в ядре с локусом гена CHD2. При потере транскрипции днкРНК CHASERR происходит повышение концентрации мРНК CHD2 с той же хромосомы, на которой снизилась транскрипция CHASERR. Предположительно, днкРНК CHASERR напрямую взаимодействует с транскриптом гена CHD2, регулируя его количество и концентрацию белка CHD2, формируя петлю отрицательной обратной связи.

Ранее в лаборатории показано, что днкРНК CHASERR может взаимодействовать не только с CHD2, но и с новосинтезированными транскриптами ряда генов в транс-локализации, вызывая, таким образом, более глобальные изменения молекулярного фенотипа клетки. Один из возможных механизмов этого взаимодействия - влияние на модификации гистонов, в частности на установление H3K27me3 [2], возможно, выступая в роли ко-фактора комплекса PRC2 [3].

У человека к настоящему времени зафиксировано два случая гетерозиготной делеции днкРНК CHASERR, что приводит к нарушениям регуляции транскрипции ряда генов, что на фенотипическом уровне приводит к задержке интеллектуального развития, а также ряда других нарушений формирования органов. Однако механизмы этого нарушения остаются не до конца понятными. В частности, не очевидно, в какой степени на фенотип оказывают цис- и транс- эффекты делеции CHASERR. Ответ на этот вопрос может помочь в выборе терапевтической стратегии для компенсации делеции днкРНК CHASERR. В частности, если цис- эффект является доминирующим, генная терапия окажется неэффективной, поскольку вставка гена в конкретное место делеции CHASERR *in vivo* пока практически невозможна. Однако, при значимой роли транс- эффекта, такая терапия может оказаться умеренно эффективной.

Медикаментозное снижение уровня экспрессии белка CHD2 до нормального уровня, а также коррекция транс- эффектов могли бы значительно улучшить состояние пациента, но на данный момент соединения, понижающие уровень белка CHD2, а также нормализующие уровни других целевых генов CHASERR в клетках, неизвестны. Возможным выходом является т. н. репозиционирование лекарств - выявление новых показаний у разрешенных к медицинскому применению лекарственных препаратов. В настоящий момент существуют масштабные базы данных (например, LINCS), в которых содержатся «транскрипционные подписи» различных химических соединений, включая известные лекарства. Под «транскрипционной подписью» здесь понимается набор генов, экспрессия которых достоверно меняется в сторону увеличения или уменьшения под воздействием конкретно вещества в определенном типе клеток. Эти данные позволяют подобрать такие соединения, которые могут скомпенсировать изменения в транскрипции, вызванные тем или иным агентом. Мы впервые применили этот подход для поиска веществ, компенсирующих потерю днкРНК. Мы провели биоинформатический скрининг базы LINCS, сравнив «транскрипционную подпись» при нокдауне днкРНК CHASERR, выявленную в работе консорциума FANTOM и в нашей более ранней работе, с «транскрипционными подписями» всех доступных там веществ. Таким образом, мы выявили ряд соединений, которые потенциально могли бы обратить «транскрипционную подпись» делеции CHASERR, то есть привести профиль экспрессии генов к норме, компенсируя делецию данной днкРНК. Для оценки влияния выбранных соединений на транскрипцию целевых генов были выбраны доступные на момент эксперимента соединения: циклоспорин и циклопиазоновая кислота.

Для экспериментальной валидации эффектов лекарств, мы использовали антисмысловые олигонуклеотиды к днкРНК CHASERR, подобранные коллегами из консорциума FANTOM. Данные олигонуклеотиды гибридизуются с днкРНК CHASERR и снижают количество ее транскрипта до ~10% от исходного спустя 24 и 48 часов после трансфекции, что подтверждено кПЦР. Клетки с нокдауном днкРНК CHASERR инкубировали с выбранными соединениями в течение 24 часов, после чего проводили от-кПЦР на выбранные гены. В результате выявлено, что нокдаун CHASERR в фибробластах приводит к значимому увеличению уровня экспрессии CHD2 в клетках. При инкубации с циклоспорином количество обоих транскриптов возрастает, что не позволяет предложить циклоспорин как потенциальное соединение для репозиционирования. Инкубация с циклопиазоновой кислотой приводит к значимому снижению уровня транскрипции CHD2, что позволяет предложить это соединение в качестве кандидата для репозиционирования. Таким образом, нами показано, что инкубация клеток, в которых симитирована потеря транскрипта днкРНК CHASERR с циклопиазоновой кислотой приводит к понижению уровня транскрипции CHD2, что указывает на потенциал этого соединения для компенсации потери данной нкРНК. Однако требуются дальнейшие исследования, чтобы определить, компенсирует ли это вещество транс- эффекты потери днкРНК CHASERR. В дальнейшей работе мы также проведем экспериментальную валидацию ряда других предсказанных соединений для выбора наилучшего кандидатного препарата для компенсации делеции CHASERR.

## Публикации:

1. Daria Marakulina, Ilya E Vorontsov, Ivan V Kulakovskiy, Andreas Lennartsson, Finn Drabløs, Yulia A Medvedeva. EpiFactors 2022: expansion and enhancement of a curated database of human epigenetic factors and complexes // **Nucleic Acids Research**, Volume 51, Issue D1, 2023, Pages D564–D570 (published 09 November 2022).
2. E Mazurov, A Szykh, YA Medvedeva. HiMoRNA: A Comprehensive Database of Human lncRNAs Involved in Genome-Wide Epigenetic Regulation // **Noncoding RNA**, 2022
3. Niels Velthuis, Birgit Meldal, Quinte Geessinck, Pablo Porras, Yulia Medvedeva, Anatoliy Zubritskiy, Sandra Orchard, Colin Logie. Integration of transcription coregulator complexes with sequence-specific DNA-binding factor interactomes // **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**. Volume 1864, Issue 10, 2021, 194749.

# РЕКОНСТРУКЦИЯ КОЭФФИЦИЕНТОВ ПОГЛОЩЕНИЯ И ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ В МЕЗОСКОПИЧЕСКОМ РЕЖИМЕ ПУТЕМ АНАЛИЗА РАННИХ ФОТОНОВ

Соловьев И.Д.<sup>1</sup>, Коновалов А.В.<sup>2</sup>, Власов В.В.<sup>2</sup>, Самарин С.И.<sup>2</sup>, Тучин В.В.<sup>1,3</sup>, Савицкий А.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> РФЯЦ ВНИИТФ им. Е.И. Забабахина, Снежинск

<sup>3</sup> СГУ им. Н.Г.Чернышевского, Саратов

Флуоресцентная молекулярная томография (ФМТ) играет все более важную роль в экспериментальной онкологии. В работе представлен и экспериментально проверен оригинальный метод мезоскопической ФМТ во временном домене, основанный на асимптотическом приближении к функции источника флуоресценции, которая справедлива для фотонов раннего прилета. Цель состояла в том, чтобы проверить эффективность метода путем экспериментального сканирования и реконструкции фантома содержащего флуорофор. Экспериментальная установка включала систему регистрации TCSPC (Time Correlated Single Photon Counting), импульсный лазер и трехканальный волоконный зонд. Сканирование фантома проводилось в мезоскопическом режиме для трехмерной геометрии отражения. Функции чувствительности моделировались методом Монте-Карло. Алгоритм compressed-sensing типа использовался для решения обратной задачи для функции распределения параметров флуоресценции, которая включала распределение коэффициента поглощения флуорофора и времени жизни флуоресценции. Распределения были разделены непосредственно во временной области методом наименьших квадратов с QR-факторизацией. В результате были получены и проанализированы 3D-томограммы параметров флуоресценции с использованием двух стратегий формирования массивов данных измерений и матриц чувствительности. Разработан алгоритм гибкого выбора оптимальной стратегии для достижения лучшего качества реконструкции. Предлагаются варианты усовершенствования метода, в частности за счет пошагового извлечения и дальнейшего использования апостериорной информации об объекте.

## Публикация:

Kononov A.V. и др. Reconstruction of fluorophore absorption and fluorescence lifetime using early photon mesoscopic fluorescence molecular tomography: a phantom study // **J. Biomed. Opt.** 2022. Т. 27. № 12.



**FONTIVITA PRETIOSA GEN. NOV., SP. NOV. –  
НОВЫЙ ТЕРМОФИЛЬНЫЙ ПЛАНТОМИЦЕТ ПОРЯДКА *TEPIDISPHAERALES***

Ельченинов А.Г.<sup>1</sup>, Подосокорская О.А.<sup>1</sup>, Новиков А.А.<sup>2</sup>, Кубланов И.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИИМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> РГУ нефти и газа им. И.М.Губкина

*Fontivita pretiosa* В-254<sup>T</sup> – новая факультативно анаэробная умеренно термофильная бактерия – была выделена из горячего источника, расположенного в поселке Горячинск (Байкальская рифтовая зона, Россия). Для получения накопительной и выделения чистой культуры была использована аэробная модифицированная среда Пфеннига с добавлением ксантановой камеди и стрептомицина. Клетки штамма В-254<sup>T</sup> были представлены одиночными и парными кокками диаметром 0.6–1 мкм, зачастую подвижными в экспоненциальной фазе роста, что было обусловлено наличием жгутиков. В стационарной фазе можно было наблюдать крупные агрегаты клеток, и хлопьевидный осадок бежевого оттенка. Рост бактерии наблюдали в диапазоне температуры 30–57°C и рН 5.1–8.4, с оптимумом при 50–54°C и 6.6–7.1 соответственно. Добавление в среду культивирования хлорида натрия и дрожжевого экстракта не было необходимым. В качестве субстратов изолят использовал различные моно- (глюкоза, манноза) и дисахара (сахароза, мальтоза), а также широкий спектр полисахаридов (ксилан, крахмал, галактан, галактоманнан, ксилан, арабинан, курдлан, β-глюкан, ксантановая камедь и др.). Рост наблюдали в аэробных и строго анаэробных условиях, однако в последнем случае урожай клеток был значительно ниже. Автотрофный тип питания, а также использование акцепторов электронов отличных от кислорода отмечены не были.

Хемотаксономический анализ показал присутствие у штамма В-254<sup>T</sup> в качестве основных жирных кислот – *изо*-С16:0, *анте*изо-С17:0 и С20:0, в качестве основного полярного липида удалось детектировать фосфатидилэтаноламин.

Размер генома *Fontivita pretiosa* В-254<sup>T</sup> составил 5.54 млн. п.о., с содержанием ГЦ-пар 64%. Филогенетический анализ позволил продемонстрировать, что штамм В-254<sup>T</sup> является представителем ранее описанного в нашей лаборатории порядка *Tepidisphaerales* (класс *Phycisphaerae*, филум *Planctomycetes*). До настоящего времени данный порядок включал только два культивируемых организма – *Tepidisphaera mucosa* 2842<sup>T</sup> и “*Humisphaera borealis*” М1803<sup>T</sup>, с которыми уровень сходства по генам 16S рНК составил для нашего организма 91.3 и 90.7% соответственно.

Функциональный анализ выявил наличие в геноме *Fontivita pretiosa* 259 генов, кодирующих ферменты метаболизма полисахаридов, что хорошо согласуется с данными фенотипического описания. Среди них 126 генов кодировали гликозидазы различных семейств, 21 ген – полисахаридлиазы, 17 генов – углеводэстеразы и 95 генов – гликозилтрансферазы. Также в геноме были закодированы ферменты, участвующие в брожении (фосфатацетилтрансфераза и ацетаткиназа, лактатдегидрогеназа, гидрогеназы) и аэробном дыхании (комплексы I, II, *b/c1*-комплекс, альтернативный комплекс III, *bd*-хинооксидаза, цитохромоксидаза *caa3*- и *cbb3*-типа).

Таким образом, совокупность данных филогенетического, филогеномного, фенотипического и хемотаксономического анализов позволила нам описать внутри глубокой ветви планктомицетов новый род термофильной бактерии, обладающей внушительным набором гидролитических ферментов.

**Публикация:**

Podosokorskaya O.A., Elcheninov A.G., Novikov A.A., Kublanov I.V. *Fontivita pretiosa* gen. nov., sp. nov., a thermophilic planctomycete of the order *Tepidisphaerales* from a hot spring of Baikal lake region // **Syst. Appl. Microbiol.** 2022. V. 45 (6). Art. 126375. doi: 10.1016/j.syapm.2022.126375

## ТОКСИН VAPC УЧАСТВУЕТ В ФОРМИРОВАНИИ СОСТОЯНИЯ ПОКОЯ КЛЕТКАМИ *M. SMEGMATIS* ЗА СЧЁТ РАСЩЕПЛЕНИЯ 23S рРНК

Замахаев М.В.<sup>1</sup>, Григоров А.С.<sup>2</sup>, Беспятых Ю.А.<sup>3</sup>, Ажикина Т.Л.<sup>2</sup>, Гончаренко А.В.<sup>1</sup>, Шумков М.С.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

<sup>3</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА

*Mycobacterium tuberculosis* — чрезвычайно эффективный патогенный микроорганизм, известный своей способностью вызывать латентную туберкулёзную инфекцию, обусловленную переходом клеток возбудителя в покоящееся состояния. В настоящее время активно изучается роль токсин-антитоксиновых систем в формировании бактериальными клетками состояния покоя, персистенции и фенотипической устойчивости к антибиотикам. Нами исследовано влияние гиперэкспрессии токсина VapC на белковый состав и физиологическое состояние клеток модельного организма *Mycobacterium smegmatis*: проведён сравнительный анализ рекомбинантного штамма с гиперэкспрессией токсина и овоидных покоящихся клеток, полученных в модели *in vitro*. Установлено, что гиперэкспрессия VapC приводит к выраженному изменению представленности в мембранной фракции клеток *M. smegmatis* белков, участвующих в работе аппарата трансляции, а также комплекса Sec-белков. Раскрыт молекулярный механизм действия токсина VapC, заключающийся в расщеплении сарцин-рициновой петли 23S рРНК. На основе экспериментальных данных сформулирована гипотеза об участии VapC в формировании состояния покоя микобактерий посредством разрезания 23S рРНК с последующей ассоциацией инактивированных рибосом с цитоплазматической мембраной. Обнаруженные особенности белоксинтезирующего аппарата покоящихся клеток микобактерий дают возможность предположить механизмы их выхода из покоящегося состояния через деассоциацию рибосом от мембраны, сопровождающуюся «залечиванием» разрыва 23S рРНК, и могут иметь значение для разработки принципиально новых противотуберкулёзных препаратов.

### Публикация:

Zamakhaev M., Grigorov A., Bespyatykh J., Azhikina T., Goncharenko A., Shumkov M. VapC toxin switches *M. smegmatis* cells into dormancy through 23S rRNA cleavage // *Arch Microbiol.* – 2023. – Vol. 205. No. 1. P. 28. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-03363-1>.

## ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АРХИТЕКТУРЫ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ

Антипов А.Н.<sup>1</sup>, Огорокова Н.<sup>1</sup>А., Мордкович Н.Н.<sup>1</sup>, Сафонова Т.Н.<sup>1</sup>, Поляков К.М.<sup>2</sup>, Дороватовский П.В.<sup>3</sup>, Вейко В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгарда РАН

<sup>3</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

Нуклеозидфосфорилазы (NP) – ферменты катаболизма нуклеозидов – обнаруживаются в клетках практически всех организмов и являются объектом достаточно пристального внимания исследователей, что обусловлено по крайней мере двумя причинами:

- выяснением роли этих ферментов в генезисе, развитии и протекании различных патологических процессов в клетках млекопитающих (онкология, ревматоидный артрит, подагра, остеоартроз, системная склеродермия и др.)

- высоким биотехнологическим потенциалом этих белков при ферментативном синтезе производных нуклеозидов, применяющихся в практической медицине (противоопухолевые, противовирусные агенты, ингибиторы репликации клеточной ДНК).

В работе получена и исследована библиотека рекомбинантных NP из различных видов бактерий: мезофильных (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Kl. aerogenes*, *Sh. oneidensis* MR-1), термофильного *G. stearothermophilus* и экстремофильного *H. chromatireducens*, а также искусственно сконструированных мутантных и гибридных форм этих белков (всего 15 белков). Впервые клонированы гены NP из *H. chromatireducens* и охарактеризованы соответствующие ферменты. Систематическое изучение термостабильности ферментов из этой библиотеки показало, что значение их температурного оптимума не является показателем термостабильности. Показано, что связывание неорганического фосфата повышает устойчивость исследуемых ферментов. Выявлено, что структура межсубъединичных контактов в этих мультисубъединичных белках влияет на термостабильность белков. Показана роль N-концевого фрагмента в придании NP термостабильных свойств.

На основании изучения взаимодействия неорганического ортованадата и NP впервые показано, что он является эффективным субстратом (миметиком ортофосфата) для этого класса ферментов. Таким образом, открыт дополнительный путь метаболизма ортованадата в микроорганизмах.

### Публикации:

1. К.М. Поляков, Н.Н. Мордкович, Т.Н. Сафонова, А.Н. Антипов, Н.А. Огорокова, П.В. Дороватовский, В.П. Вейко Роль конформационных изменений гексамерной молекулы бактериальных уридинфосфорилаз в связывании субстратов // **Кристаллография**, 2021, том 66. № 5. с. 759–764.
2. В.П. Вейко, А.Н. Антипов, Н.Н. Мордкович, Н.А. Огорокова, Т.Н. Сафонова, К.М. Поляков Термостабильность нуклеозидфосфорилаз из прокариот. 1. Роль первичной структуры n-концевого фрагмента белка в термостабильности уридинфосфорилаз // **Прикладная биохимия и микробиология**, 2022, том 58, № 6, с. 598–606
3. A.N. Antipov, N.A. Okorokova, T.N. Safonova, V.P. Veiko Vanadate as a new substrate for nucleoside phosphorylases // **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 2022 volume 27, pages 221–227

# МИКРОБНОЕ СООБЩЕСТВО МОРСКОГО МЕРОМИКТИЧЕСКОГО ЖЕЛОБА (БУХТА БИОФИЛЬТРОВ), РАСПОЛОЖЕННОГО В КАНДАЛАКШСКОМ ЗАЛИВЕ БЕЛОГО МОРЯ

Саввичев А.С.<sup>1</sup>, Кадников В.В.<sup>2</sup>, Белецкий А.В.<sup>2</sup>, Козяева В.В.<sup>2</sup>, Русанов И.И.<sup>1</sup>, Веслополова Е.Ф.<sup>1</sup>, Беленкова В.В.<sup>1</sup>, Горленко В.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Меромиктические водоемы отличаются устойчивой стратификацией водной толщи и наличием содержащего кислород аэробного и сероводородного анаэробного слоев, разделённых ред-окс зоной. В этой зоне формируются микробные сообщества, часто достигающие высокой плотности. Меромиктические водоемы, как реликтовые экосистемы, на протяжении многих лет привлекают внимание микробиологов. Нами проведены исследования состава микробного сообщества и активности микробных процессов водной толщи меромиктического желоба, расположенного в Бухте Биофильтров. Удлиненный узкий желоб имеет глубину 14–15 м. Желоб окружен широким плато до 4–5 м глубиной. Подводный желоб не изолирован от моря, что отличает его от известных меромиктических водоемов, расположенных на побережье Кандалакшского залива. В монимолимнионе желоба присутствовал сероводород, концентрация которого у дна достигала 25–38 мг л<sup>-1</sup>. Зона хемоклина в воде простиралась с 8.0 до 9.0 м. В этой зоне формируется бактериальная пластина, окрашенная в розовато-коричневый цвет. По результатам секвенирования фрагмента гена 16S рРНК было установлено, что в хемоклине доминируют зеленые серобактерии (ЗСБ) *Chlorobium phaeovibrioides*. Вторыми по численности были аэробные сероокисляющие бактерии *Sulfurimonas* sp. Из проб, отобранных в хемоклине, вырастали, в основном, коричнево-окрашенные колонии *Chlorobi* и лишь единичные колонии ЗСБ зеленого цвета. Оба морфотипа идентифицированы как *Chlorobium phaeovibrioides*. Пурпурные серобактерии (ПСБ) не формировали бактериальную пластину. Изолированная культура ПСБ идентифицирована как *Thiocapsa rosea*. Бактерии этого вида способны переключаться с фотосинтеза на аэробный хемосинтез и могут конкурировать за сульфид с сероокисляющими хемоавтотрофами. Нами выдвинуто предположение, что меромиктический желоб Бухты Биофильтров в результате своей открытости может быть одним из источников расселения АФБ в акватории Кандалакшского залива.

## Публикация:

Саввичев А.С., Кулакова А.А., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Кадников В.В., Белецкий А.В., Козяева В.В., Русанов И.И., Летарова М.А., Веслополова Е.Ф., Беленкова В.В., Демиденко Н.А., Горленко В.М. Микробное сообщество морского меромиктического желоба (Бухта Биофильтров), расположенного в Кандалакшском заливе Белого моря // **Микробиология**. 2022. Т. 91. № 4. С. 492–506. Doi 10.31857/S002636562210010X

## **АНАЛИЗ И ОЦЕНКА РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПОТЕНЦИАЛЬНЫМИ НЕЦЕЛЕВЫМИ ЭФФЕКТАМИ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ**

Яковлева И.В., Коротков Е.В., Гайдукова С.Е., Камионская А.М.

*ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН*

В течение последних десятилетий были разработаны методы редактирования генома, такие как CRISPR/Cas, TALENs, эпигенетическое редактирование и многие другие, позволяющие точно модифицировать последовательности ДНК. Хотя геномное редактирование, априори, точный и высокоэффективный метод, тем не менее, нецелевые (off-target) эффекты являются важным предметом безопасности и оценки рисков создаваемых сортов и линий растений. Объектом нашего исследования служили генно-инженерно-редактированные растения, генетический материал которых не содержит вставок рекомбинантной ДНК (или РНК). В ходе работы нами было проведено сопоставление частот реализации потенциальных рисков при геномном редактировании растений с трансгенезом и классическим мутагенезом и показано, что геномное редактирование вызывает меньше непреднамеренных модификаций. Был проведен анализ научных статей в библиографических базах данных Scimedirect, PubMed, Scopus, Google Scholar с использованием ключевых слов на английском языке и найдено более 100 исследований, изучавших off-target эффекты в случае использования CRISPR/Cas для геномного редактирования растений. Из совокупности нецелевых эффектов нами были выделены критические с точки зрения оценки рисков и разработаны предложения по принятию решений по их допустимости и снижению.

### **Публикации:**

1. Е.В. Коротков, И.В. Яковлева, А.М. Камионская (2021) Использование математических методов с целью оценки безопасности сельскохозяйственных культур // **Прикладная биохимия и микробиология**. Т. 57, вып. 2, стр. 196-205.
2. I.V. Yakovleva, A.M. Kamionskaya. (2022) State of the art: Russia starts genome-edited plant assessment // **Trends in Biotechnology**. V 40, Is 6, P. 635-638.

# ИЗМЕНЕНИЯ МОРФОЛОГИИ И ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ В ДРОЖЖЕВЫХ МОДЕЛЯХ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НВх БЕЛОК ВИРУСА ГЕПАТИТА В И АМИЛОИД Аβ42

Епремян Х.Х.<sup>1</sup>, Рогов А.Г.<sup>1,2</sup>, Голева Т.Н.<sup>1,2</sup>, Киреев И.И.<sup>3</sup>, Лаврушкина С.В.<sup>3</sup>, Зиновкин Р.А.<sup>3</sup>, Звягильская Р.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

<sup>3</sup> НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ

Впервые созданы жизнеспособные мутанты дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие белок НВх вируса гепатита В и амилоид Аβ42, один из основных маркеров болезни Альцгеймера. На всех этапах исследования в клетках, экспрессирующих НВх и Аβ42, были выявлены комплексные нарушения морфологии и функций митохондрий. Клетки отличались повышенным уровнем окислительного стресса и клеточной смерти, пониженной устойчивостью к индуцированному окислительному стрессу и потерей митохондриального ретикулума, митохондрии были фрагментированы, а агрегаты экспрессируемых белков расположены в местах скопления митохондрий. Митохондрии, выделенные из дрожжей, экспрессирующих НВх и Аβ42, имели ярко выраженные нарушения биоэнергетических параметров, проявляющиеся в основном в разобщении дыхания и фосфорилирования, сниженной продукции АТФ, избыточной продукцией активных форм кислорода и повышенной чувствительностью к индуцированному окислительному стрессу. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQThy в низких концентрациях частично восстанавливал митохондриальный ретикулум, снижал гибель клеток, увеличивал их устойчивость к индуцированному окислительному стрессу. SkQThy может быть рекомендован как перспективное терапевтическое соединение при дальнейших исследованиях.

## Публикаций:

1. Rogov A.G., Goleva T.N., Epremyan K.K., Kireev I.I., Zvyagilskaya R.A. Propagation of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species within the *Dipodascus magnusii* Cells // **Antioxidants** (Basel). – 2021. – Vol. 10(1). – P. 120.
2. Mamaev D., Zvyagilskaya R. *Yarrowia lipolytica*: a multitiered yeast species of ecological significance // **FEMS Yeast Res.** – 2021 – Vol. 21(2) – P. foab008.
3. Епремян Х.Х., Голева Т.Н., Звягильская Р.А. Влияние Тау-белка на функции митохондрий // **Биохимия**. – 2022. – Т. 87(6). – С. 1014–1029.
4. Epremyan K.K., Goleva T.N., Rogov A.G., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. The First *Yarrowia lipolytica* Yeast Models Expressing Hepatitis B Virus X Protein: Changes in Mitochondrial Morphology and Functions // **Microorganisms**. – 2022. – Vol. 10(9). – P. 1817.
5. Epremyan K.K., Rogov A.G., Goleva T.N., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. Altered Mitochondrial Morphology and Bioenergetics in a New Yeast Model Expressing Аβ42 // **International Journal of Molecular Sciences**. – 2023. – Vol. 24(2). – P. 900.

# ХАРАКТЕРИСТИКА НАКОПИТЕЛЬНЫХ КУЛЬТУР БАКТЕРИЙ ЦИКЛА АЗОТА ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ НИТРАТОМ И АММОНИЕМ ПОДЗЕМНЫХ ВОДОНОСНЫХ ГОРИЗОНТОВ И ПОДХОДЫ К ИХ *IN SITU*-БИОРЕМЕДИАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОЦЕССА АНАММОКС

Литти Ю.В.<sup>1</sup>, Вишнякова А.В.<sup>1</sup>, Бочкова Е.А.<sup>1</sup>, Колганова Т.Н.<sup>2</sup>, Сухачева М.В.<sup>2</sup>, Попова Н.<sup>3</sup>, Сафонов А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>3</sup> ИФХЭ РАН

Техногенно загрязненные подземные воды вблизи шламонакопителей предприятий радиохимической промышленности с высокими концентрациями нитратов (до 10 г/л) и аммония (до 0.5 г/л) и средней температурой 8–10°C представляют собой уникальную среду обитания для психротолерантных и психрофильных микробных сообществ цикла азота. Их изучение важно как для потенциального использования в *in situ*-биоремедиации, так и в технологиях очистки сточных вод.

Из образцов подземной воды вблизи шламохранилища АО «ЧМЗ» были получены и проанализированы накопительные культуры анаммокс, нитрифицирующих и денитрифицирующих бактерий. Несмотря на высокую активность, в соответствующих накопительных культурах не были обнаружены «классические» нитрификаторы, а денитрификация протекала преимущественно до стадии нитрита. В проточном анаммокс-реакторе было достигнуто стабильно высокое (до 100%) потребление аммония и нитрита при 15°C, однако удаление общего азота было невысоким (до 55%), что связано с нестехиометрическим образованием нитрата. Этот феномен можно объяснить сдвигом метаболизма анаммокс-бактерий в сторону продукции большего количества нитратов и меньшего количества N<sub>2</sub> при низких температурах. Общим таксоном для всех накопительных культур было семейство Xanthomonadaceae, что может указывать на его исключительную роль в этой экосистеме. Для оценки возможности использования анаммокс-процесса в подземном проницаемом барьере были определены минеральные носители, оптимальные для обрастания микроорганизмами лабораторного «теплого» анаммокс-реактора с доминированием *Candidatus Jettenia* и *Ca. Kuenezia*. Определены важные характеристики минеральных носителей для стимуляции анаммокс-активности аборигенного сообщества (*Ca. Scalindua*) при 10°C. Показана потенциальная эффективность биоаугментации «теплым» анаммокс-сообществом аборигенного микробного сообщества для ускорения биоремедиации холодных подземных водоносных горизонтов.

Работа поддержана грантом РФФ 22-24-00701.

## Публикации:

1. Botchkova E., Vishnyakova A., Popova N., Sukhacheva M., Kolganova T., Litti Y., Safonov A. Characterization of enrichment cultures of anammox, nitrifying and denitrifying bacteria obtained from a cold, heavily nitrogen-polluted aquifer // **Biology**. 2023. V. 12 (2). Art. 221. Doi: 10.3390/biology12020221
2. Popova N., Vishnyakova A., Artemiev G., Sitanskaia A., Litti Y., Safonov A. Biofilms of anammox bacteria on mineral carriers to establish a subterranean permeable barrier // **Int. J. Environ. Sci. Technol.** 2022. V. 20 (4). Doi:10.1007/s13762-022-04131-w
3. Vishnyakova A., Popova N., Artemiev G., Botchkova E., Litti Y., Safonov A. Effect of mineral carriers on biofilm formation and nitrogen removal activity by an indigenous anammox community from cold groundwater ecosystem alone and bioaugmented with biomass from a “warm” anammox reactor // **Biology**. 2022. V. 11 (10). Art. 1421. Doi: 10.3390/biology11101421

## БИОСИНТЕЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО АЛЬГИНАТА И ВЛИЯНИЕ КОНСТРУКЦИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ НА СОСТАВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ *IN VIVO*

Дудун А.А.<sup>1</sup>, Акулина Е.А.<sup>2</sup>, Жуйков В.А.<sup>1</sup>, Махина Т.К.<sup>1</sup>, Бонарцев А.П.<sup>2</sup>, Бонарцева Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет

В настоящее время использование эндопротезов и скаффолдов на основе биополимерных конструкций получило широкое применение в области тканевой инженерии. Физико-химические и биологические свойства биополимерных материалов позволяют использовать медицинские изделия на их основе для регенерации различных тканей и органов. В работе методом математического планирования путем варьирования компонентов ростовой среды оптимизирован синтез биополимеров: гидрофильного альгината и гидрофобного поли-3-оксибутирата (ПОБ) бактериальным штаммом *Azotobacter vinelandii* 12. Достигнут избирательный синтез только высокомолекулярного капсулярного альгината в отсутствие синтеза свободного альгината и ПОБ. Показано, что синтезированные в работе биополимеры по своим физико-химическим и биологическим свойствам удовлетворяют требованиям для их использования при разработке медицинских изделий для эндопротезирования в толстый кишечник. Разработаны конструкции на основе полученных ПОБ и альгината в виде кишечной заплаты и проведены операции их эндопротезирования на толстом кишечнике крысам линии Wistar. Проведен анализ качественного и количественного состава кишечной микробиоты методом 16S метагеномного профилирования у крыс после хирургического вмешательства. Показана тесная симбиотическая связь микробиоты с организмом-хозяином и отмечен резкий рост или полное исчезновение отдельных бактериальных таксономических единиц в кишечной микробиоте при имплантации конструкции ПОБ-альгинат в толстый кишечник крыс.

### Публикации:

1. Акулина Е.А., Демьянова И.В., Жаркова И.И., Воинова В.В., Жуйков В.А., Хайдапова Д.Д., Чеснокова Д.В., Меньших К.А., Дудун А.А., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Волков А.В., Асфаров Т.Ф., Иванов С.Ю., Шайтан К.В., Бонарцев А.П. Рост мезенхимальных стволовых клеток на матриксах на основе поли-3-оксибутирата, загруженных симвастатином // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. 2021. 1, 70-76. IF РИНЦ = 0.624, Q3. IF WoS = 0.804, Q3; Scopus SJR = 0.288, Q3. DOI: 10.32743/2658-6460.2020.4.15.283.
2. Dudun A.A., Akoulina E.A., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Voinova V.V., Belishev N.V., Khaydapova D.D., Shaitan K.V., Bonartseva G.A., Bonartsev A.P. Competitive Biosynthesis of Bacterial Alginate Using *Azotobacter vinelandii* 12 for Tissue Engineering Applications // **Polymers**. 2022. 14, 1, 131. WoS = 4.329, Q1; Scopus = 0.77, Q1. DOI: 10.3390/polym14010131.
3. Pryadko A.S., Mukhortova Y.R., Chernozem R.V., Pariy I., Alipkina S.I., Zharkova I.I., Dudun A.A., Zhuikov V.A., Moisenovich A.M., Bonartseva G.A., Voinova V.V., Chesnokova D.V., Ivanov A.A., Travnikova D.Y., Shaitan K.V., Bonartsev A.P., Wagner D.V., Shlapakova L.E., Surmenev R.A., Surmeneva M.A. Electrospun magnetic composite poly-3-hydroxybutyrate/magnetite scaffolds for biomedical applications: composition, structure, magnetic properties, and biological performance // **ACS Applied Bio Materials**. 2022. 5, 8, 3999-4019. IF WoS = 3.25, Q1; Scopus SJR = 0.75, Q1. DOI: 10.1021/acsabm.2c00496.



# БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА ТРУДНООБОГАТИМЫХ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ СУЛЬФИДНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

Фомченко Н.В., Муравьев М.И., Панюшкина А.Е.

*ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Исследовано биовыщелачивание полиметаллических сульфидных медно-цинковых и медно-никелевых концентратов с применением умеренно термофильной ассоциации ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов на основании сочетания высокотемпературного химического выщелачивания концентратов биораствором сульфата трехвалентного железа и биорегенерации раствора после химического выщелачивания. Установлено, что эффективность выщелачивания меди прямо пропорционально зависела от ее содержания в выщелачиваемом продукте, а эффективность выщелачивания цинка и никеля – не только от их содержаний, но и от соотношения медного минерала халькопирита и сульфидных минералов, содержащими цинк и никель в концентратах. Показано, что цинк и никель, как и при биовыщелачивании, переходили в жидкую фазу с большей скоростью, чем медь, однако скорость выщелачивания цинка была значительно выше скорости выщелачивания никеля. Исследован процесс биорегенерации растворов, полученных после высокотемпературного химического выщелачивания сульфидных полиметаллических концентратов. В результате были получены растворы сульфата трехвалентного железа, которые могут быть повторно использованы на стадии химического выщелачивания, а в процессе циркуляции этих растворов концентрации цветных металлов могут быть повышены до значений, оптимальных для их выделения в чистом виде. Показано, что медно-цинковые концентраты могут быть эффективно переработаны по биогидрометаллургической технологии с содержанием в них меди 10–15% и цинка 5–7%, что соответствует коллективным (некондиционным) концентратам, которые достаточно легко и дешево могут быть получены из полиметаллической руды при ее обогащении. Переработка медно-никелевых концентратов с подобным соотношением между медью и никелем может также осуществляться биогидрометаллургическим способом. Предложена схема возможной модернизации переработки полиметаллических сульфидных концентратов, полученных из руд Уральского и Норильского регионов, с применением интенсивной биогидрометаллургии, которая может повысить эффективность получения из них цветных металлов и улучшить экологическую обстановку промышленных регионов.

## Публикации:

1. Muravyov M., Panyushkina A. Comparison of sphalerite concentrate leaching by chemical and microbially produced ferric sulfate // **Minerals Engin.** 2022. V. 187. 107792. Doi 10.1016/j.mineng.2022.107792
2. Muravyov M., Panyushkina A., Fomchenko N. Bulk flotation followed by selective leaching with biogenic ferric iron is a promising solution for eco-friendly processing of complex sulfidic ores // **J. Environ. Manag.** 2022. V. 318. 115587. Doi 10.1016/j.jenvman.2022.115587
3. Muravyov M., Panyushkina A., Fomchenko N. Effect of copper/nickel ratio on the efficiency of biobeneficiation of bulk copper-nickel sulfide concentrates // **Minerals Engin.** 2022. V. 182. 107586. Doi 10.1016/j.mineng.2022.107586
4. Muravyov M., Panyushkina A., Bulaev A., Fomchenko N. Biobeneficiation of bulk copper-zinc and copper-nickel concentrates at different temperatures // **Minerals Engin.** 2021. V. 170. 107040.
5. Panyushkina A., Muravyov M., Fomchenko N. A case of predominance of *Alicyclobacillus tolerans* in microbial community during bioleaching of pentlandite-chalcopyrite concentrate // **Minerals.** 2022. V. 12. 396. Doi 10.3390/min12040396
6. Panyushkina A., Fomchenko N., Babenko V., Muravyov M. Effect of temperature on biobeneficiation of bulk copper-nickel concentrate with thermoacidophilic microbial communities // **Metals.** 2021. V. 11. 1969. Doi 10.3390/met11121969
7. Муравьев М.И., Панюшкина А.Е., Меламуд В.С., Булаев А.Г., Фомченко Н.В. Химическое выщелачивание коллективных сульфидных концентратов раствором сульфата трехвалентного железа // **Прикл. Биохим. Микробиол.** 2021. Т. 57. № 4. С. 380–387.
8. Фомченко Н.В., Панюшкина А.Е., Меламуд В.С., Муравьев М.И. Сравнительное выщелачивание медно-никелевых концентратов и металлургического шлака биогенным раствором трехвалентного железа // **Прикл. Биохим. Микробиол.** 2022. Т. 58. С. 382–387.

# АБСОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА И ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА

Красновский А.А., Бендикис А.С., Козлов А.С.

*ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

В виду исключительной важности кислорода в биосфере, любые свойства его молекул представляют большой интерес для изучения. В ходе многолетних исследований нашей группы методом лазерной активации кислорода впервые удалось измерить спектр поглощения кислорода в аэрированных органических растворителях и воде в естественных условиях. Примерно такими же абсорбционными свойствами, по-видимому, обладает кислород в клетках живых организмов. Успеха удалось добиться путем измерения скоростей химического захвата синглетного кислорода и интенсивности его собственной флуоресценции при действии лазерного облучения в интервале длин волн 500-1300 нм. Обнаружены два главных максимума спектра действия активации кислорода при 765 и 1273 нм. Относительная интенсивность этих максимумов зависела от природы растворителей. В неполярных гидрофобных средах полоса 765 нм в 6 раз меньше длинноволновой полосы. В воде и спиртах полоса 765 нм – в 1,5-2 раза меньше ИК полосы. Кроме этих главных полос обнаружены существенно более слабые полосы при 690 и 1070 нм. Первая – примерно в 15 раз слабее по максимальной амплитуде, чем полоса 765 нм, вторая во всех средах – примерно в 100 раз слабее, чем полоса 1273 нм. При действии красного света 630 нм, соответствующего максимуму поглощения димерного кислорода, генерацию синглетного кислорода обнаружить не удалось. Таким образом установлено, что спектр поглощения растворенного кислорода содержит те же четыре основных максимума, что и спектр поглощения газообразного кислорода в атмосфере Земли. Однако, основной максимум поглощения атмосферного кислорода соответствует Фраунгоферовой линии 762 нм, а ее интегральный абсорбционный коэффициент 300 раз больше, чем у полосы в области 1270 нм. У растворенного кислорода самой сильной является полоса в области 1270 нм, которая в 6 раз больше по амплитуде, чем полоса 762 нм. Обсуждается значение этих фактов для понимания фотодинамической активности (светокислородный эффект) и функции кислорода в клетках. Подробная информация приводится в цитированных ниже публикациях и указанных в них ссылках. Работа частично поддержана грантом РФФИ № 19-04-00331А и госзаданием ФИЦ Биотехнологии РАН.

## Публикации:

1. Kozlov A.S., Egorova O.N., Medvedkov O.I., Krasnovsky A.A. Activation of oxygen molecules by 1070 nm laser radiation in aerated solvents // **Optics Lett.** 2021. Vol. 46. No. 3/1, P. 556-559
2. Benditkis A.S., Kozlov A.S., Goncharov S.E., Krasnovsky A. A. Detection of the Fraunhofer band B (690 nm) in the absorption spectra of oxygen in aerated solvents. // **J. Opt. Soc. of America, series B.** 2021. Vol. 38, No 11. P. 3410-3415.
3. Красновский А.А., Козлов А.С., Бендикис А.С.. Лазерная активация кислорода в аэрированных растворах. Измерение спектров поглощения растворенного кислорода в естественных условиях // **Известия высших учебных заведений. Физика**, т. 64. № 11, С. 45-54 (2021)
4. Krasnovsky A. A., Kozlov A. S., Benditkis A. S.. Laser activation of oxygen in aerated solvents. Measurement of the absorption spectra of oxygen dissolved in aerated solvents under natural conditions. // **Russ. Phys. J.** 2022. Vol. 64, No. 11, P. 2035-2045
5. Ashikhmin A. A., Benditkis A. S., Moskalenko A.A., Krasnovsky, A.A.  $\zeta$ -Carotene: Generation and Quenching of Singlet Oxygen, Comparison with Phytofluene // **Biochemistry** (Moscow), 2022, Vol. 87, No. 10, pp. 1169-1178.
6. Kozlov A. S., Zhuravlev, S.G., Egorova O.N., Medvedkov O. I., Krasnovsky A. A., Jr. Detection of the vibronic 1070 nm absorption band of oxygen in aerated polar organic solvents and deuterium oxide // **Optics Lett.** 2022, submitted

# ПОИСК ПРОМОТОРОВ, ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ГЕНОМАХ, А ТАКЖЕ МНОЖЕСТВЕННОЕ ВЫРАВНИВАНИЕ СЛАБО ПОДОБНЫХ БЕЛКОВЫХ СЕМЕЙСТВ

Руденко В.М., Костенко Д.О., Суворова Ю.М. и Коротков Е.В.

*ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Разработанный ранее метод множественного выравнивания слабо подобных последовательностей (MAHDS) был применен в 2021-2022 годах для решения трех задач.

1. Мы искали тандемные повторы в геномах *Capsicum Annuum* и *Oryza Sativa* с использованием MAHDS. Всего в геноме *Capsicum Annuum* было обнаружено 908 072 районов с периодами от 2 до 200 нуклеотидов. Это составляет ~29% от генома *Capsicum Annuum*. Чаще всего встречаются тандемные повторы (ТП) длиной 2 и 3 основания. Также очень много было найдено ТП длиной 21, 4, 15 bp. Все обнаруженные TR размещены в базе данных и доступны через web-интерфейс. Мы также сделали сравнение mRPWM с другими методами поиска TR, такими как Tandem Repeat Finder, T-REKS, xStream. Мы показываем, что mRPWM может обнаружить в несколько раз больше ТП чем эти методы.

2. С помощью MAHDS было создано 5 классов промоторных последовательностей, с объемом 1740, 222, 199, 167 и 130 промоторов в геноме *Oryza Sativa*. Классы промоторов были использованы для поиска промоторных последовательностей в геноме риса. Всего удалось выявить 145277 потенциальных промоторных последовательностей (ППП). Из них 18563 приходятся на промоторы известных генов, 87233 ППП пересекаются с transposable elements, а 37390 обнаружены в неаннотированные ранее последовательностях. Вероятность ложных позитивов для случайно перемешанного генома риса составляет около  $6 \times 10^{-9}$  на один нуклеотид. Для всех прочих методов поиска ППП эта вероятность не менее  $10^{-4}$ .

3. Мы сравнили методы множественного выравнивания MAHDS, T-Coffee, MUSCLE, Clustal Omega, Kalign, MAFFT и PRANK по их способности выравнивать сильно дивергировавшие аминокислотные последовательности. Для этого мы создали тестовые аминокислотные последовательности со средним числом замен на аминокислоту ( $x$ ) от 0,6 до 5,6, всего 81 набор. Это сравнение показало, что MAHDS мог построить статистически значимое выравнивание искусственных последовательностей с  $x \leq 4,8$ , тогда как другие алгоритмы (T-Coffee, MUSCLE, Clustal Omega, Kalign, MAFFT и PRANK) не могли выполнить это при  $x > 2,4$ . Применение MAHDS для выравнивания 21 семейства сильно различающихся белков (идентичность  $< 20\%$ ) из баз данных Pfam и HOMSTRAD продемонстрировало, что он может рассчитывать статистически значимые выравнивания в случаях, когда другие методы этого делать не могут.

## Публикации:

1. Korotkov, E. V.; Kamionskaya, A.M.; Korotkova, M.A. Detection of Highly Divergent Tandem Repeats in the Rice Genome // **Genes** (Basel). 2021, 12, doi:10.3390/GENES12040473. Q2
2. Rudenko, V.; Korotkov, E. Search for Highly Divergent Tandem Repeats in Amino Acid Sequences // **Int. J. Mol. Sci.** 2021, 22, doi:10.3390/IJMS22137096. Q1
3. Korotkov, E. V.; Suvorova, Y.M.; Kostenko, D.O.; Korotkova, M.A. Multiple alignment of promoter sequences from the arabidopsis thaliana l. Genome // **Genes** (Basel). 2021, 12, 1–21, doi:10.3390/genes12020135. Q2
4. Suvorova, Y.M.; Kamionskaya, A.M.; Korotkov, E.V. Search for SINE repeats in the rice genome using correlation-based position weight matrices // **BMC Bioinformatics** 2021, 22, doi:10.1186/s12859-021-03977-0. Q1
5. Korotkov, E. V.; Suvorova, Y.M.; Nezhdanova, A. V.; Gaidukova, S.E.; Yakovleva, I. V.; Kamionskaya, A.M.; Korotkova, M.A. Mathematical Algorithm for Identification of Eukaryotic Promoter Sequences // **Symmetry** 2021, Vol. 13, Page 917 2021, 13, 917, doi:10.3390/SYM13060917. Q2
6. Korotkov, E. V.; Yakovleva, I. V.; Kamionskaya, A.M. Use of Mathematical Methods for the Biosafety Assessment of Agricultural Crops // **Appl. Biochem. Microbiol.** 2021, 57, 271–279, doi:10.1134/S000368382102006X.Q4
7. Korotkov, E.; Zaytsev, K.; Fedorov, A. Use of 6 Nucleotide Length Words to Study the Complexity of Gene Sequences from Different Organisms // **Entropy** 2022, 24, 632. <https://doi.org/10.3390/e24050632>, Q2
8. Kostenko, D.O.; Korotkov, E. V. Application of the MAHDS Method for Multiple Alignment of Highly Diverged Amino Acid Sequences // **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 3764, doi:10.3390/IJMS23073764. Q1
9. Rudenko, V.; Korotkov, E. Database of Potential Promoter Sequences in the Capsicum annuum Genome // **Biology** 2022, 11, 1117. <https://doi.org/10.3390/biology11081117>, Q1

## РАСПОЗНАВАНИЕ О-АНТИГЕНОВ В КАЧЕСТВЕ ПЕРВИЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ *E. COLI* RB49-ПОДОБНЫМИ КОЛИФАГАМИ

Ефимов А.Д., Голомидова А.К., Куликов Е.Е., Иванов П.А., Летаров А.В.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Большинство серотипов О-антигенов *Escherichia coli* обеспечивает надежную защиту клеток от прикрепления бактериофагов. Бактериофаги, способные инфицировать О-антиген-продуцирующие штаммы *E. coli*, используют несколько различных стратегий для преодоления барьера О-полисахарида (ОПС), в числе которых энзиматически активные рецептор-связывающие белки (RBP), одновременное присутствие в составе вириона нескольких ОПС распознающих RBP, специфичных каждый относительно своего типа (группы типов) О-антигена, а также распознавание консервативных полисахаридов, например, NFR и, возможно, ЕСА. Некоторые бактериофаги, родственные Т-четным, к числу которых принадлежит группа RB49-подобных вирусов, обладают достаточно широким спектром хозяев среди О-антиген-продуцирующих *E. coli*, что делает их перспективными в качестве потенциальных агентов фаговой терапии. Эти вирусы не используют ни одной из вышеперечисленных стратегий преодоления ОПС. Последовательность событий при инфекции клетки такими фагами хорошо известна: адсорбция начинается со связывания с первичным рецептором RBP gp38, расположенным на конце длинных хвостовых фибрилл (ДХФ), что инициирует перестройку базальной пластинки, разворачивание коротких хвостовых фибрилл и сокращение хвоста. Все эти бактериофаги обладают способностью инфицировать и лишенные ОПС штаммы (rough), на которых большинство из них узнают порин внешней мембраны (ОМ) – белок OmpA.

Мы продемонстрировали, что RB49-подобные фаги Cognac49 и Whisky49 способны напрямую взаимодействовать с О-антигенами некоторых штаммов в качестве первичного рецептора, распознаваемого gp38. Интересно, что, обладая способностью распознавать одновременно несколько типов О-антигенов, ДХФ этих фагов связывает альтернативные рецептор(ы) на поверхности ОМ некоторых rough штаммов, в том числе OmpA. Мы предположили, что после перестройки базальной пластинки механическая сила разворачивания коротких хвостовых фибрилл позволяет им проникать сквозь слой ОПС, связываясь с соответствующими рецепторами для плотного закрепления вириона на клетке. В то же время фаг Brandy49, обладавший самым широким спектром хозяев из исследованных вирусов, не распознает ОПС в качестве рецептора. Непрямые данные указывают на то, что его ДХФ обладают необычной способностью проникать сквозь слой ОПС для распознавания неидентифицированного консервативного рецептора на поверхности ОМ. Расшифровка этого механизма требует дополнительных исследований.

### Публикации:

1. Efimov A.D., Golomidova A.K., Kulikov E.E., Belalov I.S., Ivanov P.A., Letarov A.V. RB49-like Bacteriophages Recognize O-Antigens as One of the Alternative Primary Receptors // **Int. J. Mol. Sci.** 2022. V. 23(19). Art. 11329. doi: 10.3390/ijms231911329
2. Efimov A., Kulikov E., Golomidova A., Belalov I., Babenko V, Letarov A. Isolation and sequencing of three RB49-like bacteriophages infecting O antigen-producing *E. coli* strains // **F1000Research**. 2021. V. 10. Art. 1113. doi: 10.12688/f1000research.74169.1

## TRIM28 РЕГУЛИРУЕТ ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ МЕТИЛ-ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА KAISO ПУТЕМ СУМОИЛИРОВАНИЯ

Каплун Д.С.<sup>1,2</sup>, Лобанова Я.В.<sup>1</sup>, Филонова Г.Е.<sup>1</sup>, Жигалова Н.А.<sup>1</sup>, Прохорчук Е.Б.<sup>1,2</sup>, Женило С.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> Институт биологии гена РАН

Kaiso является метил-ДНК-связывающим транскрипционным фактором, играющим важную роль в ряде нормальных и патологических процессов: от регуляции клеточного цикла, до развития злокачественных новообразований. Ранее было показано, что сумоилирование Kaiso может значительно менять его активность, однако факторы, вовлеченные в этот процесс, до сих пор не были определены. На основании анализа литературных данных было выдвинуто предположение о том, что E3 сумо-лигаза TRIM28 играет роль в сумоилировании Kaiso. В данной работе мы показываем, что TRIM28 не только напрямую взаимодействует с Kaiso, но и значительно усиливает его сумоилирование, тем самым снижая его активность в качестве метил-зависимого транскрипционного репрессора. Также было показано, что и сумоилирование TRIM28 усиливается в присутствии Kaiso. Кроме того, были определены домены Kaiso и TRIM28, участвующие в их взаимодействии: RBCC домен TRIM28 взаимодействует с ВТВ/POZ доменом и цинковыми пальцами Kaiso.

В данной работе впервые показано взаимодействие Kaiso и TRIM28, а также их взаимное усиление сумоилирования. В целом наши данные свидетельствуют о возможном механизме регуляции экспрессии генов, осуществляемый транскрипционным фактором Kaiso.

### Публикация:

Lobanova Y, Filonova G, Kaplun D, Zhigalova N, Prokhortchouk E, Zhenilo S. TRIM28 regulates transcriptional activity of methyl-DNA binding protein Kaiso by SUMOylation // **Biochimie**. 2022. doi:10.1016/j.biochi.2022.10.006

## АНТИОКСИДАНТНОЕ И АНТИГЛИКИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ НИТРОКСИЛА ПРИ КАРБОНИЛЬНОМ СТРЕССЕ

Пугаченко И.С.<sup>1</sup>, Насыбуллина Э.И.<sup>1</sup>, Космачевская О.В.<sup>1</sup>, Новикова Н.Н.<sup>2</sup>, Топунов А.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> НИЦ «Курчатовский институт»

Изучено влияние нитроксила (HNO) – продукта одноэлектронного восстановления оксида азота на гликирование гемоглобина (Hb). Донор нитроксила (соль Ангели) ингибировал реакцию неферментативного гликирования гемоглобина метилглиоксалем, а также замедлял образование карбонильных производных, межсубъединичных сшивок и деградацию гемовой группы. Нитроксил снижал выход свободно-радикальных продуктов в реакции Hb с органической перекисью и с метилглиоксалем. Показано, что антигликирующее действие нитроксила по отношению к гемоглобину связано с его способностью перехватывать органические свободные радикалы, образуемые в ходе реакции неферментативного гликирования.

Также было исследовано влияние нитроксила на бактериальные клетки, культивируемые в условиях карбонильного стресса. Показано, что донор нитроксила (кислота Пилоти) снижал токсическое действие метилглиоксала на клетки *Escherichia coli*, что выражалось в увеличении жизнеспособности клеток, и снижении автофлуоресценции связанных с белками продуктов неферментативного гликирования. Влияние нитроксила на бактериальные клетки зависело от степени аэрации культуры. В условиях пониженной аэрации нитроксил оказывал цитопротекторное действие.

В настоящее время доноры нитроксила (соль Ангели, кислота Пилоти и др.) предложены в качестве потенциальных фармакологических препаратов с широким спектром действия. Особенно хорошо эти соединения зарекомендовали себя при сердечно-сосудистых заболеваниях и для контроля артериального давления. Сочетание антиоксидантного и антигликирующего действия нитроксила с кардио- и вазопротекторными свойствами может являться объяснением фармакологического действия его доноров. Благодаря своим свойствам нитроксил может замедлять реакции неферментативного гликирования биомолекул и выступать в роли антигликирующего агента, что позволит расширить область его применения.

### Публикации:

1. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Pugachenko I.S., Novikova N.N., Topunov A.F. Antiglycation and antioxidant effect of nitroxyl towards hemoglobin. // **Antioxidants**. 2022. V. 11. N 10. e2007. DOI: 10.3390/antiox11102007 [Q1, IF 7.528]
2. Насыбуллина Э.И., Пугаченко И.С., Космачевская О.В., Топунов А.Ф. Влияние нитроксила на клетки *Escherichia coli*, выращенные в условиях карбонильного стресса. // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2022. Т. 58. № 5. С. 459–466. DOI: 10.31857/S0555109922050117

# МИКРОБНЫЕ СООБЩЕСТВА ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЕПРОДУКТАМИ ПОЛЯРНЫХ МЕСТООБИТАНИЙ И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ ОЧИСТКИ ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ УГЛЕВОДОРОДАМИ

Семенова Е.М.<sup>1</sup>, Бабич Т.Л.<sup>1</sup>, Соколова Д.Ш.<sup>1</sup>, Ершов А.П.<sup>1</sup>, Биджиева С.Х.<sup>1</sup>, Раевская Е.И.<sup>1</sup>, Степанов А.Л.<sup>2</sup>,  
Корнейкова М.В.<sup>3,4</sup>, Мязин В.А.<sup>3</sup>, Добрянский А.С.<sup>5</sup>, Корзун А.В.<sup>2</sup>, Крюков Д.Р.<sup>6</sup>, Назина Т.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНИИ ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> МГУ им. М.В.Ломоносова

<sup>3</sup> ИППЭС КНЦ РАН

<sup>4</sup> АТИ РУДН

<sup>5</sup> Институт географии РАН

<sup>6</sup> Национальный парк «Русская Арктика»

По мере освоения Арктики возрастает техногенная нагрузка на почвы и водоемы регионов. Дизельное топливо – один из основных загрязнителей окружающей среды Мурманской и Архангельской областей. Биоремедиация – один из возможных способов борьбы с углеводородными загрязнениями в условиях Севера. Целью работы было определение состава микробных сообществ проб арктических грунтов, почв и морской воды с различной степенью загрязнения нефтепродуктами и оценка их способности принимать участие в процессе очистки от углеводородов в условиях полярных широт. В работе исследовали микробные сообщества морской воды, литоральных грунтов и прибрежных почв нефтезагрязненных территорий Кольского п-ова (поселки Белокаменка, Росляково, Кола, Печенга), а также грунтов на территории о. Земля Александры архипелага Земля Франца-Иосифа, где до 2015 г. располагался склад горюче-смазочных материалов. С помощью высокопроизводительного секвенирования V4 региона гена 16S рРНК было показано доминирование бактерий в полярных микробных сообществах; доля архей не превышала 2% (от общего количества последовательностей в библиотеках). В загрязненных пробах преобладали бактерии классов *Gamma*proteobacteria, *Alphaproteobacteria* и *Actinomycetes*. Молекулярными методами выявлены потенциальные нефтедеструкторы родов *Alkanindiges*, *Aquabacterium*, *Polaromonas*, *Pseudomonas* и *Sphingomonas*. С использованием программы iVikodak и базы данных KEGG показана потенциальная способность исследованных сообществ участвовать в метаболизме азота и серы и разложении бензоата, терефталата, жирных кислот и алканов. Было выделено 32 чистые культуры бактерий родов *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Janthinobacterium*, *Oceanisphaera*, *Paenibacillus*, *Paeniglutamicibacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Shewanella* и *Sphingomonas*. Среди них были психротолерантные и психрофильные бактерии, способные использовать сырую нефть, дизельное топливо и моторные масла с образованием биосурфактантов. Полученные результаты расширяют представления о составе и физиологических особенностях микробных сообществ загрязненных нефтепродуктами полярных местообитаний и свидетельствуют об их способности деградировать углеводороды в условиях Арктики.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ, гранта РУДН (проект №16), РФФИ (проект № 19-29-05197), Государственной научной программы № 122022400109-7, гранта ПАО НК «Роснефть».

## Публикации:

1. Семенова Е.М., Бабич Т.Л., Соколова Д.Ш., Добрянский А.С., Корзун А.В., Крюков Д.Р. Микробное разнообразие грунтов архипелага Земля Франца-Иосифа, загрязненных нефтепродуктами. // **Микробиология**. 2021. Т. 90. С. 681–691 Doi: 10.31857/S0026365621060136
2. Semenova E.M., Babich T.L., Sokolova D.S., Ershov A.P., Raievska Y.I., Bidzhieva S.K., Stepanov A.L., Korneykova M.V., Myazin V.A., Nazina T.N. Microbial communities of seawater and coastal soil of Russian Arctic Region and their potential for bioremediation from hydrocarbon pollutants // **Microorganisms**. 2022. V. 10. Art. 1490. Doi: 10.3390/microorganisms10081490

## ГЕЛИ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И ХИТОЗАНА, СШИТЫЕ ГЕНИПИНОМ ДЛЯ ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН У МЫШЕЙ С ИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ

Шагдарова Б.Ц.<sup>1</sup>, Коновалова М.В.<sup>2</sup>, Жуйкова Ю.В.<sup>1</sup>, Луньков А.П.<sup>1</sup>, Ильина А.В.<sup>1</sup>, Свирщевская Е.В.<sup>2</sup>, Варламов В.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

<sup>2</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Сахарный диабет II типа остается одним из самых распространенных заболеваний в мире. При диабете даже небольшие травмы приводят к образованию хронических ран. Хитозан – биополимер, подходящий для ускорения заживления ран благодаря своей биоразлагаемости, биосовместимости, мукоадгезивности, низкой токсичности и гемостатическому эффекту. В данной работе мы разработали гели на основе коллагена и хитозана, сшитые генипином, с входящими в их состав наночастицами серебра, синтезированными в среде производного хитозана. Для формирования гелей использовали хитозаны с молекулярными массами 100 и 700 кДа, коллаген I типа, выделенный из хвостов крыс. Для образцов гелей были изучены цитотоксичность, набухание, реологические свойства и структура гидрогелей. Гели, полученные из хитозана 700 кДа и коллагена, набухали сильнее, чем гели только на основе коллагена и хитозана 100 кДа. После сшивания у гелей наблюдалась волокнистая, полосчатая структура и крупные поры, что является благоприятным фактором для взаимодействия с клетками. После сшивания гелей генипином улучшались их упругие свойства (увеличение модуля упругости  $G'$ ). Способность гелей к заживлению ран была изучена на мышах CD1 с аллоксан-индуцированным диабетом. Применение гелей привело к увеличению экспрессии генов VEGF, TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  и TIMP1 и более раннему закрытию ран по сравнению с контрольными необработанными ранами. Все гели увеличивали отложение коллагена, восстановление волосяных фолликулов и образование сальных желез. Результаты работы показывают, что полученные гели обладают хорошими механическими свойствами и биологической активностью и имеют потенциальное применение в области заживления ран. Тем не менее, необходимы клинические исследования для сравнения эффективности гелей, поскольку модели диабета у экспериментальных животных не полностью воспроизводят патологию заболевания у человека.

Выражаем благодарность Ракитову Р.А. и Жегалло Е.А. (Палеонтологический Институт РАН) за помощь в проведении СЭМ, а также Хайдаповой Д.Д. (МГУ им. М.В. Ломоносова) и Жуйкову В.А. (ФИЦ Биотехнологии РАН) за помощь в изучении реологических свойств. Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 20-33-70168) и Министерства науки и высшего образования РФ.

### Публикация:

1. Shagdarova B., Konovalova M., Zhuikova Y., Lunkov A., Zhuikov V., Khaydapova D., Il'ina A., Svirshchevskaya E., Varlamov V. Collagen/chitosan gels cross-linked with genipin for wound healing in mice with induced diabetes // **Materials**. 2022. V.15. №. 1. С. 15. <https://doi.org/10.3390/ma15010015>



## ВЛИЯНИЕ ОСТАТКА 145 НА ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИФОТОХРОМНОГО БЕЛКА mSAASoti: ЯРКОСТЬ ИЛИ ФОТОКОНВЕРСИЯ?

Гавшина А.В., Соловьев И.Д., Савицкий А.П.

*ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН*

Фотопереключаемые флуоресцентные белки (ФБ) стали незаменимыми инструментами для изучения наук о жизни. Объектом исследования является бифотохромный ФБ mSAASoti, то есть способный к одновременной фотоконверсии из зеленого в красный и обратимого фотопереключения из флуоресцентного в темное состояние. Оба свойства были обнаружены на белке дикого типа, что делает его уникальным представителем данного семейства. В рамках данного исследования изучали влияние замен а.о. вблизи хромофора (163, 177), влияющих на фотопереключение, а также замену K145P, которая приводит к получению ярких форм ФБ, как известно на примере других белков. Так, мутантная форма K145P mSAASoti имеет самый высокий молярный коэффициент экстинкции из всех изученных форм mSAASoti; C21N/K145P/M163A переходит в темное состояние в 36 раз быстрее, чем mSAASoti, но не обладает способностью к фотоконверсии из зеленого в красный. Наконец, варианты C21N/K145P/F177S и C21N/K145P/M163A/F177S продемонстрировали высокую скорость фотопереключения как зеленой, так и красной форм.

### **Публикация:**

Gavshina, A.V., Solovyev, I.D., Savitsky, A.P. The Role of the 145 Residue in Photochemical Properties of the Biphotochromic Protein mSAASoti: Brightness versus Photoconversion. // *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, 16058. <https://doi.org/10.3390/ijms232416058>

# ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ ТАУМАТИН-ПОДОБНЫХ БЕЛКОВ (TLP) В ГЕНОМЕ ЧЕСНОКА *ALLIUM SATIVUM* L. И ИХ РОЛЬ В ОТВЕТЕ НА ЗАРАЖЕНИЕ *FUSARIUM PROLIFERATUM*

Анисимова О.К., Филюшин М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Значительные потери урожая сельскохозяйственных культур, в том числе чеснока *Allium sativum*, связаны с грибными инфекциями, в ответ на которые происходит синтез связанных с патогенезом белков (PRs). Тауматин-подобные белки (TLPs), относящиеся к одному из 17 известных семейств PR-белков – PR5, вовлечены в ответ растения на грибные инфекции. В данном исследовании были идентифицированы и охарактеризованы гены тауматин-подобных белков в геноме чеснока *A. sativum*, определена их экспрессия в ответ на инфицирование патогенным грибом *Fusarium proliferatum*.

В геноме *A. sativum* cv. Ershuizao (PRJNA606385) было идентифицировано 32 последовательности, кодирующие тауматин-подобные белки. Размеры найденных генов варьировали от 615 до 2572 пн, а соответствующие им аминокислотные последовательности включали от 204 до 323 аминокислотных остатков. На основе аминокислотных последовательностей были установлены филогенетические отношения и выявлено пять субкластеров исследуемых *AsTLPs*. В промоторных участках генов *AsTLPs* было предсказано наличие различных *cis*-регуляторных элементов, ассоциированных с ответом на фитогормоны и стрессовые факторы. У сортов Сармат и Стрелец, устойчивого и чувствительного к фузариозной гнили, соответственно, были определены паттерны экспрессии генов *AsTLPs* в корнях, донце и тканях зубчика в ответ на заражение *F. proliferatum*. В целом, у сорта Сармат экспрессия *AsTLPs* в ответ на заражение изменялась значительно сильнее, чем у сорта Стрелец. Для большинства генов *AsTLPs* было выявлено увеличение экспрессии в ответ на заражение *F. proliferatum*. В корнях сорта Сармат экспрессия *AsTLP8*, *AsTLP24* и *AsTLP27* возрастала в десятки раз через 96 часов после заражения. Наименее выраженный рост экспрессии в ответ на заражение наблюдался в тканях зубчика, что вероятно связано с проникновением патогена через корни, где ответ оказался наибольшим. Для дифференциально экспрессирующихся генов *AsTLPs* были определены и исследованы промоторные регионы (1000 пн). Полученные результаты свидетельствуют об активном участии генов *AsTLPs* в ответе на заражение *F. proliferatum* и в формировании устойчивости растений чеснока к фузариозной гнили.

## Публикация:

Anisimova, O.K.; Kochieva, E.Z.; Shchennikova, A.V.; Filyushin, M.A. Thaumatin-like Protein (TLP) Genes in Garlic (*Allium sativum* L.): Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression in Response to *Fusarium proliferatum* Infection // **Plants**. 2022. V. 11(6). Article 748. <https://doi.org/10.3390/plants11060748>