



ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
**«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»**
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ
ежегодной научной конференции
Федерального исследовательского центра
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук

26-28 февраля 2018

ГЕНОМНАЯ ИСТОРИЯ НАРОДОВ РОССИЙСКОЙ ЕВРАЗИИ

Триска П¹, Чеканов Н^{2,3}, Степанов В.⁴, Хуснутдинова ЕВ^{5,6}, Кумар Г⁷, Ахметова В⁵, Бабалян К⁸, Булыгина Е⁹, Харьков В⁴, Губина М¹⁰, Хидиятова И^{5,6}, Хитринская И⁴, Храмеева ЕЕ^{3,11}, Хусайнова Р^{5, 6}, Коновалова Н.К., Литвинов С.Р., Марусин А.Б., Мазур А.М., Пузырев В.В., Иваношук Д.Д., Спиридонова М⁴, Теслюк А.⁸, Цыганкова С.⁸, Триска М.И., Трофимова Н.В., Вайда Е¹³, Балановский О.^{14,15}, Баранова А.^{14,16,17}, Скрыбин К^{2,9,18}, Татарина Т.В.^{19,20,21,22,23}, Прохорчук Е^{24,25}.

1 *Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA, USA.*

2 *Federal State Institution "Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences", Moscow, Russia.*

3 *"Genoanalytica" CJSC, Moscow, Russia.*

4 *Institute of Medical Genetics, Tomsk National Medical Research Center, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Tomsk, Russia.*

5 *Institute of Biochemistry and Genetics, Russian Academy of Sciences, Ufa Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia.*

6 *Bashkir State University, Ufa, Russia.*

7 *School of Chemical and Biotechnology, SASTRA University, Tanjore, India.*

8 *Moscow Institute of Physics and Technology, Department of Molecular and Bio-Physics, Moscow, Russia.*

9 *Russian Scientific Centre "Kurchatov Institute", Moscow, Russia.*

10 *Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Novosibirsk, Russia.*

11 *Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo Innovation Center, Moscow, Russia.*

12 *Tyumen State Medical Academy, Tyumen, Russia.*

13 *Department of Modern and Classical Languages, Western Washington University, Bellingham, WA, USA.*

14 *Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia.*

15 *Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia.*

16 *School of Systems Biology, George Mason University, Fairfax, VA, USA.*

17 *Atlas Biomed Group, Moscow, Russia.*

18 *Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.*

19 *Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia. ttatarinova@laverne.edu.*

20 *School of Systems Biology, George Mason University, Fairfax, VA, USA. ttatarinova@laverne.edu.*

21 *Atlas Biomed Group, Moscow, Russia. ttatarinova@laverne.edu.*

22 *Department of Biology, University of La Verne, La Verne, CA, USA. ttatarinova@laverne.edu.*

23 *A. A. Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. ttatarinova@laverne.edu.*

24 *Federal State Institution "Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences", Moscow, Russia. prokhortchouk@biengi.ac.ru.*

25 *Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.*

История миграций человека через Уральские горы и прилежащие к ним равнины была богата на события — европейские племена и народы пересекали их с запада на восток, тогда как представители тюркских и уральских языковых групп шли в обратном направлении. К сожалению, осталось мало материальных источников, позволяющих реконструировать популяционную динамику в этих местах, но есть возможность оценить её с генетической точки зрения.

Нами были генотипированы и проанализированы образцы 1076 человек из 30 популяций, населяющих территории от Балтийского моря до озера Байкал. Большой объём собранных данных позволил нам детально описать популяционную структуру и выявить генетические истоки многих европейских и азиатских народов. Наше исследование удваивает количество полногеномных профилей из популяций северной Евразии, доступных на данный момент.

Обнаружено неожиданно большое количество участков унаследованного генетического сходства (identity-by-descent, IBD) между рядом сибирских популяций, таких как ханты и кеты, указывающее на их общее происхождение, несмотря на большую географическую и языковую разобщённость. Кроме того, тем же методом наблюдается также высокое сходство хантов с башкирами, тюркским этносом, населяющим относительно южное приуралье. С одной стороны, это усиливает гипотезу о финно-угорском происхождении башкир, с другой — данное исследование показало отсутствие явно выраженного ядра в

башкирском генофонде и скорее представляет этот народ многоуровневым и сложносоставным объединением тюркских, финно-угорских и индоевропейских вкладов.

У восточноевропейских славян наблюдается большое сходство в генетическом составе. Украинцы, белорусы и русские имеют почти идентичные пропорции влияния кавказских и североевропейских компонент — при практически полном отсутствии азиатских. Мы также представляем уникальную выборку образцов русских староверов, переселившихся в Сибирь в XVII веке. Сравнительный анализ методами *geAdmix* и *IBD* располагает их корни на севере Восточно-Европейской равнины, населённой северными русскими, карелами и коми. Русское население сельских районов близ Новосибирска и популяция староверов показывают пропорции генетических компонент происхождения, схожие с другими восточными славянами, но также включают 5-10% центрально-сибирского влияния, отсутствующего у европейских популяций.

Наш проект закрасил белое пятно на генетической карте Евразии: нами продемонстрирована сложная генетическая структура североевразийских этносов, выявлены генетические градиенты "запад-восток" и "север-юг", и оценён дифференцированный вклад предковых популяций в современные.

Публикация

Triska P, et al, Prokhortchouk E. Between Lake Baikal and the Baltic Sea: genomic history of the gateway to Europe. **BMC Genet.** 2017 Dec 28;18 (Suppl 1):110.

ДИССИМИЛЯЦИОННАЯ АММОНИФИКАЦИЯ НИТРАТА С ЭЛЕМЕНТНОЙ СЕРОЙ – НОВЫЙ МИКРОБНЫЙ ПРОЦЕСС, СВЯЗЫВАЮЩИЙ ЦИКЛЫ СЕРЫ И АЗОТА

Слободкина Г.Б., Марданов А.В., Равин Н.В., Фролова А.А., Черных Н.А., Бонч-Осмоловская Е.А., Слободкин А.И.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Диссимиляционное восстановление нитрата в аммоний – микробный процесс, который не приводит к образованию газообразных продуктов, и таким образом сохраняет связанный азот внутри экосистемы. До начала наших исследований единственным донором электронов серо-зависимой аммонификации нитрата считался сульфид. Мы обнаружили новый микробный процесс трансформации неорганических соединений, связывающий биогеохимические циклы азота и серы - диссимиляционное восстановление нитрата в аммоний с элементарной серой в качестве донора электронов. Термофильные анаэробные бактерии *Thermosulfurimonas dismutans* и *Dissulfuribacter thermophilus*, выделенные из глубоководных морских гидротерм, могут расти автотрофно с элементарной серой в качестве донора электронов и нитратом в качестве акцептора электронов, образуя сульфат и аммоний. Геномы обеих бактерий содержат генный кластер, который возможно кодирует энзиматическую систему восстановления нитрата в аммоний. Восстановление нитрата в нитрит осуществляется комплексом Nar. Восстановление нитрита в аммоний происходит по неканоническому пути, т.к. ген, кодирующий ключевой фермент системы Nrf, NrfA отсутствуют в геномах обоих микроорганизмов. Геномы обоих микроорганизмов содержат полный набор генов необходимых для диссимиляционной сульфатредукции. Система окисления серных соединений Sox отсутствует. Используя элементарную серу и нитрат, выделен и описан представитель нового рода в классе *Thermodesulfobacteria* - *Thermosulfuriphilus ammonigenes* gen. nov., sp. nov. О способности представителей классов *Thermodesulfobacteria* и *Deltaproteobacteria* анаэробно окислять соединения серы ранее не сообщалось, и члены этих таксонов рассматривались как участники восстановительной части биогеохимического цикла серы. Аммонификация нитрата с элементарной серой может быть важным, прежде неизвестным микробным процессом первичной продукции органического вещества в термальных экосистемах.

Публикации

- Slobodkina G.B., Mardanov A.V., Ravin N.V., Frolova A.A., Chernyh N.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. Respiratory ammonification of nitrate coupled to anaerobic oxidation of elemental sulfur in deep-sea autotrophic thermophilic bacteria // **Front. Microbiol.** 2017. 8:87. doi: 10.3389/fmicb.2017.00087
- Slobodkina G.B., Reysenbach A.-L., Kolganova T.V., Novikov A.A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Slobodkin A.I. *Thermosulfuriphilus ammonigenes* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic bacterium capable of respiratory ammonification of nitrate with elemental sulfur // **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** 2017. V. 67. P. 3474-3479. doi: 10.1099/ijsem.0.002142

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ НОВОГО ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРЕПАРАТА PBTZ169 В ЧЕЛОВЕКЕ

Макаров В.А.¹, Рябова О.Б.¹, Казакова Е.С.¹, Салина Е.Г.¹, Лепешкин А.Ю.¹, Савина С.А.¹, Cole S.², Dhar N.², Ferrari S.², Kolly G.S.², Vocat A.², Lechartier B.², Zhang M.², Neres J.², Hartkoorn R.C.², Andries K.³, Pojer F.³, Dyson P.J.³, Decosterd L.A.³, Widmer N.³, Buclin T.³, Brodin P.⁴, Delorme V.⁴, Landry V.⁴, Ribeiro A.L.⁴, Kaufmann S.⁵, Gengenbacher M.⁵, Duque-Correa M.A.⁵, Kaiser P.⁵, Schuerer S.⁵, Lazar D.⁵, Zedler U.⁵, Reece S.⁵, Nayyar A.⁵, Molteni E.⁶, Binda C.⁶, Gadupudi R.⁶, Pasca M.R.⁶, Mori G.⁶, Farina D.⁶, Chiarelli L.R.⁶, Riccardi G.⁶, Versées W.⁷, Verniest G.⁷, Manganelli R.⁷, Messens J.⁷, Sancho-Vaello E.⁸, Albesa-Jové D.⁸, de Lopes Jesus Ribeiro A.L.⁸, Guerin M.E.⁸, Mateos L.M.⁸, Centárová I.⁹, Svetlíková Z.⁹, Blaško J.⁹, Šarkan M.⁹, Huszár S.⁹, Mikušová K.⁹

¹ - ФИЦ Биотехнологии РАН,

² - Global Health Institute, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland

³ - University of Lausanne, Lausanne, Switzerland, iM4TB, Lausanne, Switzerland

⁴ - Institute Pasteur Lille, France

⁵ - Max Planck Institute for Infection Biology, Berlin, Germany

⁶ - University of Pavia, Pavia, Italy

⁷ - University of Padua, Italy

⁸ - University of Saragosa, Spain

⁹ - Comenius University of Bratislava, Bratislava Slovakia

В процессе проведения клинических исследований нового противотуберкулезного препарата PBTZ169 обнаружено, что его метаболизм у человека сильно отличается от метаболизма у бактерий и животных. Все метаболиты были идентифицированы и синтезированы и их биологическая активность была изучена. Показано, что они обладают противотуберкулезной активностью сравнимой с активностью PBTZ169 как в экспериментах *in vitro*, так и в экспериментах *in vivo*. Установлено, что эффективность препарата связана не только с его собственной активностью, но является суммой активности самого препарата и его метаболитов. Так же показано, что основной путь устойчивости микобактерий к PBTZ169 – метаболическое восстановление нитроредуктазой нитрогруппы, в лишь в незначительной мере реализуется у человека, а метаболизм протекает по пути многостадийного окисления молекулы. Для наглядной демонстрации различия активности нитроредуктаз у человека и животных, были получены генно-модифицированные мыши с пониженным содержанием нитроредуктаз и активность PBTZ169 была изучена с использованием хронической модели туберкулезной инфекции. Показано, что активность PBTZ169 на упомянутой мышиной линии многократно выше, что дает надежду на получение высокой эффективности препарата и у человека.

Публикации

- Hartkoorn R.C., Ryabova O.B., Chiarelli L.R., Riccardi G., Makarov V., Cole S.T. The mechanism of action of 5-nitrothiophenes against *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014, 58(5): 2944-7.
- Makarov V., Lechartier B., Zhang M., Neres J., van der Sar A.M., Raadsen S.A., Hartkoorn R.C., Ryabova O.B., Vocat A., Decosterd L.A., Widmer N., Buclin T., Bitter W., Andries K., Pojer F., Dyson P.J., Cole S.T. Towards a new combination therapy for tuberculosis with next generation benzothiazinones. **EMBO Mol Med.** 2014, 6(3):372-83.
- Neres J, Hartkoorn RC, Chiarelli LR, Gadupudi R, Pasca MR, Mori G, Farina D, Savina S, Makarov V, Kolly GS, Molteni E, Binda C, Dhar N, Ferrari S, Brodin P, Delorme V, Landry V, Ribeiro AL, Venturelli A, Saxena P, Pojer F, Carta A, Luciani R, Porta A, Zanoni G, De Rossi E, Costi MP, Riccardi G, Cole ST. 2-Carboxyquinoxalines kill *Mycobacterium tuberculosis* through non-covalent inhibition of DprE1. **ACS Chemical Biology**, 2015, 20;10(3): 705-14
- Makarov V., Neres J., Hartkoorn R.C., Ryabova O.B., Kazakova E., Šarkan M., Huszár S., Piton J., Kolly G.S., Vocat A., Conroy T.M., Mikušová K., Cole S.T. 8-Pyrrole-benzothiazinones non-covalent inhibitors of DprE1 from *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 2015, 58(9), 4446-52.
- Mori G., Chiarelli L.R., Esposito M., Makarov V., Bellinzoni M., Hartkoorn R.C., Degiacomi G., Boldrin F., Ekins S., de Jesus Lopes Ribeiro A.L., Marino L.B., Centárová I., Svetlíková Z., Blaško J., Kazakova E., Lepioshkin A., Barilone N., Zanoni G., Porta A., Fondi M., Fani R., Baulard A.R., Mikušová K., Alzari P.M., Manganelli R., de Carvalho L.P., Riccardi G., Cole S.T., Pasca M.R. Thiophenecarboxamide Derivatives Activated by EthA Kill *Mycobacterium tuberculosis* by Inhibiting the CTP Synthetase PyrG. **Chem Biol.** 2015, 22, 917-27.
- Rosado L.A., Wahni K., Degiacomi G., Pedre B., Young D., G. de la Rubia A, Boldrin F., Martens E., Marcos-Pascual L., Sancho-Vaello E., Albesa-Jové D., Provvedi R., Martin C., Makarov V., Versées W., Verniest G., Guerin M.E., Mateos L.M., Manganelli R., Messens J. The antibacterial prodrug activator Rv2466c is a mycothiol-dependent reductase in the oxidative stress response of *Mycobacterium tuberculosis*, **J.Biol.Chem.**, 2017, pii: jbc.M117.797837

Gengenbacher M., Duque-Correa M.A., Kaiser P., Schuerer S., Lazar D., Zedler U., Reece S., Nayyar A., Cole S., Makarov V., Barry C.E. III, Dartois V., Kaufmann S. NOS2-deficient mice with hypoxic necrotizing lung lesions predict outcomes of tuberculosis chemotherapy in humans, Scientific reports, 2017, **Scientific Reports**, 2017, 18, 7(1), 8853.

МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ ПЕРВОГО ТЕРМОФИЛЬНОГО ПЛАНКТОМИЦЕТА *THERMOGUTTA TERRIFONTIS*

Ельченинов А.Г.¹, Menzel P.², Gudbergsdottir S.R.², Слесарев А. И.³, Кадников В.В.¹, Krogh A.², Бонч-Осмоловская Е.А.¹, Peng X.², Кубланов И.В.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

³ Fidelity Systems, Inc., Gaithersburg, MD, United States

Thermogutta terrifontis R1 был описан в 2015 году как первый термофильный и один из первых анаэробных представителей филума *Planctomycetes* (Slobodkina et al., 2015). Как и все представители планктомицетов, выделенные на данный момент в чистые культуры, эта бактерия использует большой спектр разнообразных моно- и полисахаридов в качестве источника углерода и энергии.

Геномная последовательность *T. terrifontis* R1 была полностью определена с применением высокопроизводительного секвенирования на базе платформы Illumina MiSeq. С учетом полученных ранее при изучении физиологии *T. terrifontis* фенотипических данных (Slobodkina et al., 2015) мы провели *in silico* реконструкцию катаболизма углеводов, уделяя особое внимание пути разложения ксантановой камеди, поскольку (1) этот субстрат, по-видимому, является одним из селективных для планктомицетов и (2) механизмы деградации ксантановой камеди мало изучены. Всего в ходе анализа генома было обнаружено почти 200 генов т.н. CAZymes 52 семейств. Среди них был 101 ген, кодирующий гликозидазы, 14 генов полисахаридлиаз и 3 гена карбогидратэстераз, а также многочисленные гены гликозилтрансфераз. Даже с учетом того, что не все гены экспрессируются, наличие такого большого набора CAZymes хорошо коррелирует со способностью данного микроорганизма использовать для роста большое количество разных олиго- и полисахаридов. Реконструкция центрального метаболизма сахаров показала, что моносахариды утилизируются в ходе реакций гликолиза и пентозо-фосфатного пути. *T. terrifontis* обладает способностью, как к аэробному, так и к анаэробному дыханию в присутствии кислорода или нитрата, соответственно. Возможность нитратного дыхания определяется нитратредуктазой Nar и нитритредуктазой Nrf, гены которых были выявлены в геноме. Также были обнаружены все гены, кодирующие белки окислительного цикла трикарбоновых кислот. В случае если в среде нет внешнего акцептора электронов, эта бактерия может осуществлять брожение с образованием ацетата, лактата и водорода. И анаэробное дыхание, и брожение являются крайне необычными для большинства изученных планктомицетов свойствами.

Для более надежного определения пути утилизации ксантановой камеди был проведен транскриптомный анализ *T. terrifontis*, выращенной на ксантановой камеди или трегалозе. Транскриптомный анализ позволил дополнить геномные данные, особенно в части реконструкции центрального метаболизма сахаров. Сочетание геномного и транскриптомного подходов позволило предложить новый путь разложения ксантановой камеди, включающий в себя эндоксантазу (DUF1080), альфа-маннозидазу (GH38), альфа-галактозидазу (GH36), бета-глюкуронидазу (GH2) и бета-маннозидазу (GH5). Примечательно, что всего в геноме *T. terrifontis* R1 было обнаружено 9 генов, кодирующих белки с DUF1080, более того, в геномах других планктомицетов также содержится до нескольких десятков таких генов. Принимая во внимание то, что ксантановая камедь является селективным субстратом, как минимум, для термофильных и термотолерантных планктомицетов, мы считаем, что белки данного семейства играют ключевую роль в ее разложении.

Публикации

Elcheninov A.G., Menzel P., Gudbergsdottir S.R., Slesarev A.I., Kadnikov V.V., Krogh A., Bonch-Osmolovskaya E.A., Peng X. and Kublanov I.V. Sugar metabolism of the first thermophilic planctomycete *Thermogutta terrifontis*: comparative genomic and transcriptomic approaches // **Front. Microbiol.** 2017. 8:2140. doi: 10.3389/fmicb.2017.02140

РАЗРАБОТКА ТРАНСФЕКЦИОННЫХ АГЕНТОВ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО ХИТОЗАНА

Шагдарова Б.Ц.¹, Зубарева А.А.¹, Свирщевская Е.В.², Ильина А.В.¹, Варламов В.П.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Хитозан – линейный полисахарид, биоразлагаемый, биосовместимый, обладающий низким уровнем токсичности. Полимер имеет ряд биологических активностей, которые обуславливают возможность его широкого использования в различных областях науки.

Актуальным направлением является изучение возможности использования производных хитозана в качестве систем для доставки генетического материала. В настоящее время в качестве систем для доставки генетического материала в клетки активно используют невирусные конструкции на основе липосом. Липосомы обладают низкой иммуногенностью и достаточно большой емкостью, но обладают относительно высокой токсичностью и ценой. Альтернативным методом удобным для генной терапии, является доставка с использованием природных поликатионов, которые являются доступными, малотоксичными и могут переносить молекулы большеразмерных ДНК, за счёт образования полиэлектролитных комплексов с молекулами ДНК, которые проникают в клетку посредством фагоцитоза. Методом кислотного гидролиза были получены образцы хитозана с молекулярными массами 5, 20, 50, 90 и 200 кДа. На их основе были синтезированы алкильные производные — гексаноил хитозан со степенью замещения 10, 15, 30%. В работе использовали репортерную плазмиду pRFP pmKate2, кодирующую дальне-красный флуоресцентный белок. Такие белки являются хорошими кандидатами для оценки прохождения плазмиды *in vivo*, поскольку их свечение не попадает в спектр аутофлуоресценции клеток млекопитающих. Показали, что трансфекция клеток НЕК293 с помощью немодифицированного хитозана была неэффективна. Из гидрофобных производных только гексаноил хитозан с молекулярной массой 20 кДа трансфицировал клетки с эффективностью до 50% по сравнению с коммерческим липидным агентом Metafectene Pro. Дальнейшие исследования будут связаны с этим производным и модификациями на его основе.

Публикации

- Патент на изобретение** № 2627870 «Способ получения низкомолекулярного хитозана и олигомеров хитозана» от 14.08.2017 г. Авторы: Шагдарова Б.Ц., Лопатин С.А., Коновалова М.В., Ильина А.В., Албулов А.И., Варламов В.П.
- Zubareva A., Shagdarova B., Varlamov V., Kashirina E., Svirshchetskaya E. Penetration and toxicity of chitosan and its derivatives // **European Polymer Journal**. 2017. № 93. P. 743–749. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.04.021>
- Sankov V, Shagdarova B, Chudakov D, Reshetov P, Grechikhina M, Zubareva A, Varlamov V, Esipov R, Zubov V and Svirshchetskaya E Synthesis and Evaluation of Chitosan Derivatives for Large Size DNA Delivery // **Organic & Medicinal Chem J**. 2017. V 1. № 5. DOI: 10.19080/OMCIJ.2017.01.555572
- Sankov V., Shagdarova B., Varlamov V., Esipov R., Svirshchetskaya E. Large size DNA in vitro and in vivo delivery using chitosan transfection // **Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**. 2017. V. XXII. P. 190-200, DOI: 10.15259/PCACD.22.19
- Anastasia A. Zubareva, Balzhima Ts. Shagdarova, Valery P. Varlamov, Elena V. Svirshchetskaya Cell binding and penetration of quaternized chitosan derivatives // **Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**. 2016. V. XXI. P. 217-223
- Свирщевская Е.В., Зубарева А.А., Бойко А.А., Шустова О.А., Гречихина М.В., Шагдарова Б.Ц., Варламов В.П. Анализ токсичности и биосовместимости производных хитозана с различными физико-химическими свойствами // **Прикладная биохимия и микробиология**. 2016. Т. 52. №5, с. 467 - 475;

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКОВ 14-3-3 С БЕЛКАМИ-ПАРТНЕРАМИ

Тугаева К.В.^{1, 2}, Белен С.³, Куликова А.А.⁴, Цветков Ф.О.⁵, Грив С.Дж.⁶, Уикс С.Д.³, Гусев Н.Б.², Стрелков С.В.³, Энтсон А.А.⁶, Случанко Н.Н.^{1, 2}

¹ *ФИЦ Биотехнологии РАН*

² *Биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова*

³ *Католический университет г.Лёвен, Бельгия*

⁴ *Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН*

⁵ *Университет г. Марсель, Франция*

⁶ *Университет г. Йорк, Великобритания*

Особый интерес с точки зрения исследования белок-белковых взаимодействий представляют эукариотические белки 14-3-3, число партнеров которых превышает несколько тысяч. 14-3-3 образуют устойчивые димеры и специфически связывают различные фосфорилированные белки, что делает их регуляторами множества физиологических процессов [1-2]. Общий принцип узнавания в виде консенсусных 14-3-3-связывающих участков был описан более 20 лет назад, однако в настоящее время известны белки-партнеры, содержащие неканонические участки. Скорость открытия новых комплексов 14-3-3 превышает скорость их изучения, что затрудняет понимание пространственно-временной иерархии взаимодействий с участием 14-3-3 и уменьшает терапевтические модальности. За полувековую историю изучения белков 14-3-3 получено всего три комплекса с полноразмерными белками-партнерами (PDB: 1IB1, 5LTW [3], 5N6N [2]), что подчеркивает острую необходимость разработки доступных системных подходов для получения комплексов 14-3-3/партнер, исследования механизма их взаимодействия и структуры их комплексов.

Мы разработали систему коэкспрессии 14-3-3 и белка-партнера в присутствии протеинкиназы, фосфорилирующей белок-партнер [4]. Этот метод крайне удобен для получения фосфопартнеров, а также стабильных комплексов 14-3-3, образующихся при коэкспрессии. Для изучения транзистентных комплексов предложено создание химер на основе белков 14-3-3 с фрагментами белков-партнеров [5]. Показано, что создание химер может обеспечить получение эквивалентной структурной информации о комплексах 14-3-3-партнер. На основе прототипной химеры с пептидами белка HSPB6 созданы химеры с пептидами от других партнеров. Показано, что химеры могут быть успешно экспрессированы в присутствии протеинкиназы, которая избирательно фосфорилирует пептидный фрагмент. В ближайшее время будет получена химера с полноразмерным белком-партнером. Помимо структурных исследований перспективным представляется использование химер в качестве инструментов для скрининга низкомолекулярных соединений (стабилизаторы: фузикоцин, эпибестатин и пирролидон 1, ингибиторы: блапсины А и В) на наличие способности модулировать взаимодействия с 14-3-3. Таким образом, развитие и оптимизация описанных выше подходов позволит ускорить процесс получения как структурной информации, так и разработки лекарственных препаратов.

Публикации

- Sluchanko N.N., Gusev N.B. Moonlighting chaperone-like activity of the universal regulatory 14-3-3 proteins. **FEBS J** (2017) 284:1279-1295.
- Sluchanko N.N. Association of multiple phosphorylated proteins with the 14-3-3 regulatory hubs: problems and perspectives. **J Mol Biol** (2018) 430:20-26.
- Sluchanko NN, Beelen S, Kulikova AA, Weeks SD, Antson AA, Gusev NB, Strelkov SV. Structural basis for the interaction of a human small heat shock protein with the 14-3-3 universal signaling regulator. **Structure** (2017) 25:305-316.
- Tugaeva KV, Tsvetkov PO, Sluchanko NN. Bacterial co-expression of human Tau protein with protein kinase A and 14-3-3 for studies of 14-3-3/phospho-Tau interaction. **PLoS One** (2017) e0178933.
- Sluchanko NN, Tugaeva KV, Greive SJ, Antson AA. Chimeric 14-3-3 proteins for unraveling interactions with intrinsically disordered partners. **Sci Rep.** (2017) 12014.

РАЗРАБОТКА ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ОСНОВ БИОГИДРОМЕТАЛЛУРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕРАБОТКИ СЛОЖНЫХ ПОЛИМЕТАЛЛИЧЕСКИХ СУЛЬФИДНЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

Фомченко Н.В., Муравьев М.И.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Актуальность работы: Истощение запасов богатых сульфидных полиметаллических руд, необходимость вовлечения в переработку сложных руд, отсутствие эффективной технологии переработки получаемых из них сульфидных концентратов.

Экологический аспект работы: Разработка экологически чистой технологии переработки медно-цинковых концентратов, полученных из руд Уральского региона, не имеющей вредных стоков и газовых выбросов, возможность утилизации в данной технологии избытка серной кислоты, образующейся при выбросах сернистого газа в пирометаллургических процессах.

Научная новизна работы: Разработка научных основ интенсификации процессов выщелачивания металлов из сульфидных минералов на основании сочетания двух основных стадий: высокотемпературного химического выщелачивания концентратов биораствором и биорегенерации раствора после химического выщелачивания. Селективность выщелачивания цинка по сравнению с медью из медно-цинкового концентрата основана на гальванических взаимодействиях минералов.

Объекты исследований: Медно-цинковый концентрат, полученный в производственных условиях из руд Уральского региона. В работе использовались ассоциации микроорганизмов: мезофильная, включающая *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* и умеренно термофильная, включающая *Leptospirillum* spp., *Acidithiobacillus caldus* и *Sulfobacillus* spp.

Установлено, что при использовании обеих ассоциаций в процессе биовыщелачивания (биоокисления) медно-цинкового концентрата цинк выщелачивался значительно быстрее по сравнению с медью, что свидетельствовало о наличии гальванического эффекта, обусловленного совместным присутствием минералов сфалерита и халькопирита. Показано, что полученные ассоциации можно использовать для наработки биораствора для высокотемпературного химического выщелачивания концентрата и его биорегенерации. Установлено, что скорость выщелачивания из концентрата цветных металлов и ионов железа биораствором значительно повышается с повышением температуры. Наиболее эффективный процесс биорегенерации может осуществлять умеренно термофильная ассоциация, способная утилизировать продукты лизиса микробных клеток, образующиеся при высокотемпературном химическом выщелачивании.

Предложена принципиальная технологическая схема двустадийного процесса переработки медно-цинкового концентрата. Установлено, что концентрация получаемых при выщелачивании цветных металлов позволяет селективно выделить их в товарные продукты с использованием традиционной технологии. Показано, что в предложенной технологии можно получить богатые медные концентраты с относительно небольшим выходом и низким содержанием в них цинка и железа. При их пирометаллургической переработке потери цветных металлов со шлаками (отходами) будут незначительными. Избыток серной кислоты, получаемый из кислых газов пирометаллургии, может быть использован на стадии химического выщелачивания и биорегенерации в предложенной в работе технологии.

Публикации

- Фомченко Н.В., Муравьев М.И. Селективное выщелачивание цинка при биоокислении медно-цинкового концентрата // **Прикл. биохимия и микробиология**. 2017. Т. 53. № 1. С. 82–87.
- Фомченко Н.В., Муравьев М.И. Влияние условий биовыщелачивания медно-цинкового концентрата на содержание в нем цветных металлов // **Прикл. биохимия и микробиология**. 2017. Т. 53. № 4. С. 395–399.
- Фомченко Н.В., Муравьев М.И. Химическое выщелачивание медно-цинкового концентрата биораствором трехвалентного железа // **Прикл. биохимия и микробиология**. 2017. Т. 53. № 6. С. 630–634.
- Fomchenko N.V., Muravyov M.I. Two-step biohydrometallurgical technology for modernization of processing of sulfidic copper-zinc products // **Hydrometallurgy**. 2017. V. 174. P. 116–122.
- Muravyov M., Fomchenko N. Bioleaching as a method of zinc removal from copper-zinc sulfide concentrate // **J. Biotechnol.** 2017. V. 256S. P. S54.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ХЕРЕСНЫХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Эльдаров М.А.¹, Марданов А.В.¹, Белецкий А.В.¹, Думина М.В.¹, Авданина Д.А.¹, Танащук Т.Н.², Кишковская С.А.², Равин Н.В.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ВНИИ виноградарства и виноделия «Магарач» РАН, Ялта.

Хересные дрожжи представляют уникальную группу винодельческой микрофлоры и на протяжении столетий используются для получения биологически выдержанных вин. Физиологические и биохимические характеристики хересных и винных штаммов резко отличаются [1]. Для выявления природы молекулярных различий, лежащих в основе фенотипического разнообразия штаммов дрожжей, сопоставления молекулярно-генетических данных с определенными производственными показателями, нами предпринято комплексное исследование микробиологических и генетических и геномных характеристик штаммов хересных дрожжей из коллекции ННИИВиВ «Магарач».

Показано, что в условиях длительного хранения штаммы сохранили свои основные морфологические, культуральные, биохимические свойства, установлены корреляции между определенными генетическими профилями и винодельческими параметрами штаммов [2]. Методами сравнительной геномики и генотипирования идентифицированы специфические для хересных штаммов молекулярные маркеры, позволяющие проводить направленный поиск перспективных для виноделия природных и коллекционных изолятов.

Анализ расшифрованных митохондриальных геномов не выявил каких-либо существенных изменений набора и порядка расположения генов и мобильных генетических элементов, которые могли бы свидетельствовать о направленных адаптивных изменениях митогенома хересных штаммов по сравнению с винными [3].

С использованием платформ PacBio и Illumina расшифрованы последовательности ядерных геномов трех штаммов хересных дрожжей [4]. Методами сравнительной геномики охарактеризована генетическая вариабельность хересных штаммов, потенциально связанная с адаптацией этих дрожжей к специфическим условиям виноделия. Выявлены многочисленные SNP в сотнях локусах, связанных с процессами метаболизма углеводов, гомеостаза ионов, ответа на осмотический стресс, метаболизма липидов, биогенеза клеточной стенки, репарации и проч. [5].

Выявлены также различные типы хромосомных перестроек, события потери и приобретения генов, вариации в хромосомных наборах и копийности отдельных локусов.

Полученные данные расширяют наши представления об организации и эволюции генома винных штаммов дрожжей в условиях промышленной селекции, могут способствовать разработке стратегий направленного отбора и создания новых штаммов, совершенствованию технологий виноделия.

Публикации

1. Эльдаров М.А., Кишковская С.А., Танащук Т.Н., Марданов А.В. Геномика и биохимия винных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. **Успехи биологической химии**, т. 56, 2016, с. 155–196.
2. Кишковская С.А., Эльдаров М.А., Думина М.В., Танащук Т.Н., Равин Н.В., Марданов А.В. Генетическая и физиолого-биохимическая характеристика коллекции штаммов хересных дрожжей. **Прикладная биохимия и микробиология**, т. 53(3), 217, 323-332.
3. Mardanov A.V., Beletsky A.V., Eldarov M.A., Tanashchuk T.N., Kishkovskaya S.A., Ravin N.V. Complete mitochondrial genomes of three *Saccharomyces cerevisiae* flor strains. **MITOCHONDRIAL DNA PART B: RESOURCES**. V.6 (11), pp.2 697-2 712.
4. Mardanov, Andrey & Beletsky, Alexey & Eldarov, Michael & N. Tanashchuk, Tatiana & A. Kishkovskaya, Svetlana & Ravin, Nikolai. (2018). Draft Genome Sequence of the Wine Yeast Strain *Saccharomyces cerevisiae* I-328. **Genome Announcements**. 6. e01520-17. 10.1128/genomeA.01520-17.
5. Mikhail A Eldarov, Alexey V Beletsky, Tatiana N Tanashchuk, Svetlana A Kishkovskaya, Nikolai V Ravin and Andrey V Mardanov* Whole-genome analysis of three flor yeast strains revealed genetic traits specific to flor yeasts. **Frontiers in Microbiology**, submitted.

САМОЭКСЦИЗИРУЕМЫЕ ИНТЕГРАТИВНЫЕ ВЕКТОРЫ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕЙ

Агафонов М.О., Александров А.И.,

ФИЦ Биотехнологии РАН

При генетической модификации клеток эукариот, в том числе клеток дрожжей, в них вводят плазмиды или фрагменты ДНК, содержащие селективные маркеры. Последовательное введение в клетки нескольких генетических конструкций, как правило, предполагает использование такого же количества селективных маркеров, число которых бывает ограничено. Это ограничение можно преодолеть, если маркер фланкирован участками, между которыми может происходить рекомбинация. В частности, для этого можно использовать последовательности узнавания сайт-специфическими рекомбиназами, такими как рекомбиназа Cre бактериофага P1. Восстановление селективного маркера с использованием этой рекомбиназы у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием ранее разработанной системы происходит в несколько этапов и требует двух селективных маркеров, поскольку кассета для интеграции с селективным маркером, фланкированным участками узнавания Cre (*loxP*), и ген, кодирующий Cre, находятся на разных плаزمидках. Чтобы поместить ген, кодирующий Cre, на одну плазмиду вместе с последовательностью *loxP*, необходимо было исключить экспрессию этого гена при поддержании плазмиды в клетках *Escherichia coli*. Для этого в начало открытой рамки считывания этого гена был введен дрожжевой интрон. С использованием интронированного гена были сконструированы самоэксцизирующиеся векторы для дрожжей *S. cerevisiae* и *Hansenula polymorpha*. Однако при использовании этих векторов у них была обнаружена некоторая нестабильность в клетках *E. coli*, которая могла объясняться синтезом Cre, несмотря на наличие интрона. Было высказано предположение, что синтез Cre происходит в результате реинициации трансляции мРНК после интрона. Чтобы проверить это предположение, в интронированный ген были введены два варианта модификаций, предотвращающие реинициацию трансляции в рамке разными способами. Оба варианта полностью предотвратили нежелательную рекомбинацию между участками *loxP* в клетках *E. coli*. В результате были сконструированы самоэксцизирующиеся векторы для дрожжей *H. polymorpha* и *S. cerevisiae*, обладающие высокой стабильностью при поддержании в клетках *E. coli*.

Публикации

- Agaphonov MO. (2017) Improvement of a yeast self-excising integrative vector by prevention of expression leakage of the intronated Cre recombinase gene during plasmid maintenance in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett.** 364 (22).
- Agaphonov M, Alexandrov A. (2014) Self-excising integrative yeast plasmid vectors containing an intronated recombinase gene. **FEMS Yeast Res.** 14:1048-1054.

БЕНТОСНОЕ ФОТОТРОФНОЕ СООБЩЕСТВО ИЗ СОДОВОГО ОЗЕРА КИРАНСКОГО, ЮГО-ВОСТОЧНАЯ СИБИРЬ

Бурганская Е.И.¹, Брянцева И.А.¹, Гайсин В.А.¹, Груздев Д.С.¹, Рысина М.С.², Бархутова Д.Д.³,
Баслеров Р.В.¹, Горленко В.М.¹, Кузнецов Б.Б.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Московский физико-технический институт

³ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН

Содовые озера, являются аналогом экосистем раннего Протерозоя. Исследование бентосных цианобактериальных сообществ гиперсоленых содовых озер дает возможность лучше понять функционирование древних прокариотных экосистем. Нами исследованы физико-химические характеристики, пигментный и видовой состав и вертикальное распределение микроорганизмов в микробных матах содового озера Киран. Озеро Киран является уникальной экстремальной экосистемой Кяхтинского района Бурятии, расположенного вблизи границы с Монголией. В период отбора проб в сентябре 2015 г. температура воды в озере составляла 28-31°C, значение pH 9.2-9.3, общая минерализация воды около 35 г/л, карбонаты являлись основным анионом. В озере формируются сульфид-содержащие грязи, используемые в бальнеологических целях. Нами установлено, что микробный мат в озере формируется на органической основе разлагающейся биомассы планктонной цианобактерии рода *Arthrospira*. С использованием метода высокопроизводительного секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК был проведен анализ видового разнообразия бактериального сообщества микробных матов озера. В микробном сообществе доминировали алкало-галофильные или галотолерантные микроорганизмы. Преобладающими матобразующими цианобактериями были *Geitlerinema* sp. и *Spirulina major*. Пурпурные серные бактерии представлены 10 филотипами и составляли 29% от общего числа фототрофных бактерий в сообществе. Зеленые серобактерии не обнаружены, как и в других содовых озерах. Пурпурные несерные бактерии (НПБ) представлены тремя филотипами, близкими к алкалофильным видам *Rhodobaca bogoriensis*, *Rhodobaculum claviforme* и *Rubribacterium polymorphum*. Целый ряд аноксигенных фототрофных бактерий выделен в чистую культуру и идентифицирован. Особый интерес представляют новые нитчатые аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии, для которых выполнено полногеномное секвенирование. Эти микроорганизмы осуществляют сульфидзависимый фотосинтез. Среди хемотрофных бактерий обнаружены бактерии, участвующие в круговороте серы. Таким образом, микробные маты озера Киран можно охарактеризовать как сообщества сульфурета, компонентами которого являются алкалофильные и алкалотолерантные бактерии.

Публикация

Burganskaya E.I., Bryantseva I.A., Gaisin V.A., Grouzdev D.S., Rysina M.S., Barkhutova D.D., Baslerov R.V., Gorlenko V.M., Kuznetsov B.B. Benthic phototrophic community from Kiran soda lake, south-eastern Siberia // **Extremophiles**.
Published online 21 December 2017. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0989-0>

ИЗУЧЕНИЕ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ФИТОПАТОГЕНОВ ВИНОГРАДА В РОССИИ

Поротикова Е.В.¹, Дмитренко Ю.Д.¹, Рисованная В.И.², Волков Я.А.², Володин В.А.², Гориславец С.М.², Странишевская Е.П.², Юрченко Е.Г.³, Камионская А.М.¹, **Виноградова С.В.¹**

¹ *ФИЦ Биотехнологии РАН;*

² *Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарач» РАН;*

³ *Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия*

Виноград (*Vitis vinifera* L.) – одна из важных многолетних культур южных регионах России. В результате длительного срока эксплуатации насаждений, растения накапливают большое количество патогенных организмов. На сегодняшний день известно более 60 вирусов, поражающих виноград. Около 10 из них наносит серьезный экономический вред, который заключается в сокращении количества и качества урожая, сокращении продуктивного периода виноградника и необходимости его раскорчевки, а также в невозможности использовать зараженную лозу для получения посадочного материала. Пораженные растения имеют различные симптомы: покраснение и скручивание листовой пластинки, межжилковый хлороз, посветление жилок, горошение ягод и др.

Данные о распространении вирусов и бактерий винограда на территории России отсутствуют, поэтому целью нашей работы было изучение распространения наиболее экономически вредоносных вирусов винограда в южных регионах России.

Обследования проводили в хозяйствах Крыма и Краснодарского края 2014-2017 гг. В результате было отобрано 1487 образцов винограда с симптомами вирусной и бактериальной инфекции. Впервые на территории России обнаружены вирусы GRSPaV, GVA, GLRaV-2, бактерия *Pseudomonas syringae* на винограде. Определено распространение GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 – 1,64%, GFkV, бактерий рода *Agrobacterium*. Проводится изучение генетического разнообразия обнаруженных патогенов.

Публикация и патенты

- E. V. Porotikova, U. D. Dmitrenko, E. E. Atapina, Y. A. Volkov, V. I. Risovannaya, E. P. Stranishevskaya, S. M. Gorislavets, A. M. Kamionskaya, and S. V. Vinogradova. First report of the bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* on grapevine (*Vitis vinifera* L.) in Russia. **Plant Disease**. February 2017, Volume 101, Number 2. Page 380. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-16-1040-PDN>
- U.D. Dmitrenko, E.V. Porotikova, S.M. Gorislavets, V.I. Risovannaya, Y.A. Volkov, E.P. Stranishevskaya, A.M. Kamionskaya, and S.V. Vinogradova First Report of Grapevine rupestris stem pitting associated virus in Russia. **Plant Disease**. December 2016, Volume 100, Number 12. Page 2542. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0805-PDN>
- Ignatov A, Khodykina M, Vinogradova S, Polityko V, Kornev K, First Report of *Agrobacterium vitis* Causing Crown Galls of Wine Grape in Russia. **Plant Disease**. 2016, Volume 100, N 4. P. 853.
- Е.В. Поротикова, В.И. Рисованная, Я.А. Волков, Ю.Д. Дмитренко, В.А. Володин, С.М. Гориславец, Е.П. Странишевская, А.А. Аграновский, А.М. Камионская, С.В. Виноградова. Распространение вирусов скручивания листьев винограда 1 и 3 (grapevine leafroll-associated viruses-1 и -3) на территории Крыма. **Вестник МГУ**. 2016. №2. С.13-16. <http://vestnik-bio-msu.elpub.ru/jour/article/view/320>
- Перевод: E.V. Porotikova, V.I. Risovannaya, Y.A. Volkov, U.D. Dmitrenko, V.A. Volodin, S.M. Gorislavets, E.P. Stranishevskaya, A.A. Agranovsky, A.M. Kamionskaya, S.V. Vinogradova. Occurrence of Grapevine Leafroll-Associated Viruses-1 and -3 in Crimea. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, 2016, Vol. 71, No. 2, pp. 76–79. DOI: 10.3103/S0096392516020097
- E.V. Porotikova, U.D. Dmitrenko, V.A. Volodin, Y.A. Volkov, S.M. Gorislavets, E.P. Stranishevskaya, V.I. Risovannaya, A.M. Kamionskaya, and S.V. Vinogradova. First Report of Grapevine virus A in Russian Grapevines. **Plant Disease**. 2016. December 2016, Volume 100, Number 12. Page 2541. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0804-PDN>
- Поротикова Е.В., Виноградова С.В., Дмитренко Ю.Д., Волков Я.А., Рисованная В.И., Гориславец С.М., Володин В.А., Странишевская Е.П., Камионская А.М. Молекулярная диагностика бактериальных и вирусных фитопатогенов винограда, актуальных для сельского хозяйства Крыма. **Магарач. Виноградарство и виноделие**. 2015. № 3. С. 19.
- Волков Я.А., Рисованная В.И., Гориславец С.М., Володин В.А., Камионская А.М., Виноградова С.В., Странишевская Е.П. Распространение вирусных и бактериальных фитопатогенов на виноградниках юго-западной зоны Крыма. **Магарач. Виноградарство и виноделие**. 2015. № 4. С. 27-28.
- Рисованная В.И., Волков Я.А., Володин В.А., Поротикова Е.В., Гориславец С.М., Странишевская Е.П., Камионская А.М., Виноградова С.В. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2016620355 «Распространение вирусных фитопатогенов винограда *Vitis vinifera* L. на территории Крыма».** Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 17.03.2016г

А.М. Камионская, Е.В. Поротикова, В.И. Рисованная, Я.А. Волков, В.А. Володин, И.В. Яковлева, С.М. Гориславец, Е.П. Странишевская, С.В. Виноградова. **Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2016621117** «Распространение бактериальных фитопатогенов винограда *Vitis vinifera* L. на территории Крыма». Дата государственной регистрации в Реестре баз данных 16.08.2016

Поротикова Е.В., Камионская А.М., Виноградова С.В. **Патент на изобретение** «Набор синтетических олигонуклеотидов для выявления вируса крапчатости винограда (*Grapevine fleck virus*)». Дата приоритета 27.06.2016

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ «СУЩЕСТВЕННОЙ» ЛЕГКОЙ ЦЕПИ МИОЗИНА С МОТОРНЫМ ДОМЕНОМ МИОЗИНОВОЙ ГОЛОВКИ В ПРОЦЕССЕ АТРАЗНОГО ЦИКЛА

Логвинова Д.С.¹, Матюшенко А.М.¹, Николаева О.П.², Левицкий Д.И.^{1,2}

¹ ФИЦ биотехнологии РАН;

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова

При осуществлении двигательных процессов в актомиозиновых системах главные функции выполняют глобулярные головки молекул миозина, играющие роль “молекулярных моторов”. При связывании и гидролизе АТР миозиновые головки подвергаются значительным структурным перестройкам, приводящим к повороту регуляторного домена относительно моторного домена. На основании некоторых данных литературы и наших собственных результатов было высказано предположение, что при таком повороте регуляторный домен и ассоциированная с ним «существенная» легкая цепь миозина не только располагаются очень близко от поверхности моторного домена, но и могут вступать с ним в достаточно прочные взаимодействия, которые могут играть важную роль в процессе работы головки в качестве молекулярного мотора. Проверка этого предположения составляла одну из главных задач нашей работы. Другой важной задачей работы являлась экспериментальная проверка высказанного нами ранее предположения о том, что в процессе АТРАЗНОЙ реакции может происходить взаимодействие уникального дополнительного N-концевого сегмента «существенной» легкой цепи 1 (LC1) с моторным доменом миозиновой головки. Для решения этих задач нами были получены препараты изолированной миозиновой головки (субфрагмент 1 миозина, S1), в которых собственные легкие цепи были замещены на рекомбинантные LC1, флуоресцентно меченные 1,5-IAEDANS (донор) по единственному остатку цистеина, введенному методом сайт-направленного мутагенеза в различные участки последовательности LC1 – как в их С-концевой области, ассоциированной с регуляторным доменом S1, так и в области их уникального N-концевого сегмента. Методом Фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET) определяли расстояния в изолированной головке миозина (субфрагмент 1 миозина, S1) от различных участков в LC1 (как в ее С-концевой части, ассоциированной с регуляторным доменом S1, так и в N-концевом сегменте LC1) до флуоресцентного аналога ADP (TNP-ADP) в активном центре моторного домена S1. Показано, что образование комплекса S1-ADP-BeF_x (стабильного аналога интермедиата АТРАЗНОЙ реакции S1 – S1*-АТР) резко снижает расстояния от остатков цистеина как в С-концевой области LC1, так и в N-концевом сегменте LC1, до TNP-ADP в активном центре S1. Эти данные подтверждают высказанное ранее предположение о том, что в процессе АТРАЗНОЙ реакции происходит взаимодействие между LC1 и моторным доменом S1.

Публикации

Логвинова Д.С., Николаева О.П., Левицкий Д.И. «Межмолекулярные взаимодействия субфрагмента 1 миозина, индуцируемые N-концевым сегментом существенной легкой цепи 1». **Биохимия**, 2017, Т. 82, вып. 2, С. 332–334.

Logvinova D.S., Matyushenko A.M., Nikolaeva O.P., Levitsky D.I. “Transient interaction between the N-terminal extension of the essential light chain-1 and motor domain of the myosin head during the ATPase cycle”. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2018, v. 495, № 1, p. 163-167.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНОМИКА ПЛАНКТОМИЦЕТОВ: ГЛИКОЛИТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ЧЕТЫРЁХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *ISOSPHAERACEAE*

Наумов Д.Г., Иванова А.А., Мирошников К.К., Дедыш С.Н.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Планктомицеты являются широко распространённой, но слабо изученной группой бактерий. Крайне мало известно об их метаболическом потенциале и роли в природных экосистемах; лишь ограниченное число этих микроорганизмов были получены в культурах и охарактеризованы. В докладе представлены результаты секвенирования и дальнейшего анализа полногеномной последовательности болотного планктомицета *Paludisphaera borealis* PX4^T. Проведено сравнение с геномами других представителей семейства *Isosphaeraceae*: *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T, *Isosphaera pallida* IS1B^T и таксономически неохарактеризованного планктомицета SH-PL62. Геном *P. borealis* состоит из хромосомы (7.5 Мб) и двух плазмид (112 и 43 кб, соответственно). В нём закодировано около 5800 белков. Среди них удалось идентифицировать свыше 250 ферментов синтеза и расщепления олиго- и полисахаридов, в том числе 133 белка, принадлежащих ранее известным семействам гликозил-гидролаз, гликозилтрансфераз и карбогидрат эстераз из базы данных CAZy (<http://www.cazy.org/>). Обнаружено существование общего пула ферментов этой группы у *P. borealis*, *S. acidiphila* и штамма SH-PL62. Термофильный планктомицет *I. pallida* обладает редуцированным гликолитическим потенциалом. Среди 44 гликозил-гидролаз *P. borealis*, представляющих 21 семейство из базы данных CAZy, для многих удалось аннотировать субстратную специфичность. В общей сложности предсказано наличие 19 различных ферментативных активностей этого типа, их спектр хорошо согласуется с ранее известным профилем утилизации углеводов. В отдельных случаях на основе геномного анализа нам удалось внести уточнения и подтвердить их экспериментально. На основании дальних эволюционных связей дополнительно выявлено более 90 потенциальных гликозил-гидролаз, не относящихся к ныне существующим семействам CAZy. Полученные данные продемонстрировали неожиданно высокий, но частично ещё нераскрытый гликолитический потенциал планктомицетов семейства *Isosphaeraceae*. Также обнаружена большая роль горизонтальных переносов из бактерий других отделов в эволюционной истории генов синтеза и утилизации углеводов планктомицетов изучаемой группы.

Публикация

Ivanova A.A., Naumoff D.G., Miroshnikov K.K., Liesack W., Dedysh S.N. Comparative genomics of four Isosphaeraceae planctomycetes: a common pool of plasmids and glycoside hydrolase genes shared by *Paludisphaera borealis* PX4^T, *Isosphaera pallida* IS1B^T, *Singulisphaera acidiphila* DSM 18658^T, and strain SH-PL62 // **Frontiers in Microbiology**. 2017. V. 8. Art.412. doi: 10.3389/fmicb.2017.00412 (IF 4.076)

НЕОБЫЧНО ВЫСОКОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ СХОДСТВО ПОПУЛЯЦИЙ БАКТЕРИИ *DESULFORUDIS AUDAXVIATOR* ИЗ ГЛУБИННЫХ ПОДЗЕМНЫХ ВОД ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И ЮЖНОЙ АФРИКИ

Марданов А.В.¹, Кадников В.В.¹, Белецкий А.В.¹, Карначук О.В.², Равин Н.В.¹

1. ФИЦ Биотехнологии РАН

2. Томский государственный университет

Глубокие подземные местообитания характеризуются анаэробными условиями, высоким давлением и высокой температурой. Наши знания о микроорганизмах, обитающих в этих экосистемах, по-прежнему ограничены. Мы исследовали микробные сообщества, обитающих в подземных водоносных горизонтах Западной Сибири (Томская область, Россия), методами метагеномики. Профилирование состава микробного сообщества по генам 16S рРНК выявило присутствие в нем бактерии *Candidatus Desulforudis audaxviator*. Этот автотрофный сульфат-восстанавливающий микроорганизм был впервые обнаружен около 10 лет назад в воде на глубине 2,8 км в золотом руднике в ЮАР, где этот штамм, названный MP104C, был единственным обитателем. Эта бактерия не была культивирована, но ее полный геном был собран из метагеномных последовательностей. Позднее были обнаружены последовательности 16S рРНК, близкие к MP104C, в различных подземных экологических нишах.

Секвенирование метагенома позволило нам собрать полный геном длиной 2,209,583 нт для "Сибирского" штамма *Ca. Desulforudis audaxviator*, ВУ. Помимо 100% идентичности последовательностей 16S рРНК, сравнение геномов MP104C и ВУ выявило поразительное генетическое сходство этих штаммов. Структурно эти геномы отличаются наличием/отсутствием одного профага и несколькими транслокациями мобильных элементов. CRISPR локусы двух штаммов содержат почти идентичные наборы спейсеров. Анализ точечных различий между двумя геномами выявил 755 SNP, но большинство из них были сконцентрированы только в шести регионах генома, предположительно горизонтально переносимыми в популяции *Desulforudis*. За пределами этих регионов было найдено только 31 SNP. Мы также проанализировали геномы 3-х единичных клеток «сибирского» штамма *Desulforudis audaxviator*, которые оказались практически идентичны между собой, но отличались от геномов единичных клеток этой бактерии из других экосистем.

В целом полученные данные выявили неожиданное генетическое сходство двух популяций *Ca. Desulforudis audaxviator*, обитающих в географически удаленных глубинных подземных экосистемах, длительное время изолированных от поверхности. Такое генетическое сходство можно объяснить либо чрезвычайно низкой скоростью развития микроорганизмов в глубинной подземной биосфере, либо еще неизвестным способом глобальной дисперсии таких микроорганизмов.

Публикации

Kadnikov VV, Frank YA, Mardanov AV, Beletsky AV, Karnachuk OV, Ravin NV. (2017) Metagenome of the Siberian underground water reservoir. **Genome Announc.** 5(47): e01317-17.

Кадников В.В., Франк Ю.А., Марданов А.В., Белецкий А.В., Ивасенко Д.А., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. (2017) Некультивируемые бактерии и метаногенные археи доминируют в микробном сообществе подземных вод Западной Сибири. **Микробиология**, т. 86, № 3, с. 383-386.

Кадников В.В., Франк Ю.А., Марданов А.В., Белецкий А.В., Ивасенко Д.А., Пименов Н.В., Карначук О.В., Равин Н.В. (2017) Вариабельность состава микробного резервуара подземных термальных вод в Западной Сибири. **Микробиология**, т. 86, № 6, с. 739–747.

ТРАНСФОРМАЦИЯ МИНЕРАЛОВ ЖЕЛЕЗА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ АНАЭРОБНОЙ АЛАКАЛОФИЛЬНОЙ БАКТЕРИИ *FUCHSIELLA FERRIREDUCTENS*

Грачева М.А.¹, Чистякова Н.И.¹, Антонова А.В.¹, Русаков В.С.¹, Жилина Т.Н.², Заварзина Д.Г.²

¹ Физический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

² ФИЦ Биотехнологии РАН

Три железосодержащих минерала – синтезированные в лабораторных условиях ферригидрит и магнетит, а также сидерит гидротермального происхождения были протестированы на предмет возможности использования их в качестве источника энергии (акцептора/донора) для анаэробной экстремально натронофильной бактерии *Fuchsiella ferrireducens*, штамм Z-7101^T в присутствии этанола. По окончании эксперимента твердая фаза была исследована методом Мессбауэровской спектроскопии при комнатной температуре и 82°К. Было обнаружено, что все три минерала претерпевают структурные изменения в процессе бактериального роста. Синтезированный ферригидрит, используемый *Fuchsiella ferrireducens* в качестве акцептора электронов, восстанавливался бактерией с образованием крупных (> 100 нм) и мелких (~5 нм) частиц магнетита и сидерита. Результатом биотрансформации синтезированного магнетита, который мог служить как акцептором, так и донором электронов, стало появление мелких частиц магнетита без образования новой минеральной фазы. Сидерит, содержащий только атомы двухвалентного железа, мог использоваться как донор электронов наряду с этанолом. Однако, в этом случае, мессбауэровский спектральный анализ выявил образование новой фазы двухвалентного железа, близкой по структуре к сидериту биогенного происхождения, который мог появиться в результате процесса перекристаллизации сидерита под воздействием *Fuchsiella ferrireducens*. Полученные результаты свидетельствуют о способности исследуемой бактерии воздействовать на структуру как окисленных, так и восстановленных минералов железа.

Публикация

Gracheva M.A., Chistyakova N.I., Antonova A.V., Rusakov V.S., Zhilina T.N., Zavarzina D.G. Mössbauer study of iron minerals transformations by *Fuchsiella ferrireducens* // **Hyperfine Interact.** 2017. V. 238:84. 8 p. <https://doi.org/10.1007/s10751-017-1460-4>.

РОЛЬ МЕТИЛ-ДНК СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА KAISO В РЕГУЛЯЦИИ ГОМЕОСТАЗА

Женило С.¹, Деев И.², Жигалова Н.¹, Каплун Д.¹, Литвинова Е.³, Соколов А.¹, Мазур А.¹, Прохорчук Е.Б.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Институт биоорганической химии имени М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

³ ФИЦ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН

Метилирование ДНК является необходимой модификацией для развития организма. Удаление генов ДНК-метилтрансфераз, ТЕТ гидроксилаз у мышей приводит к развитию летальных дефектов. Однако, нокаут ключевых генов белков интерпретаторов метилированной ДНК не приводит к столь серьезным последствиям. Общим фенотипом при удалении различных метил-ДНК связывающих белков являются поведенческие отклонения и неврологические заболевания. Предполагается, что именно изменения в метилировании ДНК лежат в основе процессов, связанных с обучением, поведением, функционированием нервной системы. В связи с этим в последнее время активно исследуются функциональная значимость метил-ДНК связывающих белков (MBD), механизмы их действия. Одним из MBD белков является Kaiso. Kaiso – ВТВТ/POZ белок, являющийся метил-чувствительным репрессором, участвующий в раковой трансформации клеток. Несмотря на то что Kaiso является репрессором, он был детектирован на промоторах активных генов. В данной работе нам удалось показать механизм изменения транскрипционных свойств Kaiso. Способность Kaiso выступать в роли активационного фактора транскрипции оказалась связана с посттрансляционной модификацией сумоилированием. Нам удалось показать, что Kaiso модифицируется SUMO по 42 лизину, расположенному в ВТВТ/POZ домене. Сумоилирование переводит Kaiso из разряда репрессоров транскрипции в активаторы. Десумоилирование Kaiso детектируется при гиперосмотическом стрессе и является обратимым. Была получена модельная клеточная линия с точечной мутации по 42 лизину Kaiso, предотвращающая модификацию белка с помощью CRISPR/CAS9 редактирования, что привело к изменению транскрипции генов, связанных с ионным транспортом, кровяным давлением и иммунным ответом. На мышинной модели, мы показали, что Kaiso нокаутные животные предрасположены к гипертензии при высокосолевого диете. Была найдена новая мишень Kaiso – ген TRIM25, экспрессия которого менялась в зависимости от модификации Kaiso, в том числе при гиперосмотическом стрессе. При отсутствии Kaiso уровень TRIM25 был не чувствителен к высокой соли. Таким образом, нам удалось найти новую биологическую роль Kaiso в регуляции гомеостаза.

Публикация

Статья принята в печать в 2018 году в журнал **Cell Death and Differentiation**
Zhenilo S, Deyev I, Litvinova E, Zhigalova N, Kaplun D, Sokolov A, Mazur A and Egor Prokhortchouk
DeSUMOylation switches Kaiso from activator to repressor upon hyperosmotic stress.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА И ЕГО СОПОЛИМЕРОВ В ПРОЦЕССЕ БИОДЕГРАДАЦИИ *IN VITRO*

Жуйков В.А.¹, Бонарцева Г.А.¹, Бонарцев А.П.², Махина Т.К.¹, Мышкина В.Л.¹, Багров Д.В.², Яковлев С.Г.¹, Бессонов И.В.², Копицына И.Н.⁶, Морозов А.С.⁶, Русаков А.А.³, Усеинов А.С.³, Шайтан К.В.², Жаркова И.И.², Быкова Г.С.², Тарашкин Н.Ю.⁶, Киреев А.В.⁶, Воинова В.В.², Зернов А.Л.¹, Акулина Е.А.¹, Иванова Э.В.², Кузнецова Е.С.², Алексеева С.Г.⁴, Подгорский В.В.⁵, Милановский Е.Ю.², Тюгай З.Н.², Босхомджиев А.П.¹, Харитонов Е.П.², Самсонова О.В.², Ефремов Ю.М.², Кудряшова К.С.², Феофанов А.В.², Кирпичников М.П.²

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова

³ ФГБНУ «Технологический Институт Сверхтвердых и Новых Углеродных Материалов»

⁴ ОАО «Институт пластмасс»

⁵ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

⁶ Московский государственный технический университет им. Н.Э. Баумана

Поли-3-оксибутират и его сополимеры, являются биосовместимыми и биodeградируемыми полимерами. В настоящее время их используют для разработки широкого спектра изделий биомедицинского назначения (имплантов и покрытий для них, стентов, резервуаров для лекарств и др.).

По своей структуре полиоксиаканоаты (ПОА) относятся к частично кристаллическим полимерам. Молекулы ПОА формируют разнообразные надмолекулярные структуры: ламели, сферолиты, аксиалиты. Надмолекулярная структура полимера (размер и форма ламелей, их относительное расположение) существенно влияет на свойства полимера, в том числе на кинетику его ферментативного разложения. Возможности регуляции кинетики разложения ПОА путем оптимизации надмолекулярной структуры в настоящее время являются предметом активного изучения.

Чтобы понять в каких направлениях медицины можно использовать данные полимеры, необходимо исследовать изменение их физико-химических свойств в процессе биodeградации *in vitro*.

В нашей работе были проведены исследования по биodeградации ПОА *in vitro* в присутствии панкреатической липазы.

В процессе биodeградации было показано, что масса пленок из ПОБ и его сополимеров в процессе деградации в течение 6 месяцев под действием липазы снижается незначительно, не более 10% (для ПОБ с наименьшей молекулярной массой (ММ) 105 кДа).

Молекулярная масса полимеров значительно снижалась после инкубации в фосфатном буфере (0,025 М) и в буферном растворе с добавлением липазы. Наибольшее уменьшение ММ наблюдалось у высокомолекулярных полимеров.

Методом АСМ выявлены три типа изменений структуры поверхности пленок ПОБ, которые происходят при разложении панкреатической липазой: появление новых ламелей (вследствие исчезновения аморфной компоненты), исчезновение части ламелей и фрагментация ламелей на более короткие участки (за счет дефектов в надмолекулярной кристаллической структуре).

При гидролитической деструкции степень кристалличности полимеров изменяется волнообразно. При ферментативной деградации волнообразного изменения кристалличности после 1 месяца инкубации не наблюдается.

Модуль Юнга увеличивается в процессе деградации у всех полимеров: в первую неделю характерен резкий рост модуля Юнга как в растворе липазы, так и в буфере, затем он сменяется относительным плато. К 6 месяцу пленки из низкомолекулярного ПОБ (105 кДа) распадаются. Вследствие поверхностной эрозии пленок в процессе ферментативной и гидролитической деградации увеличивается гидрофильность полимеров.

Продемонстрирована разница механизмов деградации при ферментативной и гидролитической деструкции. При гидролитической деградации некаталитический механизм свойственен для 10 разных ПОА. Ферментативная деградация идет по двум механизмам – неавтокаталитическому и автокаталитическому для большинства ПОА, кроме ПОБ 1095 и ПОБВ 2,5% 768 (только неавтокаталитический механизм).

Показано, что содержание более 5,7% 3-оксивалерата в цепи сополимера является критической точкой, которая определяет область изменения структурно-механических свойств сополимера, в частности, степени кристалличности.

Пористые скэффолды из ПОБ через 6 месяцев ферментативной деградации сохраняли свою целостность, их модуль Юнга увеличивался примерно в 3,5 раза, а водопоглощение - почти в 20 раз.

Публикации

- V. A. Zhuikov, A. P. Bonartsev, D. V. Bagrov, S. G. Yakovlev, V. L. Myshkina, T. K. Makhina, I. V. Bessonov, M. N. Kopitsyna, A. S. Morozov, A. A. Rusakov, A. S. Useinov, K. V. Shaitan, and G. A. Bonartseva. Mechanics and surface ultrastructure changes of poly(3-hydroxybutyrate) films during enzymatic degradation in pancreatic lipase solution. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, 648(1):236–243, 2017.
- V. A. Zhuikov, A. P. Bonartsev, I. I. Zharkova, G. S. Bykova, N. Y. Taraskin, A. V. Kireynov, M. N. Kopitsyna, G. A. Bonartseva, and K. V. Shaitan. Effect of poly(ethylene glycol) on the ultrastructure and physicochemical properties of the poly(3-hydroxybutyrate). **Macromolecular Symposia**, 375(1), 2017.
- V. Zhuikov, A. Bonartsev, D. Bagrov, A. Rusakov, A. Useinov, V. Myshkina, T. Mahina, K. Shaitan, and G. Bonartseva. The changes in surface morphology and mechanical properties of poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymer films during in vitro degradation. **Solid State Phenomena**, 258:354–357, 2016.
- A. P. Bonartsev, I. I. Zharkova, S. G. Yakovlev, V. L. Myshkina, T. K. Mahina, V. V. Voinova, A. L. Zernov, V. A. Zhuikov, E. A. Akoulina, E. V. Ivanova, E. S. Kuznetsova, K. V. Shaitan, and G. A. Bonartseva. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by azotobacter chroococcum 7b: a precursor feeding strategy. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, 47(2):173–184, 2017.
- А. П. Бонарцев, Г. А. Бонарцева, В. Л. Мышкина, В. В. Воинова, Т. К. Махина, И. И. Жаркова, С. Г. Яковлев, А. Л. Зернов, Э. В. Иванова, Е. А. Акулина, Е. С. Кузнецова, В. А. Жуйков, С. Г. Алексеева, В. В. Подгорский, И. В. Бессонов, М. Н. Копицына, А. С. Морозов, Е. Ю. Милановский, З. Н. Тюгай, Г. С. Быкова, М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан. Биосинтез сополимера поли-3-оксибутират-со-3-окси-4-метилвалерат штаммом azotobacter chroococcum 7Б. **Acta Naturae** (русскоязычная версия), 8(3(30)):85–96, 2016.
- A. P. Bonartsev, I. I. Zharkova, S. G. Yakovlev, V. L. Myshkina, T. K. Makhina, A. L. Zernov, K. S. Kudryashova, A. V. Feofanov, E. A. Akulina, E. V. Ivanova, V. A. Zhuikov, N. V. Andreeva, V. V. Voinova, I. V. Bessonov, M. V. Kopitsyna, A. S. Morozov, G. A. Bonartseva, K. V. Shaitan, and M. P. Kirpichnikov. 3d-scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate)poly(ethylene glycol) copolymer for tissue engineering. **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, 6(1):42–52, 2016.
- A. P. Bonartsev, S. G. Yakovlev, A. P. Boskhomdzhiyev, I. I. Zharkova, D. V. Bagrov, V. L. Myshkina, T. K. Mahina, E. P. Charitonova, O. V. Samsonova, A. L. Zernov, V. A. Zhuikov, Yu M. Efremov, V. V. Voinova, G. A. Bonartseva, and K. V. Shaitan. The terpolymer produced by azotobacter chroococcum 7b: effect of surface properties on cell attachment. **PLoS ONE**, 8(2):e57200, 2013.

ФОРМИРОВАНИЕ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА ТОНКИХ ПЛЕНОК НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА И ДРУГИХ ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Жуйкова Ю. В.¹, Курек Д. В.², Шагдарова Б. Ц.¹, Ильина А.В.¹, Варламов В. П.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² ООО «Биотехнологии будущего» (Future Biotech).

Тонкие пленки, созданные из природных полисахаридов, в последние годы интенсивно изучаются, что связано с их преимуществами по сравнению с синтетическими материалами, прежде всего хорошей биологической совместимостью с живыми тканями, низкой токсичностью, биоразлагаемостью. Это позволяет использовать их в различных областях биологии и медицины. Основные физико-химические характеристики и структура применяемых полисахаридов могут оказывать существенное влияние на параметры пленок, получаемых на их основе. В настоящее время подход, основанный на нахождении взаимосвязей между структурой материалов и их свойствами, интенсивно развивается. При этом становится возможным получение материалов с заданными макропараметрами, путем исследования свойств их компонентов на молекулярном уровне.

В ходе работы с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) проанализировано влияние степени дезацетилирования (СД) и молекулярной массы (ММ) полисахарида хитозана на структурные особенности тонких пленок. Продемонстрированы различные свойства покрытий при варьировании основных характеристик исследуемых образцов хитозана. Показано, что при уменьшении степени дезацетилирования с 81 до 61% для образцов с ММ=14 кДа, а также с 95 до 38% для образцов с ММ=200 кДа, происходит уменьшение степени заполнения подложки пленкой. Молекулярная масса хитозана (ММ=31 кДа и 200 кДа при СД=90-95%) в значительной степени влияет на структуру хитозанового покрытия и в меньшей степени на толщину слоя.

Было рассмотрено влияние концентрации растворов, способа нанесения, кислотности на формирование пектиновых и хитозановых покрытий. С помощью метода кварцевого микробаланса исследовали характер формируемых поверхностей (количество адсорбируемого вещества на каждом этапе сборки мультислойной пленки, компактность, прочность), определены вязкоупругие характеристики полимерных слоев. На основании данных АСМ-микроскопии предложены модели взаимодействия двух полимеров в составе бислоев. Морфология поверхности и особенности формирования мультислойных пленок на основе полисахаридов пектина, хитозана, κ-каррагинана, гепарина, полученных методом послойной сборки разнозаряженных слоев, исследованы с помощью атомно-силовой микроскопии. Метод АСМ-спектроскопии использован для исследования жесткости, величины сил адгезии.

Биологическая совместимость мультислойных пленок на различных подложках оценивалась в результате культивирования на их поверхности фибробластоподобных клеток. Показано, что модификация подложки для улучшения адгезии наиболее эффективна с помощью пленок из 4-6 слоев хитозана и κ-каррагинана. Покрытие материала на основе титана таким наноструктурированным полимерным покрытием приводит к улучшению биосовместимости поверхности, о чем свидетельствует увеличение количества прикрепившихся клеток. Это демонстрирует возможность применения тонких пленок на основе природных полисахаридов в тканевой инженерии.

Изучение антимикробных свойств хитозана также является актуальной задачей при создании материалов на его основе для биомедицинской области. С помощью методов двукратных серийных разведений и АСМ исследована антибактериальная активность кватернизированного производного хитозана и антимикробных пептидов – мелиттина и варнерина. Показано усиление антибактериального действия, проявляемого конъюгатами.

Публикации

- Yuliya V. Chudinova, Denis V. Kurek, Valery P. Varlamov Molecular structure and formation of chitosan and pectin based thin films / **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**. 2016. № 21. С.18-26.
- Чудинова Ю. В., Шагдарова Б. Ц., Ильина А. В., Варламов В. П. Изучение антибактериального действия конъюгатов пептидов и кватернизированных производных хитозана с помощью атомно-силовой микроскопии / **Прикладная биохимия и микробиология**. 2016. Т. 52. № 5. С. 482-488.
- Чудинова Ю. В., Коновалова М. В., Ильина А. В., Варламов В. П. Влияние физико-химических характеристик хитозана на структуру тонких пленок / **Известия Уфимского научного центра РАН**. 2016. №3(1). С. 103-106.
- Yuliya V Chudinova, Denis V Kurek, Valery P. Varlamov Molecular Architecture of Natural Polysaccharide Based Thin Films / **Solid State Phenomena**. 2017. Т.258. с.358-361.

НОВЫЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Пометун А.А.¹, Каргов И.С.¹, Степашкина А.В.¹, Тишков В.И.¹, Бойко К.М.¹, Савин С.С.², Зарубина С.А.², Паршин П.Д.², Виролайнен Т.С.², Ковалевский Р.П.², Николаева А.Ю.³

¹ - ФИЦ Биотехнологии РАН

² - Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

³ - НИЦ Курчатовский институт

Формиатдегидрогеназа (ФДГ КФ 1.2.1.2.) это фермент, ген которого найден в большом количестве различных организмов. ФДГ интересна как с фундаментальной, так и с практической точки зрения. С одной стороны ФДГ – это фермент, который можно рассматривать как модельный для изучения переноса гидрид иона в активном центре очень большого суперсемейства D-специфичных дегидрогеназ 2-оксикислот, а с другой стороны – это фермент, широко применяемый на практике в системах регенерации кофактора.

В нашей лаборатории проводятся систематические исследования взаимосвязи структура-функция и работы по белковой инженерии ФДГ из разных источников. Два года назад на ежегодной конференции ИНБИ были доложены результаты по белковой инженерии ФДГ из сои. За прошедшие два года в нашей лаборатории были клонированы гены трех новых формиатдегидрогеназ – из патогенных бактерий *Staphylococcus aureus* (SauFDH), термотолерантных дрожжей *O.parapolyomorpha* (OraFDH) и мха *Physcomitrella patens* (PraFDH). Все три гена были экспрессированы в клетках *E.coli*, очищены и характеризованы.

В случае растительной PraFDH впервые в мире получен пробелок с сигнальным пептидом в активной форме. Получено 5 различных вариантов, отличающихся по структуре N-концевой последовательности. Было показано, что структура N-концевой последовательности сильно влияет на уровень экспрессии белка в *E.coli*, но практически не оказывает влияния на его основные свойства – кинетические параметры и температурную стабильность.

Проведены эксперименты по изучению взаимосвязи структура-функция OraFDH, PraFDH и SauFDH. Методом направленного мутагенеза показана важность полуконсервативного мотива XP(A)QP для катализа и стабильности формиатдегидрогеназ. Также нами выявлено несколько других интересных положений в последовательности ФДГ и изучено влияние их замен методом направленного мутагенеза. В общей сложности, получено более 20 новых мутантных форм фермента, большая часть которых обладает улучшенными свойствами по сравнению с ферментами дикого типа.

Ионные жидкости. Совместно с итальянскими коллегами из Милана изучено влияние четырех ионных жидкостей на стабильность и активность шести рекомбинантных формиатдегидрогеназ дикого типа и трех типов ФДГ с заменами. Показано, что замены на поверхности фермента дестабилизируют его в ИЖ, в то время как замены внутри белковой глобулы – стабилизируют.

Структурные исследования – получены кристаллы и решена структур апо- и холо- форм OraFDH, PraFDH и SauFDH.

Еще одним направлением работы нашей лаборатории является создание гибридных белков на основе мутантной NADP⁺-зависимой формиатдегидрогеназы, полученной нами ранее. В результате совместной работы с университетом г. Дюсельдорф были получены генетические конструкции, кодирующие гибридные молекулы FDN-VM3 P450. Была проведена экспрессия этих мутантных ферментов в клетках *E.coli* и показано, что они обладают активностью. В настоящее время также ведутся работы по созданию гибридных систем формиатдегидрогеназы с фенилацетонмонооксигеназой (РАМО).

Публикации

Тишков В.И., Пометун А.А., Степашкина А.В., Федорчук В.В., Зарубина С.А., Каргов И.С., Атрошенко Д.Л., Паршин П.Д., Шеломов М.Д., Ковалевский Р.П., Бойко К.М., Эльдаров М.А., Д'Оронцо Э., Секундо Ф., Савин С.С. Рациональный дизайн практически важных ферментов. // **Вестник Московского университета. Серия 2: Химия**, 2018, т. 59, № 2, с. 70-77

Пометун А.А., Клейменов С.Ю., Зарубина С.А., Каргов И.С., Паршин П.Д., Садыхов Э.Г., Савин С.С., Тишков В.И. Сравнение термостабильности новых формиатдегидрогеназ с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. // **Вестник Московского университета. Серия 2: Химия**, 2018, т. 59, № 2, с. 164-169

Пометун А.А., Зарубина С.А., Паршин П.А., Каргов И.С., Савин С.С., Тишков В.И. Новые формиатдегидрогеназы: взаимосвязь структура-функция. **Acta Naturae**, 2016, т. 2, с. 33-34

Тишков В.И., Пометун А.А., Зарубина С.А., Каргов И.С., Виролайнен Т.С., Атрошенко Д.Л.,

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА БИОГЕОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В АЭРОБНОЙ ВОДНОЙ ТОЛЩЕ РОССИЙСКОГО СЕКТОРА ЧЕРНОГО МОРЯ НА ПРИМЕРЕ МИКРОБНОГО ЦИКЛА МЕТАНА

Русанов И.И.¹, Юсупов С.К.¹, Захарова Е.Е.¹, Засько Д.Н.², Леин А.Ю.², Пименов Н.В.¹

¹ *ФИЦ Биотехнологии РАН*

² *Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН*

Потепление климата в северо-восточной части Черного моря и предполагаемое в связи с этим ослабление конвективного перемешивания в зимний сезон может привести к сокращению мощности аэробной зоны за счет подъема анаэробной. Биогеохимические процессы, протекающие в водной толще Российского сектора Черного моря, оказывают влияние на экологическую ситуацию всего рекреационного района, протягивающегося от Крыма до Сочи.

Многолетние исследования гидрохимической характеристики водной толщи показали, что содержание и распространение биогенных элементов в водной толще связаны с гидрологической структурой вод. Сильная изменчивость динамических процессов в верхних слоях водной толщи приводит к тому, что в зависимости от времени года в аэробной зоне происходят изменения количества и состава биогенных компонентов.

Измерение скоростей биогеохимических процессов, наряду с данными гидрохимических и гидрофизических характеристик водной толщи, могут быть использованы для определения природы и сезонной вариабельности состава и направленности потоков органического вещества. Для оценки современных потоков вещества в море ключевую роль играют биогеохимические процессы продукции (фото- и хемосинтез) и деструкции (микробная трансформация и минерализация) углерода.

Проведенные исследования выявили мозаичный характер распределения активности фотосинтеза и микробной ассимиляции углекислоты. Общей тенденцией являются обнаруженные максимумы в поверхностном слое и зоне термоклина. Анализ распределения вертикальных профилей концентрации метана в аэробной водной толще показал наличие максимумов, приуроченных к зонам повышенного содержания органического вещества. Измеренные нами на большом количестве станций интенсивности микробного метаногенеза хорошо совпадали с пиками концентрации метана в аэробной водной толще. Доказано, что повышение концентрации метана, обнаруживаемое в аэробной водной толще, обусловлено деятельностью метаногенов в анаэробных микронизах: кишечники и пеллеты зоопланктона, взвешенные частицы органического вещества. Интенсивность микробных процессов цикла метана в аэробной зоне имеет выраженный сезонный характер и тесно связана с изменениями количества и состава органического углерода.

Публикация

Русанов И.И., Леин А.Ю., Маккавеев П.Н., Клювиткин А.А., Кравчишина М.Д., Иванов М.В., Флинт М.В. Сезонная динамика биогеохимических процессов в водной толще северо-восточного района Черного моря // **Океанология**. 2018. Т. 58. № 1. С. 67-79.

СОЗДАНИЕ И СВОЙСТВА НОВЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ НЕКРАХМАЛЬНЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Рожкова А.М.¹, Зоров И.Н.^{1,2}, Рубцова Е.А.¹, Сеницына О.А.^{1,2}, Осипов Д.О.¹, Волков П.В.¹,
Баширова А.В.¹, Короткова О.Г.¹, Волчок А. А.¹, Шашков И.А.¹, Сатрутдинов А.Д.¹, Кондратьева Е.Г.²,
Сеницын А.П.^{1,2}

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² МГУ имени М.В. Ломоносова, Химический факультет

Злаки широко применяются для производства кормов, используемых в птицеводстве и животноводстве. Однако они содержат некрахмальные полисахариды (НПС) – целлюлозу, β-глюканы, ксиланы, которые негативно влияют на усвояемость кормов. Карбогидразы разрушают растворимые и нерастворимые НПС и делают питательные вещества кормов более доступными для пищеварительных ферментов животных и птицы, поэтому ферментные препараты целлюлаз, β-глюканаз, ксиланаз широко используются в качестве кормовых добавок. На платформе системы экспрессии генов гриба *Penicillium verruculosum* нами созданы новые высокопродуктивные рекомбинантные штаммы, позволившие получить кормовые ферментные препараты нового поколения, содержащие сбалансированный комплекс карбогидраз, имеющих высокую молекулярную активность по отношению к НПС зерна злаков (и имеющие низкое содержание "балластных" с точки зрения применения в качестве кормовых добавок ферментов), повышенную устойчивость к пищеварительным протеазам (пепсину, трипсину), повышенную стабильность при высоких температурах, которые используется при гранулировании комбикормов, а также не ингибирующихся белковыми ингибиторами злаков. Производство ферментных препаратов нового поколения Агроцелл Плюс, Агроксил Плюс и Агроксил Премиум налажено на заводе «Агрофермент». Исследования поддержаны Министерством образования и науки, идентификационный номер проекта RFMEFI60716X0159.

Публикации

- Рожкова А.М., Мерзлов Д.А., Баширова А.В., Зоров И.Н., Короткова О.Г., Шашков И.А., Сеницын А.П., Новый ферментный препарат для снижения вязкости цельнозерновых экстрактов ржи, **Вестн.Моск.Ун-та. Серия 2. Химия**, 2018, т.59, №2, с.121-126
- Сеницын А.П., Рубцова Е.А., Шашков И.А., Рожкова А.М., Сеницына О.А., Кондратьева Е.Г., Зоров И.Н., Мерзлов Д.А., Осипов Д.О., Матыс В.Ю. Получение и свойства новых биокатализаторов, предназначенных для разрушения некрахмальных растительных полисахаридов. **Катализ в промышленности**. 2017, т.17, №4, с.331-338
- Сеницын А.П., Волков П.В., Рубцова Е.А., Шашков И.А., Рожкова А.М., Сеницына О.А., Кондратьева Е.Г., Зоров И.Н., Сатрутдинов А.Д., Мерзлов Д.А., Матыс В.Ю. Использование индуцибельного промотора гена глюкоамилазы для получения новых мультиферментных комплексов *Penicillium verruculosum*. **Катализ в промышленности**. 2017, т.17, №5, С.407-413
- Егоров И.А., Егорова Т.В., Мосеев П.А., Кержнер М.А., Сеницын А.П. Ферментные препараты отечественного производства в комбикормах для цыплят-бройлеров, **Птицеводство**, 2018, №1, стр. 16-19
- Сеницын А.П., Зоров И.Н., Короткова О.Г., Мерзлов Д.А. Метод определения степени ингибирования ксиланаз белковыми ингибиторами злаков. 2016, **Птицеводство**, №1, с.19-24
- Короткова О.Г., Сеницына О.А., Кондратьева Е.Г., Кержнер М.А., Мосеев П.А., Сеницын А.П. Сравнительный анализ активности кормовых ферментных препаратов, предназначенных для деструкции некрахмальных полисахаридов, **Птицеводство**, 2016, №5, с.8-13

БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЙ ПОДХОД КАК АЛЬТЕРНАТИВА ХИМИЧЕСКОМУ СИНТЕЗУ ЭЛЕКТРОПРОВОДЯЩИХ НАНОКОМПОЗИТОВ С УЛУЧШЕННЫМИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Шумакович Г.П.¹, Хлупова М.Е.¹, Васильева И.С.¹, Отрохов Г.В.¹, Каплан И.Б.³, Зайчик Б.Ц.¹, Зайцева Е.А.², Морозова О.В.¹, Ярополов А.И.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

³ Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова

Предложен ферментативный способ синтеза нанокompозитного материала с контролируемой морфологией на основе электропроводящего полианилина и многостенных углеродных нанотрубок (ПАНИ/МУНТ). В качестве биокатализатора использовали высоко редокс потенциальную лакказу гриба *Trametes hirsuta*. Окислителем в реакции свободно радикальной полимеризации мономера анилина являлся атмосферный кислород. Композит ПАНИ/МУНТ получили путем ферментативной полимеризации мономера *in situ*, т.е. на поверхности МУНТ. Был разработан метод синтеза, при котором композит имел однородную структуру с отсутствием полимерной фазы, несвязанной с поверхностью углеродного наноматериала. Это было достигнуто благодаря использованию ускорителя действия фермента (димера анилина), предварительно адсорбированного на поверхности МУНТ.

Был оптимизирован биокаталитический способ получения нанокompозита. Показано, что по сравнению с химическим методом, полученный композит обладал однородной морфологией и высокими электрохимическими характеристиками. Композит ПАНИ/МУНТ был использован в качестве электроактивного материала электродов суперконденсатора – устройства для хранения и накопления энергии, которое может быть использовано в различных устройствах, в том числе гибких гаджетах. Приведены характеристики полученного гибкого и тонкого (~300 мкм) суперконденсатора на основе гелевого электролита, содержащего редокс-активное соединение. Будут рассмотрены преимущества и недостатки предложенного способа получения нанокompозита.

Публикации

- G.V. Otrokhov¹, G.P. Shumakovich¹, M.E. Khlopova¹, I.S. Vasil'eva¹, I.B. Kaplan³, B.T. Zaitchik², E.A. Zaitseva³, O.V. Morozova¹, A.I. Yaropolov¹. Biocatalytic approach as alternative to chemical synthesis of polyaniline/carbon nanotube composite with enhanced electrochemical properties. // **RSC Advances**. 2016. V. 6. P. 60372-60375.
- G.P. Shumakovich¹, O.V. Morozova¹, M.E. Khlopova¹, I.S. Vasil'eva¹, E.A. Zaitseva³, A.I. Yaropolov¹. Enhanced performance of a flexible supercapacitor due to a combination of pseudocapacitances of both PANI/MWCNT composite electrode and gel polymer redox electrolyte. // **RSC Advances**. 2017. V. 7. P. 34192-34196.

РАЗНООБРАЗИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ БАКТЕРИЙ В ЗАВОДНЯЕМОМ ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНОМ МЕСТОРОЖДЕНИИ ТЯЖЕЛОЙ НЕФТИ В ПРОЦЕССЕ ИСПЫТАНИЙ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОВЫШЕНИЯ НЕФТЕИЗВЛЕЧЕНИЯ

Семенова Е.М.¹, Шестакова Н.М.¹, Кострюкова Н.К.¹, Турова Т.П.¹, Бабич Т.Л.¹, Полтараус А.Б.², Иванов М.В.¹, Назина Т.Н.¹

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН,

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН

Залежь Кондиан высокотемпературного нефтяного месторождения Даган (КНР) служила объектом применения биотехнологии повышения нефтеотдачи, направленной на активацию пластовой микрофлоры. Внесение в пласт кислорода в виде водно-воздушной смеси или раствора H_2O_2 и солей азота и фосфора приводило к увеличению численности аэробных и анаэробных микроорганизмов и скорости метаногенеза в пластовых водах. Микробное окисление нефти сопровождалось увеличением концентрации карбонатов и летучих кислот в пластовых водах, образованием газов и биосурфактантов и снижением межфазного натяжения между пластовой водой и нефтью, что позволило получить более 46 тыс. т дополнительной нефти.

Микробное сообщество пластовой воды из призабойной зоны нагнетательной скважины залежи Кондиан было исследовано путем создания клонотек генов 16S рРНК и *alkB* и транскриптов 16S кДНК на основе тотальных ДНК и РНК, соответственно, что позволило впервые охарактеризовать не только биоразнообразие, но и метаболически активную часть пластовой микрофлоры.

В библиотеках клонов, полученных на основе ДНК, среди последовательностей *Archaea* преобладали гены 16S рРНК метаногенов родов *Methanomethylovorans*, *Methanoculleus*, *Methanolinea*, *Methanothrix* и *Methanocalculus*; среди последовательностей *Bacteria* наиболее многочисленными были гены 16S рРНК бактерий рода *Geobacillus*.

В библиотеках клонов, полученных на основе тотальной РНК, присутствовали последовательности 16S кДНК метаболически активных аэробных органотрофных бактерий (*Tepidimonas*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*), денитрифицирующих (*Azoarcus*, *Tepidiphilus*, *Calditerrivibrio*), бродильных (*Bellilinea*), железоредуцирующих (*Geobacter*), сульфат- и сероредуцирующих (*Desulfomicrobium*, *Desulfuromonas*) бактерий. Присутствие микроорганизмов основных функциональных групп, выявленных молекулярными методами, было подтверждено результатами культуральных, радиоизотопных и геохимических исследований.

Показано функционирование мезофильной и термофильной ветвей микробной пищевой цепи, включающей микроорганизмы циклов углерода, серы, железа и азота, в призабойной зоне нагнетательной скважины.

Публикации

Nazina T.N., Shestakova N.M., Semenova E.M., Korshunova A.V., Kostriukova N.K., Tourova T.P., Min L., Feng Q., Poltaraus A.B. Diversity of metabolically active Bacteria in water-flooded high-temperature heavy oil reservoir // **Front. Microbiol.** 2017. 8:707. doi:10.3389/fmicb.2017.00707.

Назина Т.Н., Фенг Ц., Кострюкова Н.К., Шестакова Н.М., Бабич Т.Л., Ни Ф., Ванг Д., Мин Л., Иванов М.В. Микробиологические и продукционные характеристики высокотемпературного месторождения тяжелой нефти Даган (блок № 1) в процессе испытаний биотехнологии повышения нефтеизвлечения // **Микробиология.** 2017. Т. 86. № 5. С. 636–650.

МУЛЬТИГЕННЫЕ СЕМЕЙСТВА ПЕРОКСИДАЗ И ЛАККАЗ – ОСНОВНЫХ ФЕРМЕНТОВ ЛИГНОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА БАЗИДИАЛЬНОГО ГРИБА БЕЛОЙ ГНИЛИ *Trametes hirsuta*

Д.В. Васина¹, К.В. Моисеенко¹, О.С. Савинова¹, О.А. Глазунова¹, Н.А. Куликова^{1,2}, Т.В. Тяжелова¹,
Т.В. Федорова¹, Королева О.В.

¹ФИЦ «Биотехнологии» РАН

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

Мицелиальные грибы обладают мощным потенциалом к разложению растительных, в том числе древесных субстратов, и тем самым являются необходимыми элементами углеродного цикла Земли, генерации гуминового составляющего почвы и формирования ее тонкой структуры. Древоразрушающие грибы, принадлежащие к отряду Basidiomycota, уникальны по своей способности разрушать компоненты клеточных стенок ксилемы. Более того, способностью разлагать лигнин – одного из наиболее трудно деградируемого растительного биополимера, обладают в основном базидиальные грибы – возбудители белой гнили древесины. Деструкция древесных субстратов является комплексным процессом, эффективность которого определяется действием ферментативных систем грибов и напрямую зависит от их качественного и количественного состава. Многие виды грибов белой гнили также обладают уникальными механизмами детоксификации, как продуктов деградации лигнина, так и различных ксенобиотиков (в том числе красителей, гербицидов, пестицидов, полициклических ароматических углеводов, диоксинов и пр.), поэтому постоянно проводятся работы по поиску, выделению и изучению новых штаммов базидиомицетов, перспективных для использования в технологиях биоконверсии и биоремедиации.

Процесс деструкции лигнина и различных ксенобиотиков грибами белой гнили состоит из большого количества стадий и его эффективность определяется уникальной лигнолитической системой, в состав которой входят такие ферменты как лакказы (КФ 1.10.3.2) и различные группы пероксидаз, в том числе марганец пероксидазы (КФ 1.11.1.13) и лигнин пероксидазы (КФ 1.11.1.14).

In silico анализ отсекуенного нами ранее генома базидиального древоразрушающего гриба белой гнили *Trametes hirsuta* показал присутствие в геноме гриба 18^и функциональных генов, кодирующих ферменты пероксидаз и 7^и функциональных генов, кодирующих ферменты лакказ. Проведено исследование фундаментальных особенностей организации пероксидазного и лакказного мультигенных семейств и изучены закономерности функционирования генов на транскрипционном уровне.

В результате проделанной работы обнаружено существенное различие в закономерностях экспрессии генов пероксидазного и лакказного мультигенных семейств. Так в случае экспрессии мультигенного семейства пероксидаз, можно наблюдать достаточно четкую закономерность: в основном экспрессируются только три гена, относящиеся к одной филогенетической кладе, при этом экспрессия остальных генов на порядок ниже. В то время как в случае экспрессии мультигенного семейства лакказ показана сложная дифференциальная картина зависимости экспрессии генов от условий культивирования, что подтверждает субфункционализацию генов лакказ. При этом мажорный фермент – продукт гена *lacA*, является конститутивным и экспрессируется во всех изученных условиях культивирования, в то время как остальные 6 генов семейства лакказ являются индуцибельными.

Публикации

- Moiseenko K.V., Vasina D.V., Farukshina K.T., Savinova O.S., Glazunova O.A., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Orchestration of the expression of the laccase multigene family in white-rot basidiomycete *Trametes hirsuta* 072: evidences of transcription level subfunctionalization. **Fungal Biology** (принята в печать).
- Vasina D.V., Moiseenko K.V., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. Lignin-degrading peroxidases in white-rot fungus *Trametes hirsuta* 072. Absolute expression quantification of full multigene family. **PLoS ONE** (2017), V. 12, №3, e0173813.
- Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. Properties of two laccases from the *Trametes hirsuta* 072 multigene family: Twins with different faces. **Biochimie** (2017), V. 142, P. 183–190. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.09.013 <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.013>
- Moiseenko K.V., Maloshenok L.G., Vasina D.V., Bruskin S.A., Tyazhelova T.V., Koroleva O.V. Laccase multigene families in Agaricomycetes. **Journal of Basic Microbiology** (2016), V.56, №12, P.1392-1397. DOI: 10.1002/jobm.201600224.
- Vasina D.V., Pavlov A.R., Koroleva O.V. Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* st. 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate. **BMC Microbiology** (2016), V.16, №1, P.106. DOI 10.1186/s12866-016-0729-0, <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0729-0>.

РАЗРАБОТКА ИТЕРАТИВНОГО АЛГОРИТМА ДЛЯ ПОИСКА МНОЖЕСТВЕННОГО ВЫРАВНИВАНИЯ СИЛЬНО ДИВЕРГИРОВАВШИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Суворова Ю.М., Пугачева В.М., Френкель Ф.Е. и Коротков Е.В.

ФИЦ «Биотехнологии» РАН.

Построение множественного выравнивания - это NP полная задача, которая является центральной задачей биоинформатики. Ее точное решение для 10 и более последовательностей достаточной длины невозможно на современных ЭВМ за разумное время. Цель работы состояла в разработке математических методов для построении множественного выравнивания сильно дивергировавших символьных последовательностей, так как существующие математические методы неспособны корректно их выравнивать. Под сильно дивергировавшими последовательностями понимаются последовательности, которые имеют общее происхождение, содержат вставки и делеции и накопили более 1.5 замены на 1 символ. В этом случае статистически значимое парное выравнивание отсутствует и любой вид прогрессивного множественного выравнивания не дает корректного результата. Мы разработали новое решение NP - полной задачи для построения множественного выравнивания для сильно дивергировавших последовательностей. Разработанный подход был применен для поиска сильно дивергировавших тандемных повторов в геноме человека (длиной от 2 до 50 нуклеотидов). Был проанализирован частично геном человека и геномы других видов и удалось показать, что около 10% геномов эукариот состоят из различных тандемных повторов различной степени дивергенции. Банк данных найденных периодичностей находится по адресу: <http://victoria.biengi.ac.ru/cgi-bin/indelper/index.cgi>. Показано, что наиболее часто встречающаяся периодичность имеет периоды равные 2, 4, 10, 11 и 47 нуклеотидам. Полученные результаты показывают, что найденные последовательности могут представлять собой древние микро и минисателлитные последовательности, а также районы связывания нуклеосом. Для изучения последовательностей ДНК из любого генома создан WEB-сервер, который находится по адресу: <http://victoria.biengi.ac.ru/splinter/login.php>. Разработанным методом построено статистически значимое множественное выравнивание промоторных последовательностей из генома *A.thaliana*. Созданный нами математический алгоритм найдет применение при аннотации различных геномов, в эволюционных биологических исследованиях и при построении моделей в финансовой области.

Публикации

- Pugacheva, Valentina, Alexander Korotkov, and Eugene Korotkov. "Search of latent periodicity in amino acid sequences by means of genetic algorithm and dynamic programming." **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology** 15.5 (2016): 381-400.
- Frenkel, F.E., Korotkova, M.A., Korotkov, E.V. «Database of Periodic DNA Regions in Major Genomes» **BioMed Research International**, 2017 (<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/7949287/>)
- Е.В. Коротков , Ю.М. Суворова, К.Г. Скрыбин Доклады Академии Наук, Исследование тандемных повторов со вставками и делециями в геноме *A. Thaliana*, том 477, No 6, с. 1–3, 2017.
- Korotkov, E.V., Korotkova, M.A. Search for regions with periodicity using the random position weight matrices in the *C.elegans* genome. **Int. J. Data Mining and Bioinformatics**, v.18, N.4, 331-354, 2017
- Korotkov, E.V., Korotkova, M.A. Study of the periodicity in Euro-US Dollar exchange rates using local alignment and random matrices **Algorithmic Finance** v. 6 (2017) 23–33 DOI:10.3233/AF-170182
- Korotkov, E., Korotkova, M. «Study of the periodicity in Euro-US Dollar exchange rates using local alignment and random matrixes» **Procedia Computer Science**, 2017 (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877050917306804>)

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ПРОТОЧНЫХ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ: ЗАКОНОМЕРНОСТИ И РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНАЛИТОВ

Жердев А.В., Урусов А.Е., Сотников Д.В., Таранова Н.А., Петракова А.В., Губайдуллина М.К., Дзантиев Б.Б.

ФИЦ Биотехнологии РАН

В современной практике крайне востребованы методы иммунохроматографического анализа (ИХА), интегрирующие высокую селективность иммунного распознавания и методическую простоту проведения реакций рецептор-аналит в проточных мембранных системах. Однако преимущества иммунохроматографии часто сопровождаются потерями в чувствительности детекции, обусловленными неравновесными режимами взаимодействий в проточных мембранных системах. В докладе представлены результаты теоретического и экспериментального изучения иммунохимических взаимодействий при проведении ИХА и разработанные на их основании способы снижения пределов детекции целевых соединений.

Разработаны математические модели, описывающие процесс формирования детектируемых комплексов в ходе иммунохроматографии. Определены ключевые параметры, определяющие предел детекции для разных форматов анализа. Рассмотрены требования к нанодисперсным маркерам, используемым в иммунохроматографии, критерии для предварительного сравнения новых кандидатных маркеров. Показаны возможности снижения чувствительности по сравнению с традиционной иммунохроматографией (предполагающей использование сферических наночастиц золота или окрашенных латексов) при переходе к наночастицам золота с сильно разветвленной поверхностью – «наноцветы» – либо к флуоресцентным нанодисперсным маркерам – квантовым точкам. Охарактеризовано влияние состава комплексов наночастиц с иммунореагентами на аналитические характеристики системы. Рассмотрены способы управления последовательностью взаимодействий реагентов в ходе иммунохроматографии. Продемонстрированы преимущества непрямой иммобилизации антител на коллоидных частицах, формирования в ходе иммунохроматографии агрегатов из функционализированных наночастиц разных типов. Описаны способы реализации анализа моновалентных антигенов с прямой зависимостью детектируемого сигнала от концентрации аналита; проведено их сопоставление с традиционной конкурентной иммунохроматографией.

Эффективность предлагаемых подходов охарактеризована на примерах разработанных систем для детекции пищевых токсикантов (микотоксины, антибиотики), кардиомаккеров, маркеров воспалительных процессов, корпускулярных антигенов.

Публикации

- Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. «Multistage in one touch» design with a universal labelling conjugate for high-sensitive lateral flow immunoassays. **Biosensors and Bioelectronics**. 2016, v. 86, p. 575-579.
- Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа, основанный на обратимой иммобилизации иммунореагентов в магнитном поле. **Патент РФ на изобретение № 2575840** (20.02.2016, «Бюллетень изобретений» № 5).
- Petrakova A.V., Urusov A.E., Gubaydullina M.K., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. "External" antibodies as the simplest tool for sensitive immunochromatographic tests. **Talanta**, 2017, v. 175, p. 77-81.
- Urusov A.E., Petrakova A.V., Gubaydullina M.K., Zherdev A.V., Eremin S.A., Kong D., Liu L., Xu C., Dzantiev B.B. High-sensitivity immunochromatographic assay for fumonisin B1, based on indirect antibody labelling. **Biotechnology Letters**, 2017, v. 39, N 5, p. 751-758.
- Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Математическое моделирование биоаналитических систем. **Успехи биологической химии**, 2017, т. 57, с. 385-438.
- Урусов А.Е., Таранова Н.А., Семейкина А.А., Петракова А.В., Губайдуллина М.К., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа с высокой степенью выявления маркера. **Патент РФ на изобретение № 2623075** (21.06.2017, «Бюллетень изобретений» № 18).
- Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Theoretical and experimental comparison of different formats of immunochromatographic serodiagnostics. **Sensors**, 2018, v. 18, N 1, article 36.
- Urusov A.E., Gubaydullina M.K., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. A new kind of highly sensitive competitive lateral flow assay displaying direct analyte-signal depend Application to the determination of the mycotoxin deoxynivalenol. **Microchimica Acta**, 2018, v. 185, N 1, article 29.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ДЛИТЕЛЬНО ВЫЖИВАЮЩИХ КЛЕТОК НЕКОТОРЫХ ПСЕВДОМОНАД И АКТИНОБАКТЕРИЙ

Мулюкин А.Л., Сорокин В.В., Козлова А.Н., Эль-Регистан Г.И.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Получены данные, свидетельствующие о высоком потенциале выживания псевдомонад *Pseudomonas aeruginosa*, *P. aurantiaca* и актинобактерий *Rhodococcus ruber*, *Microbacterium foliorum*, *Arthrobacter agilis*, значимых для клинической микробиологии и распространенных в природных местах обитания. Установлены особенности структурно-функциональных перестроек клеток исследованных микроорганизмов с образованием покоящихся форм цистоподобного типа при: дисбалансе источников питания, стрессе голодания, развитии в массе синтезируемых клетками экзополимеров. Покоящиеся клетки бактерий характеризовались: сохранностью жизнеспособности при длительном инкубировании (1–12 мес), повышенной устойчивостью к повреждающим воздействиям (например, термообработке при 55–80°C, 5–10 мин), особенностями морфологии и ультраструктурной организации. Подтверждена гипотеза о трансформации малочисленной фракции клеток-персистеров *P. aeruginosa*, обеспечивающих выживание при действии высоких доз ципрофлоксацина (25 – 100 мкг/мл), в цистоподобные покоящиеся формы и некультивируемые клетки. Выявлена многоуровневая гетерогенность длительно инкубируемых популяций бактерий, не только по наличию различных морфологических типов покоящихся клеток, но и по особенностям изменения их ультраструктурной организации при прорастании в благоприятных для роста условиях (на примере *M. foliorum* и *Arthrobacter agilis*). Полученные данные расширяют представления о способах выживания псевдомонад и актинобактерий в природных системах. Покоящиеся формы могут претендовать на формы бактерионосительства и персистенции и важны как компоненты тест-систем для проверки действия средств для борьбы с устойчивыми инфекциями. Разработанные подходы к получению покоящихся форм (в виде суспензионных культур или заключенных в экзополимер клеток) могут быть полезны для поддержания штаммов в коллекциях, в том числе, плохо выдерживающих многократные пересевы.

Публикации

- Мулюкин А.Л., Козлова А.Н., Сорокин В.В., Сузина Н.Е., Чердынцева Т.А., Котова И.Б., Гапонов А.М., Тутьян А.В., Эль-Регистан Г.И. Формы выживания *Pseudomonas aeruginosa* при антибиотической обработке // **Микробиология**. 2015. Т. 84. № 6. С. 645.
- Ivshina I.V., Mukhutdinova A.N., Tyumina N.A., Vikhareva N.V., Suzina N.E., El'-Registan_G.I., Mulyukin A.L. Drotaverine hydrochloride degradation using cyst-like dormant cells of *Rhodococcus ruber* // **Current Microbiology**. 2015. 70(3), 307-314.
- Мулюкин А.Л., Смирнова Т.А., Шевлягина Н.В., Диденко Л.В. Длительное выживание и устойчивость клеток погруженных культур псевдомонад в массе экзополимеров // **Микробиология**. 2017. Т. 86. № 3. С. 352-363.
- Соляникова И.П., Сузина Н.Е., Егозарьян Н.С., Полинцева В.Н., Мулюкин А.Л., Егорова Д.О., Эль-Регистан Г.И., Головлёва Л.А. Особенности структурно-функциональных перестроек клеток актинобактерий *Microbacterium foliorum* BN52 при переходе от вегетативного роста в состояние покоя и при прорастании покоящихся форм // **Микробиология**. 2017. Т. 86. № 4. С. 463-475.
- Solyanikova, I.P., Suzina N.E., Egozarian N.S., Polivtseva V.N., Prisyazhnaya N.V., El-Registan G.I., Mulyukin A.L., Golovleva L.A. The response of soil *Arthrobacter agilis* Lush13 to changing conditions: Transition between vegetative and dormant state // **J. Environ. Sci. Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. 2017. 52(10), 745-751.

СТРУКТУРНАЯ АДАПТАЦИЯ ВОСЬМИГЕМОВЫХ НИТРИТРЕДУКТАЗ ИЗ БАКТЕРИЙ РОДА *THIOALKALIVIBRIO* И *ГЕОБАКТЕР* К РАЗЛИЧНЫМ УСЛОВИЯМ ОБИТАНИЯ

А.В. Попинако, Т.В. Тихонова, К.М. Бойко, Е.М. Осипов, Н.И. Дергоусова, А. В. Тихонов, Д.Ю. Сорокин, В.О. Попов

ФИЦ Биотехнологии РАН

Понимание адаптационных механизмов белков из экстремофильных организмов открывает перспективы для разработки новых генно-инженерных биокатализаторов, стабильных в жестких условиях промышленных производств. В настоящей работе проведено исследование структурной адаптации групп белков на примере семейства восьмигемовых нитритредуктаз (ONRs) к экстремальным условиям дефицита протонов и повышенной концентрации соли. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей и структур ONRs из галоалкалифильных и негалофильных нейтрофильных организмов выявил механизмы адаптации ONR к экстремальным условиям. Обнаружены (1) стратегии, характерные для гало-алкалифильных белков: увеличение содержания остатков аспартата и глутамата, снижение содержания лизина на поверхности молекулы, (2) стратегии, характерные для галофильных белков (уменьшение содержания гидрофобных остатков на поверхности белка), (3) стратегии, характерные для алкалифильных белков (увеличение площади межсубъединичных гидрофобных контактов). Также выявлены уникальные адаптационные механизмы, свойственные семейству ONR, (увеличение содержания триптофана, фенилаланина, уменьшение общей площади поверхности молекулы, увеличение доли остатков с небольшим радикалом (AV) в коре, особое строение каналов активного центра). Полученная структура ONR из негалофильного нейтрофильного организма *Geobacter ammonificans* подтверждает выявленные ранее адаптационные механизмы галоалкалифильных ONRs.

Публикации

- Popinako A., Antonov M., Tikhonov A., Tikhonova T., Popov V. Structural adaptations of octaheme nitrite reductases from haloalkaliphilic *Thioalkalivibrio* bacteria to alkaline pH and high salinity. **PLoS One**. 2017 May 16.12(5). IF 3.54
- Popinako A.V., Tikhonova T. V., Antonov M. Yu., Shaitan K. V., Popov V. O. Structural adaptation of active center channels of octaheme nitrite reductases from the haloalkaliphilic bacteria *Thioalkalivibrio nitratireducens* to a proton deficit. **Molecular Biophysics**. 2017. 62(2). 284–289. IF 0.3 ISSN 0006-3509

МЕХАНИЗМЫ АДАПТАЦИИ АЛКАЛОФИЛЬНОГО ГРИБА *SODIOMYCES TRONII* К ВНЕШНЕМУ pH

Бондаренко С.А.^{1,2}, Януцевич Е.А.¹, Данилова О.А.¹, Камзолкина О.В.², Котлова Е.Р.³, Грум-Гржимайло А.А.⁴, Биланенко Е.Н.², Терёшина В.М.¹

1 ФИЦ Биотехнологии РАН

2 МГУ имени М.В.Ломоносова

3 Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Санкт-Петербург

4 Laboratory of Genetics, Plant Sciences Group, Wageningen University, The Netherlands

Алкалофилия, как способность грибов оптимально жить при высоких значениях pH, является необычным явлением среди грибов, тогда как алкалотолерантность распространена достаточно широко. Мы предположили, что адаптация к экстремальному внешнему pH должна сопровождаться созданием защитной системы в отношении мембран и макромолекул клетки, что возможно с помощью изменения состава мембранных липидов и органических осмолитов. Целью работы являлось изучение состава растворимых углеводов цитозоля и мембранных липидов у алкалофильного микромицета *Sodiomyces tronii* в оптимальных для роста условиях и под действием неблагоприятных значений pH.

Характерной особенностью состава углеводов цитозоля гриба в оптимальных условиях роста было высокое содержание трегалозы, увеличивающееся с возрастом (4-10% от сухой массы). В составе углеводов доминировали глюкоза и трегалоза, тогда как маннит присутствовал в небольшом количестве. Увеличение pH среды до 10.2, по сравнению с оптимальным pH 9.2, вызывало увеличение количества углеводов на 30-40% и значительный рост доли маннита (в 5-6 раз) на фоне снижения глюкозы. При этом не наблюдалось изменения уровня трегалозы, а среди минорных углеводов в 10 раз повышалось количество арабита. Кислые условия среды (pH 5.4) сопровождалось снижением количества углеводов на 30-40% за счет падения уровня глюкозы, что приводило к доминированию трегалозы среди углеводов (до 80% от суммы). Эти данные указывают на важную роль осмолитов в адаптации алкалофила к различным условиям pH.

В оптимальных условиях роста доминирующими фосфолипидами были фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины и фосфатидные кислоты. Фосфатидные кислоты преобладали среди фосфолипидов в трофофазе, далее их доля падала на фоне повышения стерина. Выращивание гриба на среде с pH среды 10.2 слабо изменяло состав мембранных липидов, тогда как снижение pH до нейтральных и кислых значений приводило к одинаковому эффекту – значительному повышению долей стерина и сфинголипидов на фоне снижения относительного содержания фосфолипидов, что указывало на возможное образование рафтов.

Публикация

Sofya A. Bondarenko Elena A. Ianutsevich, Olga A. Danilova, Alexey A. Grum-Grzhimaylo, Ekaterina R. Kotlova, Olga V. Kamzolkina, Elena N. Bilanenko, Vera M. Tereshina. Membrane lipids and soluble sugars dynamics of the alkaliphilic fungus *Sodiomyces tronii* in response to ambient pH // **Extremophiles**. 2017. V. 21. P. 743–754. DOI 10.1007/s00792-017-0940-4.

ФОТОСИСТЕМА 1 ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Болычевцева Ю.В.¹, Терехова И.В.¹, Шубин В.В.¹, Rögner M.², J. Kopczak M.J.², El-Mohsnawy E.², Mäntele W.³, Džafić E.³, Пищальников Р.Ю.⁴, Разживин А.П.⁵

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН

² *Biochemie der Pflanzen, Ruhr Universität Bochum, Germany*

³ *Institut für Biophysik, J.W. Goethe Universität Frankfurt, Germany*

⁴ *Институт общей физики РАН*

⁵ *МГУ имени М.В.Ломоносова, НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского*

В отличие от растений и водорослей комплексы фотосистемы 1 у цианобактерий присутствуют, главным образом, в форме тримеров. Тримеризация комплексов сопровождается образованием специфических длинноволновых форм хлорофилла. Наши исследования были направлены на выяснение биологического смысла такой тримеризации и функции длинноволновых форм в процессе захвата энергии поглощенных квантов и в процессе диссипации избыточной энергии возбуждения.

Исследования проводились на тримерных и мономерных комплексах фотосистемы 1, выделенных из цианобактерий, термофильной *Thermosynechococcus elongatus* и мезофильной *Arthrospira platensis*. Измеренные температурные зависимости колебательных ИК спектров и электронных спектров КД и поглощения показывают, что у тримерных комплексов вторичная структура белков и пространственная организация молекул хлорофилла значительно более устойчивы к тепловой денатурации, чем у мономеров.

Комплексы фотосистемы 1 содержат 96 -98 молекул хлорофилла, которые дают около 10 спектральных полос в спектрах поглощения, КД и флуоресценции. Для того, чтобы установить какие молекулы ответственны за конкретные полосы проводились квантово механические расчеты с использованием известных из РСА (Fromme, 2002) координат молекул хлорофилла. В результате были локализованы группы молекул хлорофилла ответственные за длинноволновые, долгоживущие состояния. Показано, что они локализованы в местах контактов мономерных субъединиц.

Для выяснения путей миграции энергии возбуждения по спектральным формам хлорофилла, высокой эффективности захвата этой энергии реакционным центром проводились спектрально кинетические измерения исследуемых комплексов фотосистемы 1 с разрешением 100фс.

Публикации

- Vladimir V. Shubin, Irina V. Terekhova, Yulia V. Bolychevtseva, Eithar El-Mohsnawy, Matthias Rögner, Werner Mäntele, Marta J. Kopczak, Enela Džafić. Thermostability of photosystem I trimers and monomers from the cyanobacterium *Thermosynechococcus elongates*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 179 (2017) 17–22
- R. Yu. Pishchalnikov, V. V. Shubin, and A. P. Razjivin. Spectral Differences between Monomers and Trimers of Photosystem I Depend on the Interaction between Peripheral Chlorophylls of Neighboring Monomers in Trimer. **Physics of Wave Phenomena, Optical Spectroscopy Of Biological Objects** 2017, Vol. 25, No. 3, pp. 185–195.

АКТУАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛИАКРИЛАМИДНОГО КАТИОННОГО ФЛОККУЛЯНТА В ПРОЦЕССЕ АНАЭРОБНОГО СБРАЖИВАНИЯ ОСАДКОВ СТОЧНЫХ ВОД

Никитина А.А., Литти Ю.В., Ермошин А.А., Журавлева Е.А., Ножевникова А.Н.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Обработка стоков и осадков сточных вод (ОСВ) биоразлагаемыми флокулянтами на основе полиакриламида (ПАМ) широко используется для улучшения осаждения и уплотнения ОСВ перед анаэробным сбраживанием. Нами исследовано влияние ПАМ-флоккулянта на процесс термофильного анаэробного сбраживания ОСВ при разных соотношениях по объему инокулята к субстрату (И/С) в лабораторных стационарных 0.5 л реакторах, а также исследована токсичность и биоразлагаемость ПАМ. Показано, что при дестабилизации процесса вследствие накопления ЛЖК до 14-15 г/л и падения pH среды до 5,5 добавление ПАМ (40 мг/г СВ) способствовало восстановлению метаногенеза. При этом образовывались флокулы до 2 мм в диаметре. Обнаруженный положительный эффект принудительной флокуляции был подтвержден в экспериментах с добавлением ПАМ в искусственно закисленные реакторы. Наибольший восстанавливающий эффект наблюдали в реакторах с концентрацией ПАМ 20 мг/г СВ и чуть меньший при 40 мг/г СВ в стационарных условиях. В реакторах с перемешиванием сбраживаемой массы метаногенез не восстанавливался, что, вероятно, связано с ускоренным разрушением флокул. Установлено, что ПАМ может быть использован анаэробными микроорганизмами в качестве источника С и/или N в отсутствие альтернативных субстратов. Концентрация ПАМ до 40 мг/г СВ ингибирующего действия на разложение ЛЖК и, следовательно, на синтрофные бактерии и метаногенные археи отрицательного действия не оказывает. Ингибирующий эффект ПАМ может быть связан преимущественно с замедлением гидролиза биополимеров и нарушением массопереноса.

Публикация

Litti Y., Nikitina A., Kovalev D., Ermoshin A., Mahajan R., Goel G., Nozhevnikova A. Influence of cationic polyacrilamide flocculant on high-solids' anaerobic digestion of sewage sludge under thermophilic condition // **Environ. Technol.** 2017. P. 1-10. DOI: 10.1080/09593330.2017.1417492. [Epub ahead of print]

ИССЛЕДОВАНИЕ ФОТОБИОХИМИИ ПТЕРИНОВ КАК ПОДХОД К РАЗВИТИЮ ПРИЕМОВ ФОТОТЕРАПИИ НАРУШЕНИЙ МЕЛАНОГЕНЕЗА

Телегина¹ Т.А., Людникова¹ Т.А., Буглак¹ А.А., Вечтомова¹ Ю.Л., Бирюков² М.В., Дёмин³ В.В., Крицкий¹ М.С.

¹ ФИЦ Биотехнологии РАН;

² МГУ, биологический факультет;

³ МГУ, факультет почвоведения.

Фотобиохимическое исследование птеринов важно не только в связи с анализом роли этих молекул в биохимических процессах, в том числе в древнейших фотобиологических процессах, но тесно связано с решением ряда практических задач. Витилиго, как и некоторые другие патологии, связано с нарушением меланогенеза. Сегодня наиболее успешной терапией витилиго служит UVB-узкополосная фототерапия (λ 308 или 311 нм), причем механизм терапевтического эффекта не выяснен. При витилиго наблюдается 3-5-кратное усиление *de novo* синтеза тетрагидробиоптерина (Н₄Бип) (кофермент фенилаланингидроксилазы, первого фермента в цепи биосинтеза меланина). Избыток Н₄Бип легко окисляется О₂ до биоптерина и Н₂О₂. Дополнительный вклад в развитие патологии вносит фотосенсибилизированное биоптерином (max $\lambda_{\text{возб}}$ 350 нм) окисление Н₄Бип. Образующийся Н₂О₂ нарушает цикл регенерации Н₄Бип и через цитокины стимулирует синтез избытка Н₄Бип, таким образом замыкается «порочный круг».

Как разорвать этот «порочный круг» и затормозить патологический процесс? Путь к решению содержится в результатах наших исследований фотоокисления Н₄Бип. Показано, что при воздействии облучения (λ 310-320 нм) преобладающим продуктом фотоокисления становится не биоптерин, а азодиклобутановые димеры дигидроптерина (Н₂Птр)₂ и дигидробиоптерина (Н₂Бип)₂. Методом HPLC-MS/MS установлено, что доминирующим продуктом является (Н₂Птр)₂. Согласно квантово-химическим расчётам показано наиболее стабильным азодиклобутановым димером дигидроптерина является *cis* изомер.

Мы полагаем, что удаление избытка Н₄Бип путём перевода его в птериновые димеры в процессе UVB фототерапии может разрывать патологический «порочный круг». При этом чередование темновых и световых интервалов повышает выход образования азодиклобутановых димеров до 96%. В связи с этим нами предложена оптимизированная методика УФВ фототерапии витилиго, которая апробируется совместно с сотрудниками кафедры дерматовенерологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Публикации

Telegina T.A., Lyudnikova T.A., Buglak A.A., Vechtomova Y.L., Biryukov M.V., Demin V.V., Kritsky M.S. Transformation of 6-tetrahydrobiopterin in aqueous solutions under UV-irradiation. // **J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry**. 354 (2018) 155-162.

Buglak A. A., Telegina T. A., Kritsky M. S. A quantitative structure-property relationship (QSPR) study of singlet oxygen generation by pteridines. // **Photochem. Photobiol. Sci.** 15 (2016) 801-811.

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОСИНТЕЗА РАПАМИЦИНА ШТАММОМ *STREPTOMYCES HYGROSCOPICUS* R 33-41 В УСЛОВИЯХ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Джавахия В.В., Савельева В.В., Глаголева Е.В., Савушкин В.А., Глаголев В.И., Воскресенская Е.Д.,
Новак Н.В., Овчинников А.И., Гребенева Я.О.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Введение

В настоящее время рапамицин и его химические производные (рапалоги) имеют широкое применение в качестве иммуносупрессивных и противоопухолевых агентов. Несмотря на востребованность рапамицина в медицине, существующие на сегодняшний день штаммы-продуценты характеризуются относительно невысокой продуктивностью, что затрудняет получение стабильных суперпродуцентов, способных обеспечить необходимые объемы его промышленного производства.

Цель исследования – повышение эффективности биосинтеза рапамицина новым высокопродуктивным штаммом *Streptomyces hygroscopicus*, полученным при помощи УФ-мутагенеза с последующей селекцией, а также оптимизация состава питательной среды, условий и параметров культивирования штамма.

Результаты исследований

Применение метода многоступенчатого УФ-мутагенеза и последующей селекцией, позволило авторам получить штамм *Streptomyces hygroscopicus* R 33-41, обладающий высокой продуктивностью рапамицина, повышенной устойчивостью к антибиотикам (рапамицину, амфотерицину и циклогексимиду) и способностью утилизировать некоторые источники углерода (глюкоза и глицерин) в высоких концентрациях. Проведенное масштабирование технологии биосинтеза рапамицина штаммом *Streptomyces hygroscopicus* R 33-41 совместно с оптимизацией условий и параметров культивирования, в частности регулирование активной кислотности среды, концентрации растворенного кислорода, температуры, внесение дополнительного источника углеводного питания в 15-л биореакторе, позволило получить высокое содержание рапамицина (1270 ± 5 мг/л) по окончании процесса культивирования.

При этом были устранены сложности, связанные с низкой скоростью накопления биомассы в период логарифмической фазы роста, вызывающие стремительный лизис и снижение продуцирующей способности культуры.

Публикации

Савельева В.В., Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Овчинников А.И., Савушкин В.А., Глаголев В.И., Новак Н.В., Попова Е.Д., Скрябин К.Г. Получение высокоактивного штамма *Streptomyces hygroscopicus* R 33-41 и оптимизация состава питательной среды для повышения продукции рапамицина / **Биофармацевтический журнал**. 2017. 9(6) 16-24с.

Савельева В.В., Джавахия В.В., Глаголева Е.В., Глаголев В.И., Савушкин В.А. Оптимизация питательной среды для *Streptomyces hygroscopicus* – продуцента фармацевтической субстанции рапамицина. Екатеринбург: **Международный научно-исследовательский журнал**, 2017. - №03 (57). – С.14-20.

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕКСАМЕТАЗОНА ИЗ ФОТОСТЕРИНА

Андрюшина В.А., Карпова Н.В., Ядерец В.В., Стыценко Т.С., Джавахия В.В.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Разработана эффективная схема получения фармацевтически важного глюкокортикоида нового поколения - дексаметазона из доступного растительного сырья, включающая стадии химического синтеза и стадии микробиологической трансформации с использованием селективных бактериальных штаммов, таких как, *Mycobacterium neoaurum*, *Rhodococcus erythropolis* и *Pimelobacter simplex*.

Оптимизированы важнейшие стадии получения дексаметазона, которые невозможно осуществить химическим путем, такие как, стадии ферментативного окисления боковой цепи фитостерина до андростендиона и его последующее 9 α -гидроксилирование. Использование смешанных, плотных культур в этих трансформациях позволило проводить процесс без дорогостоящего солюбилизатора – метил- β -циклодекстрина, без дополнительной стадии химического выделения и исключить образование побочных продуктов.

Созданы новые иммобилизованные биокатализаторы на основе *R. erythropolis* и *P. simplex*, которые показали стабильные результаты в нескольких циклах трансформации.

Использование растущей культуры *P. simplex* позволило провести 1,2- дегидрирование 21-ацетата-прегна-4,9(11)-диен-17 α ,21-диол-3,20-диона с минимальным накоплением побочных продуктов и получить 1,2-дегидропроизводное с выходом 87%.

Оптимизирована стадия кетализации химической схемы, что позволило увеличить выход целевого продукта и снизить количество побочного Δ 4-изомера до 1-2 %.

Определен оптимальный режим стадии ацетоксилирования, позволивший увеличить выход продукта на данной стадии на 7%.

Таким образом, проведенные постадийные усовершенствования привели к существенному увеличению общего выхода дексаметазона и значительному упрощению технологии. С учетом оптимизаций технологической схемы оформляется лабораторный регламент на способ получения дексаметазона из 9 α -гидроксиандростендиона, который может послужить основой для организации производства востребованных в медицине высокоактивных фторированных кортикоидов противовоспалительного и антиаллергического действия.

Публикации

Андрюшина В.А., Карпова Н.В., Дружинина А.В., Стыценко Т.С., Подорожко Е.А., Рябев А.Н., Лозинский В.И. «Новый иммобилизованный биокатализатор для микробиологического синтеза фармацевтических стероидов»,

Прикладная биохимия и микробиология, Т51, № 5, С 1-10, 2015.

Андрюшина В.А., Стыценко Т.С., Карпова Н.В., Джавахия В.В., Скрябин К.Г. **Патент на изобретение № 2639147** «Способ получения 17,17-этилендиокси-1,4-диен-3-она» от 20.12.2017.

БИОКРИСТАЛЛИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ В НУКЛЕОИДАХ СТАЦИОНАРНЫХ, ПОКОЯЩИХСЯ И ПОДВЕРГНУТЫХ ВОЗДЕЙСТВИЮ СТРЕССА КЛЕТКАХ ПРОКАРИОТ

Лойко Н.Г.¹, Эль-Регистан Г.И.¹, Николаев Ю.А.¹, Попов В.О.¹, Крупянский Ю.Ф.², Сеницын Д.О.², Гуларян С.К.², Степанов А.С.², Терешкина К.Б.², Чуличков А.Л.², Попов А.Н.², Сузина Н.Е.³, Соколова О.С.⁴, Шайтан К.В.⁴, Соина В.С.⁴, Смирнова Т.А.⁵, Зубашева М.В.⁵, Азизбекян Р.Р.⁶, Попов А.Н.⁷

¹ФИЦ Биотехнологии РАН

²Институт химической физики РАН

³Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН,

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,

⁵ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи

⁶НИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов

⁷European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France

Компактизация и биокристаллизация нуклеоида (БН) рассматриваются как обязательный и важный этап изменения ультраструктурной организации клетки при переходе микробной культуры от стратегии размножения к выживанию. БН обеспечивается структурной упорядоченностью комплексов ДНК с гистоноподобными белками Dps или SASP.

Феномен БН был подтвержден нами электронно-микроскопически в старвированных клетках мутанта *E.coli* – сверхсинтетика белка Dps, и выявлен в голодающих клетках дикого типа. Впервые БН была обнаружена в: 1) длительно старвированных (21 сут) клетках бактерий (р.р. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*), 2) покоящихся анабиотических формах неспорообразующих бактерий и архей, 3) эндоспорах бацилл, 4) экзоспорах стрептомицетов, а также 5) клетках *in situ*, длительное время (2-3 млн. лет) выживающих в вечной мерзлоте.

Впервые при измерении рассеяния синхротронного излучения (станция JD23-1, синхротрон ESRF, Франция) на образцах длительно старвированных и раннестационарных клеток мутантного штамма *E.coli* – сверхсинтетика белка Dps, выявлены паттерны рассеяния с зонами повышенной интенсивности на разрешениях: широкий пик – около 90 Å; узкий пик – около 44 Å и серия слабых пиков, соответствующих его гармоникам – 22 Å, 14,7 Å и т.д. Размер основного пика на разрешении 90 Å близок к размеру додекамера белка Dps. Это предполагает образование додекамеров Dps в динамике стационарной фазы (от 18 ч до 72 ч) для образования их комплексов с ДНК при формировании биокристаллов нуклеоида, что согласуется с литературными данными для размеров додекамеров Dps в искусственных нанокристаллах ДНК-Dps и данными рентгеновского рассеяния на старвированных клетках.

Обсуждаются функции и динамика БН как обязательного этапа стрессового ответа клеток и созревания покоящихся форм микроорганизмов, предназначенных для выживания и сохранения вида, а также возможная роль БН для сохранения генетической информации популяции.

Публикации

Сеницын Д.О., Лойко Н.Г., Гуларян С.К., Степанов А.С., Терешкина К.Б., Чуличков А.Л., Николаев Ю.А., Эль-Регистан Г.И., Попов В.О., Соколова О.С., Шайтан К.В., Попов А.Н., Крупянский Ю.Ф. Биокристаллизация нуклеоида бактерий в условиях стресса // Химическая физика. 2017. Т. 36. № 9. С. 59-65.

Лойко Н.Г., Сузина Н.Е., Соина В.С., Смирнова Т.А., Зубашева М.В., Азизбекян Р.Р., Сеницын Д.О., Терешкина К.Б., Николаев Ю.А., Крупянский Ю.Ф., Эль-Регистан Г.И. Биокристаллические структуры в нуклеоидах стационарных и покоящихся клеток прокариот // Микробиология. 2017. Т. 86. № 6. С. 703–719.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭКОЛОГИЯ, ТАКСОНОМИЯ И ГЕНОМИКА МАГНИТОТАКТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Козяева В.В., Дзюба М.В., Колганова Т.В., Баслеров Р.В., Патутина Е.О., Сухачева М.В., Слободова Н.В., Груздев Д.С.

ФИЦ Биотехнологии РАН

Способность к синтезу внутриклеточных органелл, называемых магнетосомы, является уникальной особенностью магнитотактических бактерий (МТБ). К МТБ относятся разнообразные по морфологии, физиологии и таксономии прокариоты, принадлежащие различным таксономическим группам. Магнетосомы являются магнитными наночастицами, отличающимися малым разбросом размеров и формы, высокой степенью химической чистоты и другими уникальными свойствами. Такие магнитные наночастицы имеют широкий спектр применения в биотехнологии и медицине.

В ходе работы методами микроскопии и филогенетического анализа было изучено разнообразие магнитотактических бактерий реки Москвы в районе Строгино. Установлены доминирующие морфотипы и выявлены последовательности генов 16S рРНК, принадлежащие порядкам *Magnetococcales* и *Rhodospirillales*. Из исследованного сообщества выделена чистая культура магнитотактических спирилл. Для выделенного штамма были определены основные фенотипические и хемотаксономические характеристики, филогенетическое положение, а также уровень ДНК-ДНК гибридизации с наиболее близкими представителями рода *Magnetospirillum*. Совокупность полученных данных позволила отнести изолят к новому виду, которому было предложено видовое название *Magnetospirillum moscoviense* ВВ-1.

Для нового вида магнитотактических спирилл был секвенирован и проанализирован геном, в котором выявлены гены, ответственные за биоминерализацию магнетосом. Организация магнетосомного геномного острова (MAI) штамма ВВ-1 оказалась сходной с MAI ближайшего культивируемого штамма *M. gryphiswaldense* MSR-1. Однако у ВВ-1 был обнаружен дополнительный оперон, состоящий из генов *tamB-like*, *tamO-like* и *tamM-like*.

Публикации

- Dziuba M, Kozaeva V, Grouzdev D, Burganskaya E, Baslerov R, Kolganova T, Chernyadyev A, Osipov G, Andrianova E, Gorlenko V, Kuznetsov B. *Magnetospirillum caucaseum* sp. nov., *Magnetospirillum marisnigri* sp. nov. and *Magnetospirillum moscoviense* sp. nov., freshwater magnetotactic bacteria isolated from three distinct geographical locations in European Russia // **Int J Syst Evol Microbiol**, 2016, 66(5):2069-77.
- Kozaeva VV, Dziuba MV, Ivanov TM, Kuznetsov BB, Skryabin KG, Grouzdev DS. Draft genome sequences of two magnetotactic bacteria, *Magnetospirillum moscoviense* ВВ-1 and *Magnetospirillum marisnigri* SP-1 // **Genome Announc.** 2016. 4(4):e00814-16.
- Козяева В.В., Груздев Д.С., Дзюба М.В., Колганова Т.В., Кузнецов Б.Б. Разнообразие магнитотактических бактерий реки Москвы // **Микробиология**. 2017. Т.86 (1). С. 99-106.
- Magnetotactic Bacteria – Trends for the Future Research. D. Grouzdev, V. Kozaeva, B. Kuznetsov, K. Skryabin// **NanoWorld J.**- 2017.- 3(2).- с. 29-31

ОБРАТИМОЕ ФОТОВЫЦВЕТЕНИЕ ФОТОКОНВЕРТИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА SAASoti.

Соловьев И.Д.^{1,2}, Гавшина А.В.¹, Савицкий А.П.^{1,2}

1 ФИЦ Биотехнологии РАН

2 Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, кафедра химической энзимологии

SAASoti – фотоконвертируемый флуоресцентный белок, выделенный из коралла *Stylocoeniella armata*. При облучении светом на длине волны 400 нм происходит необратимая фотоконверсия из зеленой (509/520) формы в красную (580/590). При облучении на длине волны 470 нм наблюдается тушение зеленой формы без возникновения красной. Флуоресценция восстанавливается в течение нескольких часов ($\tau_{1/2} = 50$ мин 25 °С). Данное явление сопровождается появлением протонированной формы хромофора, т.к. наблюдается увеличение поглощения белка при длине волны 400 нм. Явление обратимого фотовыцветания наблюдается у некоторых GFP-подобных белков (Dronpa, mTFP, IrisFP). Фотопереключаемые белки можно переводить как из темной формы в флуоресцентную, так и обратно, если использовать облучение светом при длинах волн, соответствующих поглощению различных форм хромофора. Причиной фотопереключения, наиболее вероятно, служит *цис-транс* изомеризация хромофора. В случае SAASoti облучение при $\lambda = 400$ нм приводит к фотоконверсии и фотопереключение наблюдается только при щелочных значениях pH. Свойства фотоконвертирования и фотопереключения флуоресцентных белков востребованы в суперразрешающей микроскопии.

Публикации

“Reversible photobleaching of photoconvertible SAASoti-FP” I.D. Solovyev A.V. Gavshina A.P. Savitsky, **Journal of Biomedical Photonics & Engineering**, 3(4), 2017 <http://dx.doi.org/10.18287/JBPE17.03.040303>