



X

Ежегодная научная конференция
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук
12-14 февраля 2024

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

Москва

СТРУКТУРА ВИРУСНОЙ ЧАСТИЦЫ БАКТЕРИОФАГА *E. COLI* DT57C

Летаров А.В.^{1,2}, Айала Р.³, Моисеенко А.В.², Голомидова А.К.¹, Куликов Е.Е.¹, Орехов Ф.С.⁴, Стрит М.А.³, Соколова О.С.^{2,4}, Вольф М.³

¹ ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

³ Окинавский институт науки и технологии, Онна-сон, Окинава, Япония

⁴ Биологический факультет Университета МГУ-ППИ, Шэнчэнь, Китай

T5-подобный (род Tequintavirus) бактериофаг DT57C был нами изолирован в 2006 г. из образца фекалий лошади в ходе систематического исследования экологии колифагов в кишечном микробиоме этих животных. Большая часть структурных белков этого вируса очень близка к белкам вириона фага T5, существенные отличия имеются лишь в белках латеральных хвостовых фибрилл (LTF), рецептор-узнающем белке центральной хвостовой фибриллы и декорирующем белке головки. Поэтому данные о структуре фага DT57C в значительной мере проясняют организацию классического модельного объекта – колифага T5.

Структура бактериофага была решена с помощью методов криоэлектронной микроскопии в ходе международного проекта российско-японского коллектива. Полученная модель обнаружила необычный способ присоединения LTF к базальному комплексу хвоста, с образованием переплетенной структуры N-концевых сегментов трех тримеров фибриллярного белка LtfA и 12 субединиц белка-адаптора LtfC. Полученные данные согласуются с выводами о разветвленной структуре LTF фага DT57C, сделанными нами ранее на основании генетического анализа (Golomidova et al., 2016), однако получить прямую визуализацию точки ветвления LTF в данной работе не удалось. В то же время мы обнаружили транзиторный контакт LtfB с белком pb3 (baseplate hub protein), что дает основания предположить, что сложные LTF фага DT57C помимо адсорбции выполняют еще и функцию молекулярного сенсора окружающей среды.

Помимо особенностей LTF, описан ряд иных структурных особенностей, например, тримерное состояние белка TMP как в проксимальной, так и в дистальной части хвоста, структура шейки вириона, ассиметричное присоединение декорирующего белка головки к соответствующим сайтам в центрах гексамеров главного белка капсида и другие.

Публикации:

1. Ayala R., Moiseenko A.V., Chen T.H., Kulikov E.E., Golomidova A.K., Orekhov P.S., Street M.A., Sokolova O.S., Letarov A.V., Wolf M. Nearly complete structure of bacteriophage DT57C reveals architecture of head-to-tail interface and lateral tail fibers // **Nature Commun.** 2023. V. 14. N. 1. Art. 8205. doi: 10.1038/s41467-023-43824-9
2. Ayala R., Street M., Moissenko A., Kulikov E., Kuznetsov A., Sokolova O., Wolf M., Letarov A. Reconstruction of the Entire RB43 Bacteriophage by Single Particle Cryo-EM // **Microsc. Microanal.** 2023. V. 29 (Suppl. 1). P. 928-929. doi:10.1093/micmic/ozad067.460
3. Letarov A.V. Bacterial Virus Forcing of Bacterial O-Antigen Shields: Lessons from Coliphages // **Int. J. Mol. Sci.** 2023. V. 24. Art. 17390. doi: 10.3390/ijms242417390
4. Golomidova A.K., Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Knirel Y.A., Kostryukova E.S., Tarasyan K.K., Letarov A.V. Branched Lateral Tail Fiber Organization in T5-Like Bacteriophages DT57C and DT571/2 is Revealed by Genetic and Functional Analysis // **Viruses.** 2016. V. 8. N. 1. Art. 26. doi: 10.3390/v8010026

НОВЫЙ КЛАСС НЕНУКЛЕОЗИДНЫХ ИНГИБИТОРОВ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИЧ-1, ПРОНИКАЮЩИХ ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

Макаров В.¹, Рябова О.¹, Казакова Е.¹, Монахова Н.¹, Цедиллин А.¹, Lane T.², Nelson J.², Meeker R.B.², Sanna G.², Urbina F.², Suchy A.², Ekins S.²

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Коллаборатив Фарма - Университет Северной Каролины

Современная высокоактивная антиретровирусная терапия произвела революцию в лечении больных, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), превратив его из смертельной болезни в потенциально хроническое заболевание, однако у многих пациентов с течением времени развиваются тяжелые сопутствующие заболевания. К ним в первую очередь относятся неврологические осложнения, такие как ВИЧ-ассоциированные нейрокогнитивные расстройства, часто связанные с когнитивными и/или двигательными функциональными симптомами. Нами осуществлен дизайн, синтез и проведено подробное изучение нового класса N-фенил-1-(фенилсульфонил)-1H-1,2,4-триазол-3-аминов, мишенью для которых служит обратная транскриптаза ВИЧ, которые способны элиминировать вирус из нейронов и в конечном итоге из всего организма. Лидирующие многообещающие молекулы, 12126055 и 12126065, проявляли очень высокую противовирусную активность против ВИЧ-1 дикого типа в клетках TZM (EC50 = 0,24 нМ) при цитотоксичности (CC50 = 4,8 мкМ), а также продемонстрировали активность против всех других клинически значимых мутантов ВИЧ. Указанные производные триазола также продемонстрировали отсутствие острой или подострой токсичности в экспериментах *in vivo*, хорошее проникновение в мозг *in vivo* и минимальную нейротоксичность в экспериментах с нейронами мышей при концентрациях до 10 мкМ, с 50% концентрацией цитотоксичности (TC50) > 100 мкМ, что значительно ниже EC50.

В настоящее время ведется работа по разработке современной лекарственной формы и ее фармакокинетическое исследование на животных.

Публикации:

1. Zorn K.M., Lane T.R., Russo D.P., Clark A.M., Makarov V., Ekins S. Multiple Machine Learning Comparisons of HIV Cell-based and Reverse Transcriptase Data Sets, **Mol Pharm.**, 2019, 16, 1620-1632. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b01297.
2. Puhl A.C., Garzino Demo A., Makarov V.A., Ekins S. New targets for HIV drug discovery, **Drug Discovery Today**, 2019, 24, 1139-1147. doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.013
3. Lane T., Makarov V., Nelson J., Meeker R.B., Sanna G., Riabova O., Kazakova E., Monakhova N., Tsedilin A., Urbina F., Suchy A., Ekins S. N-phenyl-1-(phenylsulfonyl)-1H-1,2,4-triazol-3-amine as a new class of HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, **Journal of Medicinal Chemistry**, 2023, 66(9):6193-6217. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c02055
4. **WO2023128786** New antiviral triazole derivatives, their synthesis and their use for treatment of mammalian viral infections, Makarov V., Riabova O., Lane T., Ekins S. 06.07.2023

РЮРИКОВИЧИ: ПЕРВЫЙ ОПЫТ РЕКОНСТРУКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ОБЛИКА ПРАВЯЩЕГО РОДА СРЕДНЕВЕКОВОЙ РУСИ ПО ДАННЫМ ПАЛЕОГЕНОМИКИ

Жур К.В.¹, Шарко Ф.С.¹, Седов В.В.², Добровольская М.В.², Волков В.Г.³, Максимов Н.Г.⁴, Сеславин А.Н.⁵, Макаров Н.А.², Прохорчук Е.Б.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт археологии РАН

³ Областное государственное автономное учреждение «Центр татарской культуры»

⁴ АНО Руниверс

⁵ Общероссийская общественная организация «РДС»

Представители рода Рюриковичей были правителями Руси в течение семи столетий, с IX до конца XVI в. «Повесть временных лет», главный летописный источник о первых веках истории Руси, ведет происхождение этого княжеского рода от варяга Рюрика, призванного на княжение в 862 г., однако прямых генетических свидетельств происхождения ранних Рюриковичей до сих пор не получено.

В данной работе впервые проведен полногеномный палеогенетический анализ костных останков представителя рода Рюриковичей – великого князя Владимирского Дмитрия Александровича (?–1294), сына великого князя Киевского и Владимирского Александра Ярославича Невского (1221–1263). Установлено, что его Y хромосома принадлежит к N1a-гаплогруппе.

Большинство современных Рюриковичей, принадлежащие, согласно их родословным, к гаплогруппе N1a, обладают максимально похожими вариантами Y хромосом между собой, а также с Y хромосомой князя Дмитрия Александровича. Совокупность полногеномных данных средневековых и современных Рюриковичей может однозначно говорить о том, что их род, начиная по крайней мере с XI в. (со времени великого князя Ярослава Мудрого), характеризуется носительством N1a-гаплогруппы Y хромосомы. Все остальные предполагаемые Рюриковичи как древние, так и современные являются носителями других гаплогрупп (R1a, I2a), обладают высокой гетерогенностью последовательности Y хромосом и не подтверждают единое происхождение.

Наиболее вероятными отдаленными предками князя Дмитрия Александровича по мужской линии были мужчины, оставившие могильник Большой Олений остров на побережье Кольского полуострова около 3600 лет назад. Моделирование генома князя Дмитрия Александровича указывает на вклад в его происхождение трех предковых компонент: (1) популяции раннесредневекового населения востока Скандинавии с острова Эланд; (2) представителей степных кочевых народов евразийских степей железного века или раннесредневекового населения Центральной Европы (степные кочевники с территории Венгрии) и (3) древнего сибирского компонента. Достоверные значения статистики также получены при замене жителей Скандинавии на представителей славянского древнерусского населения XI в.

Таким образом, впервые на примере древнего Рюриковича показана генетическая составляющая сложного характера межэтнических взаимодействий в формировании знати средневековой Руси.

Публикации:

1. Borodko DD, Zhenilo SV, Sharko FS. Search for differentially methylated regions in ancient and modern genomes. *Vavilovskii Zhurnal Genet Selektii*. 2023 Dec;27(7):820-828. doi: 10.18699/VJGB-23-95. PMID: 38213708; PMCID: PMC10777292.
2. Sharko FS, Zhur KV, Trifonov VA, Prokhortchouk EB. Distortion of Population Statistics due to the Use of Different Methodological Approaches to the Construction of Genomic DNA Libraries. *Acta Naturae*. 2023 Jan-Mar;15(1):87-96. doi: 10.32607/actanaturae.11898. PMID: 37153511; PMCID: PMC10154772.
3. Zhur KV, Sharko FS, Sedov VV, Dobrovolskaya MV, Volkov VG, Maksimov NG, Seslavine AN, Makarov NA, Prokhortchouk EB. The Rurikids: The First Experience of Reconstructing the Genetic Portrait of the Ruling Family of Medieval Rus' Based on Paleogenomic Data. *Acta Naturae*. 2023 Jul-Sep;15(3):50-65. doi: 10.32607/actanaturae.23425. PMID: 37908771; PMCID: PMC10615192.

НIS-МЕТКИ ДЛЯ ВСТРАИВАНИЯ ВНУТРЬ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

М.С. Юркова, А.Г.Тарабарова, А.Н. Федоров

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Использование аффинных меток, и преимущественно His-меток, для очистки рекомбинантных белков стало практически универсальным инструментом; однако в некоторых случаях присутствие His-меток на N- или C-концах белка может создавать проблемы: гексагистидиновая последовательность может вызывать образование телец включения, нарушение каталитических функций ферментов, нарушение белок-белковых взаимодействий, или же метка не может быть использована на N- или C-концах из-за их функциональной и/или структурной вовлеченности в другие процессы. Решить подобные проблемы и расширить область применения His-меток позволяет их включение в состав полипептидной цепи белков с учетом особенностей структуры.

В данной работе описан дизайн новых His-меток для встраивания в полипептидную цепь белков, в которых триплеты остатков гистидина разделены остатками глицина (3Н1G3Н и 3Н3G3Н). Со встроенными His-метками получены два белка, GrAD207 и eGFP, принадлежащие к разным структурным классам, и изучены такие их свойства, как стабильность, функциональность и приобретенная аффинность к ионам Ni²⁺. Показано, что оба белка со встроенными His-метками приобрели сродство к Ni²⁺ смоле, оставаясь при этом функциональными и со свободными N- и C-концами для создания фьюжн-конструктов – это существенно, поскольку оба они используются как белки-лидеры в системах слитых белков. По результатам работы сделаны выводы, что новые His-метки, 3Н1G3Н и 3Н3G3Н, могут быть рекомендованы для встраивания в белки для разделения конформационно подвижных структур и спиральных элементов, тогда как метка 7Н может быть более подходящей в случаях конформационно жестких структур.

Публикации:

1. А. Г. Тарабарова, М. С. Юркова, А. Н. Федоров. Новый Ni²⁺-аффинный вариант eGFP со свободными C- и N-концами // **Прикладная биохимия и микробиология**. - 2023. - Т 59. - № 6. - С. 614-621 DOI: 10.31857/S0555109923060193 Англ. версия DOI: 10.1134/S0003683823060194
2. A. G. Tarabarova, A. Lopukhov, A. N. Fedorov, and M. S. Yurkova. Novel His-tag variants for insertion inside polypeptide chain // **ACS Omega** 2023 DOI: 10.1021/acsomega.3c06682 PMID# PMC10785306
3. M. S. Yurkova, O. A. Sharapova, V. A. Zenin, and A. N. Fedorov. Versatile format of minichaperone-based protein fusion system. **Scientific Reports**, 9 (1), pp. 1-11. doi: 10.1038/s41598-019-51015-010

ДОСТИЖЕНИЯ ФИЦ В ГЕНОМНОМ РЕДАКТИРОВАНИИ РАСТЕНИЙ

Нежданова А.В., Кулакова А.В., Ефремов Г.И., Камионская А.М., Слугина М.А., Щенникова А.В., Кочиева Е.З.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

Для редактирования растений сем. Solanaceae (картофель, табак) были выбраны два гена: ген пластидной крахмалфосфорилазы PHO1a, вовлеченный в метаболизм крахмала, и ключевой ген биосинтеза каротиноидов, кодирующий фитоиндесатуразу PDS.

Были получены растения картофеля *Solanum tuberosum* L. четырех сортов с внесенной с помощью CRISPR-Cas9-редактирования мутацией G261V в функциональный домен белка PHO1a, которая привела к изменениям морфологии корней и надземной части растения картофеля, а также содержания крахмала и экспрессии генов метаболизма крахмала в корнях и листьях, в том числе в ответ на воздействие холодового стресса.

Также были получены растения табака *Nicotiana tabacum* L. с неполным мозаичным нокаутом гена крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1 (Pho1a)* за счет нескольких одновременных делеций с последующим сдвигом рамки считывания. Это вызвало изменения в содержании углеводов (крахмал, сахароза, глюкоза, фруктоза), хлорофиллов и каротиноидов в листовой ткани проростков. Кроме того, обнаружены сдвиги в уровне экспрессии *PHO1-L1*, других генов метаболизма крахмала (*NtBAM1*, *NtBAM9*, *NtGWD*, *NtAI*) и каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtZDS*, *NtCRTISO*, *NtVDE*), а также генов MADS-домени транскрипционных факторов (ТФ) (*NtSEP1*, *NtSEP2*, *NtSEP3*, *NtANRI*, *NtFUL1*). Полученные результаты говорят о значимости изофермента PHO1-L1 в метаболизме крахмала и развитии растения, включая фотосинтез и стрессовый ответ, а также допускают возможность непрямого участия PHO1a в регуляции стресс-чувствительных MADS-бок генов.

Кроме того, были получены трансгенные растения табака *N. tabacum* с мозаичным нокаутом гена фитоиндесатуразы PDS, что привело к изменению времени инициации цветения и морфологических характеристик, а также снижению содержания каротиноидов и хлорофиллов в ткани листа. Позднее цветение сопровождалось существенным подъемом уровня транскриптов гена фитоинсинтазы *NtPSY2* и нижестоящих структурных генов каротиногенеза.

Публикации:

1. Нежданова А.В., Слугина М.А., Кулакова А.В., Камионская А.М., Кочиева Е.З., Щенникова А.В. Влияние мозаичного нокаутирования гена фитоиндесатуразы *NtPDS* на биосинтез каротиноидов у *Nicotiana tabacum* L. // **Физиология растений**. 2023. Т. 70(6). С. 601–611. <https://doi.org/10.31857/S001533032360033X>
2. Nezhdanova A.V., Efremov G.I., Slugina M.A., Kamionskaya A.M., Kochieva E.Z., Shchennikova A.V. Effect of a radical mutation in plastidic starch phosphorylase PHO1a on potato growth and cold stress response // **Horticulturae**. 2022. V. 8(8). 730. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080730>

РОДСТВЕННЫЕ МУЛЬТИГЕМОВЫЕ ЦИТОХРОМЫ ОБЕСПЕЧИВАЮТ ЖЕЛЕЗНОЕ И СЕРНОЕ ДЫХАНИЕ НАТРОНОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *DETHIOBACTER ALKALIPHILUS* И АДАПТАЦИЮ К РАЗЛИЧНЫМ ГЕОХИМИЧЕСКИМ УСЛОВИЯМ СРЕДЫ

Гаврилов С.Н.¹, Заварзина Д.Г.¹, Меркель А.Ю.¹, Ключкина А.А.¹, Елизаров И.М.¹, Пихтерева В.А.^{1,2}, Русаков В.С.³, Маслов А.А.⁴, Зиганьшин Р.Х.⁵, Чистякова Н.И.³

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

³ Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

⁴ Геологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

⁵ ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Натронофилы являются полиэкстремофилами, обитающими при высоких солёности и рН, как правило, в содовых озёрах. Эти распространённые экосистемы считаются геологически древними и являются местами обитания предполагаемых реликтовых микробных сообществ. В своей работе мы проанализировали физиологические свойства и их детерминанты у двух штаммов натронофильной бактерии *Dethiobacter alkaliphilus* – единственного культивируемого представителя класса “Dethiobacteria”. Эти штаммы были ранее выделены из географически удалённых друг от друга содовых озёр Монголии и Кении, штамм АНТ1Т – как факультативный хемолитоавтотрофный сульфидоген, восстанавливающий серу или тиосульфат, а штамм Z-1002 – как хемолитоавтотрофный железоредуктор. Мы выявили способность штамма АНТ1Т к железоредукции и штамма Z-1002 к восстановлению тиосульфата и окислению Fe(II). Оказалось, что ключевые катаболические процессы у двух разных штаммов *D. alkaliphilus* адаптированы к геохимическим условиям двух контрастных щелочных экосистем – богатых серой содовых озёр и богатых железом серпентинитов. Геномный анализ выявил, что детерминантами окислительно-восстановительных превращений серы и железа у обоих штаммов являются мультигемовые цитохромы с-типа. Реконструкция филогении этих цитохромов выявила общность их эволюционного происхождения с неканоническими восьмигемовыми тетрагидропиримидин- и сульфитредуктазами и их структурными аналогами, железоредуктазами OthA/OswA. Были также выявлены филогенетически близкие этим цитохромам детерминанты окисления Fe(II) у штамма Z-1002. Протеомный анализ выявил две группы мультигемовых цитохромов, экспрессия которых повышается при железном, либо при тиосульфатном дыхании. Мы предполагаем, что поддержание вариативности цитохромов у бактерий данного вида является эффективной адаптационной стратегией, позволяющей занимать контрастные по условиям экологические ниши. На основании наших данных мы также полагаем, что богатые серой содовые озёра могли быть вторичными местами обитания вида *D. alkaliphilus* по сравнению с серпентинитами, и что продолжающаяся эволюция порядка *Dethiobacteriales* с переходом от железоредукции к восстановлению серных соединений может моделировать глобальные изменения прокариотной биосферы Земли, происходившие в один из поворотных моментов её истории, когда интенсификация биогеохимического цикла серы сделала его более экологически значимым по сравнению с железным циклом.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 21-14-00333 и МОН РФ.

Публикация:

1. Zavarzina D.G., Merkel A.Y., Klyukina A.A., Elizarov I.M., Pikhtereva V.A., Rusakov V.S., Chistyakova N.I., Ziganshin R.H., Maslov A.A., Gavrilov S.N. Iron or sulfur respiration – an adaptive choice determining the fitness of a natronophilic bacterium *Dethiobacter alkaliphilus* in geochemically contrasting environments // **Front. Microbiol.** 2023. V. 14. Art. 1108245. doi: 10.3389/fmicb.2023.1108245

СИСТЕМА С РАЗДЕЛЕННЫМ МАРКЕРОМ ДЛЯ CRISPR-CAS9 РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМОВ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ

А.В. Каргинов, М.Д. Пахомова, А.А. Галлямов, С.Ю. Филькин, А.Н. Федоров, М.О. Агафонов
ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН, Г

Для генетической инженерии лабораторных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, доступно множество различных инструментов, которые уже стали традиционными. Однако при проведении манипуляций с геномами промышленных штаммов этого вида, а также других видов дрожжей, часто возникают проблемы, связанные, в частности, с полиплоидностью или с отсутствием удобных селективных маркеров. В таких случаях эффективным решением проблемы может быть использование компонентов бактериального адаптивного иммунитета CRISPR-Cas9, белка Cas9 и РНК-целеуказателя. Гены, кодирующие эти компоненты, часто не удается совместить на одной плазмиде при получении конструкции в *Escherichia coli*, поэтому для введения их в клетки дрожжей часто используют либо независимые векторы, либо конструируют общий вектор *in vitro*. Задачей данной работы было разработать для дрожжей рода *Ogataea* подход, позволяющий эффективно проводить CRISPR-Cas9 редактирование генома. Для этого гены, кодирующие Cas9 и РНК-целеуказатель, поместили на независимые векторы с одинаковым дрожжевым селективным маркером. Перед трансформацией дрожжей эти векторы разрезали рестриктазами так, чтобы функциональный селективный маркер образовывался в результате гомологичной рекомбинации фрагментов, приводящей к образованию автономно-реплицирующегося вектора, который содержит и Cas9 и РНК-целеуказатель. С помощью разработанной системы проведена инактивация гена *MET8* *O. polymorpha*, *PMT1* *O. parapolymorpha* и *MET8* *Komagataella phaffii*.

Публикация:

Karginov AV, Tarutina MG, Lapteva AR, Pakhomova MD, Galliamov AA, Filkin SY, Fedorov AN, Agaphonov MO. A Split-Marker System for CRISPR-Cas9 Genome Editing in Methylotrophic Yeasts. **International Journal of Molecular Sciences**. 2023; 24(9):8173. <https://doi.org/10.3390/ijms24098173>

Работа поддержана программой развития генетических технологий по теме «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий», соглашение № 075-15-2021-1071.

СИНТЕЗ КАРОТИНОИДОВ МЕТАНОТРОФАМИ РОДА *METHYLOMONAS*: ГЕНОМНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И КОМПОНЕНТЫ СПЕКТРА ПРОДУЦИРУЕМЫХ ПИГМЕНТОВ

Ошкин И.Ю., Тихонова Е.Н., Сулейманов Р.З., Иванова А.А., Пименов Н.В., Дедыш С.Н.

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Каротиноиды – природные пигменты, проявляющие антиоксидантные свойства и характеризующиеся ярким спектром цветов от желтого до красного. Эти соединения синтезируются как эукариотическими, так и прокариотическими организмами. Среди последних особый интерес представляют продуцирующие каротиноиды метанотрофные бактерии, которые демонстрируют быстрый рост на метане или природном газе и рассматриваются в качестве потенциальных производителей кормового белка, обогащенного каротиноидами. В настоящем исследовании были проанализированы последовательности геномов пяти штаммов рода *Methylomonas*, пигментация которых варьировала от белой и желтой до оранжевой и красной, и идентифицированы каротиноиды, продуцируемые этими бактериями. Каротиноиды, синтезированные четырьмя пигментированными штаммами, включали фракцию С30, состоящую преимущественно из 4,4'-диаполикопин-4,4'-диоевой и 4,4'-диаполикопиновой кислот, а также фракцию С40, основным компонентом которой являлся 1,1'-дигидрокси-3,4-дидегидроликопин. Геномы изученных штаммов *Methylomonas* варьировали по размеру от 4.59 до 5.45 млн. п.о. и содержали 4201–4735 белок-кодирующих генов. Полученные геномы вместе с 35-ю доступными в GenBank геномами *Methylomonas* были исследованы на наличие генов, кодирующих биосинтез каротиноидов. Геномы всех пигментированных штаммов *Methylomonas* содержали гены, необходимые для синтеза 4,4'-диаполикопин-4,4'-диоевой кислоты. У единственного непигментированного представителя этого рода – «*Methylomonas montana*» MW1T – отсутствовал ген *crtN*, необходимый для синтеза каротиноидов. Почти все штаммы обладали фитоендесатуразами, что объясняло их способность к синтезу ликопина. Таким образом, представители рода *Methylomonas* потенциально могут рассматриваться в качестве продуцентов каротиноидов С30 и С40 из метана.

Работа выполнена в рамках проекта «Развитие технологий геномного редактирования для решения инновационных задач промышленных и пищевых биотехнологий» № 075-15-2021-1071, финансируемого Министерством науки и высшего образования РФ.

Публикация:

Oshkin I.Y., Tikhonova E.N., Suleimanov R.Z., Ashikhmin A.A., Ivanova A.A., Pimenov N.V., Dedysh S.N. All kinds of sunny colors synthesized from methane: genome-encoded carotenoid production by *Methylomonas* species // **Microorganisms**. 2023. V. 11. Art. 2865. Doi: 10.3390/microorganisms11122865. (IF 4.5)

РАЗРАБОТКА СМЕСЕВЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИСАХАРИДА И ПОЛИЭФИРА, ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И БИОСОВМЕСТИМОСТИ *IN VITRO*

Жуйкова Ю.В.¹, Жуйков В.А.², Варламов В.П.¹

¹ ИИБ, ФИЦ Биотехнологии РАН;

² ИИБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН.

Поли-3-оксибутират (ПОБ) и хитозан являются широко распространенными полимерами для биомедицинского использования, благодаря их биосовместимости, возобновляемости, низкой токсичности, способности к биодеградации. В ходе данной работы была разработана методика получения смесевых пленок на основе хитозана и поли-3-оксибутирата, которые в перспективе могут быть использованы в биомедицине. Основной целью работы было определение особенностей использования полимеров различной природы (гидрофильный полисахарид, гидрофобный полиэфир) в едином композите путем изучения физико-химических, механических, биологических свойств смесевых пленок.

В данном исследовании уксусная кислота была использована как растворитель для поли-3-оксибутирата. Дальнейшее добавление в смесь раствора хитозана позволило получить однородные композиты. Из них методом литья и высушивания были сформированы пленки с разным соотношением обоих полимеров (1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:20, соответственно, для хитозана и ПОБ). Результаты дифференциальной сканирующей калориметрии, термогравиметрического анализа, атомно-силовой микроскопии и ИК-спектроскопии показали, что добавление хитозана оказывало влияние на структуру композита. При увеличении количества хитозана происходило снижение степени кристалличности и небольшое уменьшение гидрофобности. С другой стороны, уменьшение процента вхождения хитозана привело к снижению способности композитов поглощать жидкость, по сравнению с чистым хитозаном. Также были проведены исследования комплексные исследования механических характеристик пленок, их способности к ферментативной биодеградации и биосовместимости по отношению к клеткам МСК. Полученные результаты в комплексе открывают перспективы разработки композитных материалов из ПОБ и хитозана с регулируемыми физико-химическими свойствами. Это будет являться актуальным для решения различных биомедицинских задач и разработки изделий с заданными характеристиками.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-00240, <https://rscf.ru/project/22-73-00240/>.

Публикации:

1. Zhuikova, Y., Zhuikov, V., Varlamov, V. Biocomposite Materials Based on Poly(3-hydroxybutyrate) and Chitosan: A Review // **Polymers**. 2022. 14(24), 5549.
2. Zhuikova Y.V., Zhuikov V.A., Makhina T.K., Efremov Y.M., Aksenova N.A., Timashev P.S., Bonartseva G.A., Varlamov V.P. Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan composite films using acetic acid as a solvent // **International Journal of Biological Macromolecules**. 2023. V. 248, 125970.

НОВЫЕ И ХОРОШО ИЗВЕСТНЫЕ ПРЕДСТАВИТЕЛИ *VERRUCOMICROBIOTA*: НА ПУТИ ОТ ТЕОРИИ К ПРАКТИКЕ

Подосокорская О.А.¹, Ельченинов А.Г.¹, Меркель А.Ю.¹, Кубланов И.В.¹, Губернаторова Е.О.², Круглов А.А.³, Недоспасов С.А.², Друцкая М.С.², Бонч-Осмоловская Е.А.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН

³ German Rheumatism Research Center (DRFZ), Leibniz Institute, Berlin, Germany

Verrucomicrobiota – группа повсеместно распространенных бактерий. Обнаруженные впервые в пресноводных биотопах в 1935 г., в чистые культуры они были выделены только в 1970 г. Впоследствии представители филума были обнаружены в самых разных местообитаниях, где их роль варьирует от автотрофов (метанотрофные представители *Methylococcaceae*) до аэро- или анаэробных гетеротрофов (абсолютное большинство представителей). Хотя представители *Verrucomicrobiota* чаще всего обнаруживаются в мезофильных морских или наземных местообитаниях, некоторые из них могут процветать и в экстремальных условиях: в холодных водах Антарктиды, содовых озерах, подводных гидротермах, грязевых вулканах и горячих источниках. Наконец, представители филума были обнаружены в различных антропогенных экосистемах (рисовые поля, полигоны ТБО, дренажи кислых пород и т.д.) и в пищеварительных трактах животных (термитов, мышей) и человека, где они выполняют одну из ключевых функций.

Задачей исследования было изучить нового представителя филума *Verrucomicrobiota* – *Fontisphaera persica* В-154Т, выделенного нами из термального местообитания Байкальской рифтовой зоны, и предположить его экологическую роль, а также исследовать роль ранее известного веррукомикроба – *Akkermansia muciniphila* в процессе предотвращения/лечения колоректального рака. Штамм В-154Т имел много общих черт с ближайшими родственными организмами – *Limisphaera ngatamarikiensis* и «*Pedosphaera parvula*»: клетки были представлены грамтрицательными кокками, способными к росту на сахарах в аэробных условиях. В то же время, наш изолят существенно отличался по ряду признаков: клетки были персикового цвета и зачастую образовывали крупные агрегаты; штамм был способен расти за счет брожения в строго анаэробных условиях и деградировал широкий спектр полисахаридов (пуллулан, ксилан, лихенан, камеди, глюко- и галактоманнан и др.), а также обладал другим набором основных жирных кислот. Филогеномный анализ показал, что штамм В-154Т является представителем нового рода и семейства, для которых было предложено название *Fontisphaera* и *Fontisphaeraceae* соответственно. Кроме того, показано, что ближайшие родственники также образуют филогенетические линии уровня семейств внутри порядка *Limisphaerales*, которое нам удалось валидно описать. Другим направлением работы с представителями *Verrucomicrobiota* стало исследование влияния *A. muciniphila* на развитие колоректального рака. Являясь частью комменсальной микробиоты человека, данная бактерия прекрасно приспособлена к анаэробному росту на муцине, обильно вырабатываемом клетками толстого кишечника. Мы показали, что различия в экспериментальных протоколах введения *A. muciniphila*, а также жизнеспособности бактерий, могут существенно повлиять на барьерные функции кишечника и оказывать комбинированное воздействие с другими видами бактерий, препятствуя развитию рака.

Работа выполнена при поддержке МОН РФ и проекта РФФИ № 22-25-00534

Публикации:

1. Podosokorskaya O.A., Elcheninov A.G., Novikov A.A., Merkel A.Y., Kublanov I.V. *Fontisphaera persica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic hydrolytic bacterium from a hot spring of Baikal lake region, and proposal of *Fontisphaeraceae* fam. nov., and *Limisphaeraceae* fam. nov. within the *Limisphaerales* ord. nov. (*Verrucomicrobiota*) // **Syst. Appl. Microbiol.** 2023. V. 46. № 4. Art. 126438. doi: 10.1016/j.syapm.2023.126438
2. Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Bondareva M.A., Podosokorskaya O.A., Sheynova A.D., Yakovleva A.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Nedospasov S.A., Kруглов A.A., Друцкая M.S. *Akkermansia muciniphila* – friend or foe in colorectal cancer? // **Front. Immunol.** 2023. V. 14. Art. 1303795. doi: 10.3389/fimmu.2023.1303795

ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ ПРИ ВЫРАЩИВАНИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР В КОНТРОЛИРУЕМЫХ КЛИМАТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ГОРОДСКОЙ ФЕРМЫ (СИТИ-ФЕРМЫ)

Румянцев Б.В., Джатдоева С.А., Кочкаров А.А.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Одним из центральных направлений исследований в области агротехнологий является создание новых методов сокращения периода вегетации выращиваемых сельскохозяйственных культур с сохранением и увеличением количества и качества получаемого урожая. К основным методам, применяемым для этих целей, можно отнести косвенное воздействие на выращиваемое растение путём управления параметрами окружающей среды [1]. При этом указанный метод, направленный на управление параметрами окружающей среды, труднореализуем в полевых условиях, поэтому, как правило, используется в рамках защищённых от воздействия погодных условий ферм [2]. Помимо повышения урожайности и сокращения полного периода вегетации, выращивание растений в рамках таких контролируемых условий позволяет тестировать математические модели влияния параметров окружающей среды на процесс вегетации. В связи с этим, одним из перспективных трендов в современной агрономии является разработка автоматизированных закрытых городских вертикальных сити-ферм с контролируемыми условиями окружающей среды, которые могут улучшить динамику процесса роста культурных растений.

На базе сити-фермы ФИЦ «Биотехнологии РАН» в 2023 году проведены исследования особенностей выращивания картофеля сорта «Инноватор» в рамках контролируемых условий автономной вертикальной фермы. Так, был проведен анализ стадий вегетации семенного материала картофеля (миниклубней и микрорастений), выращенных в условиях автоматизированной вертикальной фермы ФИЦ «Биотехнологии» РАН. На основе анализа динамики потребления воды растениями было установлено, что сокращение периода вегетации картофеля, выращенного на вертикальной ферме, составляет 20 дней по сравнению с картофелем, выращенным на поле. В случае посадки миниклубней это является следствием сокращения финальной стадии вегетации (набора массы новообразованных клубней). При этом в случае высадки микрорастений подобное сокращение периода вегетации происходит из-за сокращения как финальной, так и начальной стадий вегетации. Полученный результат уточняет динамику вегетации картофеля, выращенного в контролируемых условиях городских вертикальных сити-ферм, а также демонстрирует возможность изучения процесса развития растений с помощью автоматизированных систем агродиагностики [3].

Применение современных методов анализа и обработки данных позволило получить информацию о влиянии микроклиматических параметров на процесс вегетации картофеля в рамках сити-фермы ФИЦ «Биотехнологии» РАН. Так, на основе корреляционного и Фурье-анализа зависимостей влажности почвы и концентрации углекислого газа от времени показано, что после полива картофеля происходит отложенное снижение концентрации углекислого газа в помещении выращивания на 56 часов, что можно объяснить отложенным увеличением интенсивности процесса фотосинтеза. Кроме того, сравнение зависимости концентрации CO₂ от времени с динамикой освещения в масштабе одного дня указывает на присутствие внутреннего суточного биологического ритма скорости поглощения CO₂, который не зависит от внешних условий освещения [4].

С опорой на накопленные экспериментальные результаты разработана аналитическая модель зависимости массы клубней картофеля от концентрации углекислого газа при выращивании в закрытой системе. Модель основана на количественном описании синтеза молекул крахмала из углекислого газа при фотосинтезе. Валидация модели была проведена на основе экспериментальных данных, полученных на сити-ферме ФИЦ «Биотехнологии» РАН. Описанная модель может служить основой для бесконтактного неинвазивного измерения массы клубней картофеля в режиме реального времени при выращивании в условиях закрытых помещений, таких как вертикальные сити-фермы и теплицы, а также систем производства сельскохозяйственной продукции в космических условиях [5].

Публикации:

- [3] Rumiantsev, B., Dzhatdоеva, S., Zotov, V., & Kochkarov, A. (2023). Analysis of the Potato Vegetation Stages Based on the Dynamics of Water Consumption in the Closed Urban Vertical Farm with Automated Microclimate Control. **Agronomy**, 13(4), 954. <https://doi.org/10.3390/agronomy13040954>
- [4] Kamenchuk, V., Rumiantsev, B., Dzhatdоеva, S., Sadykhov, E., & Kochkarov, A. (2023). Analysis of Cross-Influence of Microclimate, Lighting, and Soil Parameters in the Vertical Farm. **Agronomy**, 13(8), 2174. <https://doi.org/10.3390/agronomy13082174>
- [5] Rumiantsev, B., Dzhatdоеva, S., Sadykhov, E., & Kochkarov, A. (2023). A Model for the Determination of Potato Tuber Mass by the Measurement of Carbon Dioxide Concentration. **Plants**, 12(16), 2962. <https://doi.org/10.3390/plants12162962>

ДЕЙСТВИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ ФОСФАТ-АККУМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ЛАБОРАТОРНЫХ БИОРЕАКТОРАХ, ИМИТИРУЮЩИХ ПРОМЫШЛЕННЫЕ ОЧИСТНЫЕ СООРУЖЕНИЯ

Пелевина А.В.¹, Дорофеев А.Г.¹, Берестовская Ю.Ю.¹, Грачев В.А.¹, Николаев Ю.А.¹, Каллистова А.Ю.¹, Груздев Е.В.², Белецкий А.В.², Равин Н.В.², Пименов Н.В.², Марданов А.В.²

ИИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

2ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Фосфат-аккумулярующие (ФАО) бактерии широко используются в биотехнологиях очистки сточных вод от соединений фосфора при чередовании анаэробной и аэробной фаз культивирования. Динамика формирования ФАО-сообщества и его активность обусловлены конфигурацией и режимом работы реакторов, а также количеством и составом органического вещества. Поэтому выяснение особенностей формирования микробного сообщества ФАО, спектра используемых ФАО субстратов и путей их метаболизма позволит определить функциональные особенности микроорганизмов, их место в микробном сообществе очистных сооружений и улучшить технологии удаления фосфора. Целью работы было выяснение особенностей гранулообразования, сукцессии ФАО-сообществ, спектра и путей метаболизма используемых ими органических субстратов.

В лабораторном реакторе последовательно-периодического действия при длительном культивировании (более 1 года) ФАО-сообщества обнаружено, что образование гранулоподобных агрегатов при биологическом удалении фосфора является спонтанным процессом. Наблюдения за агрегацией и сегрегацией биомассы в реакторах свидетельствовали о том, что это явления фундаментального характера – естественный этап развития ФАО-сообщества. Таким образом отпадает необходимость в специфических технологиях получения гранулированного активного ила, что позволяет существенно упростить технологический процесс и снизить эксплуатационные затраты на процесс очистки сточных вод от фосфора.

В сравнении с ацетатом проведены исследования возможности использования ФАО-сообществом, обогащенным *Ca. Accumulibacter*, 17-ти органических соединений, присутствующих в сточных водах наряду с ацетатом. Выявлено их влияние на цикл выделения/поглощения фосфатов при смене анаэробных и аэробных периодов. В частности, установлено, что, наряду с ацетатом, пропионатом и пируватом, полноценным субстратом для ФАО являются аспарагиновая и глутаминовая кислоты. С помощью метагеномного подхода были описаны основные метаболические пути *Ca. Accumulibacter*. Результаты работы могут быть использованы для разработки новых эффективных технологий очистки сточных вод от фосфора в России.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ № 21-64-00019 и МОН РФ.

Публикации:

1. Pelevina A., Gruzdev E., Berestovskaya Y., Dorofeev A., Nikolaev Y., Kallistova A., Beletsky A., Ravin N., Pimenov N., Mardanov A. New insight into the granule formation in the reactor for enhanced biological phosphorus removal // **Frontiers in Microbiology**. 2023. V. 14. Art. 1297694. doi: 10.3389/fmicb.2023.1297694.
2. Dorofeev A., Pelevina A., Nikolaev Y., Berestovskaya Y., Gruzdev E., Mardanov A., Pimenov N. Oxygen uptake rate as an indicator of the substrates utilized by *Candidatus Accumulibacter* // **Water**. 2023. V. 15. Art. 3657. Doi: 10.3390/w15203657.
3. Pelevina A.V., Berestovskaya Yu.Yu., Dorofeev A. G., Nikolaev Yu.A., Gruzdev E.V., Pimenov N.V., Mardanov A.V. Aggregate formation by a microbial community developing in a phosphorus-removing laboratory reactor // **Microbiology**. 2023. V. 92. Suppl. 1. P. S33–S36.

НОВЫЕ КАРДИОМИОПАТИЧЕСКИЕ МУТАЦИИ: ОТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДО БИОХИМИЧЕСКИХ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Нефёдова В.В.¹, Ямпольская Д.С.¹, Клейменов С.Ю.¹, Копылова Г.В.², Щепкин Д.С.², Бершицкий С.Ю.², Заклязьминская Е.В.³, Цатурян А.К.⁴, Матюшенко А.М.¹, Левицкий Д.И.¹

1ИИНИ ФИЦ Биотехнологии РАН

2Институт Иммунологии и Физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

3Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия;

4Институт Механики МГУ, Москва, Россия.

Мутации тропомиозина (Трм) являются причиной тяжелых наследственных заболеваний сердца – кардиомиопатий. Нами было проведен поиск новых мутаций в гене *TPM1*, кодирующем сердечный Трм, среди пациентов с диагностированными кардиомиопатиями. В гене *TPM1* были обнаружены мутации с.292G>A (p.Glu98Lys) и с.656A>T (p.Asp219Val), вызывающие гипертрофическую кардиомиопатию (ГКМП). Обе мутации были обнаружены в гетерозиготном состоянии. У пациента с мутацией Glu98Lys диагностирована ГКМП с выраженной диастолической дисфункцией, рестриктивным фенотипом, нарушениями ритма и проводимости. Для понимания возможного механизма развития ГКМП, вызванного мутацией Трм Glu98Lys, были проведены биохимические и физиологические исследования. Мутация Glu98Lys серьезно влияла на термостабильность молекулы Трм, но не оказывала существенного влияния на сродство Трм к F-актину. В то же время, данная замена снижала термостабильность комплексов Трм с F-актином. Эксперименты с использованием искусственной подвижной системы показали, что эта мутация повышала чувствительность тонких нитей к кальцию – с pCa 5,85 для нитей, содержащих Трм WT, до pCa 6,00 для нитей, содержащих Трм Glu98Lys. Следует также отметить, что Трм с заменой Glu98Lys существенно снижал максимальную скорость движения нитей при высокой концентрации Ca^{2+} и способствовал неполному ингибированию двигательной активности в отсутствие Ca^{2+} . Полученные данные можно объяснить ослаблением взаимодействия мутантного Трм с тропонином I (TnI). Эта гипотеза была подтверждена с использованием протоколов молекулярной динамики (МД), которая показала, что остаток Glu98 Трм участвует в образовании водородной связи с С-концевой частью TnI. В целом, полученные нами результаты описывают механизм, с помощью которого мутация Трм Glu98Lys может нарушать функцию саркомеров сердечной мышцы.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00059).

Публикации:

1. Matyushenko A.M., Nefedova V.V., Kochurova A.M., Kopylova G.V., Koubassova N.A., Shestak A.G., Yampolskaya D.S., Shchepkin D.V., Kleymenov S.Y., Ryabkova N.S., Katrukha I.A., Bershitsky S.Y., Zaklyazminskaya E.V., Tsaturyan A.K., Levitsky D.I. // Novel Mutation Glu98Lys in Cardiac Tropomyosin Alters Its Structure and Impairs Myocardial Relaxation. **Int. J. Mol. Sci.** 2023, 24(15):12359. doi: 10.3390/ijms241512359. IF=5.6
2. Tsaturyan A.K., Zaklyazminskaya E.V., Polyak M.E., Kopylova G.V., Shchepkin D.V., Kochurova A.M., Gonchar A.D., Kleymenov S.Y., Koubasova N.A., Bershitsky S.Y., Matyushenko A.M., Levitsky D.I. // De Novo Asp219Val Mutation in Cardiac Tropomyosin Associated with Hypertrophic Cardiomyopathy // **Int. J. Mol. Sci.** 2023 24(1):18. doi: 10.3390/ijms24010018. IF=5.6

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПИСАНИЕ НОВЫХ ГАЛОАЛКАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, СПОСОБНЫХ К РАЗЛОЖЕНИЮ БЕТАИНА, ПОЛИОЛОВ И ЭТАНОЛАМИНА

Кевбрин В.В.¹, Болтынская Ю.В.¹, Деткова Е.Н.¹, Жилина Т.Н.¹, Груздев Д.С.², Новиков А.А.³, Пименов Н.В.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² SciBear OU, Таллин, Эстония

³ РГУ нефти и газа имени И.М. Губкина

В ходе целенаправленного поиска анаэробных бактерий щелочных озер, способных к разложению известных осмолитов бетаина и глицерина, из содового озера Танатары (Алтайский край) было выделено два штамма Z-7014 и Z-7514. Штаммы были выделены из общей накопительной культуры на бетаине, однако при изучении их свойств было обнаружено, что каждый из них в качестве источника углерода и энергии использует только один осмолит: Z-7014 рос на бетаине, тогда как Z-7514 рос на глицерине. Анализ аннотации секвенированных геномов подтвердил наличие полнофункционального оперона, кодирующего бетаинредуктазу (*grdABC*) у Z-7014, причем бетаин разлагается по реакции Стикленда, что для алкалофильных микроорганизмов показано впервые. У Z-7514 обнаружены все три гена, кодирующие ключевые ферменты известных путей разложения глицерина: *glpK*, *gldA* и *pduCDE*. При реконструкции метаболических путей была выявлена возможность использования штаммом и других полиолов, а именно пропилен- и этиленгликоля, а кроме того, был обнаружен почти полный набор *eut* генов, кодирующих разложение этаноламина, что у алкалофильных микроорганизмов также найдено впервые. Проведенные лабораторные эксперименты подтвердили теоретические находки; получены кривые роста на данных субстратах, а также балансы некоторых из них. Филогеномный анализ показал, что штаммы образуют новые таксоны в семействе *Halanaerobiaceae*: штамм Z-7014 образует в нем новый род и вид: *Halonatronomonas betaini*, а штамм Z-7514 образует новый вид в роду *Halanaerobium*, *H. polyolivorans*. Таким образом, полученные результаты расширяют наши знания о функционировании алкалофильного микробного сообщества, из которых, в частности, вытекает существование в сообществе нового, этаноламинного пути. В прикладном аспекте штамм Z-7514 может представлять интерес как источник энзимов для расщепления жидких полиолов. Все три полиола, а также этаноламин широко используются в химической промышленности, фармпроизводствах и косметологии, а, следовательно, являются потенциально опасными поллютантами окружающей среды.

Публикации:

1. Boltyanskaya Y.V., Kevbrin V.V., Grouzdev D.S., Detkova E.N., Koziaeva V.V., Novikov A.A., Zhilina T.N. *Halonatronomonas betaini* gen. nov., sp. nov. – haloalkaliphilic isolate from soda lake capable of betaine degradation and proposal of Halarsenatibacteraceae fam. nov. and Halothermotrichaceae fam. nov. within the order Halanaerobiales // **Syst. Appl. Microbiol.** 2023. V. 46. Art. 126407. Doi: 10.1016/j.syapm.2023.126407.
2. Boltyanskaya Y., Zhilina T., Grouzdev D., Detkova E., Pimenov N., Kevbrin V. *Halanaerobium polyolivorans* sp. nov. – a novel halophilic alkalitolerant bacterium capable of polyol degradation: physiological properties and genomic insights // **Microorganisms.** 2023. V. 11. Art. 2325. Doi: 10.3390/microorganisms11092325.

МЕХАНИЗМЫ И МОРФОТИПЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ВЫЖИВАНИЯ БАКТЕРИЙ В СИЛАНОЛЬНО-ГУМАТНЫХ ГЕЛЯХ

Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Демкина Е.В., Лойко Н.Г., Борзенков И.А., Иванова А.Е., Канапацкий Т.А., Галуза О.А., Соколова Д.Ш., Ружицкий А.О.

ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

Ранее нами были разработаны новые биокомпозитные материалы, состоящие из углеводородокисляющих микроорганизмов, иммобилизованных в силанольно-гуматные гели (СГГ). В этих условиях бактерии выживали в течение длительного времени (до двух лет) с сохранением (и даже повышением) ценных технологических свойств, способности окислять углеводороды. Причины неестественно длительного выживания микроорганизмов в гелях исследованы и представлены в настоящем докладе.

Выживающие в СГГ бактерии характеризовались: (1) способностью к быстрой реактивации в свежей среде к росту и окислению углеводородов; (2) способностью синтезировать поверхностно-активные вещества; (3) повышенной стрессоустойчивостью (метаболизму и росту при высоких концентрациях Cu^{2+} и NaCl); (4) физиологической гетерогенностью популяций, выражающейся в наличии стационарных клеток, автолизированных клеток, анабиотических покоящихся форм (ПФ) цистоподобного типа; (5) наличием у многих клеток пилей, обеспечивающих (предположительно) способность клеток к обмену генетическим материалом; (6) изменением диссоциативного спектра популяции, вырастающей после длительного хранения в СГГ; (7) окислением этанола и ацетата в ходе хранения.

Другая физиологическая группа бактерий, молочнокислых, также демонстрировала повышенную выживаемость при включении в силанольно-гуматные, а также иные (камедевые и желатиновые) гели.

Чрезвычайно длительное выживание клеток в составе гелей обусловлено двумя причинами. I. Заложённые на хранение популяции находились в СТАЦИОНАРНОЙ фазе и содержали клетки двух фенотипов: (1) клетки-персистеры, способные к созреванию в ПФ; (2) метаболически активные, но пролиферативно покоящиеся клетки, далее способные или к реверсии к росту, или к лизису, или переходу в новое физиологическое состояние старых клеток. II. В геле создавались уникальные условия: (1) клетки были пространственно разобщены и разбавлены, что предотвращало или существенно замедляло автолиз; (2) в геле присутствовали источники углерода, но среда была несбалансированной по макроэлементам (недостаток фосфора, азота), что позволяло осуществлять процессы катаболизма, но не анаболизма; (3) плотность среды и наличие геля моделировали физические параметры биоплёночного окружения, что вызывало переход клеток в биоплёночный фенотип.

В итоге популяция бактерий в СГГ была высоко гетерогенной: минорная часть популяции была представлена формами покоя нескольких типов; основная часть популяции состояла из метаболически активных неделящихся клеток, сохраняющих интактность и жизнеспособность в течение 12 мес. и более, проявляющих физиологическую гетерогенность. Это физиологическое состояние можно считать новой формой существования микроорганизмов и переживания неблагоприятных условий. Оно условно названо «стареющими клетками» и дополняет две другие формы существования микроорганизмов – рост или покой (анабиоз).

Публикации:

1. Nikolaev Y.A., Demkina E.V., Ilicheva E.A., Kanapatskiy T.A., Borzenkov I.A., Ivanova A.E., Tikhonova E.N., Sokolova D.S., Ruzhitsky A.O., El-Registan G.I. Ways of long-term survival of hydrocarbon-oxidizing bacteria in a new biocomposite material – silanol-humate gel // **Microorganisms**. 2023. V. 11. Art. 1133. Doi 10.3390/microorganisms11051133
2. Galuza O.A., Kovina N.E., Korotkov N.A., El-Registan G.I., Nikolaev Yu.A. Long-term survival of bacteria in gels // **Microbiology**. 2023. V. 92. Suppl. 1. P. S17–S21.

ФОТОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФОРМИРУЮЩИХСЯ СЕМЯДОЛЕЙ ГОРОХА (*PISUM SATIVUM* L.) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА

Степанова Н.В.¹, Тимофеева Т.А.¹, Камионская А.М.¹, Смоликова Г.Н.²

¹ ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Санкт-Петербургский государственный университет

В последнее десятилетие стало активно развиваться направление, связанное с изучением механизмов т. н. нелистового фотосинтеза (non-foliar photosynthesis). К нелистовому типу фотосинтеза также относятся процессы, происходящие в формирующихся семенах растений с зеленым зародышем. Однако до сегодняшнего дня остается нерешенным вопрос о том, как зародыши семян, покрытые тканями перикарпия и кожуры, получают достаточное количество света для обеспечения энергией фотохимических реакций. Нами было показано, что фотохимически активная радиация, проходящая сквозь перикарпий и кожуру и достигающая семядолей на фотохимически активных ранней и средней стадиях созревания семян, характеризовалась высокой долей зеленого и дальнего красного света, при этом синий свет отсутствовал, а количество красного света составляло около 2%.

Объектом исследования являлись растения гороха сорта Глория, которые выращивали в запатентованной установке (патент № 220784) в 2-х модулях, один из которых освещался только синими (400–500 нм) и красными (600–700 нм) светодиодами в соотношении 1:3 (модуль КС), а во второй были добавлены зеленые светодиоды (500–600 нм) (модуль КЗС).

Эффективность фотохимических реакций оценивали методом РАМ-флуориметрии с использованием PAR-FluorPen FP 110 (PSI, Чехия) с использованием ОЖР протокола. Установлено, что, по сравнению с листьями, семядоли обоих вариантов на средней стадии созревания семян характеризуются более высоким показателем ABS/RC, который характеризует размер световых антенн. При этом у семядолей, сформированных в модуле КЗС, этот показатель был ниже, чем в модуле КС. Семядоли, сформированные в присутствии зеленого света, имели более высокие показатели Pi_Abs, Phi_Po и PHi_Eo, которые характеризуют эффективность восстановления пула пластохинонов в электронно-транспортной цепи фотосистемы II. Зрелые семена, сформированные в модуле КЗС, демонстрировали более высокую скорость прорастания, всхожесть и содержали, в среднем, на 3% белка больше, чем семена, сформированные в модуле КС.

Таким образом, нами показано, что зеленый свет, проникающий сквозь ткани перикарпия и кожуры, влияет на фотохимическую активность зародышей гороха и эффективность накопления запасных питательных веществ. На следующем этапе работы планируется провести сравнительный анализ экспрессии генов, участвующих в фотохимических процессах зеленых листьев, перикарпия, кожуры и семядолей.

Публикации:

1. Патент на полезную модель № 220784 U1 Российская Федерация, МПК A01G 9/00, A01G 9/20. устройство для выращивания растений: № 2023118466: заявл. 12.07.2023: опубл. 03.10.2023 / Н. В. Степанова, В. С. Водолазский, Т. А. Тимофеева [и др.]; заявитель Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук». – EDN CSRUXD.
2. Smolikova GN, Stepanova NV, Kamionskaya AM, Medvedev SS. Photochemical activity in developing pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons depends on the light transmittance of covering tissues and the spectral composition of light. *Vavilovskii Zhurnal Genet Seleksii*. 2023 Dec;27(8):980-987. doi: 10.18699/VJGB-23-113. PMID: 38239962; PMCID: PMC10792502.

ДИНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА С ГИСТИДИНОВЫМИ И ТИОЛОВЫМИ ЛИГАНДАМИ: АНТИОКСИДАНТНЫЕ И АНТИРАДИКАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

Шумаев К.Б.¹, Космачевская О.В.¹, Насыбуллина Э.И.¹, Пугаченко И.С.¹, Рууге Э.К.^{2,3}, Каленикова Е.И.³, Топунов А.Ф.¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ биотехнологии РАН;

² НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова Минздрава России

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Оксид азота (NO) является регулятором многих важнейших метаболических и физиологических процессов. Среди биологически активных производных NO особое место занимают динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ). Помимо NO, ДНКЖ содержат органические лиганды, в качестве которых чаще всего выступают остатки цистеина и гистидина. В данной работе исследовались антиоксидантные и антирадикальные свойства ДНКЖ, связанных с остатками гистидина, а также некоторыми тиоловыми лигандами.

Показано, что ДНКЖ, в лигандную сферу которых включены остатки His39 и Cys34 бычьего сывороточного альбумина (БСА-ДНКЖ), перехватывают свободные радикалы, образующиеся в системе, содержащей метмиоглобин и гидропероксид трет-бутила (*t*-BOOH). Кроме того, БСА-ДНКЖ ингибируют вызванную *t*-BOOH окислительную деградацию коэнзимов Q₉ и Q₁₀ в гомогенате миокарда крыс. ДНКЖ, связанные с имидазольной группой дипептида L-карнозина (бета-аланил-L-гистидина), также нейтрализуют прооксиданты, формирующиеся при взаимодействии метмиоглобина с *t*-BOOH. Установлено, что связанные с карнозином ДНКЖ снижают уровень свободных радикалов пиперазина в системе, содержащей *t*-BOOH, ионы двухвалентного железа, донор нитроксильного аниона (соль Ангели) и NERES-буфер. Кроме этого, карнозиновые ДНКЖ реагируют с супероксидными радикалами (O₂⁻), возникающими в ферментативной системе ксантин-ксантиноксидаза. Образование ДНКЖ с тиоловыми группами (тиолат анионами, -S⁻) глутатиона и липоевой кислоты защищает эти лиганды от окисления *t*-BOOH и пероксинитритом (ONOO⁻). Нужно отметить, что ДНКЖ с липоевой кислотой более эффективно перехватывают ONOO⁻, чем комплексы с глутатионом и N-ацетилцистеином. С другой стороны, БСА-ДНКЖ лишь незначительно защищали остаток Cys34 альбумина от окисления *t*-BOOH и ONOO⁻.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что NO-лиганды ДНКЖ непосредственно реагируют с различными прооксидантами, хотя физико-химические свойства органических лигандов также имеют значение. Вместе с тем, ещё одним важным механизмом антиоксидантного действия ДНКЖ является включение в эти комплексы редокс-активных ионов железа.

Публикации

1. Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Ruuge E.K., Kalenikova E.I., Topunov A.F. Histidine-bound dinitrosyl iron complexes: antioxidant and antiradical properties. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. e17236. DOI: 10.3390/ijms242417236. [Q1, IF = 5.6]
2. Пугаченко И.С., Насыбуллина Э.И., Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Действие пероксинитрита и гидропероксида трет-бутила на тиоловые лиганды динитрозильных комплексов железа. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2023. Т. 59. № 5. С. 440-449. DOI: 10.31857/S0555109923050148.

АНОКСИГЕННЫЕ ФОТОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ СТРАТИФИЦИРОВАННЫХ ВОДОЕМОВ, ОТДЕЛЯЮЩИХСЯ ОТ БЕЛОГО МОРЯ

Лунина О.Н.¹, Горленко В.М.¹, Груздев Д.С.², Беленкова В.В.¹, Веслополова Е.Ф.¹, Саввичев А.С.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ciBear OU, Tallinn, Estonia

Аноксигенные фототрофные бактерии (АФБ) являются типичными обитателями освещенной границы сероводородной зоны водной толщи стратифицированных водоемов. Участвуя в процессах круговорота углерода и серы, АФБ являются продуцентами органического вещества и осуществляют светозависимое окисление сероводорода. АФБ предотвращают проникновение сероводорода в верхние слои воды и отравление водоема. Продукция АФБ часто сопоставима с продукцией оксигенных фототрофов.

На протяжении последних 15-ти лет внимание ученых нашего института было привлечено к АФБ, развивающимся в водоемах Кандалакшского побережья Белого моря. Характерной чертой этих водоемов является образование высокоплотных сообществ в хемоклине водной толщи с доминированием бактерий *Chlorobium phaeovibrioides*. Нами были изучены сообщества АФБ шести водоемов, находящихся на разных стадиях изоляции от моря, выделены зеленые и пурпурные АФБ, относящиеся к родам *Chlorobium*, *Prosthecochloris*, *Thiocapsa*, *Thiocystis*, *Thiorhodococcus*, а также *Rhodovulum*, *Rhodopseudomonas*.

Впервые были выделены неизвестные ранее коричнево-окрашенные аналоги известного зеленого штамма *C. phaeovibrioides* DSM 265, показано разнообразие их морфотипов.

В оз. Большие Хрусломены показано стабильное сосуществование зеленого и коричневого морфотипов *C. phaeovibrioides* DSM 265, представляющих собой один и тот же микроорганизм с разными наборами фотосинтетических пигментов, аналогов чему не было найдено ни в одном из ранее изученных водоемов мира. Два штамма зеленых серобактерий (ЗСБ), выделенные из этого озера (*BrKhr17* и *GrKhr17*), по совокупности свойств были причислены к новым штаммам вида *Chlorobium phaeovibrioides*.

Из трех водоемов было выделено 3 пары (зелено- и коричнево-окрашенный) морфотипов ЗСБ родов *Chlorobium*, *Prosthecochloris*, получены их полные геномы, на основании сравнения которых с уже известными геномами была предложена новая концепция понимания наследования и передачи генов, ответственных за синтез бактериохлорофиллов и каротиноидов у зелено- и коричнево-окрашенных ЗСБ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 23-24-00208).

Публикации:

1. Лунина О.Н., Груздев Д.С., Пацаева С.В., Жильцова А.А., Сузина Н.Е., Краснова Е.Д., Воронов Д.А., Кокрятская Н.М., Веслополова Е.Ф., Саввичев А.С. Аноксигенные фототрофные бактерии меромиктического озера Большие Хрусломены (о. Олений, Кандалакшский залив, Мурманская область, Россия) // **Микробиология**. 2023. Т. 92. № 6. С. 564–580. doi 10.31857/S0026365623600268
2. Grouzdev D., Gaisin V., Lunina O., Krutkina M., Krasnova E., Voronov D., Baslerov R., Sigalevich P., Savvichev A., Gorlenko V. Microbial communities of stratified aquatic ecosystems of Kandalaksha Bay (White Sea) shed light on the evolutionary history of green and brown morphotypes of Chlorobiota // **FEMS Microbiol. Ecol.** 2022. V. 98. № 10. P. 1–11. doi: 10.1093/femsec/fiac103

УЛУЧШЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ДРОЖЖЕЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ОТЕЧЕСТВЕННОМ ВИНОДЕЛИИ, С ПОМОЩЬЮ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ

Васягин Е.А.¹, Ракитин А.Л.¹, Марданова Е.С.¹, Белецкий А.В.¹, Шаламитский М.Ю.³, Танащук Т.Н.³, Ураков В.Н.², Кушников В.В.², Равин Н.В.¹, Марданов А.В.¹

¹ ИИБ ФИЦ Биотехнологии РАН,

² Лаборатория молекулярной генетики, Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН

³ ВНИИВиВ Магарач РАН, Ялта

В основе современного промышленного виноделия лежит использование стартовых культур специализированных винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Подавляющее большинство красных и некоторые белые вина получают путем двух последовательных стадий брожения – осуществляемого дрожжами винного брожения, и яблочно-молочного брожения (ЯМБ), осуществляемого молочнокислыми бактериями. Включение стадии ЯМБ в технологический цикл снижает кислотность вина и улучшает его букет. Однако молочнокислые бактерии, которые осуществляют ЯМБ, чувствительны к ингибирующим условиям винного брожения. Поэтому перспективным является создание дрожжевого штамма, который одновременно мог бы осуществлять как винное брожение, так и ЯМБ. Еще одной проблемой при производстве вина является накопление в нем этилкарбамата. Это вещество является канцерогеном и образуется во время брожения и хранения вина в результате спонтанной химической реакции этанола с карбамоильными соединениями, в основном мочевиной, выделяемой дрожжевыми клетками. Целью данной работы было улучшение характеристик дрожжей, используемых в отечественном виноделии, с помощью геномного редактирования и последующей функциональной характеристике свойств данных штаммов в условиях микровиноделия.

В качестве объекта исследований в работе был использован винный штамм дрожжей *S. cerevisiae* I-328 из коллекции ВНИИ виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, который используется в промышленном виноделии. Этилкарбамат образуется из мочевины, поэтому снижение концентрации мочевины опосредованно приведет к снижению содержания этилкарбамата в вине. Были получены два штамма. Первый штамм со сниженным уровнем продукции этилкарбамата. Для этого с помощью системы CRISPR/Cas9 была произведена делеция гена *CAR1*, ответственного за превращение аргинина в мочевины и орнитин. Для создания второго дрожжевого штамма, способного к ЯМБ, в его геном, вместо гена *CAR1*, была интегрирована кассета экспрессии с генами малат-пермеазы и малолактоического фермента, под контролем промоторов, активных на поздних стадиях брожения. Ген малат-пермеазы был взят из дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, продукт этого гена осуществляет активный перенос яблочной кислоты внутрь дрожжевых клеток. Ген малолактоического фермента был взят из молочнокислой бактерии *Oenococcus oeni*. Этот фермент осуществляет декарбоксилирование L-яблочной кислоты до L-молочной кислоты и диоксида углерода. В результате полногеномного сравнения с исходным штаммом было подтверждено, что для первого штамма был делетирован ген *CAR1*, а для второго показана успешная интеграция кассеты ЯМБ вместо гена аргиназы. Последующая функциональная характеристика данных штаммов в условиях микровиноделия показала, что инактивация гена *CAR1* не оказала влияния на основные технологические показатели виноматериалов, при этом концентрация этилкарбамата в них уменьшилась на 50%, а использование штаммов с интеграцией кассеты ЯМБ приводило к утилизации до 90% L-яблочной кислоты.

Публикации:

1. Shalamitskiy, M. Y., Tanashchuk, T. N., Cherviakov, S. N., Vasyagin, E. A., Ravin, N. V., & Mardanov, A. V. (2023). Ethyl Carbamate in Fermented Food Products: Sources of Appearance, Hazards and Methods for Reducing Its Content. **Foods**, 12(20), 3816. doi: 10.3390/foods12203816
2. Uraikov VN, Mardanov AV, Alexandrov AI, Ruzhitskiy AO, Ravin NV, Kushnikov VV. CAR1 as a new selective marker for genetic engineering of wine yeasts. **J Microbiol Methods**. 2023 Nov;214:106840. doi: 10.1016/j.mimet.2023.106840.
3. Марданов А.В., Е.А. Васягин, Е.С. Марданова А.В., Белецкий, М.Ю., Шаламитский., Т.Н., Танащук., В.Н. Ураков, В.В. Кушников, А.Л., Ракитин, Н.В. Равин. Транскриптомный анализ штамма винных дрожжей с делецией гена аргиназы *car1*. **Микробиология**. 2023. 92. S1., S93-S96. Doi: 10.1134/S0026261723603901

Патент: Ураков В.Н., Кушникова В.В., Александров А.И., Марданов А.В., Равин Н.В., Танащук Т.Н., Иванова Е.В., Шаламитский М.Ю. Винный полиплоидный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* I-328-15 (ВКПМ Y-5146), в геном которого включены гены ферментов яблочно-молочного брожения. Патент РФ № 2804092 от 26.09.2023 года.

ВОЗМОЖНОСТИ И ПРОБЛЕМЫ АНТИТЕЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА НАНОЧАСТИЦАХ ЗОЛОТА

Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Конъюгаты антител с наночастицами золота (НЧЗ) являются одними из наиболее часто используемых меченых реагентов в биохимических исследованиях и аналитических системах. Однако их состав и связывающая способность в большинстве работ остаются неохарактеризованными, что в значительной степени связано с ограничениями методов, используемых для измерения этих величин.

Мы предлагаем для этих целей сочетание методики определения состава конъюгатов НЧЗ с антителами и новой методики определения антиген-связывающей активности антител, иммобилизованных на НЧЗ. Методики основаны на измерении флуоресценции триптофана в растворах, полученных после центрифугирования конъюгатов, и в тех же растворах после добавления к ним известного количества белка. С использованием этих методик изучены особенности разных вариантов иммобилизации антител, связывающих высоко- и низкомолекулярные антигены.

Моноклональные антитела (Ig G) против С-реактивного белка были конъюгированы с пятью препаратами НЧЗ (средние диаметры – от 15 до 55 нм) при разных соотношениях реагентов. Установлено, что после иммобилизации антител на НЧЗ лишь 17-34% антиген-связывающих сайтов сохраняют способность связывать антиген (с учетом двухвалентности Ig G). С увеличением размеров наночастиц доля активных антител в конъюгате возрастает. Однако это не приводит к выигрышу в суммарном содержании активных антител в получаемых препаратах коллоидных растворов, поскольку суммарная площадь поверхности частиц падает с увеличением их диаметра. Адсорбция при соотношении одна молекула Ig G на 100 нм² поверхности НЧЗ приводит к практически полному связыванию антител из раствора.

В случае белковых антигенов ослаблению связывания способствуют стерические ограничения при взаимодействиях между крупными молекулами антигена и антителами с плотной поверхностной иммобилизацией. Кроме того, стерические ограничения возникают при образовании в растворе агрегатов между поливалентными антигенами и конъюгатами антитело-НЧЗ. Поэтому необходимо отдельное изучение низкомолекулярных антигенов, для которых исключаются указанные выше факторы и становится возможным описание именно инактивации иммобилизованных молекул антител.

С этой целью исследована связывающая способность конъюгированных с НЧЗ моноклональных антител против флуоресцеина. Рассмотрены сферические НЧЗ пяти размеров, две разнозарядные формы флуоресцеина и три степени покрытия поверхности НЧЗ иммобилизованными антителами. Для НЧЗ диаметром от 14 до 35,5 нм с монослоями иммобилизованных антител процент молекул, способных связывать карбоксифлуоресцеин, варьировал от 6% до 17%. Связывание аминифлуоресцеина с антителами на отрицательно заряженной поверхности НЧЗ более эффективно: для НЧЗ со средним диаметром 21 нм процент активных сайтов иммобилизованных антител достигал 27% по сравнению с 13% для карбоксифлуоресцеина. Как видим, несмотря на небольшой размер флуоресцеина, лишь небольшая часть сайтов связывания Ig G сохраняет связывающую способность после иммобилизации на поверхности НЧЗ. Следовательно, наблюдаемую инактивацию антител в комплексах с НЧЗ нельзя объяснить только стерическими ограничениями.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии размера наночастиц на сохранение активности иммобилизованных антител. Важным новым результатом является влияние заряда гаптена вне его антитело-связывающей части на способность взаимодействовать с иммобилизованными антителами. Заряженные группы, не исключая контакта конъюгата антитело–наночастица с антигеном, могут существенно изменять процент сохранивших активность иммобилизованных антител.

Публикации:

1. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. (2023). Ability of antibodies immobilized on gold nanoparticles to bind small antigen fluorescein. **International Journal of Molecular Sciences**, 24(23), 16967.
2. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. (2023). Changes in antigen-binding ability of antibodies caused by immobilization on gold nanoparticles: A case study for monoclonal antibodies to fluorescein. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 13, 550.

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРООРГАНИЗМОВ НЕФТЯНЫХ ПЛАСТОВ С ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННОЙ ПЛАСТОВОЙ ВОДОЙ И ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Соколова Д.Ш.¹, Кадников В.В.², Равин Н.В.², Семенова Е.М.¹, Хисаметдинов М.Р.³, Бабич Т.Л.¹, Биджиева С.Х.¹, Ершов А.П.¹, Марданов А.В.², Назина Т.Н.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИНБ, ФИЦ Биотехнологии РАН

³ Татарский научно-исследовательский и проектный институт нефти (ТатНИПИнефть), Бугульма

Применение микробиологических методов увеличения нефтеизвлечения (ММУН) в трещиноватых карбонатных отложениях осложнено геологическим строением коллектора, высокой минерализацией пластовых вод и высокой вязкостью нефти. Микробные технологии позволяют целенаправленно регулировать активность пластового микробного сообщества с образованием нефтewытесняющих метаболитов. Целью работы было определение состава микроорганизмов и их метаболического потенциала в пластовых водах Архангельского, Ново-Елоховского и Ромашкинского нефтяных месторождений с карбонатными коллекторами и высокоминерализованной пластовой водой. Результаты определения разнообразия прокариот в исследованных нефтяных пластах, полученные методом анализа генов 16S рРНК, коррелировали с результатами метагеномного анализа. С использованием биоинформатических методов предсказан метаболический потенциал компонентов микробного сообщества. В ходе работы было проанализировано 75 метагеномов прокариот, которые принадлежали бактериям 16 известных филумов, включая *Desulfobacterota*, *Bacillota*, *Pseudomonadota*, *Thermotogota*, *Actinobacteriota*, *Spirochaetota*, *Patescibacteria*, и археям филума *Halobacteriota*. Результаты метагеномного анализа были подтверждены выделением 20 чистых культур бактерий родов *Desulfoplanes*, *Halanaerobium*, *Geotoga*, *Sphaerochaeta*, *Tangfeifania*, *Mesobacillus*, *Cytobacillus* и *Bacillus*. Бродильные бактерии родов *Geotoga*, *Petrotoga* и *Sphaerochaeta*, являются постоянными, зачастую минорными компонентами микробных сообществ нефтяных пластов, и их функциональная роль в сообществах недостаточно ясна. Выделенные накопительные и чистые культуры галофильных бродильных бактерий продуцировали из сахаросодержащих и белковых субстратов метаболиты (низшие жирные кислоты, спирты и газы (CO₂ и H₂)), перспективные для применения в микробных технологиях увеличения нефтеизвлечения. Таким образом, активация бродильной микробиоты посредством введения органических субстратов с поверхности земли представляется перспективным подходом в пластах с высокой соленостью, однако следует учитывать также активность сульфидогенов, потребляющих продукты метаболизма бродильных бактерий и восстанавливающих сульфат до сероводорода.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 21-64-00019).

Публикация:

Kadnikov V.V., Ravin N.V., Sokolova D.S., Semenova E.M., Bidzhieva S.K., Beletsky A.V., Ershov A.P., Babich T.L., Khisametdinov M.R., Mardanov A.V., Nazina T.N. Metagenomic and culture-based analyses of microbial communities from petroleum reservoirs with high-salinity formation water, and their biotechnological potential // **Biology**. 2023. V. 12. Art. 1300. doi: 10.3390/biology12101300

ПОЛУЧЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ ЛАКТОБАКТЕРИЙ, СИНТЕЗИРУЮЩИХСЯ В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ ПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ

Пометун А.А.^{1,2}, Шапошников Л.А.¹, Широкова А.А.^{1,2}, Савин С.С.^{1,2}, Атрошенко Д.Л.¹, Бойко К.М.¹, Матюта И.О.¹, Агеевец В.А.³, Клейменов С.Ю.^{1,4}, Чикурова Н.Ю.^{1,2}, Тишков В.И.^{1,2}

¹ ИИБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова

³ ФГБУ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург

⁴ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Проблема антибиотикорезистентности при борьбе с различными патогенными организмами стоит очень остро на настоящий момент. Одним из перспективных методов терапии является использование пробиотических штаммов лакто- и бифидобактерий. При этом, детальные механизмы действия этих штаммов до сих пор не изучены. Вероятным механизмом может являться секреция специфических белков в ответ на действие патогенных организмов. В литературе есть данные, что при культивировании бактерий рода *Lactobacillus* в присутствии клеток рода *Klebsiella*, лактобактерии синтезируют ряд дополнительных белков, способствующих подавлению роста клебсиелл. [1] Среди белков, синтезирующихся только в ответ на присутствие клебсиелл, были найдены пептидазы, ферменты, гидролизующие нуклеиновые кислоты, и различные белки метаболизма. Изучение таких белков может помочь изучить механизм действия лактобактерий, а также может открыть новые перспективы создания антибактериальных препаратов.

Нашим коллективом были отобраны наиболее перспективные белки лактобактерий, проведено клонирование генов, кодирующих рибонуклеозидгидролазу С (RihC) и L-лактатдегидрогеназы (L-LDH) экспрессия этих ферментов в клетках *E.coli*, очистка методом аффинной хроматографии, разработаны методы определения их активности, определена их пространственная структура и основные биохимические характеристики. Эксперименты с добавлением этих белков в среду, содержащую патогенные организмы, показали замедление роста биопленок для некоторых видов патогенов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 23-64-10029

Публикации:

1. Shaposhnikov L.A., Savin S.S., Tishkov V.I., Pometun A.A. Ribonucleoside hydrolases – structure, functions, physiological role and practical uses. **Biomolecules**, 2023, v. 13, № 1375, doi: /10.3390/biom13091375 (Q1, IF = 5,5)
2. Шапошников Л.А., Тишков В.И., Пометун А.А. Лактобактерии и Клебсиеллы: две противоположности в борьбе за здоровье организма. **Успехи Биологической Химии**, 2024, т. 64, с. 143-178 (IF = 2,8)
3. Shaposhnikov L.A., Chikurova N.Yu., Chernobrovkina A.V., Tishkov V.I., Pometun A.A. Development of an Approach to Determining Enzymatic Activity of Ribonucleoside Hydrolase C Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography A**, 2024, v. 1715, № 464561, doi: /10.1016/j.chroma.2023.464561 (Q1, IF = 4,1)
4. Shaposhnikov L.A., Chikurova N.Yu., Atroshenko D.L., Savin S.S., Kleymenov S.Yu., Chernobrovkina A.V., Pometun E.V., Minyaev M.E., Matyuta I.O., Hushpulian D.M., Boyko K.M., Tishkov V.I., Pometun A.A. Structure-functional examination of novel ribonucleoside hydrolase C (RihC) from *Limosilactobacillus reuteri* LR1. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024, v. 25, № 1, p. 538 doi: 10.3390/ijms25010538 (Q1, IF = 5,6)

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОГО СБРАЖИВАНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ ЗА СЧЕТ СТИМУЛЯЦИИ ПРЯМОГО МЕЖВИДОВОГО ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ МЕЖДУ СИНТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ И МЕТАНОГЕННЫМИ АРХЕЯМИ

Журавлева Е.¹, Шехурдина С.¹, Лайкова А.¹, Попова Н.², Андреев Е.³, Ковалев Д.⁴, Ковалев А.⁴, Лойко Н.¹, Котова И.³, Крюков Э.⁵, Литти Ю.¹

¹ ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИФХЭ РАН

³ Биологический факультет МГУ М.В. Ломоносова

⁴ ФГБНУ ФНАЦ ВИМ

⁵ ИМГМУ им. И.М. Сеченова

Анаэробное сбраживание (АС) является перспективным экологичным способом переработки органических отходов с образованием полезных продуктов, таких как биогаз и биоудобрение. Одной из лимитирующих стадий АС является синтрофная стадия, в ходе которой происходит разложение летучих жирных кислот (ЛЖК). Накопление ЛЖК быстро приводит к снижению pH и дестабилизации системы АС. Одним из способов интенсификации синтрофного процесса является стимуляция прямого межвидового переноса электронов (DIET) за счет внесения электропроводящих материалов (ЭМ) и передачи электронов напрямую в биопленках между электрогенными и электротрофными микроорганизмами. Показана возможность стимуляции DIET при совместном АС органической фракции твердых коммунальных отходов (ОФ-ТКО) с осадком сточных вод (ОСВ) в термофильном режиме в крупном лабораторном реакторе непрерывного действия с высокой нагрузкой по органическому веществу (ОВ). При нагрузке по ОВ равной 12,1 кг ОВ/(м³ сутки) статистически достоверно ($p < 0,05$) подтверждено повышение продукции биогаза на 9% в реакторе с карбоновой тканью в сравнении с контролем. Биопленка на карбоновой ткани характеризовалась накоплением синтрофных представителей родов *Tepidanaerobacter* и *Defluviitoga*, способных к DIET. В высоконагруженной системе АС (12,5 г/л ЛЖК) показано положительное влияние внесения нержавеющей стали (НС) и карбонового войлока (КВ). Потенциальный выход СН₄, максимальная скорость производства СН₄ и лаг-фаза были значительно (до 1,4, 3,9 и в 2,0 раза соответственно; $p < 0,05$) улучшены при добавлении НС и КВ по сравнению с контролем и диэлектрическими аналогами. В биопленках происходило накопление электроактивных групп *Ureibacillus* и *Limnochordia* – на НС, и *Coprothermobacter* и “*Ca. Caldatribacterium*” для КВ, а также увеличивалась электрон-транспортная способность на 82% (НС) и 63% (КВ).

Работа выполнялась в рамках проекта НЦМУ «Агротехнологии будущего».

Публикации:

1. Zhuravleva E.A., Kovalev A.A., Kovalev D.A., Kotova I.B., Shekhurdina S.V., Laikova A.A., Krasnovsky A., Pygamov T., Vivekanand V., Li L., He C., Litt Y.V. Does carbon cloth really improve thermophilic anaerobic digestion performance on a larger scale? focusing on statistical analysis and microbial community dynamics // **J. Environ. Management**. 2023. V. 341. P. 118124. Doi 10.1016/j.jenvman.2023.118124
2. Shekhurdina S., Zhuravleva E., Kovalev A., Andreev E., Kryukov E., Loiko N., Laikova A., Popova N., Kovalev D., Vivekanand V., Litt Y. Comparative effect of conductive and dielectric materials on methanogenesis from highly concentrated volatile fatty acids // **Bioresource Technology**. 2023. V. 377. P. 128966. Doi 10.1016/j.biortech.2023.128966

ГРИБЫ-ДЕСТРУКТОРЫ ТЕМПЕРНОЙ ЖИВОПИСИ, ИЗОЛИРОВАННЫЕ В ГОСУДАРСТВЕННОЙ ТРЕТЬЯКОВСКОЙ ГАЛЕРЕЕ: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА И РАЗРАБОТКА АНТИСЕПТИКОВ

Жгун А.А.¹, Авданина Д.А.¹, Потапов М.П.¹, Нураева Г.К.¹, Шумихин К.В.², Троян Е.В.², Александрова Л.А.³, Хомутов А.Р.³, Макаров В.А.¹, Карпова Н.В.¹, Ядерец В.В.¹, Кардонский Д.А.⁴, Шагдарова Б.Ц.¹, Жуйкова Ю.В.¹, Варламов В.П.¹, Симоненко Н.П.⁵, Шитов М.В.²

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Государственная Третьяковская галерея

³ ИМБ РАН

⁴ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

⁵ ИОНХ РАН

Мицелиальные грибы являются одними из основных микроорганизмов, способных разрушать объекты культурного наследия, в частности, произведения живописи. Ранее с разрешения главного хранителя музейных предметов Третьяковской галереи Т.С. Городковой мы отобрали серию микробиологических проб в залах древнерусского искусства, определили ~300 последовательностей микроскопических грибов в исходных пробах и в полученных на их основе культурах; потенциально опасные для экспонатов культивируемые грибы-деструкторы темперной живописи выделили в чистые линии.

Это дало возможность в текущей работе провести подбор таргетированных антисептиков против грибов-деструкторов, доминантных для микробиома Третьяковской галереи. Для этого использовали разрабатываемые соединения: фосфорсодержащие аналоги аминокислот, алкилнуклеозиды, низкомолекулярный хитозан и аналоги циклических гидроксамовых кислот, а также стандартные антисептики, применяемые в живописи: Катамин АБ и пентохлорфенолят натрия. Провели серии экспериментов на агаризованных питательных средах; наиболее активные соединения (3'-модифицированные производные N4-алкил-5-метил-2',3'-дидезоксицитидинов и хитозаны с молекулярной массой 25 и 45 кДа) использовали для защиты живописных материалов в созданных макетах. Оказалось, что разрабатываемые соединения обладают более высокой активностью в составе макетов по сравнению со стандартными антисептиками, при этом не воздействуют на поверхностные и спектральные свойства материалов.

С другой стороны, микроорганизмы, приспособленные к экстремальным условиям обитания на основе живописных материалов, могут обладать уникальными свойствами, имеющими потенциальное применение в биотехнологии. Так, темперные краски делаются на основе яичного желтка, содержащего до 2% холестерина в сухом виде; защитные лаки содержат в своем составе тритерпеноиды. В связи с этим изучили способность грибов-деструкторов темперной живописи трансформировать близкородственные соединения, стероиды. Оказалось, что все изоляты Третьяковской галереи способны трансформировать андростендион, некоторые штаммы показали эффективность трансформации, близкую к промышленному штамму *Curvularia lunata* RNCIM F-981. Всего охарактеризовали 33 стероида, образующихся при трансформации андростендион, для 19 из них установили структуру. В данной работе мы впервые показали, что грибы-деструкторы темперной живописи обладают дифференциальной стероид-трансформирующей активностью в зависимости от условий среды и трансформируемого субстрата, что может быть перспективно для промышленного применения.

Публикации:

- Zhgun, A.A.; Potapov, M.P.; Avdanina, D.A.; Karpova, N. V.; Yaderets, V. V.; Dzhavakhiya, V. V.; Kardonsky, D.A. Biotransformation of Androstenedione by Filamentous Fungi Isolated from Cultural Heritage Sites in the State Tretyakov Gallery. **Biology**. 2022, 11, 883, doi:10.3390/BIOLOGY11060883.
- Makarov, D.A.; Negrya, S.D.; Jasko, M. V.; Karpenko, I.L.; Solyev, P.N.; Chekhov, V.O.; Kaluzhny, D.N.; Efremenkova, O. V.; Vasilyeva, B.F.; Chizhov, A.O.; Avdanina, D.A.; Zhgun, A.A.; Kochetkov, S.N.; Alexandrova L.A. 5-Substituted Uridines with Activity against Gram-Positive Bacteria. **ChemMedChem** 2023, e202300366, doi:10.1002/CMDC.202300366.
- Alexandrova, L.A.; Shevchenko, O. V.; Jasko, M.V.; Solyev, P.N.; Karpenko, I.L.; Negrya, S.D.; Efremenkova, O. V.; Vasilieva, B.F.; Efimenko, T.A.; Avdanina, D.A.; Nuraeva G.K.; Potapov M.P.; Kukushkina V. I.; Kochetkov S. N.; Zhgun A.A. N3'-Amino modifications enhance the antifungal properties of N4-alkyl-5-methylcytidines for potential biocides. **New Journal of Chemistry**. 2022, 46, 5614–5626, doi:10.1039/D1NJ04312A.
- Zhgun, A.; Avdanina, D.; Shagdarova, B.; Nuraeva, G.; Shumikhin, K.; Zhuikova, Y.; Il'ina, A.; Troyan, E.; Shitov, M.; Varlamov, V. The Application of Chitosan for Protection of Cultural Heritage Objects of the 15–16th Centuries in the State Tretyakov Gallery. **Materials** (Basel). 2022, 15, 7773, doi:10.3390/MA15217773.
- Александрова Л.А., Карпенко И.Л., Кочетков С.Н., Негря С.Д., Сольев П.Н., Шевченко О.В., Ясько М.В., Нураева Г.К., Потапов М.П., Авданина Д.А., Троян Е.В., Шитов М.В., Жгун А.А. Новые N4-модифицированные 2'-дезоксинуклеотиды, проявляющие антимикозную активность. **Патент** RU 2766333C1. 15 мая 2022.

ДЕГРАДАЦИЯ ПОЛИЛАКТИДА РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ В УСЛОВИЯХ КОНТРОЛИРУЕМОГО КОМПСТИРОВАНИЯ С УЧАСТИЕМ МИКРОМИЦЕТОВ ИЗ РОДА *ASPERGILLUS* И БАКТЕРИЙ ИЗ РОДА *LYSINIBACILLUS* И *BACILLUS*

Миронов В.В.¹, Острикова В.В.¹, Щелушкина А.А.¹, Соколова Д.Ш.¹, Трофимчук Е.С.², Плуталова А.В.², Москвина М.А.², Черникова Е.В.², Гроховская Т.Е.², Ефимов А.В.², Чжан Ш.³

¹ ИИМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

³ Колледж портовой и прибрежной инженерии, Университет Джимей, Сянь, Китай

Возрастающие экологические проблемы требуют использования биоразлагаемых полимерных материалов для изготовления упаковки. Полилактид является такой альтернативой заменой традиционным трудно разлагаемым полимерам. Одна из проблем использования полилактида заключается в низких скоростях его разложения в условиях окружающей среды. Решить эту проблему может метод промышленного компостирования, при котором пластик попадает в отходы вместе с остатками пищи. Изучена деградация пленок полилактида различной структуры в условиях контролируемого компостирования. Мы продемонстрировали, что полилактид разлагается в течение одного месяца в субстрате, моделирующем стандартное промышленное компостирование. Независимо от исходной структуры образцов среднечисловая молекулярная масса (M_n) полимера уменьшалась до 4 кДа, а степень кристалличности возрастала примерно до 70% после 21 дня компостирования. В этом случае на термофильной стадии происходит интенсивное биоразложение полимера с участием микромицетов из рода *Aspergillus* и бактерий из рода *Lysinibacillus* и *Bacillus*. Добавление инокулянта к стандартному субстрату приводило к ускоренной деградации образцов полилактида в течение одной недели за счет абиотического гидролиза. Эти результаты подтвердили, что промышленное компостирование может решить проблему утилизации пластика, по крайней мере, для полилактида.

Исследование выполнено за счет средств гранта РНФ № 23-24-00237, <https://rscf.ru/project/23-24-00237/>.

Публикации:

1. Trofimchuk E., Ostrikova V., Ivanova O., Moskvina M., Plutalova A., Grokhovskaya T., Shchelushkina A., Efimov A., Chernikova E., Zhang S., Mironov V. Degradation of structurally modified polylactide under the controlled composting of food waste // *Polymers*. 2023. V. 15. № 19. Art. 4017. P. 1–23. DOI 10.3390/polym15194017.
2. Миронов В.В., Трофимчук Е.С., Острикова В.В., Плуталова А.В., Москвина М.А., Щелушкина А.А., Черникова Е.В., Соколова Д.Ш. Особенности деструкции полилактида в присутствии представителей рода *Bacillus* // *Микробиология*. 2023. Т. 92. № 5. С. 527–532. DOI 10.31857/S0026365623600207.

ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ИНАКТИВАЦИИ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* И БЕЛКОВЫЙ ПРОФИЛЬ ПОКОЯЩИХСЯ ФОРМ *MYCOBACTERIUM SMEGMATIS*, СОДЕРЖАЩИХ ЭНДОГЕННЫЕ ПОРФИРИНЫ

Шашин Д.М.¹, Демина Г.Р.¹, Линге И.А.², Глигонов И.А.¹, ВострокнUTOва Г.Н.¹, Цедилин А.М.¹, Капрельянц А.С.¹, Апт А.С.², Савицкий А.П.¹, Шлеева М.О.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза РАН

Проблемой эффективного лечения туберкулеза в клинике является распространённость антибиотикорезистентных штаммов возбудителя *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Около четверти населения земного шара латентно инфицированы этим патогеном, что обусловлено переходом *Mtb* в состояние покоя. Известные противотуберкулезные препараты, применяемые в медицинской практике, не активны в отношении покоящихся *Mtb*. Фотодинамическая инактивация (ФДИ) является одной из альтернатив антибиотикотерапии, способной инактивировать бактерии, в том числе с широкой и множественной лекарственной устойчивостью. Наиболее перспективным является использование эндогенных фотосенсибилизаторов, в частности порфиринов. Целью данной работы являлось оценка возможности фотоинактивации вегетативных и покоящихся форм *Mtb* и выявление первичных белковых мишеней такого воздействия на микобактерии.

Покоящиеся формы *Mtb* содержали в 6 раз больше порфиринов по сравнению с вегетативными клетками. В присутствии в среде роста 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) наблюдалось увеличение количества порфиринов в покоящихся клетках *Mtb* в 85 раз. В покоящихся формах *Mtb* было выявлено необычное производное копропорфирина - тетраметиловый эфир копропорфирина (ТМК) и его комплекс с цинком. В присутствии АЛК в покоящихся клетках *Mtb* увеличивается концентрация уропорфирина, копропорфирина и, особенно, ТМК. Присутствие Mg^{2+} и Zn^{2+} вызывало дополнительное увеличение накопления порфирина. Анализ транскриптома выявил повышение активности ряда генов при росте клеток в присутствии АЛК, связанное с путями синтеза и метаболизма порфиринов и прекорринов. Как вегетативные, так и покоящиеся клетки *Mtb*, выращенные в присутствии АЛК, демонстрировали очень высокую фоточувствительность (около 99,99% бактерий погибало) как *in vitro*, так и в макрофагах. Под действием света с длиной волны 565 нм происходит необратимое образование белковых агрегатов в покоящихся формах *M. smegmatis*, вследствие которого наблюдается исчезновение белков в разделяющем геле электрофореза. Светочувствительные белки включают в себя белки, принадлежащие гликолитическому пути, ЦТК, пентозафосфатному пути, пути окислительного фосфорилирования и продукции энергии. Ряд белков, участвующих в защите клетки от окислительного стресса и препятствующих агрегации белков были чувствительны к свету. ФДИ приводит к подавлению активности дыхательной цепи и разрушению ферментов, вовлечённых в процесс биосинтеза белков и нуклеиновых кислот – необходимых процессов для перехода бактерий из покоящегося состояния в состояние активного размножения. Изобилие мишеней фотодинамического воздействия и эффективные методы индукции фоточувствительности микобактерий делает ФДИ с участием эндогенных порфиринов перспективным способом борьбы с латентными и лекарственно-устойчивыми формами туберкулеза.

Публикации:

1. Shashin DM, Demina GR, Linge IA, Vostroknutova GN, Kaprelyants AS, Savitsky AP, Shleeva MO. The Effect of Antimicrobial Photodynamic Inactivation on the Protein Profile of Dormant Mycolicibacterium smegmatis Containing Endogenous Porphyrins. *Int J Mol Sci*. 2023;24(18). doi:10.3390/ijms241813968
2. Shleeva MO, Linge IA, Gligonov IA, Vostroknutova GN, Shashin DM, Tsedilin AM, Apt AS, Kaprelyants AS, Savitsky AP. Acquiring of photosensitivity by *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* and inside infected macrophages is associated with accumulation of endogenous Zn-porphyrins. *Sci Rep*. 2024;14(1):846. doi:10.1038/s41598-024-51227-z

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОМНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВЫХ АНАЭРОБНЫХ АРХЕЙ

Хомякова М.А., Меркель А.Ю., Мамий Д.Д., Клюкина А.А., Сорокин Д.Ю., Слободкин А.И.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Археи, относящиеся к классу “*Candidatus Bathyarchaeia*”, широко распространены в различных бескислородных экосистемах и считаются одними из самых распространенных групп микроорганизмов на Земле. Однако существуют лишь единичные сообщения о лабораторном культивировании *Bathyarchaeia*, и ни один из представителей этого класса не выделен в чистой культуре. Мы смогли культивировать представителя батиархей (штамм M17CTs), полученного из анаэробного осадка прибрежного озера. Клетки штамма M17CTs представляли собой мелкие неподвижные кокки, 0,4–0,7 мкм в диаметре. Цитоплазматическая мембрана окружена S-слоем и покрыта внешней электронно-плотной оболочкой. Штамм M17CTs является строгим анаэробом мезофилом. Рост происходит в присутствии метоксилированных ароматических соединений вместе со сложными белковыми субстратами. Полный геном штамма M17CTs имеет размер 2,15 Мб с содержанием G+C ДНК 38,1%. На основании филогеномного положения, а также фенотипических и геномных свойств, мы предлагаем отнести штамм M17CTs к новому виду нового рода *Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., нового семейства *Bathyarchaeaceae*, нового порядка *Bathyarchaeales* и нового класса *Bathyarchaeia*, и даем описание этих таксонов под SeqCode. Штамм M17CTs является первым устойчиво культивируемым представителем батиархей.

Из осадков содового озера и наземного грязевого вулкана впервые получены высокоочищенные культуры алкалофильных ацетикластических метаногенов. Клетки двух штаммов представляют собой неподвижные палочки, образующие нити. Штамм из грязевого вулкана (M04Ac) имеет диапазон pH для роста от 7,5 до 10,0 (оптимум 9,0), тогда как штамм из содового озера (Mx) является облигатным алкалофилом, растущим в диапазоне pH 7,7–10,2. (оптимум 9,3–9,5). Геномы обоих штаммов кодируют все ферменты, необходимые для ацетикластического метаногенеза и различные механизмы (гало)щелочной адаптации, включая биосинтез эктоина, что является первым свидетельством образования этого осмопротектора у архей. По филогении гена 16S рРНК штаммы принадлежат к роду *Methanothrix*, однако расширенная филогеномная реконструкция ясно указывает на полифилетическое происхождение видов этого рода. Мы предложили реклассифицировать род *Methanothrix* в новый род *Methanocrinis*, а также описываем под SeqCode штаммы Mx^{Ts} и M04Ac^{Ts} как новые виды *Methanocrinis natronophilus* и *Methanocrinis alkalitolerans*. Эта работа демонстрирует, что низкоэнергетический ацетикластический метаногенез может функционировать при экстремальных условиях, существующих в (гало)щелочных средах обитания.

Публикации:

1. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Mamiy D.D., Klyukina A.A., Slobodkin A.I. Phenotypic and genomic characterization of *Bathyarchaeum tardum* gen. nov., sp. nov., a cultivated representative of the archaeal class *Bathyarchaeia* // **Front. Microbiol.** 2023. V. 14. Art. 1214631. doi: 10.3389/fmicb.2023.1214631
2. Khomyakova M.A., Merkel A.Y., Slobodkin A.I., Sorokin D.Y. Phenotypic and genomic characterization of the first alkaliphilic aceticlastic methanogens and proposal of a novel genus *Methanocrinis* gen. nov. within the family *Methanotracheaceae* // **Front. Microbiol.** 2023. V. 14. Art. 1233691. doi: 10.3389/fmicb.2023.1233691

ДОКСИЦИКЛИН-РЕГУЛИРУЕМАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ХИМЕР НА ОСНОВЕ dCAS9 И ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ НУКЛЕОМА *IN VIVO*

Малюшенок Л.Г.^{1,2}, Абушинова Г.А.^{1,2}, Казачкина Н.И.¹, Жердева В.В.¹, Богданов А.А. Jr.^{1,3}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН;

² Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН;

³ Медицинская школа UMASS Chan, отделение радиологии, Вустер, Массачусетс, США.

С момента открытия системы CRISPR/Cas9 разрабатывались подходы для многоцветного мечения этих белков. Каталитически неактивные Cas9 (dCas9) можно использовать для картирования генов в структуре хроматина на уровне отдельных клеток и тканей.

Цель нашего исследования заключалась в получении и тестировании химерных белков на основе ортологов dCas9 и флуоресцентных белков (FP), экспрессируемых под индуцибельным доксициклиновым промотором Tet-On для обеспечения регулируемой экспрессии химер в клетках и на опухолевых моделях животных.

Все химерные конструкции получали на основе лентивирусного (LV) вектора третьего поколения FU-tet-o-hOct4, в котором экспрессия генов осуществляется под Tet-On доксициклин (Dox)-индуцибельным промотором. Ортологи dCas9 из *S. thermophilus* (St1) и *N. meningitidis* (Nm) и флуоресцентные белки (FP) в соотношении 1:1 были слиты с сигналом ядерной локализации (NLS). Пара белков EGFP и mCherry была выбрана как удовлетворяющая условиям FRET. Сконструированные векторы (FU-Tet-o-SttdCas9-EGFP и FU-Tet-o-NmdCas9-mCherry) использовали для получения лентивирусных частиц с последующей трансдукцией клеток аденокарциномы человека A549. Клетки, экспрессирующие двойные химеры (St1dCas9-EGFP и NmdCas9-mCherry), прививали бестимусным мышам для получения опухолевых ксенографтов. Экспрессию двойных химер в ксенографтах индуцировали путем введения доксициклина животным через внутрижелудочный зонд. Флуоресцентные изображения опухолей регистрировали с использованием планарной системы iBox (UVP, США).

Клетки, экспрессирующие St1dCas9-EGFP и NmdCas9-mCherry, демонстрировали нормальную морфологию с преимущественно ядерной двойной локализацией. Экспрессия белков развивалась уже через 24 ч после индукции, при отмене Dox флуоресцентный сигнал снижался в течение 4-5 дней. Максимальная интенсивность флуоресценции в подкожных опухолевых ксенографтах регистрировалась на 3-и сутки после индукции экспрессии химерного белка. Для улучшения оптического контраста использовали 0,7 М раствор гадобутрола. Далее с использованием МРТ-установки 1Т М3 MRI (Aspect Imaging, Израиль) получали МР-контрастные изображения опухолей. Показано, что максимальный флуоресцентный сигнал в опухолях соответствовал участкам их интенсивной перфузии, что подтверждалось совмещением флуоресцентных изображений в красном канале (экспрессия NmdCas9-mCherry) и МР-стеков, полученных в результате МРТ исследования животных. Таким образом, впервые продемонстрирована Tet-зависимая экспрессия двойных химерных флуоресцентных ортологов dCas9 *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-14-00205.

Публикации:

1. L. Maloshenok, G. Abushinova, N. Kazachkina, A. Bogdanov, Jr. and V.Zherdeva. Tet-Regulated Expression and Optical Clearing for In Vivo Visualization of Genetically Encoded Chimeric dCas9/Fluorescent Protein Probes// **MDPI Materials**, 2023, Vol 16(3), p. 940.
2. A.Bogdanov Jr., V. Tuchin, N. Kazachkina, V. Zherdeva, L. Maloshenok, D. Tuchina, I. Meerovich, I.Solovyev, A. Savitsky. Clinical MRI contrast agent improves fluorescent imaging of red fluorescent protein expression in-vivo due to the effect of tissue optical clearing// **SPIE**, 2023, 12378, Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics XX, 1237806.

НОВЫЕ ПУРПУРНЫЕ СЕРНЫЕ БАКТЕРИИ СЕМЕЙСТВА *ECTOTHIORHODOSPIRACEAE* ИЗ ЭПИКОНТИНЕНТАЛЬНЫХ СОДОВЫХ ОЗЕР ЮГО-ЗАПАДНОЙ И ЮГО-ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ И МОНГОЛИИ

Брянцева И.А., Горленко В.М.

ИНМИ ФИЦ Биотехнологии РАН

В 1993 г. Г.А. Заварзиным выдвинута гипотеза о том, что микробные сообщества эпиконтинентальных содовых водоемов могут рассматриваться как реликтовые и, возможно, могли являться центрами микробного биоразнообразия. Изучение данного типа озер представляет интерес с точки зрения выявления новых форм микроорганизмов, развивающихся в экстремальных условиях (рН 9–10, минерализация 1–300 г/л) и их эволюции. Целью работы было изучение биоразнообразия аноксигенных фототрофных бактерий (АФБ), развивающихся в эпиконтинентальных содовых озерах.

В результате многолетних исследований было установлено, что во всех исследованных озерах (≈ 40) обитают, а в большинстве озер доминируют, АФБ семейства *Ectothiorhodospiraceae*. Все выделенные штаммы *Ectothiorhodospiraceae* являются алкалофилами и натронофилами (=содофилами), нуждающимися в карбонат-ионах, а также галотолерантами. Наиболее интересные штаммы изучены и описаны как новые таксоны.

В настоящее время сем. *Ectothiorhodospiraceae* включает три рода, два из которых, *Ectothiorhodosinus* и *Thiorhodospira*, описаны авторами данной работы. Третий род – *Ectothiorhodospira* включает 10 видов, три из которых (*Ect. magna*, *Ect. variabilis* и *Ect. lacustris*) также описаны авторами этой работы.

Все бактерии, описанные в качестве новых таксонов сем. *Ectothiorhodospiraceae*, имеют уникальные свойства и встречаются только в эпиконтинентальных содовых озерах, которые представляют собой особый тип экосистемы с автохтонным сообществом, хорошо адаптированным к местным экстремальным природным условиям. Таким образом, эпиконтинентальные содовые озера являются источником новых бактериальных таксонов, что свидетельствует об особой эволюционной роли данных изолированных экосистем, существовавших также и в геологическом прошлом Земли.

Публикация:

Bryantseva I.A., Kyndt J.A., Gorlenko V.M., Imhoff J.F. Ectothiorhodospira lacustris sp. nov., a new purple sulfur bacterium from low-mineralized soda lakes that contains a unique pathway for nitric oxide reduction // **Microorganisms**. 2023. V. 11. № 5. Art. 1336. Doi: 10.3390/microorganisms11051336

НОВЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Салина Е.Г.¹, Деджакоми Дж.², Погодин П.В.³, Поройков В.В.³, Макаров В.А.¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

² Университет Павии, Павия, Италия

³ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва

Новые соединения с противотуберкулезной активностью необходимы для расширения существующего арсенала терапевтических средств. Был проведен виртуальный скрининг библиотеки химических соединений ИОХ РАН, состоящей из примерно 200 000 молекул, в результате предложено 30 соединений, потенциально обладающих антимикобактериальной активностью. Была проведена оценка их активности в отношении *M. tuberculosis* H37Rv. Двенадцать соединений показали значения МИК в диапазоне от 2,17 до 16,67 мкМ, остальные соединения продемонстрировали существенно более высокие значения МИК. Обнаруженные антимикобактериальные средства относятся к разным химическим классам. Далее, был применен другой подход к поиску новых соединений с противотуберкулезной активностью – высокопроизводительный скрининг 500 оригинальных молекул, синтезированных в лаборатории биомедицинской химии ФИЦ Биотехнологии РАН. В результате было обнаружено новое производное бензотиазолтиазолидина 11726172 с оригинальным механизмом действия, которое обладает активностью против *M. tuberculosis* как *in vitro*, так и *in vivo*, а также в отношении покоящихся бактерий и клинических изолятов с множественной лекарственной устойчивостью. 11726172 не проявляет антагонизма по отношению к известным противотуберкулезным соединениям и имеет перспективу применения в клинической практике в комбинации с ними.

Публикации:

1. Pogodin PV, Salina EG, Semenov VV, Raihstat MM, Druzhilovskiy DS, Filimonov DA, Poroikov VV. Ligand-based virtual screening and biological evaluation of inhibitors of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. SAR QSAR **Environ Res.** 2024 35(1):53-69. doi:10.1080/1062936X.2024.2304803.
2. Salina EG, Postiglione U, Chiarelli L, Recchia D, Záhorszka M, Lepioshkin A, Monakhova N, Pál A, Porta A, Zanoni G, Korduláková J, Kazakova E, Sassera D, Pasca MR, Makarov V, and Degiacomi G. A new benzothiazolthiazolidine derivative 11726172 is active *in vitro*, *in vivo*, and against non-replicating cells of Mycobacterium tuberculosis. **mSphere.** 2022, 7(6): e00369-22.
3. Salina EG, Makarov V. Mycobacterium tuberculosis Dormancy: How to Fight a Hidden Danger. **Microorganisms.** 2022, 10(12):2334. doi: 10.3390/microorganisms10122334.

БИОГЕННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ИНДИКАТОР МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК

Складнев Д.А.¹, Сорокин В.В.¹, Саакян С.В.², Алексеева А.П.²

ИИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

2ФГБУ НМИЦ глазных болезней им. Гельмгольца, Минздрав РФ

Одной из основных особенностей метаболически активных живых клеток является их природная способность при росте обмениваться органическими соединениями с ростовой средой и секретировать соединения, которые могут выступать как доноры электронов при восстановлении катионов до нуль-валентного состояния. Потеря зарядов запускает кластеризацию восстановленных атомов металлов, что в дальнейшем приводит к генерации *de novo* биогенных наночастиц металлов. Уровень метаболической активности клеток отражается на параметрах наночастиц, тогда как в отсутствие активных клеток, даже в богатых органикой средах, наночастицы не формируются. В отчётный период мы использовали генерацию *de novo* биогенных наночастиц для решения трёх актуальных вопросов.

При использовании модифицированного протокола генерации биогенных наночастиц была проведена оценка уровней метаболической активности тканей биоптатов у клинко-морфологических доказанных одиннадцати различных типов новообразований органа зрения. Впервые было показано, что уровень формирования *de novo* наночастиц серебра повышается в ряду: здоровые ткани век и конъюнктивы–доброкачественные опухоли (в 1,5–2 раза больше)–злокачественные опухоли (в 3,7–6,1 раза). Наибольший уровень генерации наночастиц наблюдался при меланоме кожи век (до 8,0 раз). Были отмечены различия динамики роста наночастиц в присутствии клеток различных типов опухолей, позволяющие продолжить исследования для уточнения метода экспресс-диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований.

Ранее мы показали, что суспензии клеток психроактивных бактерий *Cryobacterium arcticum* активно генерируют наночастицы серебра в ходе культивирования при оптимальной для них температуре (+9°C), но теряют эту способность примерно через 1 ч при комнатной температуре. Клетки психроактивных бактерий были впервые использованы для оценки влияния неполного подавления синтеза нуклеиновых кислот или белка на генерацию наночастиц. Было установлено, что сохранение способности генерировать наночастицы серебра позволяет анализировать разнородность физиологического состояния отдельных клеток популяции.

Публикации:

1. Саакян С.В., Складнев Д.А., Алексеева А.П., Сорокин В.В., Безнос О.В. Возможности спектрометрической диагностики доброкачественных и злокачественных опухолей конъюнктивы // **Российский офтальмологический журнал**. 2023. Т. 16. № 2. С. 119-123. Doi: 10.21516/2072-0076-2023-16-2-119-123
2. Складнев Д.А., Сорокин В.В. Генерация биогенных наночастиц металлов *de novo* как индикатор метаболической активности клеток // **Российские нанотехнологии**. 2023. Т. 18. № 3. С. 1–16. Doi: 10.56304/S1992722323030111
3. Складнев Д.А., Сорокин В.В., Саакян С.В., Карлов С.П., Погосян С.И. Способ использования интегрирующей сферы для фотометрической регистрации формирования *de novo* биогенных наночастиц металлов. **Патент РФ** 2797775. 08.06.2023.

ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ ВОСТРЕБОВАННЫХ ПРОМЫШЛЕННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ НОВЫХ ШТАММОВ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Зоров И.Н.^{1,2}, Рожкова А.М.^{1,2}, Доценко А.С.¹, Короткова О.Г.¹, Денисенко Ю.А.¹, Синельников И.Г.¹, Осипов Д.О.¹, Шашков И.А.¹, Сатрутдинов А.Д.¹, Чулкин А.М.¹, Синицын А.П.^{1,2}

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ им. Ломоносова, Химический факультет, Кафедра химической энзимологии

На основе мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* создана экспрессионная платформа, позволяющая производить различные технические ферменты при уровне секреции целевых белков 40–60 г/л культуральной среды. На ее основе были созданы новые высокопродуктивные рекомбинантные штаммы-продуценты, которые продуцируют сбалансированный комплекс различных карбогидраз. Создание ферментных препаратов с высокой молекулярной активностью и повышенной операционной стабильностью для использования в процессах производства кормов для сельскохозяйственных животных, в пищевой промышленности, в текстильной и целлюлозно-бумажной, а также для биоконверсии лигноцеллюлозной биомассы является одной из приоритетных задач лаборатории биотехнологии ферментов.

Ранее в лаборатории были разработаны целлюлазы с повышенной термо- и операционной стабильностью для использования в процессах биоконверсии лигноцеллюлозы. Так, многоточечные мутации в белковой глобуле эндоглюканазы *Penicillium verruculosum* PvCel5A позволили увеличить температуру плавления на 7,7 °С, повысить стабильность при 75 °С в 5.5 раза при одновременном двукратном увеличении молекулярной активности [F.Contreras et al, ACS Sustainable Chem. Eng., 2020].

Повышение термостабильности – важная задача инженерии белков, особенно для дальнейшего промышленного применения. Влияние аминокислотных замен на термостабильность может быть теоретически рассчитано с использованием алгоритмов программ-предикторов. Сравнение результатов различных алгоритмов предикторов термостабильности белков позволило выявить ресурсы с наибольшей эффективностью для инженерии целлюлаз [1]. Дальнейшее развитие исследований в области методов белковой инженерии карбогидраз позволило создать штаммы-продуценты промышленно-востребованных инулиназы и ксиланазы с повышенной температурной стабильностью и молекулярной активностью [2-4].

Публикации:

1. Anna Dotsenko, Jury Denisenko, Dmitrii Osipov, Aleksandra Rozhkova, Ivan Zorov, and Arkady Sinitsyn / Testing and improving the performance of protein thermostability predictors for the engineering of cellulases. **J. of Bioinformatics and Computational Biology** V. 21, №. 02, 2330001 (2023). 10.1142/S0219720023300010
2. A. Dotsenko, A. Rozhkova, Ju. Denisenko, I. Shashkov, A. Sinitsyn/ Stabilization of elements of secondary structure in *Aspergillus awamori* exo-inulinase for thermostability improvement. **Bioresource Technology Reports**, 24, 101644, (2023). <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101644>
3. Рожкова А.М., Денисенко Ю.А., Милова Е.С., Зоров И.Н., Синицына О.А., Ярошенко Е.В., Синицын А.П. Новый комплексный ферментный препарат экзо-инулиназы и пектинлиазы для использования в технологии переработки топинамбура, **Биотехнология**, (2023), Т.39, № 5, с. 33-43
4. Dotsenko A, Sinelnikov I, Rozhkova A., Zorov I., Sinitsyn A. / Flexibility of active center affects thermostability and activity of *Penicillium canescens* xylanase E. **Biochimie**, (2023), 10.1016/j.biochi.2023.10.004

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ РЕДКОГО КОДОНА UUA В ГЕНОМАХ БАКТЕРИЙ РОДА *STREPTOMYCES* И ИХ ФАГОВ

Антонов И.В.¹, O'Loughlin S.², Гороховский А.¹, O'Connor P.³, Baranov P.², Atkins J.²

School of Biochemistry and Cell Biology, University College Cork, Ireland

¹ ИИБ ФИЦ Биотехнологии РАН

² School of Biochemistry and Cell Biology, University College Cork, Ireland

³ EIRNA Bio, Ireland

У бактерий рода *Streptomyces* клеточный цикл включает переход от раннего вегетативного состояния к более поздней фазе, когда синтезируются вторичные продукты, включая антибиотики, формируются воздушные гифы и происходит спорообразование. Транскрипционный фактор *AdpA*, имеющий два домена, активирует экспрессию многочисленных генов, участвующих в переходе от фазы вегетативного роста. мРНК *adpA* многих видов *Streptomyces* содержит кодон UUA в области между 5'-последовательностью, кодирующей один домен, и 3'-последовательностью, кодирующей другой его и С-концевой домен. Кодоны UUA исключительно редки у *Streptomyces*. Соответствующая этим кодонам функциональная и зрелая тРНК отсутствует в клетках *Streptomyces* на ранней и вегетативной фазе клеточного цикла – она синтезируется и аминоацилируется только на поздних стадиях. Здесь мы сообщаем о сигналах-кандидатах перекодирования (recoding), которые могут влиять на декодирование линкерной области между двумя доменами, содержащей редкий кодон UUA. Кроме того, перед основной открытой рамкой считывания (ORF) гена *adpA* была найдена еще одна короткая консервативная открытая рамка считывания – так называемая upstream ORF или uORF. Интересно, что старт-кодоном у этой uORF, как правило, служит GUG, а внутри она также содержит редкий кодон UUA. Этот кодон обычно располагается за 5 нуклеотидов до начала основной ORF. Экспериментальные данные по профилированию рибосом (Ribo-seq) показывают трансляцию этой 5'-области.

С другой стороны, мы исследовали наличие UUA кодонов в геномах фагов, заражающих бактерии рода *Streptomyces*. Десять лет назад UUA-опосредованный обход трансляции был предложен в качестве сенсора фага *Streptomyces* на стадии клеточного цикла хозяина и эффектора его литического/лизогенного переключения. Мы предоставляем первые экспериментальные доказательства этого предложения.

Данная работа была выполнена при частичной поддержке гранта РФФ № 20-74-00128.

Публикация:

Antonov, I. V., O'Loughlin, S., Gorohovski, A. N., O'Connor, P. B., Baranov, P. V., & Atkins, J. F. (2023). *Streptomyces* rare codon UUA: from features associated with 2 *adpA* related locations to candidate phage regulatory translational bypassing. *RNA biology*, 20(1), 926-942.

ТЕТРАГИДРОБИОПТЕРИН В ПАТОГЕНЕЗЕ И ФОТОТЕРАПИИ ВИТИЛИГО

Вечтомова Ю.Л.¹, Телегина Т.А.¹, Буглак А.А.², Борзова В.А.¹, Капитонова М.А.², Низамутдинов А.С.³, Мадиров Э.И.³, Макарова Д.А.³, Крицкий М.С.¹

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН;

² Санкт-Петербургский государственный университет;

³ Казанский федеральный университет

Витилиго – это хроническое дерматологическое заболевание, характеризующееся образованием депигментированных пятен на коже вследствие нарушения биосинтеза меланина. Наблюдается рост заболеваемости этой болезнью, что определяет актуальность данного исследования. Пусковым моментом нарушений меланогенеза в меланоцитах, по-видимому, связан с функционированием тетрагидробиоптерина (H4Bip) - кофермента фенилаланингидроксилазы. При витилиго в меланоцитах фиксируется 3-5 кратный избыток H4Bip, который ингибирует тирозиназу – ключевой фермент в синтезе меланина. Будучи восстановленным соединением H4Bip легко окисляется кислородом воздуха. Окисление сопровождается образованием свободных радикалов птеринов и пероксида водорода (H₂O₂), при этом возникает сильный окислительный стресс.

Для лечения витилиго применяют УФ-фототерапию (308 и 311 нм), которая является наиболее успешным методом лечения витилиго. Нами была предложена гипотеза, согласно которой главной мишенью УФ-излучения является H4Bip. Было доказано образование димеров дигидроптерина ((H₂Ptp)₂) при УФ-фотоокислении H4Bip и показано, что спектр действия их образования лежит в области 300-325 нм.

С помощью квантово-химических расчетов мы оценили возможность протекания реакций окисления H4Bip в темноте и образование димеров дигидроптерина при действии УФ облучения. Для моделирования окислительного стресса методом флуоресценции была проведена окислительная модификация сывороточного альбумина человека (САЧ) в присутствии H4Bip и рассчитано содержание фракции окисленного белка (ФОБ). Установлено, что в белке происходит сильная окислительная модификация аминокислот (ФОБ 0,64) в присутствии H4Bip. При УФ-облучении системы (САЧ + H4Bip) ФОБ снижается до 0,39. По-видимому, при УФ облучении часть H4Bip трансформируется в димеры дигидроптерина и не участвует в окислительной модификации белка. Данные об окислительной модификации САЧ согласуются с данными динамического светорассеяния: H4Bip способствует агрегации САЧ с образованием частиц с гидродинамическим радиусом $R_h \geq 2000$ нм, которые могут стать иммуногенными.

С целью оптимизации УФ-фототерапии нами было предложено использовать УФ излучение в области 325 nm, поскольку при этом меньше будут повреждаться белки. Среди источников УФ для целей фототерапии витилиго нами предложены светодиодные источники, которые можно сконструировать в виде LED-матрицы по размеру поврежденного участка кожи и обеспечить необходимую дозу облучения.

Публикации:

1. Телегина Т.А., Вечтомова Ю.Л., Крицкий М.С., Низамутдинов А.С., Мадиров Э.И., Макарова Д.А., Буглак А.А. Фотоокисление тетрагидробиоптерина как основа фототерапии витилиго. // **Оптика и спектроскопия**. 2022. 130(5):761-767.
2. Buglak AA, Kapitonova MA, Vechtomova Y.L., Telegina T.A. Insights into Molecular Structure of Pterins Suitable for Biomedical Applications. // **Int. J. Mol. Sci.** 2022. 23(23):15222.
3. Telegina, T.A.; Vechtomova, Y.L.; Borzova, V.A.; Buglak, A.A. Tetrahydrobiopterin as a Trigger for Vitiligo: Phototransformation during UV Irradiation. // **Int. J. Mol. Sci.** 2023. 24(17):13586.

РОЛЬ ОСМОЛИТОВ И МЕМБРАННЫХ ЛИПИДОВ В АДАПТАЦИИ АЦИДОФИЛЬНЫХ ГРИБОВ

Януцевич Е.А.¹, Данилова О.А.¹, Грум-Гржимайло О.А.^{2,3}, Терёшина В.М.¹

¹ ИНМИ ФИЦ биотехнологии РАН

² Беломорская биологическая станция им. Н.А. Перцова, Биофак, МГУ им. М.В.Ломоносова

³ Лаб. генетики, группа изучения растений, Университет Вагенингена, Нидерланды

Считается, что основным механизмом адаптации к кислым условиям среды является поддержание уровня внутриклеточного pH при помощи водородных помп. Нами было высказано предположение об участии осмолитов и мембранных липидов в защите цитоплазматической мембраны от агрессивной кислой среды. Ранее мы впервые показали, что в мицелии ацидофильного базидиомицета *Sistotrema brinkmannii* содержится большое количество трегалозы. Для доказательства участия осмолитов в адаптации ацидофильных грибов мы изучили состав осмолитов и мембранных липидов еще у двух грибов: базидиомицета *Phlebiopsis gigantea* и аскомицета *Mollisia* sp. в динамике роста при оптимальных условиях (pH 4.0) и на границах диапазона роста (pH 2.6; 5.0 либо 6.0). Оба гриба относятся к облигатным ацидофилам (оптимум роста при pH 4.0 и отсутствие роста при pH 7.0). Было показано, что и у *P. gigantea*, и у *Mollisia* sp. трегалоза является одним из основных осмолитов, наряду с полиолами, на всех стадиях роста в оптимальных условиях (pH 4.0), что подтверждает участие осмолитов в адаптации к кислым условиям среды. Фосфатидные кислоты, наряду с фосфатидилэтаноламинами, фосфатидилхолинами и стеринами доминируют в составе мембранных липидов у обоих грибов, что также указывает на их роль в экстремофилии. Культивирование *P. gigantea*, имеющего узкий оптимумом роста при pH 4.0, на границах диапазона при pH 2.6 и 5.0 приводит к резкому снижению скорости роста, что сопровождается снижением уровня осмолитов и существенными изменениями в составе мембранных липидов. Напротив, у *Mollisia* sp. с широким диапазоном роста (pH 3.0–5.0) количество осмолитов или не меняется (при pH 6.0), или возрастает (при pH 2.6), при этом изменения в составе мембранных липидов незначительны, что подтверждает наше предположение о взаимосвязи изменений в мембранной и осмолитной системах грибов в ответ на стрессорные воздействия. В совокупности полученные данные доказывают участие осмолитов и мембранных липидов в адаптации ацидофилов.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-74-00040.

Публикации:

1. Януцевич Е.А., Данилова О.А., Грум-Гржимайло О.А., Гроза Н.В., Терёшина В.М. Адаптация ацидофильного гриба *Sistotrema brinkmannii* к pH фактору // **Микробиология**. 2023. V. 92. № 3. P. 279–288. Doi:10.31857/S0026365622600870
2. Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo O.A., Tereshina V.M. The Role of osmolytes and membrane lipids in the adaptation of acidophilic fungi // **Microorganisms**. 2023. V. 11. № 7. Art. 1733. P.1–15. Doi: 10.3390/microorganisms11071733

ТОКСИН-АНТИТОКСИНОВЫЙ МОДУЛЬ *VapBC* АКТИВИРУЕТСЯ В ПРИСУТСТВИИ ТЕТРАЦИКЛИНА И СПОСОБСТВУЕТ ПОВЫШЕНИЮ ВЫЖИВАЕМОСТИ КЛЕТОК *M. SMEGMATIS*

Замахаев М.В.¹, Беспятых Ю.А.², А.В. Гончаренко А.В.¹, Шумков М.С.¹

¹ ИИБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА

Токсин-антитоксиновые (ТА) системы широко распространены в бактериальных геномах. Так, например, *Mycobacterium smegmatis* – модельный организм для изучения физиологии возбудителя туберкулёза *Mycobacterium tuberculosis* – имеет 8 ТА-локусов, в том числе системы *vapBC* и *mazEF*, изучение физиологического значения которых стало целью данного исследования. В ходе экспериментальных работ был проведён анализ данных протеомного профилирования образцов культур *M. smegmatis* с гиперэкспрессией токсина *VapC* в контексте перестройки метаболических процессов; также было изучено участие гиперэкспрессии токсина *VapC* в стрессовом ответе клеток *M. smegmatis* на тепловой шок и введение в среду культивирования антибиотиков. В ходе экспериментов оценивалась чувствительность к антибиотикам штаммов с делецией локусов *vapBC*, *mazEF*, а также двойных делеционных мутантов $\Delta vapBC \Delta mazEF$. Результаты количественного протеомного анализа полученных белковых профилей, показывают, что гиперэкспрессия токсина *VapC* в клетках *M. smegmatis* вызывает перенаправление белкового синтеза в сторону уменьшения количества ферментов, участвующих в катаболизме углеводов, сопровождающееся накоплением белков, участвующих в процессах, связанных с окислительным стрессом и общими стрессовыми реакциями. Далее было установлено, что такая активация общей реакции на стресс приводит к повышению термоустойчивости клеток *M. smegmatis* при 70 °С, но не влияет на чувствительность к ципрофлоксацину и изониазиду. Однако через 24 ч культивирования с тетрациклином у штамма с делецией локуса *vapBC* наблюдалось значительное снижение количества КОЕ – на 2 порядка. В то же время штамм с двойной делецией ($\Delta vapBC \Delta mazEF$) восстановил фенотип дикого типа, поскольку гибель культуры, наблюдаемая при делеции *vapBC* и вызываемая бактерицидной активностью токсина *MazF* была устранена. Через 48 ч воздействия тетрациклина значимость системы *mazEF* проявилась еще сильнее: в культурах $\Delta vapBC \Delta mazEF$ наблюдалась не только реверсия фенотипа $\Delta vapBC$ к дикому типу, но и более высокая выживаемость бактериальных культур в присутствии этого антибиотика. Аналогичный уровень значения КОЕ наблюдался у штамма $\Delta mazEF$. Проведённое в дальнейшем определение уровней экспрессии генов *vapC* и *mazF* в условиях культивирования в присутствии тетрациклина продемонстрировало, что уровень экспрессии гена *vapC* увеличился примерно в 21 раз после 2 ч инкубации с тетрациклином, а уровень экспрессии гена *mazF* – почти в 117 раз. Данный результат указывает на индуцируемую природу увеличения уровней экспрессии токсинов *VapC* и *MazF* после введения тетрациклина и свидетельствует также о том, что судьба клетки в данных стрессовых условиях зависит от взаимодействия соответствующих ТА-систем.

Публикация:

Zamakhaev M., Bespyatykh J., Goncharenko A., Shumkov M. The Benefits of Toxicity: *M. smegmatis* *VapBC* TA Module Is Induced by Tetracycline Exposure and Promotes Survival. **Microorganisms**. 2023; 11(12):2863. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122863>

ДИСПЕРСНЫЕ ПОВТОРЫ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГЕНОМАХ

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

ИНБ ФИЦ Битехнологии РАН

Мы разработали новый метод (IP метод) поиска дисперсных повторов в разнообразных геномах (Korotkov et al. 2023). Этот метод позволяет найти дисперсные повторы в любом геноме в том случае, когда среднее число замен между любыми двумя повторами в расчета на одно основание (x) ДНК будет меньше 1.7. Все ранее разработанные методы поиска дисперсных повторов (RED, RECON или Repeat_masker и многие другие) могут найти дисперсные повторы только для $x \leq 1.0$. Это означает, что впервые появилась возможность проверить существование семейств повторов в интервале $1.0 \leq x \leq 1.7$ в прокариотических геномах. Мы применили IP метод для поиска дисперсных повторов в геномах 39 бактерий случайно выбранных из всех известных типов (phyla) бактерий. Полученные результаты показывают, что геном каждой из изученных бактерий содержат сильно дивергировавшее семейство повторов с числом копий от 103 для генома *Spiroplasma poulsonii* до 14383 для генома *Gemmata obscuriglobus*. Повторы занимают от 30% до 60% бактериальных геномов и более 90% повторов наложены как мотив на кодирующие последовательности. Длины найденных дисперсных повторов лежат в интервале от 450 до 580 оснований в зависимости от генома бактерии. Поиск повторов в случайно перемешанных геномах показал, что число ложных позитивов для полученных результатов менее 1%.

Мы сформировали также консенсусные последовательности для повторов из каждой бактерии при помощи программы Weblogo. Эти консенсусы показывает, что обнаруженные повторы внутри семейства слабо подобны друг другу, но в них встречается достаточно много небольших участков длиной 3-5 оснований или отдельных позиций, где наблюдается почти 100% подобие. Можно сказать, что повторы содержат консервативные островки которые чередуются слабо подобными районами.

Мы предполагаем, что найденные в работе дисперсные повторы могут быть участками связывания различных нуклеоид-ассоциированных белков и способствовать свертке бактериальной ДНК в nucleoid (Verma et al. 2019). Также можно думать, что обнаруженные семейства повторов могут принимать участие в создании жидкокристаллической структуры в составе ДНК бактерии (Yevdokimov et al. 2009).

Публикация:

Korotkov E, Suvorova Y, Kostenko D, Korotkova M. 2023. Search for Dispersed Repeats in Bacterial Genomes Using an Iterative Procedure. *Int J Mol Sci* 24: 10964. <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/13/10964/html>

КОМБИНИРОВАННЫЙ ГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ СУЛЬФИДНОГО ЗОЛОТОСОДЕРЖАЩЕГО КОНЦЕНТРАТА

Булаев А.Г.¹, Бодуэн А.Я.², Меламуд В.С.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² АО «НПО «РИВС»

Реакторное биоокисление сульфидных концентратов и автоклавное окисление широко используются для предварительной обработки упорных сульфидных концентратов и повышения извлечения золота цианированием. Непрерывное реакторное биоокисление требует сравнительно длительного времени пребывания (несколько суток), однако в некоторых случаях оно не может обеспечить эффективного окисления некоторых сульфидных минералов. Автоклавное окисление обеспечивает окисление за короткое время пребывания. В то же время, если перерабатываемый концентрат содержит большое количество сульфидной серы, это вынуждает снижать плотность пульпы (содержание твердой минеральной фазы в выщелачивающем растворе) при проведении автоклавного окисления и ограничивает его экономическую привлекательность.

В настоящей работе были проведены лабораторные испытания для изучения проблем, связанных с обоими методами обработки упорных сульфидных золотосодержащих концентратов. Исследовали применение реакторного биоокисления и автоклавного окисления на основе на примере пирит-арсенопиритового золотосодержащего концентрата. Извлечение золота из необработанного концентрата цианированием достигала 58%. Непрерывное биоокисление в течение 2, 4 и 6 сут обеспечило окисление 43, 74 и 79% сульфидной серы (Ss) соответственно. Извлечения золота из продуктов биоокисления (биокеков) составило 68, 82 и 88% соответственно. Автоклавное окисление как необработанного концентрата, так и доокисление биокека позволило окислить 97–99% Ss и достичь извлечения золота 96–97%. При этом биоокисление в течение 2 сут позволило снизить содержания Ss и увеличить плотность пульпы для автоклавного окисления.

Таким образом, было показано, что комбинированный процесс позволил повысить эффективность предобработки золотосодержащего концентрата, так как стадия автоклавного окисления обеспечивает высокое извлечения золота, а при применении комбинированной технологии (биоокисление и доокисление биокека) обеспечило получение продукта с оптимальным содержанием Ss для дальнейшего окисления в автоклаве.

Публикация:

Boduen A., Zalesov M., Melamud V., Grigorieva V., Bulaev A. Combined bacterial and pressure oxidation for processing high-sulfur refractory gold concentrate // **Processes**. 2023. V. 11. № 11. Art. 3062. P. 1–14. Doi: 10.3390/pr11113062

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ/СОПОЛИМЕРИЗАЦИЯ АНИЛИНА И 3-АМИНОБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ В ГЛУБОКОМ ЭВТЕКТИЧЕСКОМ РАСТВОРИТЕЛЕ

И.С. Васильева, О.В. Морозова, Г.П. Шумакович, А.И. Ярополов

ИНБИ ФИЦ биотехнологии РАН

Глубокие эвтектические растворители (ГЭР) могут компенсировать недостатки традиционных органических растворителей и ионных жидкостей и отвечают требованиям «зеленой» химии. Однако потенциал их использования как среды для проведения биокаталитических реакций изучен недостаточно. В настоящей работе ГЭР бетаин глицерин (молярное соотношение 1:1) был использован в качестве соразтворителя для ферментативной матричной полимеризации/сополимеризации анилина (АНИ) и 3-аминобензойной кислоты (ЗАБК). Лакказа базидиального гриба *Trametes hirsuta* являлась катализатором, а атмосферный кислород служил окислителем. Были получены интерполиэлектролитные комплексы гомополимеров полианилина (ПАНИ), поли(3-аминобензойной кислоты) (ПЗАБК) и сополимера поли(анилин-со-3-аминобензойная кислота) (П(АНИ-ЗАБК)) на пленкообразующей матрице полистиролсульфоната натрия (ПСС). Физико-химические характеристики комплексов полимер/ПСС были изучены методами УФ-видимой, ИК-спектроскопии и циклической вольтамперометрии. Исследования методом атомно силовой микроскопии показали, что комплекс ПАНИ/ПСС имел гранулярную форму, П(АНИ-ЗАБК)/ПСС – сферическую, а (ПЗАБК)/ПСС – веретенообразную форму. Сополимер по сравнению с гомополимерами показал большую антимикробную активность в отношении *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Кроме того, интерполиэлектролитные комплексы ПАНИ/ПСС и П(АНИ-ЗАБК)/ПСС являлись высокоэффективными антистатическими агентами, и могут быть использованы также для создания антистатических покрытий.

Публикации:

Vasil'eva, O. Morozova, G. Shumakovich and A. Yaroplov. Betaine-Based Deep Eutectic Solvent as a New Media for Laccase-Catalyzed Template-Guided Polymerization/Copolymerization of Aniline and 3-Aminobenzoic Acid. // **International Journal of Molecular Sciences**. 2022. V. 23. № 19. Article number: 11409. <https://doi.org/10.3390/ijms231911409>

ЛИНИЯ КЛЕТОК CHO 4BGD С НОКАУТАМИ ГЕНОВ BAK1, BAX, DHFR, GLUL (GS) И ОВЕРЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНОВ BCL-2, BECLIN-1 РЕЗИСТЕНТНА К ИНДУКЦИИ АПОПТОЗА, СКЛОННА К АУТОФАГИИ И ОБЕСПЕЧИВАЕТ БОЛЬШОЙ ТИТР РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Воробьев И.И., Синегубова М.В., Колесов Д.Э., Ходак Ю.А., Орлова Н.А.

ИНБ ФИЦ Биотехнологии РАН,

Направленное редактирование генома культивируемых клеток млекопитающих при помощи системы CRISPR/Cas позволяет быстро получить родительские клетки с улучшенными ростовыми свойствами для последующего создания более продуктивных клеток-продуцентов биофармацевтических белков. При помощи двух последовательных раундов редактирования генома клеток китайского хомячка (CHO) и клонирования клеток мы получили линию CHO 4BGD с нокаутом проапоптотических генов *bak1* и *bax*, нокаутом двух генов потенциальных селекционных маркеров – глутаминсинтазы (*glul*, *gs*) и дигидрофолатредуктазы (*dhfr*). Одновременно с вторым раундом редактирования генома в клетки были введены дополнительные копии генов антиапоптотического белка Bcl-2 и индуктора макроаутофагии Beclin-1 [1,2] под контролем конститутивного промотора EEF1A1.

По данным полногеномного секвенирования, все восемь целевых аллелей в геноме клеток 4BGD были успешно разрушены при редактировании, при этом два отредактированных локуса содержали большие вставки нерелевантной ДНК, происходящей из другой хромосомы CHO, из плазмиды, кодирующей нуклеазу Cas9, и из генома *E. coli*. В геноме 4BGD отсутствовали иные вставки ДНК *E. coli*, а все известные гены CHO сохранились в неповрежденном состоянии. Практически не было обнаружено событий нецелевого редактирования генома для всех использованных гидовых РНК.

Клетки 4BGD приобрели желаемый фенотип: они полностью устойчивы к индукции внутреннего пути апоптоза и пригодны для получения стабильно трансфицированных клеток с селекционным маркером DHFR, в них, в отличие от клеток с инактивацией одного аллеля *dhfr*, проходит амплификация трансгена под воздействием повышающихся концентраций метотрексата. Полученная на основе 4BGD клональная линия-продуцент моноклональных антител живет в режиме культивации с подпиткой (fed batch) на 6 дней дольше, чем аналогичный продуцент на основе интактных клеток CHO S.

Клетки 4BGD не демонстрировали заметного увеличения уровней экспрессии Bcl-2 и Beclin-1 в экспоненциальной фазе роста, однако при их продолжительном культивировании наблюдается сильное повышение уровня экспрессии Bcl-2 и сохранение уровня экспрессии Beclin-1, а также увеличение уровня основного маркера аутофагии – липидизированной формы белка LC-3. Уровни экспрессии генов, связанных с индукцией аутофагии и внутреннего пути апоптоза в клетках 4BG, также значительно отличались от родительских клеток.

Метод, включающий мультиплексное редактирование системой CRISPR/Cas9 и одновременную стабильную трансфекцию плазмидами, кодирующими гены для оверэкспрессии, позволяет получать клетки желаемого фенотипа, не содержащие значимых нецелевых изменений генома, и пригоден для быстрого получения клеток CHO с желаемыми свойствами для биофармацевтических приложений.

Публикации:

1. Orlova NA, Dayanova LK, Gayamova EA, Sinegubova MV, Kovnir SV, Vorobiev II. Targeted Knockout of the *dhfr*, *glul*, *bak1*, and *bax* Genes by the Multiplex Genome Editing in CHO Cells. **Dokl Biochem Biophys**. 2022;502(1):40-44. <https://doi.org/10.1134/S0003683823080057> doi: 10.1134/S1607672922010082. (Russian version)
2. Kovnir SV, Dayanova LK, Gayamova EA, Dybovsky LN, Vorobiev II, Orlova NA. Knockout of BAX, BAK1 Genes and Overexpression of BCL2, BECN1 Genes Increase Lifespan and Maximum Density of CHO-S Cell Culture. **Biotechnology**. 2022;38(4):16-22. (In Russ). doi:10.56304/S0234275822040081.

ОПТИМИЗАЦИЯ БИОСИНТЕЗА АДПИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ ПО ОБРАЩЕННОМУ β -ОКИСЛЕНИЮ ЖИРНЫХ КИСЛОТ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *ESCHERICHIA COLI*

Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г.

ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН

Адипиновая кислота относится к веществам “строительным блокам”, способным служить удобными предшественниками в последующем синтезе широкого спектра промышленно-значимых соединений, обладающих высокой добавленной стоимостью. Востребованными производными соответствующего карбоксилата являются не только смазочные материалы, пластификаторы и фармацевтические субстанции, но и компоненты искусственных волокон. Так, большая часть адипиновой кислоты, ежегодно производящейся в объемах превышающих 3,5 миллиона тонн, используется для получения нейлона-6,6. В настоящее время производство адипиновой кислоты основывается на нефтехимическом синтезе с использованием бензола в качестве предшественника. Однако, она может быть получена из возобновляемого сырья в результате микробиологического синтеза, основанного на принципе функционального обращения биохимических реакций β -окисления, включающих, в том числе, реакции деградации фенилацетата и жирных кислот.

В настоящей работе, клетки *E. coli* были подвергнуты направленной инженерии с целью обеспечения конверсии глюкозы в целевое соединение по обращенному пути β -окисления жирных кислот (БОЖК) с последующей оптимизацией биосинтетических характеристик базового рекомбинанта. В качестве исходного использован ранее сконструированный штамм BOX3.3 $\Delta 4 P_{trc-id-4}$ -*fabI* (*E. coli* MG1655 *lacI*^o, Δ *ackA-pta*, Δ *proxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, P_L -SD _{ϕ 10}-*atoB*, $P_{trc-ideal-4}$ -SD _{ϕ 10}-*fadB*, Δ *fadE*, P_L -SD _{ϕ 10}-*tesB*, Δ *yciA*, $P_{trc-ideal-4}$ -SD _{ϕ 10}-*fabI*), лишенный путей смешанно-кислотного брожения и способный к формированию масляной кислоты из глюкозы по обращенному БОЖК. Биосинтез адипиновой кислоты штаммом на уровне 0,1 мМ обеспечен при первичной конденсации ацетил-КоА и сукцинил-КоА под действием 3-оксоацил-КоА-тиолазы PaaJ. Инактивация сукцинил-КоА-синтазы, в результате делеции генов *sucCD*, не повышала внутриклеточной доступности сукцинил-КоА для целевых биосинтетических реакций и не приводила к росту накопления рекомбинантом адипата. При инактивации глиоксилатного шунта, за счет делеции генов *aceBAK* оперона и *glcB*, синтез адипиновой кислоты рекомбинантом повышался в три раза и достигал 0,33 мМ. Интенсификация ЦТК за счет усиления анаплеротического формирования щавелевоуксусной кислоты из фосфоенолпирувата, в результате повышения экспрессии гена фосфоенолпируваткарбоксилазы, *pps*, приводила к росту синтеза адипиновой кислоты в 1,2 раза до 0,39 мМ. Обеспечение возможности формирования щавелевоуксусной кислоты из пировиноградной, при введении в штамм пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis*, приводило к интенсификации цикла в 1,5 раза и сопровождалось ростом секреции адипиновой кислоты до 0,49 мМ. Последующая инактивация в штамме сукцинатдегидрогеназы, при делеции генов *sdhAB*, повышала секрецию целевого соединения до 0,52 мМ.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 22-14-00040).

Публикации:

1. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. Эффект инактивации глиоксилатного шунта на биосинтез адипиновой кислоты штаммами *Escherichia coli* по обращенному β -окислению жирных кислот // **Прикладная биохимия и микробиология**, 2023, Т. 59, №3, С. 235-243.
2. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. Эффект интенсификации цикла трикарбоновых кислот на биосинтез адипиновой кислоты штаммами *Escherichia coli* по обращенному β -окислению жирных кислот // **Прикладная биохимия и микробиология**, 2024, Т. 60, №3. Принято к печати.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ «ГОРЯЧИХ ТОЧЕК» ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ СОЗРЕВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА moxSAASoti ПРИ 37 °С

Марынич Н.К.¹, Савицкий А.П.^{1,2}

1 ИНБИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

2 Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

SAASoti-бифотохромный GFP-подобный белок. Он обладает одновременно двумя типами фотопревращений: обратимым фотопереключением (переход между флуоресцирующим и нефлуоресцирующим состояниями) и необратимой фотоконверсией (переход из зеленого в красное флуоресцирующее состояние). Созревание флуоресцентных белков – сложный процесс, объединяющий экспрессию, фолдинг белка и автокаталитическое формирование хромофора. Поскольку все известные на сегодняшний день GFP-подобные белки выделены из морских организмов (кораллов или медуз), для большинства из них нормальная физиологическая температура созревания находится около 20 °С. Оптимизация созревания GFP-подобных белков в клетках млекопитающих является важной задачей, однако рациональный поиск аминокислотных остатков представлен нечасто. В большинстве случаев это свойство приобретает белками в результате многих циклов случайного мутагенеза. Интересной задачей является обнаружение «горячих точек», т.е. положений в аминокислотной последовательности, которые влияют на процесс созревания moxSAASoti при 37 °С. Нам удалось найти два положения – 74 и 125, которые, очевидно, влияют на процесс созревания moxSAASoti, что было проверено путем введения замен в эти положения сайт направленным и сайт-насыщающим мутагенезами. При сравнении с подобными белками, созревающими при 37°С, удалось выделить определенные группы вокруг положений, замены в которых повлияли на созревание SAASoti, что свидетельствует о взаимодействии аминокислотных остатков в определенных областях в бочонке, отвечающих за фолдинг и созревание при 37°С, причем каждая из замен изменяет взаимодействие между аминокислотными остатками. Можно предположить, что при подборе замены необходимо также анализировать область контактов аминокислотного остатка и сравнивать с контактами в «успешных» белках подобного типа.

Публикация:

Марынич Н.К., Савицкий А.П. Определение «горячих точек» для улучшения созревания флуоресцентного белка moxSAASoti при 37 °С // **Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.** 2024. Т. 65. № 3. С. 255–261 (принято к публикации).

ВЫСОКООЧИЩЕННЫЕ ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ КЛЕТОЧНЫЕ ЧЕХЛЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ МАТРИЦЫ В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Мулюкин А.Л.¹, Данилевич В.Н.², Козлов С.А.², Сорокин В.В.¹

¹ ИНМИ, ФИЦ Биотехнологии РАН

² ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Неэффективная экстракция ДНК из микробных клеток с прочными оболочками (ряда грамположительных бактерий, покоящихся форм, грибов) ограничивает результативность их выявления с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Многие методы, используемые для эффективного выделения ДНК из таких микроорганизмов, являются дорогостоящими и предусматривают использование большого количества стадий и реагентов. Поэтому практичными и востребованными для молекулярно-генетических исследований множества проб являются простые, быстрые и экономичные подходы к получению высокоочищенных и пригодных для ПЦР образцов ДНК. Один из них основан на получении чехлов из микробных клеток, содержащих внутри ДНК, за счет кипячения биомассы в растворах хаотропных агентов, отмывок и ферментативной обработки. Хотя применение этого подхода обеспечивало повышение чувствительности ПЦР-детекции для широкого круга микроорганизмов, требовались вариации пробоподготовки или включение дополнительных процедур пробоподготовки. В наших исследованиях была решена задача подбора новых лизирующих смесей для быстрого получения образцов ДНК, пригодных для ПЦР, из различных грибов и бактерий, в том числе, важных объектов клинической диагностики. Наиболее эффективным для получения высокоочищенных ДНК-содержащих чехлов из грибных клеток было краткосрочное кипячение биомассы в щелочной смеси на основе мочевины с додецилсульфатом натрия, аммиаком и цитратом натрия. Действие этой смеси приводило к деструктивным изменениям с разрыхлением и утратой целостности клеточных стенок и образованию обширных пор, достаточных для выхода из клеток денатурированных белков, РНК и других компонентов, и к истощению пула биогенных элементов. Высокая степень очистки ДНК-содержащих чехлов от примесей была необходимым условием успешности ПЦР для всех исследованных штаммов грибов, в том числе, клинических изолятов. Разработанный метод получения высокоочищенных образцов ДНК отличается (1) быстротой; (2) отсутствием необходимости в дорогостоящих и токсичных реагентах и в дополнительной обработке ферментами; (3) возможностью работы одновременно с большим количеством образцов, и может найти применение в молекулярно-генетической диагностике.

Публикация:

Danilevich V.N., Kozlov S.A., Sorokin V.V., Mulyukin A.L. Highly purified DNA-containing cell envelopes from fungi for direct use in PCR // *Anal. Chim. Acta.* 2023. V. 1273. e:341528. doi: 10.1016/j.aca.2023.341528

СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СВЕТОСОБИРАЮЩЕГО КОМПЛЕКСА LH2 ИЗ ПУРПУРНОЙ СЕРНОЙ БАКТЕРИИ *ECTOTHIORHODOSPIRA HALOALKALIPHILA*

Бойко К.М.¹, Бурцева А.Д.¹, Баймухаметов Т.Б.², Ашихмин А.А.³, Попов В.О.¹

¹ ИНБИ ФИЦ Биотехнологии РАН,

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,

³ Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Фотосинтез - это глобальный биосферный процесс, в ходе которого происходит преобразование энергии солнечного света в энергию химических связей органических соединений, от которых зависит большинство живых форм на Земле. Фотосинтезирующие бактерии обладают одной из наиболее простых и стабильных систем для сбора и эффективной трансформации солнечной энергии по сравнению с другими фотосинтезирующими организмами. Основой фотосинтетического аппарата бактерий являются светособирающие комплексы, которые поглощают энергию квантов солнечного света и переводят ее в энергию электронного возбуждения с последующей передачей этой энергии на реакционные центры, где происходит первичное запасание энергии в виде энергии разделенных зарядов.

Фотосинтетический аппарат пурпурных бактерий расположен во внутренней цитоплазматической мембране, и, как правило, включает в себя реакционный центр и два светособирающих комплекса, LH1 и LH2. Комплексы LH1 и LH2 построены по универсальному модульному принципу из одинаковых субъединиц, каждая из которых состоит из двух низкомолекулярных полипептидов, бактериохлорофилла и каротиноидов. При этом пространственная архитектура таких комплексов играет определяющую роль в их функционировании. К настоящему моменту описан ряд структур комплексов LH2 из пурпурных несерных бактерий, однако для такого комплекса из пурпурных серных бактерий структурные данные высокого разрешения неизвестны.

В настоящей работе методом криоэлектронной микроскопии установлена пространственная структура комплекса LH2 из пурпурной серной бактерии *E. Haloalkaliphila* с наивысшим для таких комплексов разрешением – 1.7Å и проведен сравнительный анализ полученных структурных данных. В частности, достигнутое разрешение позволило однозначно идентифицировать гены, полипептидные продукты которых являются компонентами данного комплекса.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-74-00062.

Публикации:

А.Д. Бурцева, Т.Н. Баймухаметов, И.О. Илясов, М.А. Большаков, А.А. Москаленко, К.М. Бойко, А.А. Ашихмин. Исследования структуры светособирающего пигмент-белкового комплекса LH2 из пурпурной серной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* методом криоэлектронной микроскопии. **Кристаллография**, 2023, том 68, № 6, с. 882–888

ФОРМАТ КОНФЕРЕНЦИИ

12 февраля – весь день в режиме офлайн,

13 и 14 февраля – председатели и докладчики в режиме офлайн, слушатели – по желанию.

Место проведения

12-13 февраля – зал ФИЦ (в ИНМИ, пр-т 60-летия Октября)

14 февраля – зал ИНБИ (Ленинский пр-т)

порядок выступления	Ин-т	Фамилия, имя отчество докладчика	доклад	Лаборатория/группа	Время
12 февраля, понедельник (конференц-зал ФИЦ, ИНМИ)					
Открытие Конференции					
1	ИНМИ	Летаров Андрей Викторович	Структура вирусной частицы бактериофага E. coli DT57C	Лаборатория вирусов микроорганизмов	10-40 - 11-00
2	ИНБИ	Макаров Вадим Альбертович	Новый класс ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы ВИЧ-1, проникающих через гематоэнцефалический барьер	Лаборатория биомедицинской химии	11-00 - 11-20
3	ИНБ	Прохорчук Егор Борисович	Рюриковичи: первый опыт реконструкции генетического облика правящего рода средневековой Руси по данным палеогеномики	Лаборатория геномики и эпигеномики позвоночных	11-20 - 11-40
4	ИНБИ	Юркова Мария Сергеевна	Nis-метки для встраивания внутрь полипептидной цепи	Лаборатория молекулярной биотехнологии	11-40 - 12-00
5	ИНБ	Кочиева Елена Зауровна	Достижения ФИЦ в геномном редактировании растений	Лаборатория системной биологии растений	12-00 - 12-20
6	ИНМИ	Гаврилов Сергей Николаевич	Родственные мультигеновые цитохромы обеспечивают железное и серное дыхание натронофильной бактерии <i>Dethiobacter alkaliphilus</i> и адаптацию к различным геохимическим условиям среды	Лаборатория метаболизма экстремофильных прокариот	12-20 - 12-40
7	ИНБИ	Агафонов Михаил Олегович	Система с разделенным маркером для CRISPR-Cas9 редактирования геномов метилотрофных дрожжей	Группа геномного редактирования промышленных микроорганизмов, Лаборатория молекулярной генетики	12-40 - 13-00
8	ИНМИ	Ошкин Игорь Юрьевич	Синтез каротиноидов метанотрофами рода <i>Methylomonas</i> : геномный потенциал и компоненты спектра продуцируемых пигментов	Лаборатория молекулярной экологии и филогеномики бактерий	13-00 - 13-20
Перерыв до 13-50					
9	ИНБ	Жуйкова Юлия Владимировна	Разработка смесевых композиционных материалов на основе полисахарида и полиэфира, исследование их физико-химических свойств и биосовместимости in vitro	Лаборатория инженерии биополимеров	13-50 - 14-10
10	ИНМИ	Подсокорская Ольга Андреевна	Новые и хорошо известные представители Verrucomicrobiota: на пути от теории к практике	Лаборатория метаболизма экстремофильных прокариот	14-10 - 14-30
11	ИНБИ	Румянцев Борис Вадимович	Интеллектуальная обработка данных при выращивании сельскохозяйственных культур в контролируемых климатических условиях автоматизированной городской фермы (сити-фермы)	Группа альгобиотехнологии	14-30 - 14-50
12	ИНМИ	Пелевина Анна Витальевна	Действие различных физико-химических факторов на активность фосфат-аккумулирующих бактерий в лабораторных биореакторах, имитирующих промышленные очистные сооружения	Лаборатория реликтовых микробных сообществ	14-50 - 15-10
13	ИНБИ	Нефёдова Виктория Викторовна	Новые кардиомиопатические мутации: от генетических до биохимических и физиологических исследований	Лаборатория структурной биохимии белка	15-10 - 15-30
14	ИНМИ	Кевбрин Вадим Владимирович	Выделение и описание новых галоалкалофильных бактерий, способных к разложению бетаина, полиолов и этаноламина	Лаборатория реликтовых микробных сообществ	15-30 - 15-50

порядок выступления	Ин-т	Фамилия, имя отчество докладчика	доклад	Лаборатория/группа	Время
13 февраля, вторник (конференц-зал ФИЦ, ИНМИ)					
16	ИНМИ	Николаев Юрий Александрович	Механизмы и морфотипы длительного выживания бактерий в силанольно-гуматных гелях	Лаборатория выживаемости микроорганизмов	10-30 - 10-50
17	ИНБ	Степанова Наталия Вячеславовна	Фотохимическая активность формирующихся семядолей гороха (<i>Pisum sativum</i> L.) в зависимости от спектрального состава света	Группа биоинженерии растений	10-50 - 11-10
18	ИНБИ	Шумаев Константин Борисович	Динитрозильные комплексы железа с гистидиновыми и тиоловыми лигандами: антиоксидантные и антирадикальные свойства	Лаборатория биохимии азотфиксации и метаболизма азота	11-10 - 11-30
19	ИНМИ	Лунина Ольга Николаевна	Аноксигенные фототрофные бактерии стратифицированных водоемов, отделяющихся от Белого моря	Лаборатория микробиологии и биогеохимии водоемов	11-30 - 11-50
20	ИНБ	Васягин Егор Аркадьевич	Улучшение характеристик дрожжей, используемых в отечественном виноделии, с помощью геномного редактирования	Лаборатория систем молекулярного клонирования и Лаборатория геномики микроорганизмов и метагеномики	11-50 - 12-10
21	ИНБИ	Сотников Дмитрий Васильевич	Возможности и проблемы антител, иммобилизованных на наночастицах золота	Лаборатория иммунобиохимии	12-10 - 12-30
22	ИНМИ	Соколова Дияна Шамилевна	Метагеномный анализ микроорганизмов нефтяных пластов с высокоминерализованной пластовой водой и их биотехнологический потенциал	Лаборатория нефтяной микробиологии	12-30 - 12-50
23	ИНБИ	Пометун Анастасия Александровна	Получение и функциональная характеристика белков лактобактерий, синтезирующихся в ответ на действие патогенных организмов	Лаборатория молекулярной инженерии	12-50 - 13-10
Перерыв до 13-40					
24	ИНМИ	Журавлева Елена Александровна	Интенсификация процесса анаэробного сбраживания органических отходов за счет стимуляции прямого межвидового переноса электронов между синтрофными бактериями и метаногенными археями	Лаборатория микробиологии антропогенных местообитаний	13-40 - 14-00
25	ИНБ	Жгун Александр Александрович	Грибы-деструкторы темперной живописи, изолированные в Государственной Третьяковской галерее: использование их биотехнологического потенциала и разработка антисептиков	Группа генетической инженерии грибов	14-00 - 14-20
26	ИНМИ	Миронов Владимир Витальевич	Деградация полилактида различной структуры в условиях контролируемого компостирования с участием микромицетов из рода <i>Aspergillus</i> и бактерий из рода <i>Lysinibacillus</i> и <i>Bacillus</i>	Группа микробных процессов конверсии органических отходов	14-20 - 14-40
27	ИНБИ	Шашин Денис Максимович	Влияние фотодинамической инактивации на жизнеспособность <i>Mycobacterium tuberculosis</i> и белковый профиль покоящихся форм <i>Mycobacterium smegmatis</i> , содержащих эндогенные порфирины	Лаборатория биохимии стрессов микроорганизмов	14-40 - 15-00
28	ИНМИ	Хомякова Мария Александровна	Фенотипическая и геномная характеристика новых анаэробных архей	Лаборатория разнообразия и экологии экстремофильных микроорганизмов	15-00 - 15-20
29	ИНБИ	Жердева Виктория Вячеславовна	Доксициклин-регулируемая экспрессия генетически кодируемых химер на основе dCas9 и флуоресцентных белков для визуализации нуклеома <i>in vivo</i>	Лаборатория молекулярного имиджинга	15-20 - 15-40
30	ИНМИ	Брянцева Ирина Андреевна	Новые пурпурные серные бактерии семейства <i>Ectothiorhodospiraceae</i> из эпиконтинентальных содовых озер юго-западной и юго-восточной Сибири и Монголии	Лаборатория экологии и геохимической деятельности микроорганизмов	15-40 - 16-00

порядок выступления	Ин-т	Фамилия, имя отчетсво докладчика	доклад	Лаборатория/группа	Время
14 февраля, среда (конференц-зал ИНБИ)					
31	ИНБИ	Салина Елена Геннадьевна	Новые соединения с противотуберкулезной активностью	Группа биохимии адаптации микроорганизмов	10-30 - 10-50
32	ИНМИ	Складнев Дмитрий Анатольевич	Биогенные наночастицы как индикатор метаболической активности клеток	Лаборатория выживаемости микроорганизмов	10-50 - 11-10
33	ИНБИ	Зоров Иван Никитич	Подходы к созданию востребованных промышленных ферментных препаратов на основе новых штаммов мицелиального гриба <i>Penicillium verruculosum</i>	Лаборатория биотехнологии ферментов	11-10 - 11-30
34	ИНБ	Антонов Иван Валентинович	Изучение роли редкого кодона UUA в геномах бактерий рода <i>Streptomyces</i> и их фагов	Группа регуляторной транскриптомики и эпигеномики	11-30 - 11-50
35	ИНБИ	Вечтомова Юлия Леонардовна	Тетрагидробиоптерин в патогенезе и фототерапии витилиго	Лаборатория экологической и эволюционной биохимии	11-50 - 12-10
36	ИНМИ	Януцевич Елена Алексеевна	Роль осмолитов и мембранных липидов в адаптации ацидофильных грибов	Группа экспериментальной микологии	12-10 - 12-30
37	ИНБИ	Замахаев Михаил Владимирович	Токсин-антитоксिनный модуль <i>VarBC</i> активируется в присутствии тетрациклина и способствует повышению выживаемости клеток <i>M. smegmatis</i>	Группа редактирования геномов микроорганизмов	12-30 - 12-50
38	ИНБ	Коротков Евгений Вадимович	Дисперсные повторы в бактериальных геномах	Группа математического анализа последовательностей ДНК и белков	12-50 - 13-10
Перерыв до 13-40					
39	ИНМИ	Булаев Александр Генрихович	Комбинированный гидрометаллургический процесс для переработки сульфидного золотосодержащего концентрата	Лаборатория хемолитотрофных микроорганизмов	13-40 - 14-00
40	ИНБИ	Ярополов Александр Иванович	Ферментативная полимеризация/сополимеризация анилина и 3-аминобензойной кислоты в глубоком эвтектическом растворителе	Лаборатория химической энзимологии	14-00 - 14-20
41	ИНБ	Воробьев Иван Иванович	Линия клеток CHO 4BGD с нокаутами генов <i>bak1</i> , <i>Wax</i> , <i>DHFR</i> , <i>GLUL</i> (<i>GS</i>) и оверэкспрессией генов <i>bcl-2</i> , <i>Bcl2l1</i> резистентна к индукции апоптоза, склонна к аутофагии и обеспечивает большой титр рекомбинантных белков при длительном культивировании	Лаборатория биоинженерии клеток млекопитающих	14-20 - 14-40
42	ИНБИ	Гулевич Андрей Юрьевич	Оптимизация биосинтеза адипиновой кислоты из глюкозы по обращенному β -окислению жирных кислот рекомбинантными штаммами <i>Escherichia coli</i>	Группа метаболической инженерии бактерий	14-40 - 15-00
43	ИНБИ	Марынич Надежда Константиновна	Определение «горячих точек» для улучшения созревания флуоресцентного белка <i>moxSAASoti</i> при 37 °C	Лаборатория физической биохимии	15-00 - 15-20
44	ИНМИ	Мулюкин Андрей Львович	Высокоочищенные ДНК-содержащие клеточные чехлы как эффективные матрицы в полимеразной цепной реакции	ЦКП «Коллекция UNIQEM»	15-20 - 15-40
45	ИНБИ	Бойко Константин Михайлович	Структурные исследования светособирающего комплекса LH2 из пурпурной серной бактерии <i>Ectothiorhodospira haloalkaliphila</i>	Лаборатория инженерной энзимологии	15-40 - 16-00
Заккрытие Конференции					